

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA
APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ESTUDO DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA
AO DIAZEPAM NO CONTROLE DA ALODINIA E NA
MODULAÇÃO DE RECEPTORES DE DOR EM MODELO
EXPERIMENTAL DE TENDINITE**

YOSE MARIE ELIZABETH E SILVA

São Paulo

2021

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

YOSE MARIE ELIZABETH E SILVA

**ESTUDO DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADA
AO DIAZEPAM NO CONTROLE DA ALODINIA E NA
MODULAÇÃO DE RECEPTORES DE DOR EM MODELO
EXPERIMENTAL DE TENDINITE**

Trabalho apresentado ao Programa
como requisito para obtenção de título
de Doutora em Biofotônica Aplicada
às Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

São Paulo

2021

Silva, Yose Marie Elizabeth e.

Estudo da terapia por fotobiomodulação associada ao diazepam no controle da alodinia e na modulação de receptores de dor em modelo experimental de tendinite. / Yose Marie Elizabeth e Silva. 2021.

87 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos.

1. Dor. 2. Tendinopatias. 3. Fotobiomodulação. 4. Mecanismos. 5. Diazepam.

I. Marcos, Rodrigo Labat.

II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 18 de março de 2021.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Yose Marie Elizabeth e Silva

Título da Tese: "Estudo da terapia por fotobiomodulação associada ao Diazepam no controle da alodinia e na modulação de receptores de dor em modelo experimental de tendinite".

Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROF^a. DR^a. ADRIANA LINO DOS SANTOS FRANCO




Membro: PROF. DR. RENATO ARAÚJO PRATES



Membro: PROF. DR. LÚCIO FRIGO



Membro: PROF^a. DR^a. STELLA REGINA ZAMUNER



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os animaizinhos que participam das pesquisas científicas por todo o mundo, em nome do bem da espécie humana...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, cujos caminhos custo a entender, e que me carregou no colo para chegar até o final deste trabalho.

Muito obrigada ao meu queridíssimo esposo, que cuidou muito de mim principalmente na etapa final, onde quase tudo que foi possível aconteceu. Os caminhos de Deus...

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Labat, por fazer o possível para que este trabalho fosse concluído a tempo. Ele sempre tão calmo, eu sempre tão estressada....

Obrigada aos Professores deste Programa de Pós-Graduação, por tantos ensinamentos recebidos, sempre solícitos quando precisei um pouco mais...

Obrigada aos muitos amigos feitos durante o Curso, que compartilharam comigo bons e maus momentos, e tantas vezes me ajudaram a prosseguir.

Obrigada às meninas responsáveis pelo Biotério, Núria, Vanessa e todas que tão bem cuidaram dos animaizinhos, para podermos trabalhar. Obrigada por todo o apoio que senti.

À Patrícia e ao Rodney, um incomensurável obrigado. Não conheço muitas pessoas como vocês. Muito, muito obrigada por tudo.

Obrigada à minha tia Fátima e minha cunhada Fernanda, que se empenharam por mim quando precisei das medicações. Nunca terei como agradecer o suficiente.

Obrigada aos meus pacientes, pois mais pacientes impossível. Foram abandonados, mas não me abandonaram. Vou cuidar de vocês logo, logo.

Obrigada demais à minha super, hiper, ultra, mega, querida, assistente-filha Karine, pelo suporte e carinho. De novo, os caminhos de Deus.

Yose Marie

“Aprendi que a maturidade vem aos poucos.

Que família é quase tudo.

Que amigos bons e sinceros são poucos.

Que cuidar da sua vida é sempre a melhor opção.

Que dias melhores sempre virão.

Que na vida, nem tudo vale a pena.

**E principalmente, que minha felicidade depende das
escolhas que eu faço.”**

(Autor desconhecido)

RESUMO

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, e constitui o principal motivo para a busca de tratamento especializado. As dores relacionadas às tendinopatias são frequentes e difíceis de serem tratadas e a terapia por fotobiomodulação (FBM) tem apresentado resultados promissores no controle da inflamação e da dor. Visto serem os benzodiazepínicos utilizados no tratamento auxiliar de dores crônicas, neste trabalho objetivou -se estudar o efeito da terapia por FBM associada ao Diazepam, um agonista de receptores gabaérgicos, na modulação da alodinia, bem como determinar os mecanismos de ação envolvidos. **Metodologia:** Ratos Wistar machos foram distribuídos em sete (7) grupos experimentais, a saber: I- Grupo Controle saudável (CTL); II- Grupo Tendinite Não Tratado (NT); III- Grupo Tendinite tratado com Fotobiomodulação (FBM) nos parâmetros de 810 nm, 3 J, 100 mW; IV- Grupo Tendinite tratado com Diazepam (DZP), V- Grupo Tendinite tratado com FBM associada ao Diazepam (FBM+DZP), VI- Grupo Tendinite tratado com Diazepam associado ao Flumazenil (FLU+DZP) e VII- Grupo Tendinite tratado com Flumazenil associado à FBM (FLU+FBM). A tendinite foi induzida a partir da injeção transcutânea de colagenase tipo I na região do tendão calcâneo e os tratamentos ministrados de acordo com a descrição de cada grupo experimental. Após 8 horas da indução da tendinite, foi mensurado a alodinia local. No final do experimento os animais foram eutanasiados e os tendões removidos para análise. Foi avaliado a expressão gênica de receptores B1, NK1, GABA α ₁, GABA α ₂ e níveis de Mieloperoxidase (MPO). **Resultados:** O Tratamento com FBM reduziu a expressão gênica de receptores B1, NK1, GABA α ₂ e aumentaram GABA α ₁. Ambos os níveis de MPO e alodinia mecânica também foram reduzidos no grupo FBM. O grupo FBM+DZP reduziu a expressão dos receptores de B1 e GABA α ₁, MPO e alodinia mecânica. O grupo FLU+FBM apresentou piora na expressão de todos os receptores quando comparados ao grupo FBM. **Conclusões:** Nossos resultados demonstram que a terapia por fotobiomodulação auxilia no controle da Dor e os mecanismos associados a este controle da dor também estão relacionados à modulação de receptores B1, NK1, GABA α ₁ e GABA α ₂ além do controle do processo inflamatório. Além da conhecida ação da fototerapia na redução da dor pela modulação do processo inflamatório, este trabalho demonstrou que a FBM age nos receptores GABA α ₁, auxiliando no processo de sedação e controle parcial da dor. A relação entre estes mecanismos ainda merece ser investigada, uma vez que são escassos os trabalhos para a maioria destes mecanismos.

Palavras-chave: Dor, tendinopatias, fotobiomodulação, mecanismos, Diazepam, receptor NK1, receptor B1, receptor gabaérgico, mediadores inflamatórios.

ABSTRACT

Pain is an unpleasant sensory and emotional experience and is the main reason for seeking specialized treatment. Pains related to tendinopathies are frequent and difficult to be treated and photobiomodulation therapy (PBM) has shown promising results in controlling inflammation and pain. Since benzodiazepines are used in the auxiliary treatment of chronic pain, this research aimed to study the effect of PBM therapy associated with Diazepam, a gabaergic receptor agonist, on the modulation of allodynia, as well as to determine the mechanisms of action involved. **Methodology:** Male Wistar rats were distributed in seven (7) experimental groups, namely: I- Healthy Control Group (CTL); II- Untreated Tendinitis Group (NT); III- Tendinitis group treated with Photobiomodulation (PBM) in the parameters of 810 nm, 3 J, 100 mW; IV- Diazepam-treated Tendinitis Group (DZP); V- Tendinitis group treated with PBM associated to DZP (PBM + DZP) , VI- Tendinitis group treated with Diazepam associated to Flumazenil (FLU + DZP) and VII- Tendinitis Group treated with Flumazenil associated to PBM (FLU + PBM). Tendinitis was induced from the transcutaneous injection of collagenase type I in the region of the calcaneus tendon and the treatments were administered according to the description of each experimental group. After 8 hours of tendinitis induction, local allodynia was measured. At the end of the experiment, the animals were euthanized and the tendons removed for analysis. Gene expression of B1, NK1, GABA α ₁, GABA α ₂ receptors and myeloperoxidase (MPO) levels were evaluated. **Results:** Treatment with PBM reduced the gene expression of B1 and NK1 receptors. Both MPO levels and mechanical allodynia were also reduced in the PBM group. The PBM + DZP group reduced the expression of B1, MPO and mechanical allodynia receptors. The FLU + PBM group showed a worsening in the expression of all receptors when compared to the PBM group. **Conclusions:** Our results demonstrate that photobiomodulation therapy helps to control pain and the mechanisms associated with this pain control are also related to the modulation of B1, NK1, GABA α 1 and GABA α 2 receptors in addition to controlling the inflammatory process. In addition to the well-known action of phototherapy in reducing pain by modulating₁ the inflammatory process, this study demonstrated that FBM acts on GABA α receptors, helping in the process of sedation and partial pain control. The relationship between these mechanisms still deserves to be investigated, since the work for most of these mechanisms is scarce.

Keywords: Pain, tendinopathies, photobiomodulation, mechanisms, Diazepam, NK1 receptor, B1 receptor, gabaergic receptor, inflammatory mediators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	p.
Figura 1. Estrutura hierárquica do tendão.....	21
Figura 2. Tendão calcâneo.....	22
Figura 3. Fluxograma do trabalho.....	52
Figura 4. Curso Temporal da Dor.....	52
Figura 5. Tendões removidos após a eutanásia dos animais. MT: Região Miotendídica; T: Tendão propriamente dito; OT: Região Osteotendínea.....	53
Figura 6. Teste de Alodinia Mecânica: Figura 6A: Analgesímetro Randall Selito, onde o teste foi realizado; Figura 6B: Teste de Alodinia.....	55
Figura 7. Gráfico 1: Curso Temporal da Dor.....	59
Figura 8. Gráfico 2. Alodinia mecânica após indução da tendinite.....	60
Figura 9. Gráfico 3: Avaliação da atividade da Mieloperoxidase.....	61
Figura 10. Gráfico 4: Avaliação da Expressão Gênica do receptor de Bradicinina B1.....	62
Figura 11. Gráfico 5: Avaliação da Expressão Gênica do receptor de Neurocinina NK1.....	63
Figura 12. Gráfico 6: Avaliação da Expressão Gênica de receptor de GABA α 1.....	64
Figura 13. Gráfico 7: Avaliação da Expressão Gênica de receptor de GABA α 2.....	65

LISTA DE TABELAS

	p.
Tabela 1. Parâmetros utilizados na terapia por fotobiomodulação	54
Tabela 2: Sequência de primers utilizados na análise de expressão gênica por RT- PCR	58

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

α	Alfa
ACh	Acetilcolina
A δ	Fibras A delta
AIEs	Fibras A delta
AINEs	Anti-inflamatórios Não-Esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
AsGaAl	Arseneto de Gálio-Alumínio
ATP	Trifosfato de Adenosina
β	Beta
B1	Receptor de Bradicinina 1
B2	Receptor de Bradicinina 2
BK	Bradicinina
BZD	Benzodiazepínicos
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
cDNA	DNA complementar
CCO	Citocromo C Oxidase
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CINC-1	Citocina indutora quemoatrativa de neutrófilos
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CTL	Grupo Controle
δ	Delta
DE	Densidade de energia
DP	Densidade de potência
DZP	Diazepam e Grupo Diazepam
ϵ	Epsilon
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FBM	Fotobiomodulação e Grupo Fotobiomodulação

FBM+DZP	Grupo Fotobiomodulação associado ao Diazepam
FLU	Flumazenil e Grupo Flumazenil
FLU+DZP	Grupo Flumazenil associado ao Diazepam
FLU+FBM	Grupo Flumazenil associado à Fotobiomodulação
γ	Gamma
g	Gramma
Ga-As-Al	Arseneto de Gálio-alumínio
GABA	ácido gama-aminobutírfujz9co
GABA _A	Receptor GABA _A
h	hora
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
He-Ne	Hélio-Neônio
HILT	Laserterapia de alta intensidade
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
J	Joule
J/cm ₂	Joule por cm ²
kDa	Quilodalton
Kg	Kilograma
λ	comprimento de onda
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LLLT	<i>Low Level Laser Therapy</i>
®	Marca Registrada
m/s	metros por segundo
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μmol	Micromol
μM	Micrômetro
μM	Micromolar
Mg	miligrama

mRNA	RNA mensageiro
mW	Miliwatt
MMP	Metaloproteinase da Matriz
MPO	Mieloperoxidase
nm	nanômetro
nM	nanomolar
NFkB	Fator nuclear kappa B
NKA	Neurocinina A
NK ₁	Neurocinina 1
NK ₁ R	Receptor de Neurocinina 1
NO	Óxido nítrico
NT	Grupo Não Tratado
θ	Theta
O ₂	Oxigênio
π	Pi
PBMT	<i>Photobiomodulation Therapy</i>
PBR	<i>Peripheral Benzodiazepine Receptor</i>
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
ρ	Rho
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação de Transcriptase Reversa - reação em cadeia da polimerase
s	segundo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
TC	Tendão Calcâneo
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alpha
TSPO	Proteína Translocadora 18 kDa
UHC	Universal Health Coverage
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

	p.
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	18
2.1 A Dor.....	18
2.2 Morfologia do Tendão Calcâneo.....	20
2.3 Tendinopatias.....	22
2.3.1 Mediadores Inflamatórios nas Tendinopatias.....	25
2.3.1.1 Citocinas Inflamatórias.....	26
2.3.1.2 Substância P.....	26
2.3.1.3 Bradicininina.....	28
2.3.1.4 Mieloperoxidase.....	29
2.4 Terapêuticas Associadas à Analgesia.....	30
2.4.1 Tratamento da Dor com Fotobiomodulação.....	32
2.4.2 Tratamento da Dor com Benzodiazepínicos.....	39
2.4.2.1 Benzodiazepínicos e Receptores Gabaérgicos (GABA).....	39
2.4.2.2 Flumazenil.....	48
2.4.2.3 Fotobiomodulação Associada a Benzodiazepínicos.....	48
3. OBJETIVOS.....	50
4. METODOLOGIA.....	51
4.1 Tratamentos Utilizados.....	54
4.1.1 Fotobiomodulação - FBM.....	54
4.1.2 Diazepam - DZP.....	54
4.1.3 Fotobiomodulação associada ao Diazepam – FBM+DZP.....	54
4.1.4 Diazepam associado ao Flumazenil – DZP+FLU.....	54

4.1.5 Flumazenil associado à Fotobiomodulação – FLU+FBM.....	55
4.2 Análises realizadas.....	55
4.2.1 Análise funcional: teste de alodinia mecânica.....	55
4.2.2 Análise Bioquímica: atividade da Mieloperoxidase.....	56
4.2.3 Análise da Expressão Gênica por RT-PCR.....	57
4.3 Análise Estatística	57
5. RESULTADOS.....	59
5.1 Determinação do Curso Temporal na Alodinia Mecânica após a indução da Tendinite.....	59
5.2 Avaliação da Alodinia Mecânica após o Tratamento com FBM associada ou não com Diazepam.....	60
5.3 Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	61
5.4 Expressão Gênica do receptor de Bradicinina B1.....	62
5.5 Expressão Gênica de receptor de Neurocinina NK1.....	63
5.6 Expressão Gênica de receptor de GABA α 1.....	64
5.7 Expressão Gênica de receptor de GABA α 2.....	65
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÕES.....	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	
ANEXOS.....	

1. INTRODUÇÃO

A dor, em sua manifestação aguda ou crônica, é a maior responsável pela busca de auxílio, pelos pacientes, dos profissionais de saúde. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), é mister a busca de novas tecnologias e formas de gerenciamento multidisciplinar da dor, para o alívio do sofrimento e melhora da qualidade de vida dos indivíduos que com ela convivem (Pigatto *et al.*, 2017; Kopf & Patel, 2010).

As tendinopatias representam cerca de 30% das consultas referidas às dores musculoesqueléticas em vários países do mundo, levando a um forte impacto tanto na qualidade de vida dos pacientes como no aspecto econômico, em função das despesas médicas e/ou perda da produtividade, ausência no trabalho e nas atividades escolares (Challoumas *et al.*, 2019; Lipman *et al.*, 2018; Snedeker & Foolen, 2017).

O tendão calcâneo é o maior e mais forte tendão do corpo humano. No entanto, é frequentemente lesionado, pois é colocado sob alta sobrecarga e demandas funcionais durante atividades físicas e esportivas. (De Jesus *et al.*, 2015). Hong-Yun & Ying-Hui (2016) afirmam que a tendinopatia do tendão calcâneo é uma síndrome clínica caracterizada pela combinação de dor, edema e performance prejudicada, sendo comuns nos esportes e na vida diária.

Existem várias terapias para modular o processo de cura dos tendões, em função da etiologia das tendinopatias ser complexa e multifatorial. Essas terapias incluem a fotobiomodulação (FBM), injeção de esteroides e fatores de crescimento, anti-inflamatórios não-esteroidais, terapias genéticas, terapias com ondas de choque e exercícios. (Lipman *et al.*, 2018; Morita *et al.*, 2017).

A terapia por fotobiomodulação tem sido amplamente utilizada na área médica, devido a seus efeitos terapêuticos benéficos na analgesia, ação anti-inflamatória e resolução de ferimentos, embora seus mecanismos de ação não sejam completamente conhecidos. Sabe-se que pode agir por meio da modulação de vários mediadores inflamatórios, mudanças na condução do impulso dos nociceptores e efeitos no metabolismo dos linfócitos. Sua maior

vantagem, quando comparada com outras modalidades terapêuticas é poder ser utilizada em todas as enfermidades, sem efeitos colaterais e sem risco de overdose de medicação (Luke *et al.*, 2019; Akerzoul & Chbicheb, 2018; White *et al.*, 2018; Francio *et al.*, 2017; Cotler *et al.*, 2015; Lins *et al.*, 2010).

Embora a FBM tenha sido inicialmente utilizada em lesões de tecidos moles e inflamação, sua aplicação expandiu-se para uma variedade de lesões musculoesqueléticas, incluindo tendinopatias, e parece ser uma alternativa promissora para o tratamento da dor (Lipman *et al.*, 2018; Fallah *et al.*, 2017; Pigatto *et al.*, 2017; Cotler *et al.*, 2015).

Quadros crônicos de dor, resultantes de situações de dor aguda não satisfatoriamente sanados, de lesões neuropáticas ou de origem central, são bastante frequentes. Muitas vezes é preciso lançar mão de fármacos co-analgésicos, tais como os benzodiazepínicos, em função de suas atividades ansiolíticas, hipnóticas, anticonvulsivantes e miorelaxantes, apesar de seus efeitos adversos (Khiavi *et al.*, 2020; Friedman *et al.*, 2017; Naloto *et al.*, 2016).

A partir da tendinite induzida nos tendões calcâneos dos animais deste estudo experimental, procurou-se observar as respostas de analgesia em situações de uso único do fármaco Diazepam (benzodiazepínico) e da associação deste com a terapia por fotobiomodulação, utilizando o Laser de Baixa Intensidade. Procurou-se identificar também os mecanismos envolvidos nesta analgesia, associando o antagonista do receptor gabaérgico (Flumazenil) ao fármaco Diazepam, bem como à terapia por fotobiomodulação.

2. CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 A Dor

Em 2020, a IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) revisou a definição de dor, conceituando-a como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial”, apresentando um enunciado conciso e inequívoco, abrangendo as mais variadas experiências de dor, sua diversidade e complexidade, sendo válida tanto para dor aguda como crônica, e aplicável a todas as condições de dor, a humanos e animais e, sobretudo, definida pela perspectiva da pessoa que sente a dor (De Santana *et al.*, 2020).

Embora a presença da dor em resposta a um dano tecidual seja um fenômeno normal, evitando um dano físico ao nosso corpo e servindo como sinal de aviso, ela pode estar associada com estresse psicológico e emocional, não necessariamente físico (Pigatto *et al.*, 2017; Chang *et al.*, 2019; Rosas *et al.*, 2006). O mecanismo neurofisiológico da transmissão da dor, incluindo percepção, transdução do sinal e processamento central da informação nociva é chamada nocicepção e o sistema de condução desses sinais é chamado de sistema nociceptivo (Levashova & Myagova, 2018; Kopf & Patel, 2010).

A percepção da dor é mediada pela excitação dos nociceptores existentes nas terminações nervosas livres das fibras nociceptivas A e C. A dor aguda é causada pela estimulação de nociceptores conectados às fibras A δ , que têm pequeno diâmetro (2 a 5 μm), velocidade de condução do estímulo intermediária (12 a 30 m/s) e pobremente mielinizadas. Estas fibras têm poucas ramificações, por isso transportam sensação de dor aguda e localizada, que ocorre durante os estímulos nocivos (Sousa *et al.*, 2018; Mizutani *et al.*, 2004).

A dor inflamatória está relacionada a danos teciduais que levam a reações inflamatórias. Já a dor neuropática resulta da lesão de um nervo e sensibilização neuronal nos sistemas nervosos central (SNC) e periférico (SNP). Ambos os tipos estão intimamente relacionados, visto que danos à inervação resultarão em respostas inflamatórias, levando à dor inflamatória. Da

mesma forma, a inflamação tecidual ativa uma cascata inflamatória, liberando uma variedade de mediadores inflamatórios como a Substância P (SP), prostaglandina E₂ (PGE₂), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e neurocinina A (NKA), prejudicando as inervações (Chang *et al.*, 2019; Mizutani *et al.*, 2004).

A excitação dos nociceptores iniciará a dor inflamatória aguda e a modulação da hiperalgesia que se segue envolve a interação de vários mecanismos fisiológicos compensatórios e adaptativos, que irão produzir substâncias para bloquear a transmissão da dor, como os opioides (principal), GABA (ácido gama-aminobutírico), sistemas colinérgicos, monoaminérgicos (noradrenalina, dopamina e serotonina), canabinóides e sistema neurotransmissor de orexina. Por esses motivos, a transdução dos sinais de dor no sistema nervoso central (SNC) não é equivalente à percepção da dor (Levashova & Myagova, 2018; Kopf & Patel, 2010; Ferreira *et al.*, 2005).

A sensação de dor que persiste, após cessado o estímulo nocivo, é transmitida para o sistema nervoso periférico pelas fibras C, que têm diâmetro extremamente pequeno (0,3 a 1,5 μm), são amielinizadas, e por isso têm velocidade de condução dos potenciais de ação muito lenta (0,5 a 2 m/s). As fibras C são altamente ramificadas, então a sensação de dor é percebida não só na área danificada, mas também nas regiões vizinhas. Além disso, os nociceptores conectados às fibras C são polimodais, ou seja, sensíveis a vários tipos de estímulos (Sousa *et al.*, 2018; Mizutani *et al.*, 2004).

Dores crônicas (mais de seis meses de duração) são condições complexas, severas e debilitantes, que podem levar a uma redução considerável na função e qualidade de vida. Além disso, restrições nas atividades diárias, na vida social e no trabalho, distúrbios do sono, ansiedade e depressão são frequentemente reportados. Segundo os autores, indivíduos com dor crônica representam entre 10,1% e 55,2% da população em vários países, e está associada com altos custos, tanto relacionados aos cuidados com a saúde quanto com os custos indiretos pelo trabalho perdido ou produtividade reduzida (Chang *et al.*, 2019; Micheli *et al.*, 2017; Qaseem *et al.*, 2017; Hopkins *et al.*, 2016; Cotler *et al.* 2015).

O papel do estresse no processo doloroso é fundamental, uma vez que o estresse é entendido como uma ruptura na homeostase que ativa programas neurais, hormonais e comportamentais necessários para restabelecer o equilíbrio do organismo. Apesar da dor ser reconhecida como importante forma de estresse, a relação entre dor e estresse ainda é bastante controversa (Rosas *et al.*, 2006).

São inúmeras as terapias farmacológicas utilizadas para o controle da dor, porém seu uso também está relacionado à presença de alguns efeitos colaterais indesejáveis. Além disso, tratamentos de longo prazo tendem a ter sua efetividade reduzida em função do desenvolvimento de tolerância às drogas utilizadas (Sousa *et al.*, 2018).

Uma das pedras angulares da Universal Health Coverage (UHC) é o acesso aos medicamentos essenciais e tecnologias de saúde, que têm o potencial de salvar vidas e melhorar a qualidade de vida e bem-estar da população mundial (World Health Organization, 2014; Pigatto *et al.*, 2017). Desta forma, novas tecnologias e uma abordagem multidisciplinar ajudarão na gestão adequada da dor, para aliviar o sofrimento e melhorar a qualidade de vida das pessoas que com ela vivem (Pigatto *et al.*, 2017).

2.2 Morfologia do Tendão Calcâneo

Os tendões são compostos por uma estrutura altamente organizada, que permite a transmissão de uma ampla magnitude de forças que ocorrem entre o músculo e o osso durante as atividades diárias. Esta estrutura tem alta interação entre a atividade de células localizadas como tenócitos, tenoblastos e células-tronco, com uma matriz extracelular composta principalmente por fibras colágenas paralelas do tipo I, que podem ser divididas em fascículos, fibrilas, subfibrilas, microfibrilas e componentes de tropocolágeno. Um grupo de fibras constitui um fascículo; os fascículos unidos formam feixes, que são envolvidos pelo endotendão, que contém vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (Snedeker & Foolen, 2017; Hong-Yun & Ying-Hui, 2016).

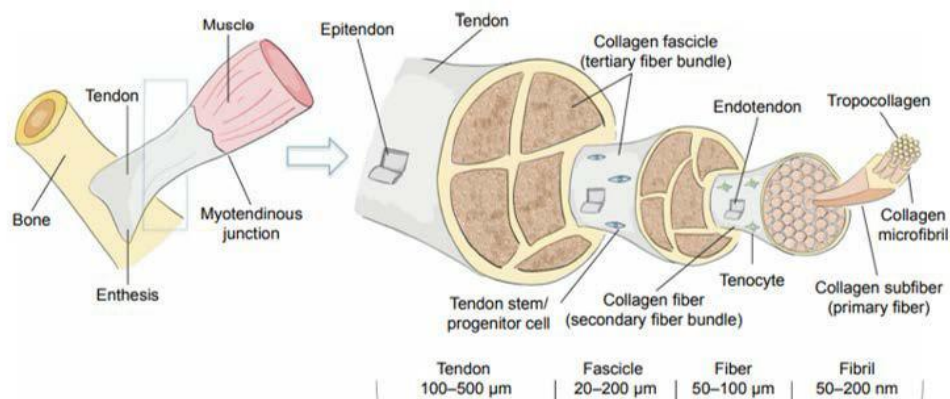


Figura 1. Estrutura hierárquica do tendão. (Fonte: Lipman *et al.*, 2018)

Essa estrutura hierárquica de colágeno, entrelaçada com numerosas proteínas não fibrilares, é essencial para a habilidade dos tendões em suportar carga com estabilidade, permitindo que as cargas sejam transmitidas do músculo ao osso (Puri *et al.*, 2015). A matriz colágena também inclui colágeno do tipo III em quantidades variadas, estando este geralmente relacionado aos estágios iniciais da reparação. Além das fibras colágenas, a elastina contribui com cerca de 1 a 2% da massa seca dos tendões (Lipman *et al.*, 2018, Snedeker & Foolen, 2017).

O tendão calcâneo (TC) é o maior e mais forte tendão do corpo humano (De Jesus *et al.*, 2015). O TC normal é visto como uma estrutura fibrilar e geralmente arredondada, branca e elástica, porque a maior parte dele é avascular. A área do tendão aproximadamente 1 a 6 cm acima da inserção do calcâneo é a menos vascularizada em todas as idades, resultando em uma capacidade reparadora limitada em momentos de *stress* ou lesão. (Hong-Yun & Ying-Hui, 2016).



Figura 2. Tendão calcâneo

(FONTE: <https://encrypted->

tbn0.gstatic.com/images?q=tbn%3AAND9GcSjbnLn_ZVM30Fo6Z9wdZ0oLwsGe_DTw1kQE8CsS_gpurZNXtdr)

Quatro tipos de receptores aferentes são encontrados na superfície ou internamente nos TC. São: corpúsculos de Ruffini (receptores de pressão), corpúsculos de Vater Paccinni (receptores de movimento), organelas de Golgi dos tendões (mecanorreceptores) e terminações nervosas livres (receptores de dor). As organelas de Golgi são os receptores mais abundantes, podendo detectar pressão e alterações no estiramento do tendão (Hong-Yun & Ying-Hui, 2016).

A capacidade reparadora dos tendões revela que estes são um sistema fisiologicamente complexo, com forte coordenação entre as fibras colágenas e os tecidos sinoviais, conectando os sistemas imune, vascular e nervoso (Snedeker & Foolen, 2017).

2.3 Tendinopatias

O termo “tendinopatia” foi adotado recentemente, englobando os aspectos clínicos de dor, edema e redução funcional dos tendões, sendo considerado um distúrbio comum, compreendendo cerca de 1/3 das queixas musculoesqueléticas. Estas desordens (tendinopatias) representam um forte impacto tanto na qualidade de vida dos pacientes como economicamente,

devido às despesas relacionadas ao seu tratamento (Challoumas *et al.*, 2019; Lipman *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2018; Snedeker & Foolen, 2017; Morita *et al.*, 2017; Hopkins *et al.*, 2016; Puri *et al.*, 2015; Sugg *et al.*, 2014).

A tendinopatia é uma doença degenerativa com cura lenta, e embora os danos agudos (danos traumáticos em tecido previamente saudável) frequentemente se curem com recuperação aceitável da função, raramente o tendão recupera sua força e elasticidade originais. (Puri *et al.*, 2015; Sugg *et al.*, 2014; Marcos *et al.*, 2012).

Alguns tipos específicos de tendinopatias são mais prevalentes em diferentes grupos de indivíduos (atletas, trabalhadores população em geral, pacientes com comorbidades), mas idade e gênero não parecem constituir fatores importantes nestas patologias (Hopkins *et al.*, 2016), opinião esta, entretanto, não compartilhada por Puri *et al.* (2015).

A exata origem e desenvolvimento das tendinopatias ainda são incertas, o que torna as terapias pouco efetivas. Isso porque os mecanismos fundamentais da patogênese e recuperação dos tendões permanecem desconhecidos, e vários fatores têm sido propostos como influenciadores na resposta dos tendões, desde a remodelação saudável até a degeneração do mesmo (Puri *et al.*, 2015; Sugg *et al.*, 2014). Entretanto, parecem resultar de uma falta de equilíbrio entre as alterações regenerativas protetoras e a resposta patológica resultante do tendão após seu uso excessivo, causando microtraumas repetitivos nas fibras, levando a uma transição contínua do processo fisiológico para o patológico. O corpo conseqüentemente secretará substâncias para promover a cura, inclusive fatores inflamatórios. A falha do processo curativo levará então à degeneração do tendão, e em alguns casos à sua ruptura, requerendo intervenção cirúrgica (Challoumas *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2018; Snedeker & Foolen, 2017; Hong-Yun & Ying-Hui, 2016; Rees *et al.*, 2014; Marcos *et al.*, 2012).

Khan *et al.* (2000) propuseram a “hipótese bioquímica” para explicar a dor associada com as tendinopatias, como a liberação de estímulos nocivos e conseqüente ativação de nociceptores. Foi demonstrado que os tenócitos têm a habilidade de produzir substâncias sinalizadoras tipicamente ligadas à transmissão neuronal, incluindo substância P (SP), catecolaminas, glutamato e

acetilcolina (ACh). Entretanto, os autores consideram serem necessários mais estudos para inferir se essas substâncias sinalizadoras são causa ou subproduto do quadro de doença (Lipman *et al.*, 2018).

As tendinopatias no TC são uma das mais frequentes lesões em tornozelos e pés, visto estes tendões serem colocados sob alta sobrecarga e demandas funcionais durante atividades físicas e esportivas (Lemme *et al.*, 2018; Hong-Yun & Ying-Hui, 2016; De Jesus *et al.*, 2015). Hong-Yun & Ying-Hui (2016) afirmam que a tendinopatia do tendão calcâneo é uma síndrome clínica caracterizada pela combinação de dor, edema e performance prejudicada.

Nos pacientes com tendinopatias calcâneas o tendão torna-se grosso, desigual e amarronzado (Hong-Yun & Ying-Hui, 2016). Histologicamente, o tecido do tendão no estágio inicial da doença está caracterizado pelo desenvolvimento de fibrose: fibras colágenas desorientadas, composição alterada das proteínas da matriz extracelular e formação de novos vasos (Morita *et al.*, 2017).

Tendões normais apresentam macrófagos M2 e ocasionalmente macrófagos M1 nas camadas do endotendão, porém não existem macrófagos nas fibras tendíneas. Em resposta ao dano estrutural, citocinas quimiotáticas liberadas pela matriz extracelular do tendão promovem a chegada de neutrófilos e macrófagos M1, os primeiros a chegar ao local nas primeiras 24 horas. Ao longo de 28 dias, os macrófagos M2 vagarosamente se acumulam em pontos de organização da matriz extracelular e tornam-se o fenótipo macrofágico dominante. Desta forma, os macrófagos contribuem para a degradação e subsequente reparo da matriz extracelular do tendão lesado (Sugg *et al.*, 2014).

Para Hong-Yun & Ying-Hui (2016), o tecido afetado nas tendinopatias do tendão calcâneo não apresenta macrófagos, neutrófilos ou outras células inflamatórias, e consideram o termo tendinite inapropriado em função disto. Segundo os autores, existe um aumento do número de tenócitos, que têm uma forma irregular e um alto índice de apoptose. Rees *et al.* (2014) também falam sobre o aumento de tenócitos e retrucam em relação ao aspecto não-inflamatório, visto que os tenócitos proliferam e tornam-se

metabolicamente ativos em resposta a citocinas e fatores de crescimento, que fazem parte da resposta inflamatória.

A neovascularização é uma característica da tendinopatia calcânea. Essa neovascularização e as novas inervações que a acompanham têm sido hipoteticamente apontadas como a fonte da dor na porção média da tendinopatia crônica (Hong-Yun & Ying-Hui, 2016; Rees *et al.*, 2014).

2.3.1 Mediadores Inflamatórios nas Tendinopatias

A inflamação é considerada um processo fisiológico essencial no corpo humano. A inflamação aguda e controlada exerce um efeito protetor nos tecidos, mas a inflamação crônica e não controlada é prejudicial. Na patogênese das tendinopatias, inflamação e degeneração podem não ser processos separados, pois geralmente interage uma com a outra. O processo degenerativo pode ser desencadeado pela inflamação, e a inflamação também terá seu papel no processo degenerativo posteriormente (Tang *et al.*, 2018). Para Puri *et al.* (2015), permanece não respondida a questão fundamental sobre a inflamação estar implicada na degeneração do tendão, e caso positivo, qual o seu papel nesse processo.

Muitos são os mediadores inflamatórios nas tendinopatias calcâneas. Podemos citar a interleucina 1- β (IL1- β), interleucina 6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina 17A (IL17-A), interleucina 21 (IL-21), interleucina 33 (IL-33) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Além disso, substâncias como a fosfolipase A2 (PLA2), a substância P (SP) e a bradicinina (BK) são elementos importantes como fatores algogênicos, visto a dor estar sempre presente nestas patologias (Tang *et al.* 2018).

Algumas destas citocinas e substâncias algogênicas, juntamente com seus receptores serão estudadas em nosso experimento, e por isso será objeto de maior detalhamento. A concentração da enzima Mieloperoxidase (MPO), por ser uma importante marcadora inflamatória, e a via gabaérgica de inibição da transmissão do estímulo doloroso também serão estudados, e por isso também serão detalhados a seguir.

2.3.1.1 Citocinas Inflamatórias

Para Tang *et al.* (2018), a expressão de citocinas da família das IL-6 está aumentada nas patologias tendíneas. A IL-6 possui função imunoreguladora e está envolvida na cura do tendão. Está associada com a síntese de colágeno e pode levar a um aumento da expressão de marcadores de pró-colágeno no peritendão do tendão calcâneo humano. Segundo Morita *et al.* (2017), a citocina IL-6 é a única citocina envolvida em doenças dos tendões humanos e está aumentada em rupturas de tendão, enquanto IL-1 β , IL-6 e TNF- α tendem a estar aumentados em modelos animais com lesões de tendão.

2.3.1.2 Substância P (SP)

A substância P (SP) é um potente neuropeptídeo liberado pelos nociceptores para aumentar a transmissão do estímulo nociceptivo através de suas ações na coluna dorsal da medula espinhal. Ela serve como neurotransmissora e neuromoduladora, e pode estar associada com a percepção da dor, edema e fibrose nas doenças tendíneas. Está amplamente distribuída no corpo humano, especialmente no sistema nervoso e células inflamatórias. No tendão, pequenos neurônios sensoriais periféricos e tenócitos podem expressar SP, e os estímulos nocivos e a carga mecânica pode desencadear sua liberação. Ela também é passível de ser efetivamente bloqueado, o que é de interesse clínico (Tang *et al.*, 2018).

A SP está implicada no desenvolvimento das tendinopatias; entretanto se ela é causa ou resultado permanece sem resposta. Oh *et al.* (2020) em um estudo experimental observaram que a exposição rápida à SP mostrou-se relacionada à cura do tendão, enquanto repetições longas estão fortemente ligadas ao desenvolvimento da tendinopatia. Os autores concluíram nesse estudo que exposições prolongadas à SP são uma das causas das tendinopatias.

Para Rees *et al.* (2014) existem fortes evidências de que o processo de neovascularização nas tendinopatias crônicas envolva elementos da resposta inflamatória, e cita como exemplo que a injeção da SP na região peritendínea aumenta a vascularização dos tendões. Além disso, a SP exerce

um efeito proliferativo nos tenócitos, aumentando a formação de colágeno tipo III, contribuindo para a formação de pequenas fibras colágenas nos tendões tendinopáticos. Os níveis de SP estão aumentados nas patologias tendíneas crônicas, acelerando a hiperplasticidade e angiogênese.

A SP preferencialmente se une ao receptor NK1 (NK1R). Estes receptores são receptores acoplados à Proteína G localizados no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP) (Chang *et al.*, 2019). A interação da SP com os receptores NK1R induz diretamente a vasodilatação, o que aumenta a permeabilidade vascular e permite o extravasamento de plasma e a degranulação de mastócitos. A degranulação de mastócitos libera histamina, que por sua vez amplifica ainda mais os processos vasculares e ativa nociceptores. Os linfócitos, granulócitos e macrófagos possuem receptores para SP e essas células podem ser estimuladas a produzir citocinas. Os macrófagos estimulados pela SP produzem os mediadores inflamatórios PGE₂ e tromboxano, assim como as citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF α). Todos estes eventos moleculares sustentam a síntese e a liberação de novas moléculas de SP, perpetuando assim este ciclo vicioso. Além disso, estes mecanismos não envolvem apenas as fibras no local do dano tecidual, mas também se estendem para tecidos circundantes que não foram danificados, onde provocam uma hiperalgesia secundária (Chang *et al.* 2019; De Paula, 2017).

A SP é biologicamente ativa em concentrações extremamente baixas e participa da patofisiologia de doenças inflamatórias dos sistemas respiratório, gastrointestinal e musculoesquelético. No SNC, acredita-se que a SP participe de várias respostas comportamentais, na regulação da sobrevivência e degeneração neuronais, na função cardiovascular e respiratória e na ativação do reflexo emético. Na medula espinhal, a SP participa na transmissão de estímulos nociceptivos e modula reflexos autonômicos. Na periferia, a SP está localizada nos neurônios sensoriais primários e neurônios intrínsecos dos tratos gastrointestinal, respiratório e genitourinário (Teodoro *et al.*, 2013).

Em pequenas doses, a SP estimula a liberação de endorfinas, mas em altas doses, excita diretamente os neurônios no cérebro, provocando

hiperalgesia. O papel antinociceptivo da SP já foi confirmado no SNC e no SNP. No SNC o efeito analgésico está associado principalmente com padrões opioide-dependentes, embora outros estudos tenham demonstrado o envolvimento do GABA_AR (receptor de GABA_A) e receptores de glicina na lâmina V da coluna espinhal (Nyman *et al.*, 2021; Chang *et al.*, 2019).

Chen & Chen (2014), em um modelo experimental de indução de dor muscular crônica generalizada por injeção ácida em ratos, desenvolvida para simular os sinais clínicos de fibromialgia, reproduziram o efeito inibitório da SP, quando de sua aplicação concomitante ou previamente à do ácido, podendo silenciar os nociceptores musculares por 2 dias. Os autores consideraram este conhecimento clinicamente útil para o desenvolvimento de estratégias para a prevenção de dores musculares crônicas causadas por lesões musculares repetidas ou insultos isquêmicos.

Tendo em vista o exposto, a SP representa um importante alvo em pesquisas destinadas a esclarecer o processo relacionado à fisiopatologia da dor e na busca por formas de seu controle, tentando minimizar as consequências deletérias deste neuropeptídeo nos tecidos lesados (De Paula, 2017).

2.3.1.3 Bradicinina

A bradicinina é uma molécula nonapeptídea, de baixo peso molecular, da família das cininas vasoativas, que possui meia vida plasmática curta e níveis baixos na circulação sanguínea. Sua atividade biológica é mediada por dois receptores, B1 e B2, e a ativação de ambos induz inflamação via liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento da permeabilidade vascular. O receptor B1 é induzido e regulado conforme a evolução dos quadros infeccioso, inflamatório ou traumático, enquanto o receptor B2 é constitutivamente expressado pelos tecidos periféricos e centrais (Oliveira Jr. *et al.*, 2016).

A estimulação dos nociceptores mecânicos e polimodais no tecido lesado levam à produção de bradicinina (BK). A ativação da BK pelos estímulos nocivos leva à produção de muitos mediadores inflamatórios como a PGE₂ e

SP. Esse processo desempenha uma importante função na ocorrência da dor e sensibilização (Mizutani *et al.*, 2004).

Trabalhos como os de Silva *et al.* (2011) e Manchini *et al.* (2014) demonstraram, em dois modelos experimentais diferentes em ratos (edema de pata e infarto de miocárdio respectivamente) a redução da expressão gênica de receptores B1 após tratamento com FBM.

Pigatto *et al.* (2019, 2017) observaram que a aplicação de LED vermelho (660 nm) previamente à injeção de BK na região intra-plantar das patas de ratos reduziu a resposta nociceptiva dos animais.

De Oliveira *et al.* (2017), em um trabalho experimental sobre os efeitos da FBM em mediadores inflamatórios (TNF- α , CINC-1) e dor (receptores B1 e B2), em um quadro induzido de osteoartrite aguda, verificaram que a FBM contribuiu para a redução da expressão gênica e proteica dos receptores B1 e B2, diminuindo a hiperalgesia mecânica.

2.3.1.4. Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que desempenha papel fundamental nos mecanismos bactericidas dos mamíferos, sendo encontrada principalmente em leucócitos polimorfonucleares neutrófilos. A MPO está diretamente relacionada com os mecanismos bactericidas dependentes de O₂, sendo catalisadora do processo de formação de radicais altamente reativos como o ácido hipocloroso (HClO⁻) e íons halogênicos, constituindo, portanto, importante mecanismo de defesa contra microrganismos patogênicos (Pereira *et al.*, 2000).

A MPO é uma marcadora química da infiltração neutrofílica, ou seja, a presença de neutrófilos pode ser avaliada pela dosagem dessa enzima (Bradley *et al.*, 1982; Marcos, 2010).

Pallotta *et al.* (2012), em um trabalho sobre a ação da FBM em artrite induzida por kaolin associada à carragenina em ratos, demonstraram que, três horas após a indução da inflamação (2 horas após a aplicação da FBM), as doses de energia de laser de 6 J e 10 J inibiram significativamente a

atividade da MPO. Seis horas após a indução da inflamação, todos os grupos experimentais (tratados com diclofenaco, FBM com doses de energia de 1, 3, 6 e 10 J) foram capazes de produzir uma inibição significativa da concentração de MPO, quando comparados ao grupo controle. Pelos resultados conseguidos, os autores sugerem que a radiação laser pode agir modulando o processo inflamatório e possivelmente estimulando a produção de mediadores anti-inflamatórios.

Borin *et al.* (2015) encontraram redução dos níveis de MPO quando da inibição da TNF- α por meio da administração de Etanercept, uma solução utilizada terapeuticamente para reduzir a TNF- α disponível, diminuindo a ativação dos receptores de membrana TNF e conseqüentemente as ações pró-inflamatórias, incluindo o recrutamento de neutrófilos.

Marcos (2010) observou redução em 50% da atividade da MPO após 3 J de FBM (810 nm) em comparação ao grupo onde houve indução de tendinite sem tratamento, embora com discreto aumento quando comparado ao grupo controle (sem tratamento).

Outros trabalhos relacionados à dor de origem inflamatória também avaliaram a concentração da MPO como referência para a efetividade de seus resultados. Manchope *et al.* (2016) avaliaram o efeito analgésico do flavonoide naringenina e Kuedo *et al.* (2016) também o fizeram com a astaxantina, um carotenoide. Em ambos os trabalhos, as substâncias testadas produziram uma redução da quantidade da enzima MPO, ou seja, houve redução do recrutamento de neutrófilos nas áreas experimentais dos animais.

2.4 Terapêuticas Associadas à Analgesia

Existem várias terapias para modular o processo de cura dos tendões, mas ainda nenhuma foi considerada mais consistentemente efetiva, devido à gênese das tendinopatias ser complexa e multifatorial. Essa é mais uma razão que torna urgente melhorar a compreensão da fisiologia dos tendões (Lipman *et al.*, 2018; Snedeker & Foolen, 2017; Rees *et al.*, 2014).

Segundo Hopkins *et al.* (2016), os objetivos do tratamento das tendinopatias são redução da dor, prevenção da recorrência, e retorno aos

esportes ou à pré-lesão funcional. A falha dos tratamentos conservadores leva à intervenção cirúrgica para excisão do tecido tendinopático e reparação da ruptura do tendão.

Estas terapias incluem fisioterapia (passiva ou ativa), drogas anti-inflamatórias não-esteroidais via oral, injeções de corticosteroides (largamente inefetivas e potencialmente danosas ao paciente), injeção de fatores de crescimento, injeções de plasma rico em plaquetas ou sangue autólogo, proloterapia (terapia injetável regenerativa), quiropraxia, estimulação com laser de baixa energia (LLLT ou fotobiomodulação - FBM), desenvolvimento de terapias genéticas, terapias com ondas de choque e exercícios (Hopkins *et al.*, 2016; Rees *et al.*, 2014).

As drogas analgésicas com atividade periférica podem agir por dois mecanismos diferentes. Primeiro prevenindo a sensibilização de nociceptores por meio de drogas que inibem os mediadores químicos da inflamação, como os inibidores de ciclooxigenase. O segundo mecanismo é pelo bloqueio direto da hiperalgesia, como em medicações opioides e drogas que promovem o aumento do óxido nítrico (Ferreira *et al.*, 2005).

Cabe colocar que as terapias-padrão (medicamentosas) têm seus riscos e perfis de efeitos colaterais associados, incluindo úlcera péptica/sangramento gástrico, efeitos sistêmicos (cardiovasculares), infecções (incluindo abscesso epidural), dependência de narcóticos, deformidades, déficits neurológicos e complicações cirúrgicas. (Francio *et al.*, 2017; Snedeker & Foolen, 2017; Cotler *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2013).

Marcos *et al.* (2012) apontam que drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINEs) são amplamente prescritos e usados no tratamento das lesões de tendão há anos. Entretanto, essas drogas usualmente tratam somente os sintomas da inflamação e não a causa da doença. Adicionalmente, foram observados vários tipos de efeitos colaterais relacionados ao uso prolongado dessas drogas. Os autores dizem ainda que o risco de tendinopatias é aumentado pelo uso de alguns tipos de drogas anti-inflamatórias, tendo sido levantada a hipótese de que alguns tratamentos farmacológicos são danosos ao tendão devido ao aumento da expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs), como a MMP-9 e MMP-13.

Challoumas *et al.* (2019), em um estudo retrospectivo comparando procedimento cirúrgico sem tratamento, cirurgia simulada e modalidades de terapias baseadas em exercícios, não encontraram evidências de superioridade do tratamento cirúrgico em relação às terapias baseadas em exercícios em pacientes com tendinopatias, em médio e longo prazo. Os autores concluíram que os profissionais de saúde que tratam pacientes com tendinopatias devem reservar as cirurgias para casos seletos e somente se, após um suficientemente longo período (12 meses) de exercícios de carga, essa terapia tiver falhado.

Apesar das terapias existentes atualmente, as lesões tendíneas podem resultar em uma inabilitação do indivíduo que pode durar vários meses, e ainda resultar em um tendão mais fraco e suscetível a mais danos (Lipman *et al.*, 2018).

Faremos, a seguir, uma exposição das terapêuticas relacionadas à analgesia mais relacionadas ao nosso trabalho, tanto no âmbito farmacológico como não farmacológico.

2.4.1 Tratamento da Dor com Fotobiomodulação

A fotobiomodulação foi descoberta há aproximadamente 50 anos (1966) por Endre Mester, na Hungria. Terminologias como “terapia com laser de baixa intensidade”, “terapia de laser de baixa potência”, “laser frio”, “soft laser” e “fotobioestimulação” foram utilizadas por muito tempo, mas em 2014 uma decisão consensual da *North American Association for Light Therapy* e da *World Association for Laser Therapy* instituiu o termo “terapia por fotobiomodulação”, unificando-os (Anders *et al.*, 2015).

O termo “terapia por fotobiomodulação” pode ser melhor compreendido como uma forma de terapia luminosa que utiliza fontes de luz não-ionizantes, incluindo lasers, LEDs e faixas de luz do espectro visível e infravermelho. É um processo não-térmico envolvendo cromóforos endógenos e eventos fotoquímicos em várias escalas biológicas. Esse processo tem resultados terapêuticos benéficos que incluem, mas não se limitam ao alívio da

dor ou inflamação, imunomodulação, e promoção de cicatrização e regeneração tecidual (Anders *et al.*, 2015).

Sabe-se agora que LASERs (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) e LEDs (*non-coherent light-emitting diodes*) trabalham igualmente bem. Estudos recentes comparando lasers a fontes de luz equivalentes (luz solar, lâmpadas fluorescentes e incandescentes, e LEDs) com comprimento de onda e densidade de potência similares, não encontraram diferenças essenciais entre eles (Pigatto *et al.*, 2019; Hamblin, 2017, 2016; Cabras *et al.*, 2016).

Os lasers de baixa potência ou terapêuticos utilizados na terapia por fotobiomodulação apresentam propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e bioestimuladoras, e são utilizados como adjuvantes na analgesia farmacológica e fisioterápica (White *et al.*, 2018; Francio *et al.*, 2017; Cabras *et al.*, 2016; Lins *et al.*, 2010). Sua maior vantagem, comparando-se com outras modalidades terapêuticas, é que pode ser utilizada em todas as enfermidades, tendo mostrado excelentes resultados no controle da inflamação, alcançando resultados semelhantes a anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), porém sem efeitos colaterais indesejáveis (irritação do trato gastrointestinal e redução do colágeno) e sem risco de overdose de medicação. Também foi observado não ocorrer o desenvolvimento de tolerância ou adaptação aos seus efeitos analgésicos em tratamentos a longo prazo (Akerzoul & Chbicheb, 2018; Sousa *et al.*, 2018; Cotler *et al.*, 2015; De Jesus *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2013; Lins *et al.*, 2010).

Sousa *et al.* (2018) avaliaram o efeito da FBM no limiar de dor em ratos, aplicando-a por vários tempos e densidades de energia diferentes. Os autores observaram não ocorrer o desenvolvimento de tolerância ou adaptação ao efeito analgésico na FBM.

Os aparelhos geralmente utilizados na FBM têm luz irradiada na região do vermelho ao infravermelho próximo do espectro de luz (630 a 1000 nm), potência entre 10 mW e 500 mW, densidade de potência (irradiância) geralmente por volta de 5 W/cm^2 , e a luz é aplicada na lesão ou no local da dor por 20 a 30 segundos algumas vezes na semana, por várias semanas (Sousa *et al.*, 2018; Cotler *et al.*, 2015).

A luz é absorvida por moléculas presentes nas células chamadas cromóforos, como a citocromo-c-oxidase, localizadas dentro das mitocôndrias. A energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos. Por estas características, o tratamento com FBM não causa aumento evidente de temperatura no tecido tratado nem nenhuma alteração significativa na estrutura tecidual. (Yousefi *et al.*, 2019; De Freitas & Hamblin, 2016; Cabras *et al.*, 2016; Cotler *et al.*, 2015; Lins *et al.*, 2010).

Pigatto *et al.* (2017) comentam que além do comprimento de onda outros fatores como unidade de potência, densidade de potência, densidade de energia, dose e tempo de aplicação são essenciais para estabelecer a efetividade da fototerapia. Diferentes situações biológicas podem requerer diferentes doses; comprimentos de onda relativamente pequenos podem ter seus efeitos fortalecidos aumentando-se a densidade de potência. Aumentar a duração do tratamento ou a densidade de potência aumenta a probabilidade do efeito acumulativo, porque uma grande quantidade de energia luminosa do fóton se espalhará em níveis mais profundos do tecido; ao mesmo tempo, isso pode promover aquecimento no local da lesão, reduzindo o efeito benéfico do tratamento.

Alves *et al.* (2013) aplicaram a mesma densidade de energia (4 J/cm²) em tempos diferentes de irradiação e densidades de potência diferentes (50 mW e 100 mW). Embora em ambas as densidades de potência os resultados tenham sido significantes, os autores acreditam que o maior tempo de irradiação em 50 mW tenha sido o responsável pela maior efetividade.

O mecanismo principal pelo qual FBM promove regeneração pós-dano tecidual permanece obscuro, mas sabe-se que a FBM pode levar ao aumento da atividade mitocondrial, com consequente aumento no ATP (aumento na atividade da citocromo-c-oxidase, quando ativada pela luz), liberação local de óxido nítrico (vasodilatação), síntese proteica, diminuição dos níveis de PG, presença de mitose celular, migração e proliferação de queratinócitos e neoangiogênese (Yousefi *et al.*, 2019; White *et al.*, 2018; Lipman *et al.*, 2018; Fallah *et al.*, 2017; Francio *et al.*, 2017; Hamblin, 2017; Pigatto *et al.* 2017; De Freitas & Hamblin, 2016; Cabras *et al.*, 2016; Cotler *et*

al., 2015; Carvalho *et al.*, 2013; Lins *et al.*, 2010). Como o ATP é a “moeda de energia” de uma célula, a FBM tem uma ação potente que resulta na estimulação das funções normais da célula (Jose *et al.*, 2018).

Os efeitos analgésicos da FBM são dose-dependentes, e a resposta não é observada quando uma sub ou superdosagem são usadas. (Pereira *et al.*, 2017; Hamblin, 2017; De Freitas & Hamblin, 2016; Cotler *et al.* (2015). A aplicação da luz na faixa do infra-vermelho para tratamento da dor tem vantagens clínicas como penetração em maior profundidade, com entrega de energia transcutânea, de forma não-invasiva (Sousa *et al.*, 2018).

A FBM diminui a liberação de substâncias algogênicas e aumenta significativamente os limiares de dor pela estimulação da síntese de endorfinas, reduzindo assim a sensação dolorosa. A dor pode ser modulada após a utilização de lasers terapêuticos e o mecanismo proposto está relacionado com a redução da velocidade de condução do nervo e seus potenciais de ação, assim como a supressão de estímulos nocivos₂. Inicialmente, na dor aguda, haverá uma diminuição dos níveis de PGE (Ferreira *et al.*, 2005) e outros marcadores inflamatórios pela inibição direta de terminais aferentes periféricos, que suprimem a sensibilidade periférica e limitam a liberação de neurocininas. A FBM reduz os níveis de histamina, acetilcolina, serotonina e bradicinina, além de aumentar os níveis de acetilcolinesterase, drenagem linfática, ATP, metabolismo aeróbico, limiares de dor, beta-endorfinas e encefalinas, balancear a atividade da adrenalina e noradrenalina, e diminuir a produção de substância P no corno espinhal posterior. Os autores afirmam que a irradiação laser exerce seu efeito analgésico quebrando o ciclo vicioso de contração-edema-dor. (Luke *et al.*, 2019; Tomazoni *et al.*, 2017; Akerzoul & Chbicheb, 2018; Micheli *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017; De Freitas & Hamblin, 2016; Mizutani *et al.* 2004; Cotler *et al.*, 2015; Lins *et al.*, 2010).

De Freitas & Hamblin (2016) e Cotler *et al.* (2015) explicam que a radiação laser inibe a transmissão das fibras A δ e C dos estímulos nociceptivos induzidos pelo calor e frio, visto que essas terminações nervosas são de natureza muito superficial e estão facilmente dentro das profundidades de penetração dos comprimentos de onda utilizados na FBM. O efeito direto da FBM está inicialmente no nível da rede neural epidérmica, mas os efeitos se

movem para os nervos nos tecidos subcutâneos, nos gânglios simpáticos e nas junções neuromusculares dos músculos e troncos nervosos.

Para Kisselev & Moskvina (2019), diferentemente dos analgésicos, a FBM não atinge somente um elo na recepção da dor, mas atinge toda a hierarquia de mecanismos de sua origem e regulação. Segundo os autores, depois de uma terapia bem-organizada, o efeito pode persistir por longos períodos.

Pereira *et al.* (2017) demonstraram que a FBM com 3 ou 8 J/cm² induz uma redução significativa nas citocinas IL-1 β e TNF- α , liberadas no momento da lesão. Os resultados de seu trabalho sugeriram que a FBM a 3 ou 8 J/cm² modulam primariamente o sistema opioide endógeno e não está diretamente mediada por receptores serotoninérgicos.

As reduções das expressões gênicas de IL-1 β e IL-6 e a redução do número de células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) após o uso da FBM, em 808 nm e 50 mW, também foram observadas por Alves *et al.* (2013), em modelo experimental de osteoartrite. Além disso, o tratamento do mesmo quadro com 808 nm e 100 mW evidenciou uma redução expressiva de TNF- α , em valores similares aos do grupo controle (saudável).

Segundo Cotler *et al.* (2015), a FBM pode ter efeitos a curto, médio e longo prazo e o alívio da dor de ação rápida ocorre poucos minutos após a aplicação, como resultado de um bloqueio neural dos nervos periféricos e simpáticos e a liberação de contrações neuromusculares, levando a uma redução dos espasmos.

Marcos (2010) avaliou a expressão gênica de COX -1, COX-2, TNF- α , TGF- β , IL-10, MMP-3, MMP-9 e MMP-13, a produção de PGE₂, de nitrotirosina, NK-1, e atividade da MPO, em modelo de tendinite calcânea em ratos, tratada com FBM e diclofenaco de sódio. Os resultados mostraram eficácia na redução do edema, da atividade neutrofílica, da expressão de COX-2 e na modulação de importantes marcadores inflamatórios.

Mizutani *et al.* (2004) compararam os níveis séricos de PGE₂ antes e após a irradiação com laser. Em sua conclusão, os autores dizem que a FBM efetivamente atenuou a dor clinicamente em 80,7% dos pacientes e está

fortemente associada à diminuição do nível sérico de PGE₂, levando à inibição da sensibilização para a dor nociceptiva. Os resultados do trabalho sugerem que a FBM inibe a cascata do ácido araquidônico no tecido levando a uma diminuição da produção de PGE₂, fenômeno este que subsequentemente afeta a produção de BK e muitos tipos de citocinas inflamatórias.

De Freitas & Hamblin (2016) relatam que estudos com FBM em dor aguda e analgesia pré-operatória mostram que uma única aplicação (geralmente entre 30 a 60 segundos) é suficiente para causar analgesia, enquanto para dor crônica e algumas condições degenerativas mais sessões são necessárias.

Khammas *et al.* (2019), em seu trabalho sobre estomatites aftosas recorrentes, dizem que a primeiro motivo para a aplicação da FBM nesses casos é providenciar o alívio imediato da dor. Os autores concluíram que tanto a triancinolona tópica quanto a FBM são modalidades eficientes de tratamento na redução da dor nestas lesões, com resultados mais promissores para a FBM.

Luke *et al.* (2019) e Spanemberg *et al.* (2016) também observaram redução significativa da dor pela aplicação da FBM em distúrbios das mucosas orais, incluindo a mucosite, considerada a lesão oral mais dolorosa, que requer analgésicos narcóticos, afetando a qualidade de vida do paciente. Os autores relataram que, em algumas situações, a dor diminuiu consideravelmente após a primeira sessão de FBM.

A FBM também reduz a dor em pacientes que sofrem de neuralgia pós-herpética, de hipersensibilidade dentinária cervical e de dor periodontal durante tracionamento ortodôntico. Vale dizer que a intensidade da dor durante o tratamento ortodôntico é algumas vezes reportada ser tão forte quanto a dor relatada à extração dental (Wu *et al.*, 2018; Jose *et al.*, 2018).

White *et al.* (2018) compararam os efeitos da FBM e da utilização de HILT (laserterapia de alta intensidade) utilizados em uma paciente fibromiálgica, para tratamento de sintomatologia droga-resistente. Os autores encontraram melhores resultados com a HILT (42 e 75W) na redução de alguns sintomas importantes apresentados, inclusive permitindo

descontinuidade da medicação opioide utilizada. Os autores consideram que a FBM é raramente considerada no tratamento de pacientes com fibromialgia, apesar de seus benefícios demonstrados por Gür *et al.* (2002), onde sua utilização, sozinha ou associada à amitriptilina, mostrou-se segura e efetiva no tratamento dos sintomas da fibromialgia quando utilizados diariamente por duas semanas.

Embora a FBM tenha sido inicialmente utilizada em lesões de tecidos moles e inflamação, sua aplicação expandiu-se para uma variedade de quadros musculoesqueléticos, incluindo tendinopatias. De Jesus *et al.* (2015) avaliaram o efeito da FBM na modulação do processo inflamatório de TC de ratos. Os principais achados de seu estudo foram reduções na IL-1 β , COX₂ e PGE₂ para níveis quase normais após 3 e 7 aplicações de FBM. Os mecanismos anti-inflamatórios da FBM não foram completamente esclarecidos, no entanto, nesse caso, a FBM provavelmente modulou os agentes pró-inflamatórios reduzindo a expressão de mRNA de IL-1 β e COX₂ e consequentemente reduzindo os níveis de PGE₂, migração celular e a quantidade de neutrófilos, macrófagos e mastócitos no tecido lesado.

Carvalho *et al.* (2013) também observaram redução dos níveis de expressão gênica de COX-1, COX-2 e PGE₂ quando da aplicação de FBM após 1h da lesão em modelo experimental de tensão muscular em ratos, comparando os efeitos da FBM associada ou não ao uso de diclofenaco tópico e intramuscular.

Marcos *et al.* (2012) observaram que a FBM com 3 J de energia diminuiu significativamente o processo inflamatório agudo por meio da inibição seletiva de COX-2, mostrando o potencial da FBM como não-droga alternativa aos inibidores de COX, além de ter-se mostrado capaz de preservar as características dos tendões, com similaridade aos tendões saudáveis, em modelo experimental de tendinite no TC em ratos. Resultados semelhantes foram alcançados por Naterstad *et al.* (2018), comparando diclofenaco, dexametasona e FBM, também utilizando a energia de 3J e comprimento de onda de 810 nm.

Micheli *et al.* (2017) induziram um modelo de artrite reumatóide em ratos e aplicou-se a FBM, sendo esta capaz de reduzir a hipersensibilidade

entre 5 a 60 minutos após o tratamento. O efeito anti-hipersensibilidade do laser desapareceu 24h após o tratamento, sugerindo um perfil de relaxamento da sintomatologia, provavelmente devido a uma redução temporária das citocinas pró-inflamatórias, e subsequente diminuição da inflamação.

A ausência de parâmetros específicos que determinem protocolos do uso da FBM, tais como densidade de força, tempo de tratamento e tamanho da área a ser exposta, comprimento de onda adequado (λ) e doses, ainda fazem da terapia por fotobiomodulação um tópico de debate. Porém, o surgimento de mais estudos que demonstrem sua validação e métodos adequados faz crer em sua potencial aceitação para o uso clínico (Lipman *et al.*, 2018; Francio *et al.*, 2017; Farhadi *et al.*, 2017).

Apesar de seus já conhecidos efeitos antálgicos e anti-inflamatórios, são poucos os trabalhos na literatura que pesquisaram os mecanismos de ação da FBM ao nível tecidual, na intenção de suprimir a dor. Colaborar, nesse sentido, se possível, é uma das intenções desse trabalho.

2.4.2 Tratamento da Dor com Benzodiazepínicos

2.4.2.1 Benzodiazepínicos e Receptores Gabaérgicos (GABA)

Os benzodiazepínicos (BZD) são uma classe de medicamentos psicoativos amplamente utilizados como agentes ansiolíticos, sedativos, hipnóticos, relaxantes musculares, anticonvulsivantes e amnésicos, antes ou durante a anestesia. São seguros e efetivos em tratamentos curtos, mesmo se alguns efeitos colaterais, como amnésia anterógrada for reportada. A tolerância se desenvolve rapidamente em sua atividade sedativa e vários sinais de um estado de dependência podem ser observados quando ocorre uma interrupção abrupta dessas medicações (Ettcheto *et al.*, 2020; Seelhammer *et al.*, 2018; Lüscher *et al.*, 2012; Bateson, 2002).

Embora por si mesmos não induzam a anestesia, eles são frequentemente utilizados como adjuntos via pré-medicação, no preparo de pacientes para procedimentos cirúrgicos, inclusive em pacientes pediátricos (Hauer & Houtrow, 2017; Bateson, 2002; Richtsmeler *et al.*, 1992). De modo geral, altas doses são necessárias para os efeitos sedativos, hipnóticos e

miorelaxantes, enquanto baixas doses têm ação ansiolítica e anticonvulsivante (Bateson, 2002).

Reddy & Patt (1994), em seu artigo sobre BZD, dizem que o Diazepam (Valium), criado em 1962, é bem tolerado em humanos e tem potencial 5 vezes maior como sedativo e relaxante muscular em animais, e eficácia 10 vezes maior como anticonvulsivante que seu antecessor, o clordiazepóxido (Librium – 1962). Segundo os autores, eles são indicados para dor associada à ansiedade, dor devido à lesão muscular e espasmos, e dor lancinante devido à lesões nervosas.

Segundo Ralvenius *et al.* (2015), os benzodiazepínicos clássicos, não seletivos, não apresentam propriedades analgésicas clinicamente relevantes pois as doses e graus de ativação dos receptores necessárias para um efeito relevante devem ser significativamente maiores para antihiperalgisia do que para sedação. Em doses não sedativas, estes BZD não induzem antihiperalgisia significativa.

Os BZD estão também entre as drogas capazes de deprimir e modular as respostas imune e inflamatória, com efeitos tais como redução da resistência às infecções, redução do *burst* oxidativo e da fagocitose por macrófagos, inibição da quimiotaxia de células inflamatórias, diminuição do ânion superóxido e de algumas interleucinas (De Lima *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2008).

O uso prolongado de BZD pode levar a inúmeros problemas, incluindo déficits cognitivos, evidenciados por problemas na coordenação motora e memória, além de, como foi dito, o desenvolvimento de tolerância e dependência. Em estudos com animais, a tolerância aos efeitos sedativos aconteceu mais rapidamente do que os efeitos anticonvulsivante e ansiolítico, sugerindo que diferentes processos possam estar envolvidos na resposta de tolerância para cada um desses comportamentos. Para Bateson (2002), o desequilíbrio do número de receptores GABA_A em função da exposição prolongada a moduladores positivos benzodiazepínicos é um mecanismo potencialmente óbvio para o desenvolvimento da tolerância.

Para o tratamento farmacológico da dor crônica não neuropática, o uso de opioides já é standardizado, apesar de seus efeitos colaterais indesejáveis significantes, que podem influenciar na aderência ou à descontinuidade ao tratamento. Pacientes com neuropatias não respondem a drogas anti-inflamatórias não esteroidais e a resistência ou insensibilidade a opioides é comum. Deve-se ter cuidado ao utilizar os BZD como adjuvantes no controle da dor, pois seus efeitos sedativos e depressores respiratórios são aumentados pelo uso combinado com opioides, e os efeitos adversos são dependentes da dose, forma de administração, idade e situação clínica. Em algumas situações clínicas, a adição de BZD pode reduzir a quantidade de opioide e outros analgésicos, e então pode ser considerado um “poupador de opioides” (Micheli *et al.*, 2017; Richtsmeler *et al.*, 1992).

A maioria das ações dos BZD parece resultar da facilitação da atividade inibitória do maior neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, o ácido gama-aminobutírico (GABA), em seu receptor, favorecendo o fluxo de íons cloreto através dos canais ionotrópicos ligados a ele e produzindo a hiperpolarização das membranas neuronais (Ettcheto *et al.*, 2020).

O GABA está presente em 30% das sinapses, e é essencial para todo o equilíbrio entre a excitação neuronal e inibição vitais para o funcionamento normal do cérebro. Muita inibição, ou pouca excitação, pode levar ao coma, depressão, pressão sanguínea baixa, sedação ou sono. A ausência de equilíbrio nestes extremos pode resultar em morte. Os sintomas exatos dependem da região do cérebro envolvidas e exatamente quais células nervosas estão fora de equilíbrio. A restauração da normalidade entre a excitação e inibição é o maior objetivo das terapias que atingem a inibição neuronal mediada por GABA (Johnston, 2005; Bateson, 2002).

O GABA produz sua inibição neuronal agindo em uma grande diversidade de receptores de membrana. Estes receptores podem ser divididos em 2 maiores tipos: receptores ionotrópicos, que são canais iônicos dependentes de ligantes (receptores GABA_A e GABA_C), e receptores

metabotrópicos (receptores GABA_B), que agem via segundos mensageiros (Johnston, 2005).

Além dos moduladores exógenos, como os benzodiazepínicos, os receptores GABA são modulados por um grande número de substâncias endógenas (íons metálicos como zinco, esteroides e químicos derivados da dieta, como os flavonóides (Sigel & Steinmann, 2012; Johnston, 2005; Bateson, 2003).

A complexidade dos receptores GABA_A reside na existência de inúmeras subunidades, que mediam diferentes comportamentos e respostas farmacológicas. Nos humanos existem 6 subunidades α , 3 subunidades β , 3 subunidades γ , 3 subunidades ρ e uma de cada: ϵ , δ , θ e π subunidades. Os receptores ionotrópicos GABA consistem em cinco subunidades proteicas dispostas ao redor de um canal central, que constitui o canal iônico. A maioria dos receptores GABA_A, em particular aqueles associados aos sites benzodiazepínicos, compreendem as subunidades α , β e γ . Os receptores GABA_A contendo α_1 , α_2 , α_3 e α_5 são sensíveis à modulação pelos BZD clássicos, enquanto os que contêm α_4 e α_6 são insensíveis a eles. (Ettcheto *et al.*, 2020; Zeilhofer *et al.*, 2018; Sigel & Steinmann, 2012; Johnston, 2005; Bateson, 2002).

Os BZD clássicos como o Diazepam (DZP) ligam-se com alta afinidade a várias combinações de receptores GABA_A. porém exclusivamente a subunidade α adjacente à subunidade γ define a natureza do site do BZD. Acredita-se que a subunidade α_1 do receptor GABA_A seja responsável pelos efeitos sedativos, enquanto as subunidades α_2 e α_3 exercem atividades ansiolíticas e antidepressivas. Já a subunidade α_5 está envolvida no controle de funções cognitivas como memória e aprendizado (Ettcheto *et al.*, 2020; Lüscher *et al.*, 2012; Bateson, 2002; Walters *et al.*, 2000; Reddy & Patt, 1994; Richtsmeler *et al.* 1992).

Os sites benzodiazepínicos dos receptores GABA_A de subtipo α_3 são os mais densamente encontrados no corno dorsal da coluna espinhal, seguidos dos subtipos α_2 e α_1 , e os menos encontrados são os de subtipo α_5 . O subtipo α_1 está concentrado ao redor do canal central; o subtipo α_2 é mais abundante na superfície do corno dorsal, onde estão as terminações

das fibras nociceptivas. O subtipo α_3 está mais concentrado ao longo do corno dorsal e ao redor do canal central, enquanto a presença do subtipo α_5 é muito fraca. Esses dados são de relevante importância visto que é amplamente aceito que a redução da inibição dos circuitos processadores da dor do corno dorsal espinhal é o fator que mais contribui para as diferentes formas de dor crônica (Ralvenius *et al.*, 2015).

Os BZD, quando aplicados na coluna espinhal, aliviam a dor patológica, entretanto com insuficiente eficácia e efeitos indesejáveis, o que têm impedido seus usos na terapia rotineira para dor. Trabalhos utilizando drogas seletivas dos subtipos de receptores GABA_A têm mostrado a separação entre a hiperalgesia desejada e os efeitos indesejados, conceituando que essas situações não podem ser alcançadas com BZD não-seletivos. (Ralvenius *et al.*, 2015).

Ralvenius *et al.* (2015) testaram três subtipos de receptor GABA_A (α_2 , α_3 e α_5) isoladamente em animais geneticamente modificados em relação a esses receptores e compararam com a eficácia do Diazepam (DZP), considerado um BZD não-seletivo, em relação à hiperalgesia mecânica e térmica. Em ambos os estímulos, o melhor e mais forte efeito anti-hiperálgico foi obtido nos animais que eram sensíveis ao site BZD apenas no receptor α_2 . Os animais que apresentavam esta sensibilidade ao α_3 e α_5 também apresentaram resposta anti-hiperálgica, porém em menor extensão, enquanto os animais que foram tratados com DZP não apresentaram nenhuma resposta anti-hiperálgica. Todos os animais foram geneticamente modificados em relação ao receptor α_1 , a fim de evitar a indução de sedação, um fator que potencialmente confunde os testes comportamentais de dor. Além disso, os animais tratados como subtipo α_2 apresentaram pronunciada analgesia sem os efeitos colaterais indesejáveis presentes nos BZD não-seletivos (Zeilhofer *et al.*, 2018; Ralvenius *et al.*, 2015).

Existem essencialmente 3 classes de ligantes para os receptores benzodiazepínicos: os moduladores positivos (agonistas benzodiazepínicos: benzodiazepínicos, barbitúricos e drogas Z), que são anticonvulsivantes e ansiolíticos; os moduladores negativos (agonistas inversos), compostos que

competem e mudam a concentração do GABA, que são convulsivantes e ansiogênicos; e os moduladores neutros (antagonistas benzodiazepínicos), que não produzem efeitos sozinhos, mas competem pelo site para os BZD, mas não afetam a concentração dependente do GABA, e são capazes de bloquear os efeitos dos moduladores positivos e negativos (o "antagonista" clássico de benzodiazepínicos é o flumazenil) (Sigel & Steinmann, 2012; Johnston, 2005).

A ocupação do site benzodiazepínico na ausência de GABA não causa ativação do receptor. Acredita-se que os BZD agem primariamente aumentando a frequência de abertura dos canais-portão de cloro ligado ao GABA, na presença deste, em contraste com os barbitúricos que, em baixas concentrações, realçam a ação do GABA por aumentarem o tempo de abertura desses canais. Em altas concentrações, os barbitúricos ligam-se diretamente aos canais na ausência de GABA, tornando-se potencialmente perigosos. Esta é a principal razão pela qual os BZD tornaram-se medicações de escolha em relação aos barbitúricos como ansiolíticos (Bateson, 2002).

A atividade ansiolítica dos BZD, mediada através do GABA, influencia vários sistemas de neurotransmissão tais como o noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico, mostrando que a ação destes fármacos depende da ativação de neurotransmissores mediada via sistema gabaérgico; também foi observada sua ação, provavelmente periférica, que induz aumento dos níveis de corticosterona em ratos (Levashova & Myagkova, 2018; Rosas *et al.*, 2006).

Além de atuar nos receptores ao nível do SNC, existem também receptores periféricos para BZD, localizados em sua maioria, fora do SNC, conhecidos por TSPO (proteína translocadora 18 kDa), denominados anteriormente a 2006 como PBR ("*peripheral benzodiazepine receptor*"). A TSPO distingue-se farmacologicamente dos receptores centrais de BZD, localizados nos neurônios, e não têm relação com o GABA ou com os íons cloreto. Estes sítios periféricos de ligação para BZD já foram identificados nos rins, fígado e pulmões, adrenal e testículos, além de várias células do sistema imune tais como linfócitos, monócitos, macrófagos e

polimorfonucleares, sendo que as células que apresentam maior densidade desses receptores são os neutrófilos e macrófagos. Essas células são mais prontamente alteradas após o uso de baixas doses de DZP, enquanto as células que apresentam menor densidade desses receptores (como os linfócitos) necessitam de doses maiores desse benzodiazepínico. (De Lima *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2008, Papadopoulos *et al.*, 2006).

A TSPO é uma proteína localizada principalmente na interface entre as membranas mitocondriais interna e externa, estando em contato com o citosol. Ela participa de várias funções celulares, incluindo transporte de colesterol e síntese de hormônios esteroidais, abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, respiração mitocondrial, apoptose, proliferação celular, gênese tumoral e inflamação. Atualmente, tem sido amplamente utilizada como marcadora em inflamações neurológicas ou ativação da micróglia, marcadora tumoral, além de seus efeitos anti-inflamatórios tanto no sistema nervoso central como no periférico (Lee *et al.*, 2020; Tamayo-Cabeza *et al.*, 2017).

Os resultados de De Lima *et al.*, (2010) sugerem que a administração de DZP em dose de 1 mg/kg não interfere com a viabilidade de linfócitos e os níveis séricos de corticosterona. Entretanto, o uso de DZP em doses mais elevadas (10 mg/kg) altera tais parâmetros, além de induzir a tolerância funcional. Muito provavelmente, esses efeitos tenham a ver com o número de receptores TSPO presentes nas células avaliadas e/ou com os níveis plasmáticos do DZP após as doses administradas. As autoras sugerem que o DZP assim administrado (dose próxima à utilizado na clínica médica para tratamento da ansiedade) seja incapaz de interferir com os linfócitos e/ou com a resposta imune adquirida, ao contrário do que já foi relatado para a imunidade inata, em especial para os macrófagos e neutrófilos.

Monteiro *et al.* (2008) pré-trataram animais com DZP, em doses únicas de 1 e 10 mg/kg, uma hora antes da inoculação intra-peritoneal de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Os resultados obtidos no trabalho mostraram quantidade significativamente menor de células inflamatórias e TNF- α no grupo tratado com 10 mg/kg em relação ao grupo controle não-

tratado, assim como em ambas as concentrações houve menor proporção de macrófagos espalhados em relação ao grupo não-tratado, embora não significante entre si. Segundo os autores, estes achados corroboram a hipótese e que o tratamento com DZP, em dose única, pode influenciar de forma significativa o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda induzida por endotoxinas, com possíveis implicações na eficiência da resposta infecciosa.

Lazzarini *et al.* (2006) estudaram os efeitos anti-inflamatórios do DZP em modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos, e a influência do óxido nítrico (NO) nesta resposta inflamatória. Os autores utilizaram altas doses de DZP (10 e 20 mg/kg), aplicados 1h previamente à indução do edema de pata, utilizando como grupo controle a dose de DZP de 1 mg/kg. Os animais foram eutanasiados 4 h após a indução com carragenina, segundo os autores momento esse pico dos efeitos do DZP. Comparadas ao grupo controle, altas doses de DZP reduziram significativamente o edema das patas, mostrando o efeito dose-dependente. Além disso concluiu-se que o DZP conseguiu diminuir a inflamação aguda inibindo a produção de NO por meio da ativação dos receptores TSPO dentro das células endoteliais e/ou células do sistema imune.

Lee *et al.* (2020) relatam que estudos recentes indicam que o aumento de sítios de ligação de TSPO em imagens de humanos têm implicações diferentes das dos roedores, o que pode implicar em aspectos da homeostase cerebral diferente entre estas espécies. Este fator deverá ser levado em consideração nos futuros estudos da função da TSPO em doenças neurológicas. Dependendo do grau de inflamação, a correlação entre a TSPO e a neuroinflamação deverá ser interpretada com cuidado, e outros componentes inflamatórios deverão ser estudados.

Rosas *et al.* (2006) estudaram os efeitos da interação entre o estresse por isolamento social e o DZP sobre a hipernocicepção experimental em ratos Wistar. O estudo investigou os efeitos do DZP em dose ansiolítica (2 mg/kg) durante 7 dias e em seguida avaliado o limiar de hipernocicepção dos animais. Os autores concluíram que, nesse estudo, evidenciou-se pouca ausência de relação entre o isolamento social e a dor e

pouca relação desta droga com este tipo de estímulo estressor e a nocicepção. Algumas possibilidades levantadas pelos autores são que a dose ansiolítica utilizada ou o tempo de tratamento com o DZP possam não ter sido suficientes para provocar alterações na hipernocicepção e nas respostas ao estímulo estressor, dentre outros parâmetros investigados.

Gracely *et al.* (1978), citados por Reddy & Patt (1994), em um estudo sobre DZP e limiar de dor, tiveram resultados que sugeriram que os BZDs produzem efeitos no componente emocional-motivacional da experiência de dor, mas não no componente sensorial-discriminativo ou no controle central da dor.

Segundo Reddy & Patt (1994), nenhum efeito direto dos BZDs foi demonstrado sobre os sistemas classicamente responsáveis pela nocicepção. Sua propriedade anticonvulsivante, associada aos efeitos saudáveis na dor neuropática, tem levado a postular que os BDZ diminuem a dor neuropática por inibirem ativação em pontos ectópicos na periferia.

Para Richtsmeier *et al.* (2002), que estudaram dor aguda em crianças associando BZD a opioides, a redução da dor deu-se devido à ação ansiolítica dos mesmos e não por suas propriedades analgésicas.

Friedman *et al.* (2017) realizaram um estudo clínico, randomizado e duplo-cego em 545 pacientes com dor lombar aguda, onde compararam a evolução funcional e da dor após o uso de naproxeno associado ao DZP ou a placebo no período de 1 e 3 meses após a visita ao centro médico. A pesquisa foi motivada visto que mais de 2,5 milhões de pessoas nos EUA buscam os serviços de emergência devido ao quadro de dor lombar, sendo frequentemente tratados com anti-inflamatórios não-esteroidais associados a benzodiazepínicos, embora não existam evidências para este procedimento. Em sua conclusão, os autores disseram que o DZP não pareceu conferir nenhum benefício além do grupo placebo quando adicionado ao naproxeno para o tratamento de dor lombar não radicular e não traumática. Os autores colocam, como uma das possíveis limitações do estudo, a possibilidade da verdadeira eficácia do DZP ter se perdido em função de uma dose insuficiente, apesar de terem cuidadosamente espelhado a realidade da prática emergencial.

Sun *et al.* (2014) investigaram os efeitos da metazolamida (MZA) e do DZP na dor aguda e compararam com os efeitos da acetazolamida (AZA) em camundongos. Já foi comprovado que a AZA consegue aliviar a inflamação e a dor crônica induzida em nervos periféricos, porém ainda era desconhecido se teria ou não efeito sobre dor aguda induzida térmica e quimicamente. O DZP foi ministrado nas doses de 0,25, 0,5 e 1 mg/kg, e os testes mecânicos e químicos foram realizados no mínimo após 30 minutos de administração das drogas. Os resultados demonstraram que o AZA falhou em produzir analgesia em dor aguda estimulada termicamente, porém atenuou a dor aguda estimulada quimicamente; a MZA e o DZP falharam na redução da dor aguda estimulada tanto termicamente quanto quimicamente. Os autores consideram que não foram as baixas doses de DZP a principal causa de ausência do efeito analgésico do mesmo.

2.4.2.2 Flumazenil

Enquanto os BZD de meias-vidas mais curtas (especificamente o midazolam) tendem a ser preferidos como adjuvantes anestésicos, a fim de minimizar efeitos pós-operatórios como a sedação, a introdução à clínica do antagonista de BZD, o flumazenil, deu aos anestesistas a habilidade de controlar com rapidez e exatidão o retorno do paciente e finalizar rapidamente reações paradoxais de agonistas benzodiazepínicos. O flumazenil intravenoso, com efeito de pico em 6 a 10 minutos, atua como um inibidor competitivo no sítio de ligação dos BZD do receptor GABA_A. Como o tempo de ação do flumazenil é menor do que o dos BZD, a ressedação pode ocorrer após a dissipação do efeito da reversão inicial (Seelhammer *et al.*, 2018, Bateson, 2002).

Anseloni & Gold (2008) estudaram o limiar nociceptivo nas patas de ratos utilizando midazolam e flumazenil, entre outros fármacos. O Flumazenil utilizado individualmente não influenciou o limiar nociceptivo na presença ou ausência de inflamação, porém sua associação com o midazolam resultou em redução dos efeitos antinociceptivos do midazolam em ambas as situações. Os autores concluíram que os efeitos antinociceptivos do midazolam são mediados por receptores benzodiazepínicos centrais, e não por receptores

benzodiazepínicos periféricos, tanto na presença quanto na ausência de inflamação.

Segundo Seelhammer *et al.* (2018), ainda é limitada a informação sobre os efeitos da administração de flumazenil durante a recuperação após anestesia geral para tratar depressão respiratória ou excesso de sedação. Além disso, os resultados clínicos entre os pacientes após receber flumazenil durante a recuperação da anestesia são obscuros.

2.4.2.3 Fotobiomodulação associada a Benzodiazepínicos

Khiavi *et al.* (2020) compararam pacientes com quadro de Síndrome de Disfunção Dolorosa Miofascial (MPDS) em relação a várias terapias utilizadas. Em seu trabalho, 3 grupos de pacientes foram formados. O primeiro grupo foi tratado com farmacoterapia durante 2 semanas (relaxante muscular – 500 mg de metocarbamol 3x ao dia; anti-inflamatório não-esteroidal – naproxeno 250 mg 2x ao dia; benzodiazepínico – clonazepam 1 mg, 1x por dia). O segundo grupo foi tratado com a mesma farmacoterapia que o Grupo 1, associado à FBM (3 x semana, com total de 10 sessões), e no terceiro grupo associaram-se o aparelho oclusal e a farmacoterapia utilizada no Grupo 1 (aparelho utilizado por no mínimo 8h por dia, durante 1 mês). Os resultados mostraram uma expressiva redução da sensibilidade dolorosa tanto com o laser como com o aparelho oclusal, em relação ao uso único da farmacologia, o que levou os autores a concluir que a FBM pode ser considerada uma alternativa conveniente para os tratamentos convencionais da Síndrome de Disfunção Dolorosa Miofascial.

Considerando-se as terapias farmacológicas em voga para o controle da dor periférica e todas as contraindicações a elas pertinentes, cabe buscarmos terapias auxiliares não farmacológicas ou que com elas colaborem, minimizando seus efeitos nocivos ao corpo humano. É imprescindível também a compreensão dos mecanismos envolvidos nestes processos, a fim de aperfeiçoar os caminhos da analgesia.

Como apresentado nesta contextualização, os trabalhos associando fármacos benzodiazepínicos com terapia por fotobiomodulação são escassos e

o estudo da luz nos mecanismos envolvendo receptores GABA são inexistentes até o momento. A compreensão destas associações é importante, a fim de verificar a existência de efeitos somatórios ou inibitórios sobre os receptores GABA o que levaria ao uso destas terapias no tratamento de processos dolorosos, além do efeito anti-inflamatório já conhecido em vários trabalhos científicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Estudar o efeito da terapia por fotobiomodulação utilizando laser com baixa intensidade associado com terapia medicamentosa agonista de receptores Gaba (Diazepam) no controle da sensibilidade dolorosa (alodinia), na expressão de receptores inflamatórios e de dor (Neurocinina NK1, Bradicinina B1, GABA) e nos níveis de Mieloperoxidase (MPO).

3.2 Objetivos Específicos:

- Investigar o efeito da fotobiomodulação associada ou não com tratamento farmacológico (Diazepam) na alodinia mecânica;
- Investigar o efeito da fotobiomodulação associada ou não com tratamento farmacológico (Diazepam) na atividade de Mieloperoxidase.
- Avaliar o efeito da fotobiomodulação associada ou não com Diazepam na expressão gênica de receptores de neurocininas (NK1), receptor de bradicinina (B1), e receptores benzodiazepínicos (GABA α 1 e GABA α 2).

4. METODOLOGIA

Esse estudo foi realizado em 72 ratos machos Wistar, com peso aproximado entre 400 e 600 g, nascidos entre novembro de 2019 e janeiro de 2020, e protocolado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animal da Universidade Nove de Julho (CEUA), sob o número 232171019 (ID 000196).

Os animais foram criados e cuidados no Biotério da Universidade Nove de Julho, com livre acesso a água e ração, mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12h.

Os 72 animais foram distribuídos em 7 grupos experimentais, com 8 elementos cada (Figura 5). À exceção do Grupo Controle, em todos os animais foi induzido um quadro inflamatório (tendinite) no tendão calcâneo de ambas as patas traseiras, por meio de uma injeção subcutânea de colagenase (100 µg/pata). O Grupo 2 (Tendinite Não-tratado – NT) não recebeu qualquer tratamento para este quadro inflamatório, enquanto todos os demais receberam conduta terapêutica, a fim de avaliar principalmente a resposta de dor aguda inerente à tendinite.

Para que fosse realizada a aplicação da colagenase, os animais foram levemente sedados (sedação inalatória) com Isoflurano (BioChimico®, Lote 008694, validade 04/21). Os referidos grupos são:

Grupo 1. Controle (CTL);

Grupo 2. Tendinite Não-tratado – NT;

Grupo 3. Tendinite tratado com Fotobiomodulação - FBM;

Grupo 4. Tendinite tratado com Diazepam - DZP;

Grupo 5. Tendinite tratado com Fotobiomodulação associada ao Diazepam – FBM+DZP;

Grupo 6. Tendinite tratado com Diazepam associado ao Flumazenil – FLU+DZP;

Grupo 7. Tendinite tratado com Flumazenil associado à Fotobiomodulação – FLU+FBM.

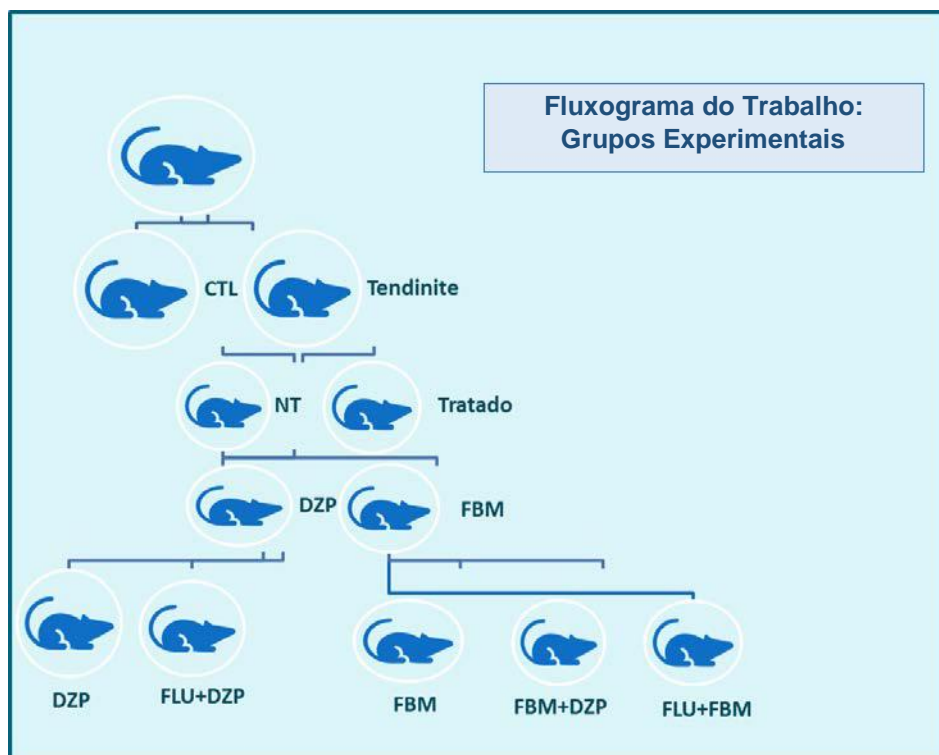


Figura 3. Fluxograma do trabalho (Arquivo pessoal Yose M.E. e Silva)

Previamente a este experimento foi realizado, em um grupo de 20 ratos machos Wistar (40 tendões das patas esquerdas e direitas), o estudo do Curso Temporal da Dor pós-indução de tendinite. Os animais foram divididos em 5 grupos: 1h, 2h, 4h, 6h, 8h e 12h e foram realizados 4 ciclos de alodinia inicialmente, para serem comparados com as alodínias finais, tendo como objetivo verificar o momento de maior expressão da sensibilidade dolorosa. Este teste foi realizado no Analgesímetro Randall Selito, marca Insight (Laboratório da Universidade Nove de Julho), sendo o limiar de dor necessário para que o animal retirasse a pata do dispositivo de pressão do aparelho registrado em gramas (Ferreira *et al.*, 2005).

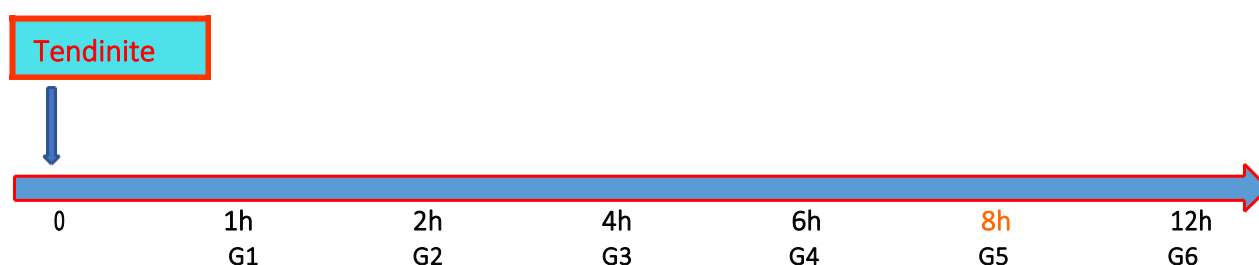


Figura 4. Curso Temporal da Dor (Arquivo pessoal Yose M.E. e Silva).

Com a determinação do curso temporal, as medidas de alodinia nos grupos Tratados (G3 – G7) foram realizadas após 8h da indução dos quadros de tendinite, e os tratamentos preconizados para cada grupo em prazo anterior a estas 8h, dependendo do tempo de absorção de cada um e o tempo necessário para sua ação no momento de maior dor dos animais (dor aguda).

Todos os animais foram eutanasiados 2 horas após as respectivas terapias, de modo a obter uma maior expressão gênica dos marcadores a serem analisados. A eutanásia foi realizada via inalatória (Isoflurano, BioChimico®, Lote 008694, validade 04/21) e os tendões das patas traseiras direita e esquerda foram então removidos para as análises subsequentes.

Os tendões foram divididos em três grupos de análise, de modo que as patas direita e esquerda do animal ficassem em grupos distintos. Os que receberiam análise histológica foram armazenados em formol, e os demais congelados a -80°C , para as análises bioquímica e molecular.

Todos os procedimentos foram realizados por uma única operadora, diminuindo os desvios que porventura pudessem ocorrer.

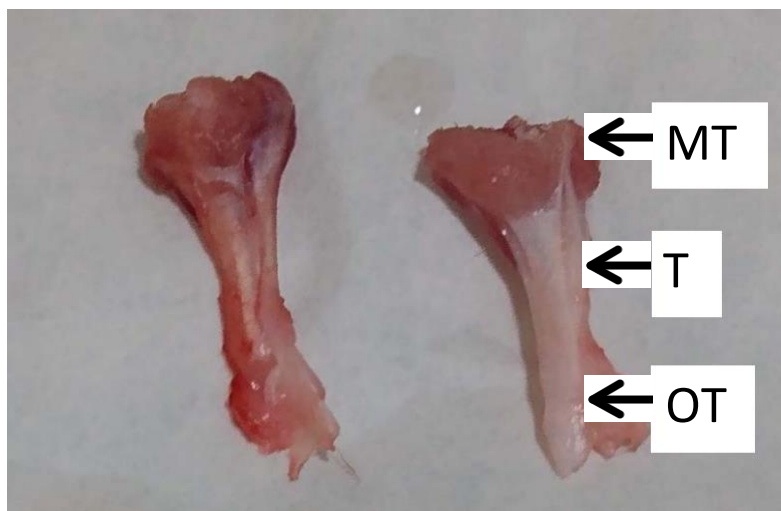


Figura 5: Tendões removidos após a eutanásia dos animais. MT: Região Miotendídena; T: Tendão propriamente dito; OT: Região Osteotendínea. (Arquivo pessoal: Yose Marie E. e Silva).

4.1. Tratamentos utilizados:

As doses e vias de aplicação dos medicamentos foram guiados pela Tabela de Doses para CEUA e Biotério da Universidade Federal de Alfenas (MG), com o auxílio da médica-veterinária do Biotério da Universidade Nove de Julho. As doses de medicação recebidas nos tratamentos foram correspondentes aos pesos dos animais, verificados imediatamente antes do início do experimento.

4.1.1 Fotobiomodulação - FBM

Os parâmetros utilizados foram: λ : 810 nm; Tipo de Diodo: AsGaAl (MMOptics®); Potência: 100 mW; Energia: 3 J; Tempo por ponto: 30 s; Pontual (Único Ponto). A terapia com fotobiomodulação foi aplicada 30 minutos antes das 8 horas pós-indução da tendinite.

Tabela 1: Parâmetros utilizados na terapia por fotobiomodulação

λ (nm)	Tipo de Diodo	Potência (W)	Energia (J)	Tempo (s)	Área de saída do feixe (cm ²)	Densidade de energia (J/cm ²)	Densidade de Potência (W/cm ²)	Modo
808	AsGaAl	0,1	3	30	0,03	100	3,33	Contínuo

4.1.2 Diazepam - DZP

Uso de Diazepam (Genéricos Hipolabor), 5 mg/ml, lote AO 003/19, validade 04/21. A medicação foi ministrada injeção intraperitoneal (IP), 30 minutos antes das 8 horas pós-indução da tendinite.

4.1.3 Fotobiomodulação associada ao Diazepam – FBM+DZP

A FBM foi aplicada, com os parâmetros já citados, 30 minutos antes das 8 horas pós-indução da tendinite, e imediatamente após foi ministrado o Diazepam (IP).

4.1.4 Diazepam associado ao Flumazenil – DZP+FLU

A injeção de Diazepam foi administrada (IP) 45 minutos antes das 8 horas pós-indução da tendinite. Quinze minutos após o tratamento com o

benzodiazepínico foi ministrado injeção (IP) de Flumazenil (Flumazil, 0,1 mg/kg, Laboratório Cristália, lote 19110214, validade 11/21).

4.1.5 Flumazenil associado à Fotobiomodulação – FLU+FBM

O Flumazenil foi ministrado (IP) 45 minutos antes das 8 horas pós-indução da tendinite. Quinze minutos após o Flumazenil foi aplicada a FBM, seguindo os parâmetros já mencionados.

4.2 Análises Realizadas:

4.2.1 Análise funcional: teste de alodinia mecânica

The International Association for the Study of Pain (IASP) define alodinia como uma sensação dolorosa causada por um estímulo que normalmente não induz a uma resposta nociceptiva (Borin *et al.*, 2015).

Como anteriormente explicado, este teste foi realizado no Analgesímetro Randall Selito, marca Insight (Laboratório da Universidade Nove de Julho), sendo o limiar de dor necessário para que o animal retirasse a pata do dispositivo de pressão do aparelho registrado em gramas (Ferreira *et al.*, 2005).

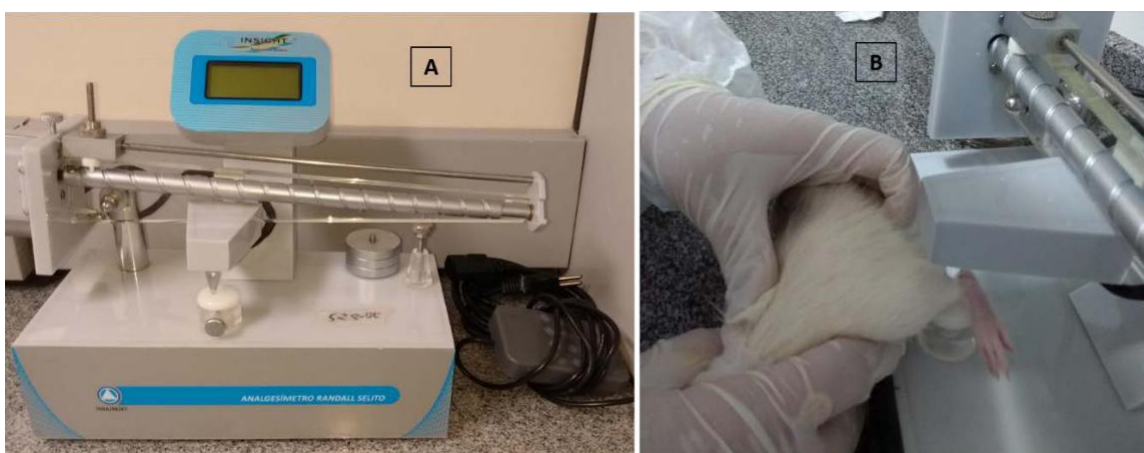


Figura 6A: Analgesímetro Randall Selito Figura 6B: Teste de alodinia mecânica

Figura 6: Teste de Alodinia Mecânica. Figura 6A: Analgesímetro Randall Selito, onde o teste foi realizado; Figura 6B: Teste de Alodinia propriamente dito.

4.2.2 Análise bioquímica: atividade da Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos intracelulares de neutrófilos e pode ser utilizada como um marcador do conteúdo de neutrófilos em tecidos (Bradley *et al.*, 1982; Marcos, 2010). Foi avaliada, portanto, a atividade desta enzima como um indicador da presença e quantidade de neutrófilos presentes no tecido tendíneo nos grupos experimentais, assim como no Grupo Controle.

O método da medida da atividade de MPO baseia-se na velocidade de oxidação do substrato o-dianisidina na presença de água oxigenada, que é evidenciada pela mudança de absorbância medida por espectrofotometria a 460 nm (Marcos, 2010). Neste ensaio, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é quebrado pela MPO liberada de amostras de tecidos por homogeneização em detergente (tampão HTAB). O radical de oxigênio resultante (O^-) combina com o dihidroclorato de o-dianisidina, um doador de hidrogênio (AH_2), o qual é convertido para um composto colorido (A). A formação desse composto colorido ao decorrer do tempo é medida utilizando-se um espectrofotômetro, que determina a quantidade de MPO no tecido (Bradley *et al.*, 1982).

Após os animais serem sacrificados, os tendões foram removidos, dissecados e transferidos para uma cuba. Foi adicionado igual volume de brometo de hexadeciltrimetilamônia, seguido de homogeneização em vórtex e ultrasonicação durante 20 segundos. Os tubos foram aquecidos durante 2h a 60°C em estufa, para inativação da atividade endógena de Catalase e então centrifugados a 12000 g durante 2 minutos. Dez microlitros do sobrenadante foram pipetados (em duplicata) em microplaca de 96 poços e acrescidos com 200 μ L de uma solução de tampão fosfato de potássio (pH 6) contendo 0,164 mg/ml de dihidroclorato de o-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A mudança de absorbância a 460 nm foi medida em um leitor de microplacas durante 10 minutos e a atividade de MPO calculada a partir da velocidade máxima da reação por segundo. O resultado foi expresso em Unidade de MPO/tendão, sendo que uma unidade de MPO é definida como a quantidade em μ mol de H_2O_2 degradado por minuto (Marcos, 2010).

4.2.3 Análise da Expressão Gênica por RT-PCR

Após a indução da tendinite e seus respectivos tratamentos, os animais foram eutanasiados por inalação de anestésico e os tendões das patas direita e esquerda, removidos e armazenados a -80°C , para análise da expressão de mRNA por RT-PCR, em tempo real.

A expressão gênica foi quantificada pela reação em cadeia da polimerase reversa (PCR) em tempo real. O RNA total das amostras foi extraído com o reagente Trizol, de acordo com instruções do fabricante. Após tratamento com DNase, a síntese dos cDNAs foi feita pelo método da transcriptase reversa, empregando a enzima Superscript, na presença de mistura de primers randômicos e oligo dT. A análise das amostras em tempo real obedeceu a um ciclo de desnaturação inicial (10 minutos a 95°C) e quarenta ciclos de amplificação (30 segundos de desnaturação a 95°C e 1 minuto de anelamento e extensão a 60°C).

Os resultados da expressão gênica foram interpretados usando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Ct: número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência acima do valor de fundo – background) que relaciona a expressão do gene de interesse comparado àquela do gene controle B-actina (Marcos, 2010).

Foram avaliados a expressão gênica dos seguintes receptores: Bradicinina (B1), Receptor de Neurocinina (NK-1) e Receptor GABA ($\text{GABA}_{\alpha 1}$ e $\text{GABA}_{\alpha 2}$). As informações dos primers utilizados foram apresentadas na tabela abaixo:

Tabela 2: Sequência de primers utilizados na análise de expressão gênica por RT-PCR.

PRIMERS	SEQUÊNCIA
B-ACTINA	FOWARD: AAGATTTGGCACCACACTTTCTACA REVERSE: CGGTGAGCAGCACAGGGT
B1	FORWARD: TCGTCGGCAGAGATTTCCAG REVERSE: CCACCCTCTGTGAGGTACT
NK-1	FORWARD: GTCCTTGTGTACCGCACAGT REVERSE: AAGACTTTATGCCCGTCGCT
GABA _A 1	FOWARD: TGCCCAATAAACTCCTGCGT REVERSE: TTCGGCTCTCACAGTCAACC
GABA _A 2	FOWARD: TACTTCTGCTTGCTGTTCAGCTT REVERSE: CAGCGGAAACCATACGTTGC

4.3 Análise Estatística

Os dados foram descritos em valores médios com os respectivos desvios-padrão. As análises estatísticas foram feitas através do GraphPad Prism (Versão 8.0.1). Para os dados foi utilizado o teste de One-way ANOVA com post-hoc utilizando teste de Tukey e avaliado o intervalo de confiança de 10%. O nível de significância estatístico foi para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Determinação do Curso temporal na Alodinia Mecânica após Indução da Tendinite.

O gráfico da figura 7 mostra o curso temporal da alodinia mecânica calculada a partir da variação entre a resistência à dor final pela inicial, a partir da pressão sobre o tendão calcâneo. Neste gráfico podemos observar a redução da resistência à dor a partir das 2 horas após a indução da tendinite. A resistência a dor foi menor entre os tempos de 6 e 8 horas. A partir destes resultados, foi utilizado como referência o intervalo de 8 horas após a indução da tendinite para realização desta análise funcional para os diferentes grupos experimentais.

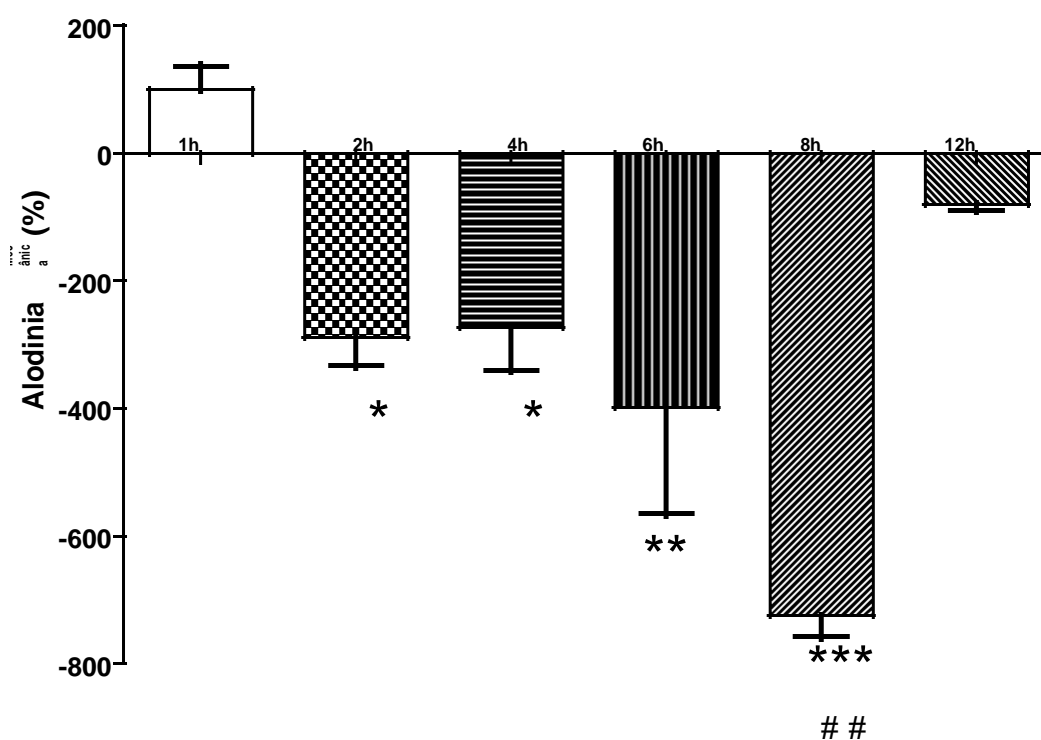


Figura 7. Gráfico 1: Curso Temporal da Dor. Alodinia mecânica nos Tempos 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas após a indução da tendinite.

5.2 Avaliação da Alodinia Mecânica após o Tratamento com FBM associada ou não com Diazepam

O gráfico da figura 8, mostra a alodinia mecânica após 8 horas da indução da tendinite e o efeito dos diferentes tratamentos, farmacológicos ou da fototerapia. Os valores foram representados pelo percentual de redução da resistência a dor, após o teste de compressão sobre o tendão calcâneo dos ratos.

O grupo NT apresentou significativa redução da resistência a dor quando comparado ao grupo CTL. Similarmente ao grupo NT, os grupos DZP, FLU+DZP e FLUM+FBM apresentaram redução da resistência a dor quando comparado com o grupo CTL.

Os grupos FBM e FBM+DZP apresentaram valores de alodinia mecânica similares ao grupo CTL onde não houve indução da tendinite. O grupo FLU+PBM redução a resistência a dor quando comparado ao grupo FBM. Não foi observada alteração da alodinia mecânica entre o grupo FBM e sua associação com Diazepam (FBM+DZP).

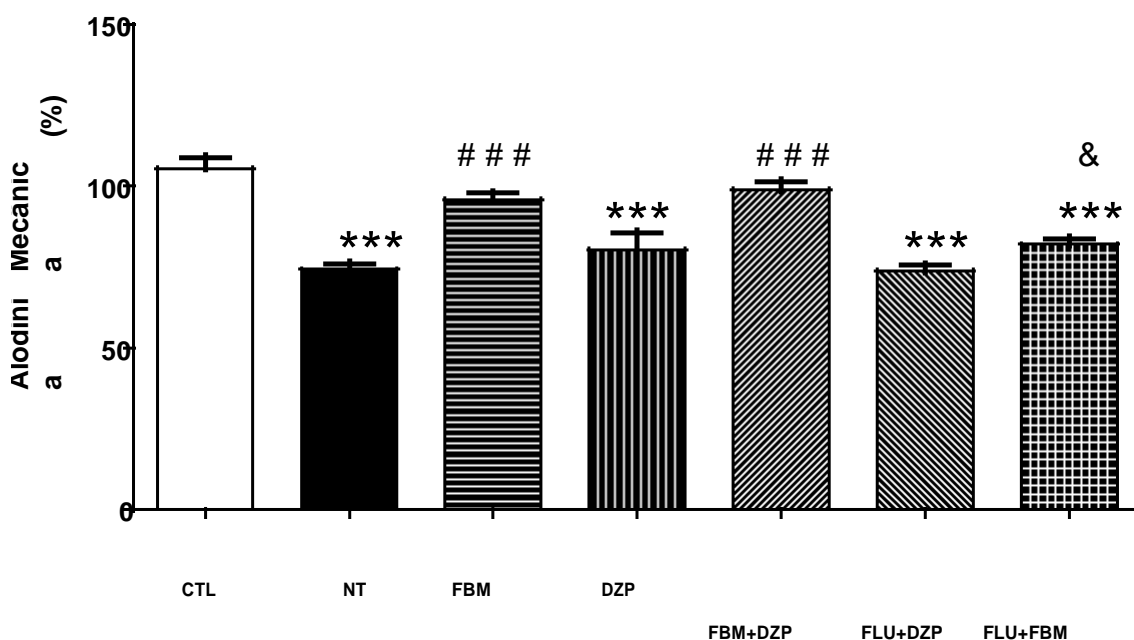


Figura 8. Gráfico 2. Alodinia mecânica após indução da tendinite. Grupos: Controle (CTL), Tendinite Não Tratado (NT), tratado com FBM (FBM), tratado com Diazepam (DZP), tratado com associação de FBM+Diazepam (FBM+DZP), tratado com associação Flumazenil + Diazepam (FLU +DZP), e tratado com associação de Flumazenil + FBM (FLU+FBM). *** $p < 0,001$ VS CTL; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ VS NT e & $p < 0,05$ VS FBM.

5.3 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

No gráfico da figura 9 podemos observar a atividade da enzima mieloperoxidase em diferentes grupos experimentais, 8 horas após a indução da tendinite sobre o tendão calcâneo. Foi observado aumento da MPO no grupo NT quando comparado ao grupo CTL. O grupo FBM reduziu a MPO quando comparado ao grupo NT, com valores próximos ao grupo CTL. O grupo DZP não conseguiu reduzir a MPO quando comparado ao grupo CTL. No entanto, no grupo FBM+DZP quando houve associação das terapias farmacológicas e fototerapia, foi observado redução de MPO. O grupo FLU+FBM onde houve pré-tratamento com Flumazenil e em seguida o uso do Laser, a MPO apresentou resultados elevados comparados ao grupo FBM.

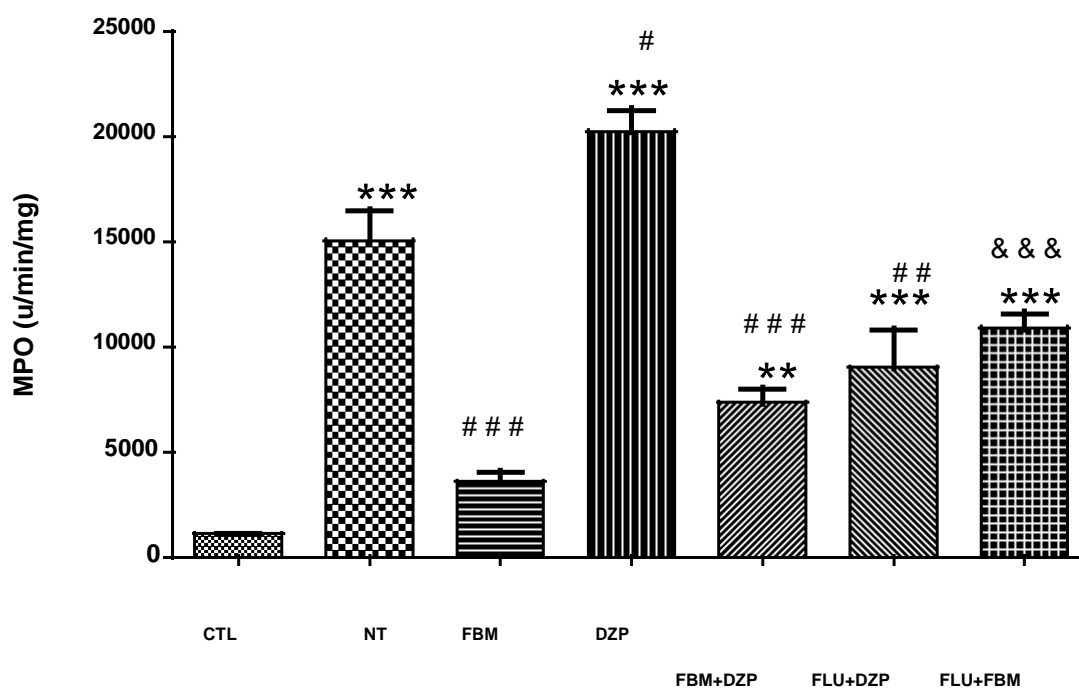


Figura 9. Gráfico 3: Avaliação da atividade da mieloperoxidase. Grupos: Controle (CTL), Tendinite Não Tratado (NT), tratado com FBM (FBM), tratado com Diazepam (DZP), tratado com associação de FBM+Diazepam (FBM+DZP), tratado com associação Flumazenil + Diazepam (FLU +DZP), e tratado com associação de Flumazenil + FBM (FLU+FBM). *** $p < 0,001$ VS CTL; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ VS NT; &&& $< 0,001$ VS DZP.

5.4 Expressão Gênica do receptor de Bradicinina B1

Na figura 10, temos o gráfico da expressão gênica dos receptores de Bradicinina B1 após 8 horas da indução da tendinite. Os grupos NT e DZP apresentaram aumento na expressão do receptor B1 quando comparado ao grupo CTL. Todos os grupos, exceto o DZP, apresentaram redução na expressão de B1 quando comparado ao grupo NT. Não houve diferença entre os grupos FBM com o grupo FBM+DZP. Também não foi observada diferença na expressão de B1 entre os grupos FBM e FLU+FBM.

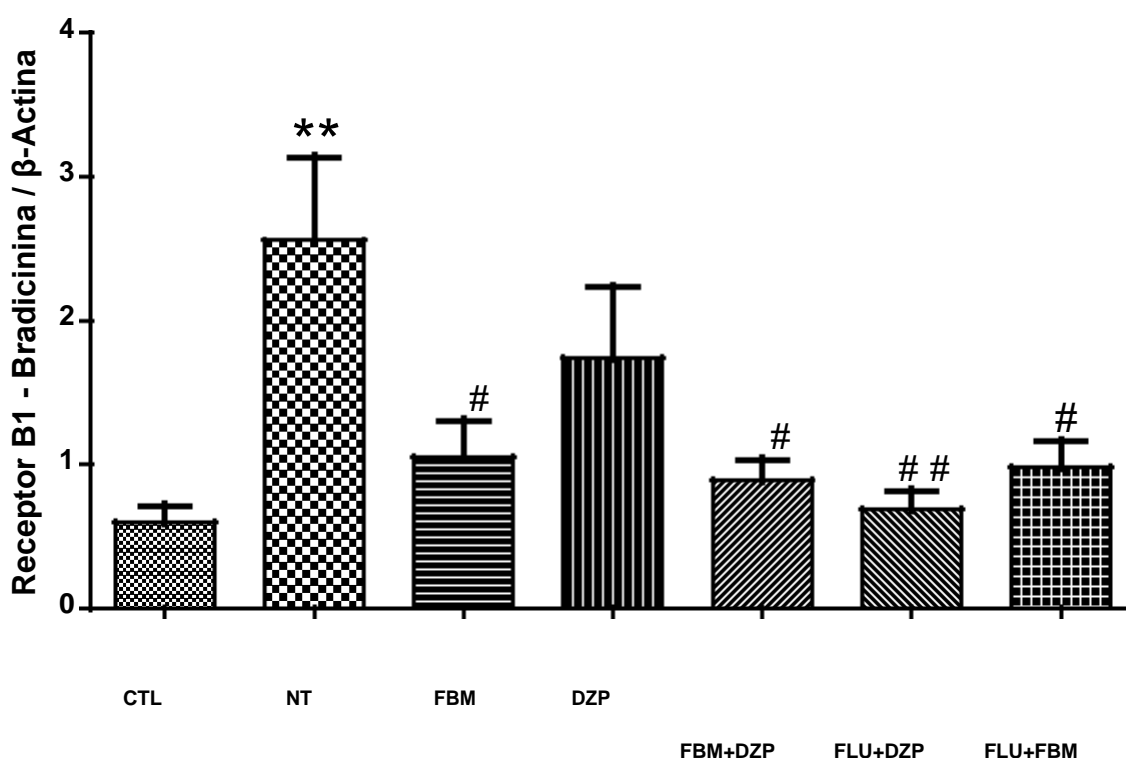


Figura 10. Gráfico 4: Avaliação da Expressão Gênica do receptor de Bradicinina B1. Grupos: Controle (CTL), Tendinite Não Tratado (NT), tratado com FBM (FBM), tratado com Diazepam (DZP), tratado com associação de FBM+Diazepam (FBM+DZP), tratado com associação Flumazenil + Diazepam (FLU +DZP), e tratado com associação de Flumazenil + FBM (FLU+FBM). *** $p < 0,001$ VS CTL; ### $p < 0,001$ VS NT; # $p < 0,05$ VS NT.

5.5 Expressão Gênica de receptor de Neurocinina (NK1)

No gráfico da figura 11 é apresentada a expressão gênica do receptor NK1 de Neurocinina e Substância P. Podemos observar o aumento da expressão gênica de NK1 em todos os grupos onde a tendinite foi induzida, quando comparado ao grupo CTL. O grupo FBM apresentou redução da expressão de NK1 quando comparado ao grupo NT. O tratamento farmacológico apresentado no grupo DZP não reduziu NK1 quando comparado ao grupo NT. Ademais, o grupo FLU+FBM apresentou aumento na expressão de NK1 quando comparado ao grupo FBM.

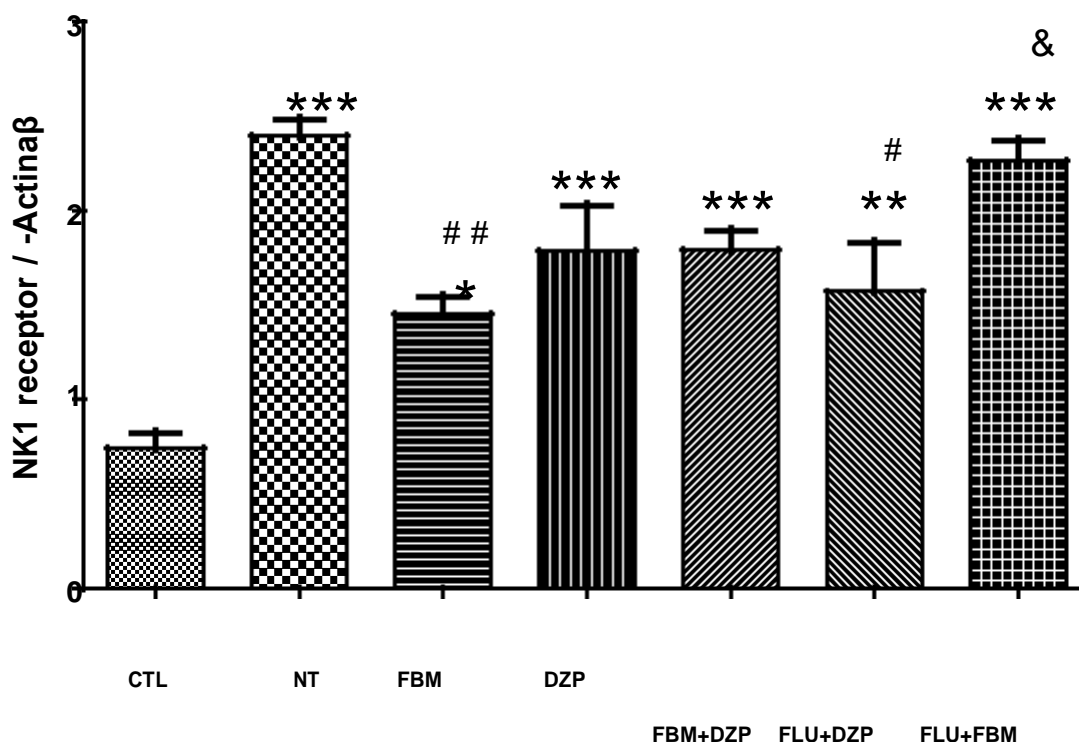


Figura 11. Gráfico 5: Avaliação da Expressão Gênica do receptor de Neurocinina NK1. Grupos: Controle (CTL), Tendinite Não Tratado (NT), tratado com FBM (FBM), tratado com Diazepam (DZP), tratado com associação de FBM+Diazepam (FBM+DZP), tratado com associação Flumazenil + Diazepam (FLU +DZP), e tratado com associação de Flumazenil + FBM (FLU+FBM). *** $p < 0,001$ VS CTL; ## $p < 0,001$ VS NT; & $p < 0,05$ VS FBM.

5.6 Expressão Gênica de receptor de GABA α 1

No gráfico da figura 12 podemos observar a expressão gênica de receptores GABA α 1 nos tendões calcâneos após a indução da tendinite e durante diferentes tratamentos. Os grupos NT, FBM e DZP apresentaram aumento na expressão de GABA α 1 quando comparado ao grupo CTL. O grupo FBM+DZP apresentou redução na expressão de GABA α 1 quando comparado com o tratamento sem associação, representado pelos grupos FBM ou DZP. Ambos os grupos pré-tratados com Flumazenil (FLU+DZP e FLU+FBM) apresentaram redução na expressão de GABA α 1, quando comparados ao grupo NT e ao grupo NT e FBM.

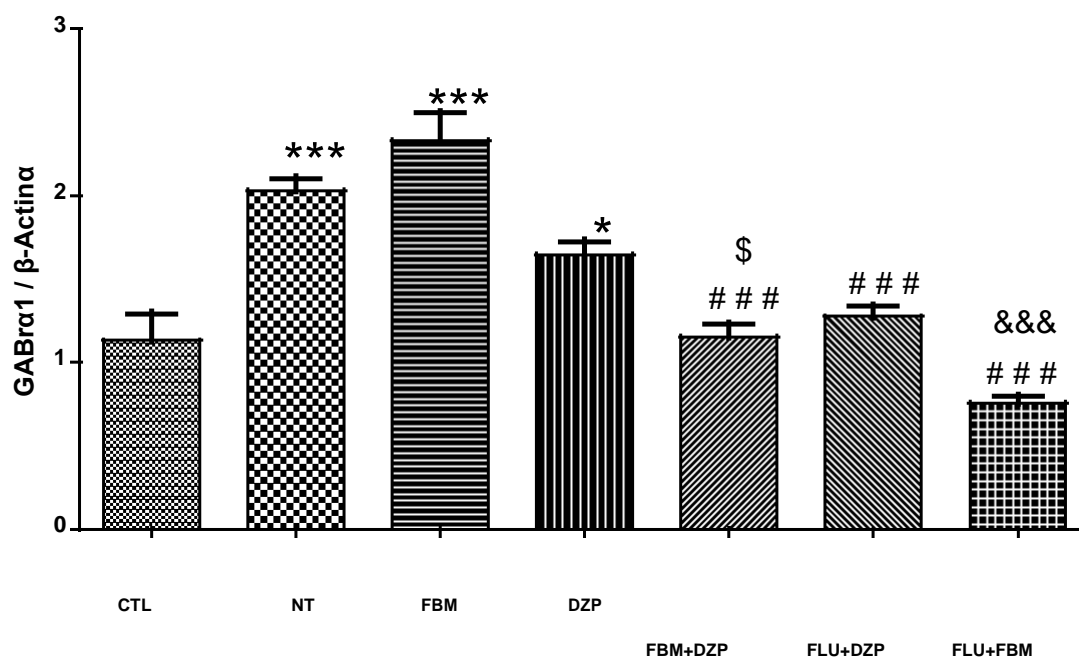


Figura 12. Gráfico da expressão gênica de GABA α 1 em tendões calcâneos após a indução da tendinite e em diferentes tratamentos. Grupos: Controle (CTL), Tendinite Não Tratado (NT), tratado com FBM (FBM), tratado com Diazepam (DZP), tratado com associação de FBM + Diazepam (FBM+DZP), tratado com associação Flumazenil + Diazepam (FLU +DZP), e tratado com associação de Flumazenil + FBM (FLU+FBM). *** $p < 0,001$ VS CTL; ### $p < 0,001$ VS NT; \$ $p < 0,05$ VS DZP; & $p < 0,05$ VS FBM.

5.7 Expressão Gênica de receptor de GABA α 2

No gráfico da figura 13 podemos observar a expressão gênica de receptores GABA α 2 nos tendões calcâneos após a indução da tendinite e durante diferentes tratamentos. Ambos os grupos NT, DZP e FBM+DZP apresentaram aumento na expressão de receptores GABA α 2. O grupo FBM apresentou expressão de GABA α 2 similar ao grupo CTL.

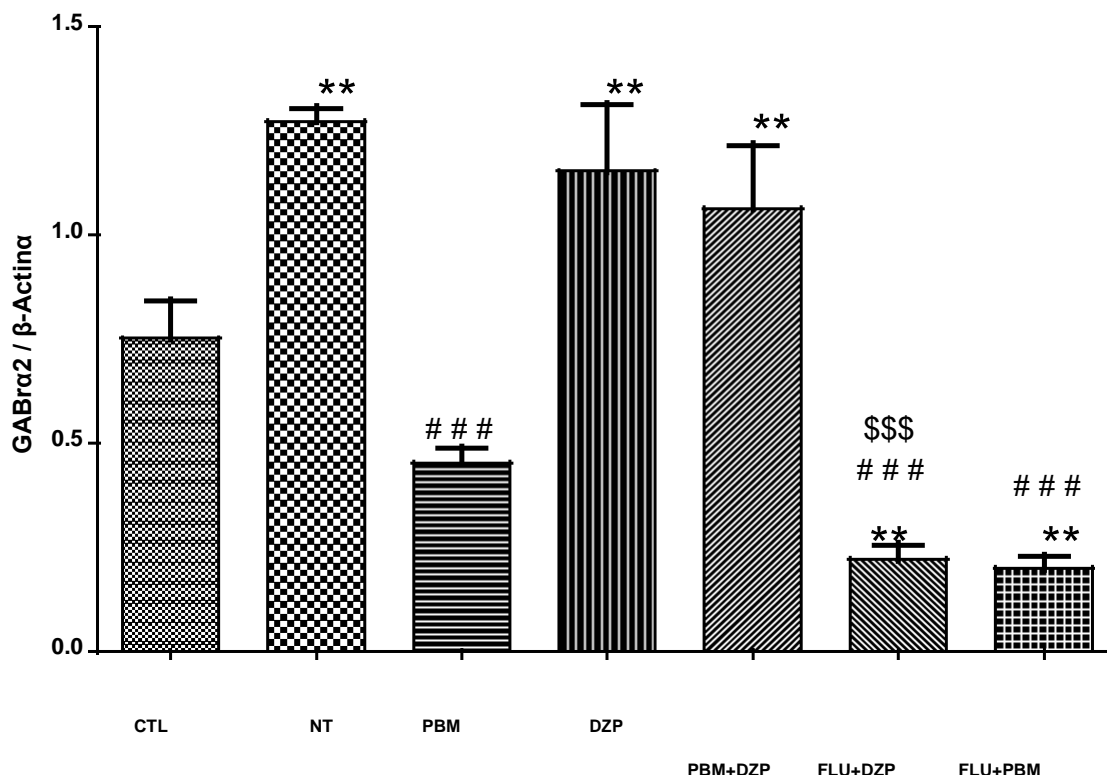


Figura 13. Gráfico da expressão gênica de GABA α 2 em tendões calcâneos após a indução da tendinite e em diferentes tratamentos. Grupos: Controle (CTL), Tendinite Não Tratado (NT), tratado com FBM (FBM), tratado com Diazepam (DZP), tratado com associação de FBM + Diazepam (FBM+DZP), tratado com associação Flumazenil + Diazepam (FLU +DZP), e tratado com associação de Flumazenil + FBM (FLU+FBM). ** $p < 0,01$ VS CTL; ### $p < 0,001$ VS NT; \$ $p < 0,05$ VS DZP.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos o efeito da terapia por fotobiomodulação no processo doloroso em modelo experimental de tendinite induzida por collagenase tipo I. Primeiramente, foi realizado um estudo temporal do limiar de dor e a partir do Curso Temporal, foi observada a progressão da dor no momento de maior sensibilidade, registrada 8h após a indução da tendinite. Na segunda etapa deste estudo, quando foram incorporados grupos experimentais com tratamento farmacológico associado ou não com a terapia por fotobiomodulação, foi observado que o grupo tendinite sem tratamento (NT) reduziu a resistência à dor na alodinia mecânica, bem como aumentou a expressão de receptores de Bradicinina (B1) e de Neurocinina (NK1). Houve ainda aumento da atividade de MPO neste grupo sem tratamento (NT). O grupo com tendinite, tratado com fotobiomodulação (FBM), aumentou a limiar de dor, bem como reduziu a expressão de receptores B1 e NK1, além de diminuir a atividade de MPO. Quando houve pré-tratamento com o antagonista gabaérgico (Flumazenil), a terapia com fotobiomodulação apresentou diminuição levemente significativa o limiar de dor, registrado no teste de alodinia mecânica, além de apresentar menor expressão de receptores B1 (embora não significativa), expressão levemente maior dos receptores NK1, além do aumento da atividade da MPO, quando comparado ao grupo FBM. O grupo FBM também aumentou a expressão dos receptores GABA α 1 e reduzir a de receptores GABA α 2. O pré tratamento com antagonista GABA (Flumazenil) reduziu a ação da terapia por fotobiomodulação.

O modelo de lesão tendínea escolhido neste trabalho, induzida por collagenase, é bastante utilizado em vários artigos, sendo considerado um modelo seguro e padronizado de lesão (Naterstad *et al.*, 2018; Gong *et al.*, 2018; Jesus *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014; Solchaga *et al.*, 2014; Marcos *et al.*, 2012, 2010).

As tendinopatias são doenças conhecidas pela tríade presença de dor, edema e desempenho prejudicada, e têm alta prevalência, compreendendo 30% das queixas musculoesqueléticas, causando um forte

impacto tanto econômico quanto na qualidade de vida dos pacientes (Challoumas *et al.*, 2019; Lipman *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2018; Snedeker & Foolen, 2017; Morita *et al.*, 2017; Hopkins *et al.*, 2016; Hong-Yun & Ying-Hui, 2016; Puri *et al.*, 2015; Sugg *et al.*, 2014).

Existem várias terapias para modular o processo de cura dos tendões, mas nenhuma ainda foi considerada totalmente efetiva, devido à gênese das tendinopatias ser complexa e multifatorial. Os objetivos do tratamento das tendinopatias são redução da dor, prevenção da recorrência, e retorno ao estado de pré-lesão funcional. (Lipman *et al.*, 2018; Snedeker & Foolen, 2017; Hopkins *et al.*, 2016; Rees *et al.*, 2014).

Um dos tratamentos sugeridos neste trabalho, para controle da sintomatologia dolorosa, foi o uso do benzodiazepínico Diazepam, conhecido pelo seu efeito sedativo e ansiolítico (Seelhammer *et al.*, 2018; Hauer & Houtrow, 2017; Lüscher *et al.*, 2012; Sigel & Steinmann, 2012). O Diazepam (DZP) foi utilizado para avaliar a importância de agonistas GABA na sensibilidade dolorosa e se o uso de terapia por fotobiomodulação teria alguma relação com esta via.

Neste estudo, observamos que no grupo NT, em que a tendinite foi induzida e não foi realizado nenhum tratamento, a intensidade da percepção dolorosa foi maior que nos demais grupos, considerando-se a diminuição da resistência à dor pelo teste de alodinia mecânica bem como o aumento dos receptores de B1 e NK1,

Nossos resultados mostraram que o Diazepam não aumenta, com significância, a resistência à dor no teste de alodinia mecânica e a expressão de receptores NK1, além de reduzir a expressão de receptores de Bradicinina B1 quando comparado ao grupo não tratado (NT). O grupo DZP não conseguiu reduzir a atividade de MPO em relação ao grupo NT, indicando haver a continuidade do processo inflamatório, uma vez que o Diazepam tem efeito ansiolítico. Contudo, os BZD estão também entre as drogas capazes de deprimir e modular as respostas imune e inflamatória, em função da existência de receptores benzodiazepínicos periféricos (TSPO ou PBR) localizados em células destes dois sistemas. Esses receptores periféricos são encontrados principalmente em macrófagos e neutrófilos, e dessa forma podem ocorrer

alterações na imunidade inata, o que justificaria o pequeno aumento, embora significativo, nos valores de MPO no grupo DZP quando comparado ao grupo NT (De Lima *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2008; Lazzarini *et al.* 2006).

Segundo Ralvenius *et al.* (2015), os benzodiazepínicos clássicos, não seletivos, como o Diazepam, não apresentam propriedades analgésicas clinicamente relevantes pois as doses e graus de ativação dos receptores necessárias para um efeito relevante devem ser significativamente maiores para antihiperalgisia do que para sedação, trazendo consigo efeitos indesejáveis. Assim, em doses não sedativas, como as utilizadas neste trabalho, estes BZD não induzem antihiperalgisia significativa.

Os BZD são indicados para dor associada à ansiedade, dor devido à lesões muscular e espasmos, e dor lancinante devido à lesões em inervações, agindo como co-analgésicos. Vários trabalhos pesquisaram a relação entre a dose e o tempo de tratamento utilizado com o estresse causado pelo aumento do limiar nociceptivo provocado pelo agente agressor, e consequente percepção da dor. Ainda não ficou estabelecido se, em dose ansiolítica (até 2 mg/kg), existe diminuição da percepção da dor em função da característica tranquilizante e miorelaxante do DZP ou por alguma ação anti-inflamatória do mesmo (Friedman *et al.*, 2017; Sun *et al.* (2014); Rosas *et al.*, 2006; Richtsmeier *et al.*, 2002; Reddy & Patt, 1994; Gracely *et al.*, 1978).

Esta foi uma das motivações deste trabalho, por meio da observação dos receptores de bradicinina (BK) e Substância P (SP), ambas algogênicas, e dos receptores gabaérgicos GABA_A, de subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$, maiores responsáveis pelos efeitos ansiolíticos e analgésicos, respectivamente (Ettcheto *et al.*, 2020; Zeilhofer *et al.*, 2018; Ralvenius *et al.*, 2015; Lüscher *et al.*, 2012).;

Estes resultados apresentam uma preocupação na escolha de tratamentos com vistas à ação analgésica que possam repercutir na ação anti-inflamatória, uma vez que o processo de degeneração tecidual presente na inflamação pode continuar, mesmo com o controle parcial da dor. Em relação ao processo doloroso na tendinite, vários trabalhos estudaram os possíveis mecanismos envolvidos nesta doença, bem como o papel da terapia por fotobiomodulação na regulação da dor (Chang *et al.* 2019; Pereira *et al.*, 2017;

De Freitas & Hamblin, 2016; Jesus *et al.* 2015). Neste estudo, foi incluído um grupo com tendinite e tratado utilizando FBM, nos parâmetros 808nm, 3J e 100mW, parâmetros estes que mostraram bons resultados em relação a dores musculoesqueléticas em vários trabalhos anteriores (entre 808 e 830 nm: Sousa *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2017; Marcos *et al.*, 2012,2010; Pallotta *et al.*, 2012).

Como citado anteriormente, o tratamento foi realizado no pico da dor que foi obtida a partir da realização do teste de alodinia mecânica e da determinação do Curso Temporal da Dor neste modelo experimental de tendinite. A análise da sensibilidade à dor pelo teste de alodinia mecânica foi realizada 30 minutos após a irradiação, a fim de avaliar o efeito analgésico da fototerapia. Nossos resultados demonstraram que o grupo FBM apresentou significativa redução da sensibilidade à dor, com valores similares ao grupo CTL em que não foi realizada a indução da tendinite. No grupo FBM ainda foi observada redução na expressão de receptores B1 e NK1, mostrando a ação da luz em receptores de Bradicinina bem como de Neurocinina (Substância P). Ademais, foi observada também uma redução da atividade de MPO neste grupo, o que significa um controle do processo inflamatório a partir da terapia por fotobiomodulação.

Até o momento, o principal mecanismo de controle da dor na terapia por fotobiomodulação conhecido está relacionado à sua ação sobre vários marcadores inflamatórios, em vários modelos de estudo, tanto clínicos quanto laboratoriais (Pigatto *et al.*, 2019, 2017; Naterstad *et al.*, 2018; White *et al.*, 2018; De Oliveira *et al.*, 2017; Francio *et al.*, 2017; Hamblin, 2017, 2016; Cabras *et al.*, 2016; Casalechi *et al.*, 2014; Marcos *et al.*, 2012, 2010; Pallotta *et al.*, 2012).

A utilização de medicamentos anti-inflamatórios e opioides, assim como de fármacos co-analgésicos como os benzodiazepínicos, no controle das dores agudas e crônicas tem sido bastante estudada. Apesar da eficiência que possam alcançar nessa missão, estes fármacos trazem consigo muitos efeitos indesejáveis ao paciente, além de serem dispendiosos. Desta forma, torna-se necessário continuar a busca de formas de controle da dor menos

deletérias e que tenham um custo menor, a fim de melhorar a qualidade de vida do paciente.

Neste trabalho, são apresentados resultados que ampliam este cenário, considerando que a dor também pode ser modulada nos primeiros minutos após a utilização da terapia por fotobiomodulação, com mecanismos que vão além dos seus conhecidos efeitos anti-inflamatórios. Para isso, foram realizadas análises funcionais (Alodinia mecânica), bioquímicas (Atividade da enzima Mieloperoxidase – MPO) e moleculares (Expressão Gênica dos receptores de Neurocinina – NK1; Receptores de Bradicinina – B1; Receptores GABA α 1 e GABA α 2).

Considerando a análise funcional, foi avaliada a sensibilidade nos tendões pelo teste de alodinia mecânica, utilizando o *Randall Selitto*. Tomando-se como ponto de partida o grupo CTL, observou-se redução do limiar de dor em todos os grupos, à exceção do grupo FBM e FBM+DZP, confirmando o efeito analgésico da FBM. Os grupos FBM e FBM+DZP também foram os únicos com diferenças significantes em relação ao grupo NT. Todos os demais grupos apresentaram significância semelhante entre si e com o grupo NT, inclusive o grupo FLU+FBM, mostrando ter havido interferência do Flumazenil na atividade analgésica da FBM. O grupo FLU+DZP, além de ser semelhante ao grupo NT, também o foi com o grupo DZP. Uma hipótese para este fato pode ser a atuação da FBM sobre a expressão destes receptores gabaérgicos neste momento ocupados pelo Flumazenil.

Os grupos FBM e FBM+DZP apresentaram valores semelhantes da percepção de dor entre si, e houve leve diferença significativa entre os grupos FBM e FLU+FBM. Este resultado fortaleceu nossa hipótese que a FBM teria também ação sobre os receptores GABA e o uso do Flumazenil, considerado um fármaco de meia-vida curta (Seelhammer *et al.*, 2018, Bateson, 2002), poderia reduzir estes efeitos sedativos observados no uso da fotobiomodulação. Considerando não haver diferença na sensibilidade a dor nos grupos DZP e FLU+DZP, o motivo pode estar relacionado também a concentração do fármaco, bem como a metabolização rápida nos animais utilizados neste experimento.

Khiavi *et al.* (2020) encontraram melhores resultados no controle da dor miofascial associando farmacoterapia contendo um fármaco benzodiazepínico (1mg de clonazepam, por duas semanas) com a fotobiomodulação do que a mesma farmacoterapia usada isoladamente, no tratamento de síndrome miofascial. Da mesma forma, em nosso trabalho, os valores da alodinia no grupo FBM+BZD foram significativamente melhores do que no grupo DZP.

O uso de DZP adicionado ao naproxeno no tratamento de dor lombar aguda não traumática, comparado à associação naproxeno + placebo, não mostrou significância em relação à percepção dolorosa, foco do estudo de Friedman *et al.* (2017). A grande preocupação dos autores neste trabalho foi o uso injustificado de benzodiazepínicos, questionando a eficácia dos mesmos nesse tipo de dor.

Outra análise utilizada neste trabalho foi a atividade MPO. A Mieloperoxidase é uma enzima importante química da atividade inflamatória, por ser encontrada principalmente em leucócitos polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos (Pallotta *et al.*, 2012; Marcos, 2010; Pereira *et al.*, 2000; Bradley *et al.*, 1982). O aumento da atividade desta enzima pode significar uma degeneração tecidual decorrente do processo inflamatório (Marcos, 2010).

Os resultados, nesse trabalho, mostraram uma diferença estatisticamente significativa do grupo NT e de todos os grupos que receberam tratamento, com exceção do grupo tratado exclusivamente com fotobiomodulação (FBM), em relação ao grupo controle (CTL), sendo essa diferença, levemente menor do que o grupo FBM no grupo onde a FBM foi associada ao DZP. Podemos inferir a partir desse resultado, que a fotobiomodulação teve um efeito protetor sobre a degeneração tecidual quando de sua aplicação isolada após a indução do estímulo agressor (30 minutos antes do período de maior sensibilidade dolorosa).

Resultados semelhantes da diminuição dos valores de MPO foram encontrados em trabalhos anteriores, embora as metodologias tenham sido diferentes em relação ao momento de aplicação da terapia e dosimetria, tanto para a FBM quanto para os fármacos administrados (Kuedo *et al.*, 2016; Manchope *et al.*, 2016; Borin *et al.*, 2015; Pallotta *et al.*, 2012; Marcos, 2010).

Os tratamentos com fotobiomodulação (grupo FBM) e fotobiomodulação associada ao Diazepam (FBM+DZP) mostraram redução significativa dos valores de MPO em relação ao grupo com tendinite sem tratamento (NT), embora entre si não tenha havido diferença. O único grupo que não apresentou diferença significativa com o grupo NT foi o que associou Flumazenil à fotobiomodulação (FLU+FBM). Embora graficamente possa ser sugerida uma grande diferença entre os valores dos grupos DZP e NT, essa diferença foi leve, porém significativa, tendo no grupo DZP os valores de MPO aumentados. Já o grupo FLU+ DZP apresentou redução significativa dos níveis de MPO em relação ao grupo NT, levemente menor que a verificada nos grupos PBM e PBM+DZP. O Flumazenil, ocupando em parte o site benzodiazepínico não permitiu o aumento de MPO nos níveis do grupo NT.

Em relação à MPO, pode-se dizer que o grupo onde o DZP foi utilizado singularmente (DZP) apresentou os maiores níveis da enzima, maiores inclusive que os do grupo NT. De Lima *et al* (2010) demonstraram não existir alteração dos parâmetros de imunidade adquirida na dosagem de 1mg/kg como a utilizada em nosso trabalho. Este e outros trabalhos sugeriram que estas alterações acontecem com doses maiores (10 mg/kg e 20 mg/kg) e podem ser prejudiciais à resolução do processo inflamatório, inclusive pelo aumento da produção corticosterona pela estimulação de receptores benzodiazepínicos periféricos presentes nas células adrenais (De Lima *et al.*, 2010) da Silva *et al.*, 2003; Lazzarini *et al.*, 2006, 2001). Ainda nesse sentido, Massoco & Palermo-Neto citam interferência do Diazepam, com diminuição de neutrófilos, utilizando dose de 1,5 mg/kg durante 7 dias, tratamento iniciado 4h previamente ao estímulo agressor.

Os grupos FBM e FLU+FBM apresentaram diferença significativa entre si, com aumento da quantidade de MPO no grupo onde o Flumazenil foi associado à terapia por fotobiomodulação. Em princípio pode-se dizer que o Flumazenil reduziu a ação anti-inflamatória, além de fortalecer as evidências de relação da FBM com a via gabaérgica, vista a ligação do antagonista benzodiazepínico no site de ligação do GABA_AR.

Outra análise utilizada neste trabalho foi a expressão gênica dos receptores de Neurocinina (NK-1). A importância da Substância P como neurotransmissora, potencializadora da resposta inflamatória e de grande potencial algogênico já foi relatada por vários autores (Oh *et al.*, 2020; Chang *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2018; De Paula, 2017; Teodoro *et al.*, 2013). Portanto, a expressão gênica aumentada dos receptores de SP (receptores NK1R) nos tecidos analisados evidencia pouca efetividade do tratamento realizado sobre a SP presente no respectivo processo inflamatório. O inverso, ou seja, a diminuição dessa expressão denota maior efetividade do tratamento sobre este parâmetro, com conseqüente menor percepção de dor.

Como esperado, os níveis de receptores NK1R do grupo NT foram significativamente maiores que os do grupo CTL e FBM, mostrando efetividade da FBM na redução destes receptores. Os valores dos grupos DZP e FBM+DZP apresentaram-se semelhantes quantitativamente em relação ao grupo NT, corroborando os resultados da alodinia mecânica.

A tendência de redução da expressão de receptores NK-1 no grupo DZP comparado ao grupo NT, mesmo que não significativa, pode estar relacionado com a interferência destes receptores benzodiazepínicos periféricos à atividade anti-inflamatória (Lee *et al.*, 2020; Levashova & Myagkova, 2018; Tamayo-Cabeza *et al.*, 2017; De Lima *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2008, Papadopoulos *et al.*, 2006). Contudo, a reduzida ação no grupo DZP pode ter relação com a baixa concentração utilizada neste trabalho. O Diazepam foi utilizado previamente ao estímulo agressor e muitas vezes em dosagens maiores e por tempo prolongado, enquanto em nosso trabalho o DZP foi utilizado 30 minutos previamente ao ápice de dor definido pelo Curso Temporal, 8 horas após a indução da tendinite com colagenase.

O grupo FLU+FBM apresentou aumento na expressão dos receptores NK1 em relação ao grupo FBM, mostrando novamente existir alguma interferência do Flumazenil nos efeitos da FBM, porém sua meia-vida curta não permitiu maior diferença. Esse resultado parece corresponder com a resposta à alodinia desse grupo também ter sido levemente menor, porém significativa, em relação ao grupo FBM.

A expressão de receptores de Bradicinina (B1) também foram avaliados. Com relação aos receptores de Bradicinina B1, esta molécula faz parte da família das cininas vasoativas, e a ativação de seus receptores B1 e B2 induz a inflamação via liberação de citocinas inflamatórias e aumento da permeabilidade vascular, e desempenha importante papel na ocorrência da dor e sensibilização nociceptiva. Neste trabalho, dosamos a expressão gênica do receptor B1, induzido e regulado por quadros inflamatórios como o modelo experimental de tendinite ao qual nos propusemos (Oliveira Jr. *et al.*, 2016).

Apenas nos grupos NT e Diazepam os valores de expressão gênica dos receptores de Bradicinina B1 mostraram-se significativamente alterados, com maior produção de receptores B1 em relação ao grupo CTL. Esta maior expressão de receptor B1 correspondeu ao aumento da percepção de dor encontrada na alodinia, onde não foi encontrada diferença significativa entre estes 2 grupos (NT e DZP).

Por outro lado, todos os grupos que receberam alguma forma de tratamento tiveram a expressão de B1R reduzida, sendo que não houve significância no grupo DZP, ao contrário dos demais, que apresentaram diferença significativa em relação ao grupo NT. A terapia com fotobiomodulação (grupo FBM) reduziu significativamente a expressão gênica do B1R em relação ao grupo NT, como já foi comprovado em vários trabalhos anteriores (Pigatto *et al.*, 2019, 2017; De Oliveira *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2011; Manchini *et al.* 2014) correspondendo também à melhora na alodinia. Não houve diferença significativa entre os grupos onde a FBM agiu isolada ou associada a um fármaco (FBM+DZP e FLU+DZP), embora tenha ocorrido leve diferença entre os valores obtidos no grupo FLU+DZP em relação à FBM, diferença essa que não permitiu redução da percepção de dor na alodinia, pois este grupo (FLU+DZP) na alodinia teve semelhança com o grupo NT. Podemos concluir que nem o DZP nem o Flumazenil interferiram na ação da FBM sobre a expressão gênica do B1R e que a FBM age efetivamente na redução da expressão gênica de B1R, reduzindo seus valores à semelhança do grupo CTL.

Podemos inferir também que o fármaco Diazepam não reduziu a expressão do receptor B1, permanecendo no mesmo nível do grupo NT.

Quando se associou a ele o Flumazenil (grupo FLU+DZP), seu antagonista competitivo, observou-se diminuição da expressão de B1R, assim como no grupo FLU+FBM, ambos assemelhando-se ao grupo FBM nesse quesito. Essas diminuições da expressão de B1R nesses grupos (FLU+DZP e FLU+FBM) não foram suficientes, no entanto, para a redução da alodinia, visto que os valores permaneceram semelhantes ao grupo NT em todos eles, inclusive no grupo DZP. Hipóteses para este resultado envolvem a baixa dose utilizada de Diazepam, um BZD não seletivo, que por isso não permitiu ação anti-inflamatória e analgésica do mesmo (Zeilhofer *et al.*, 2018; Ralvenius *et al.*, 2015; De Lima *et al.*, 2010); outra hipótese seria o momento de administração do fármaco, no ápice da dor, permitindo sua ação por pouco tempo (30 minutos) até a medição final da alodinia (trabalhos como Monteiro *et al.*, 2008 e Lazzarini *et al.*, 2001, pré-medicaram com Diazepam antes da indução do dano, ao contrário de nosso experimento).

Nossos resultados apresentados até aqui direcionam para um efeito da FBM no mecanismo de ação GABA. Assim, foi realizada também a análise da expressão de receptores GABA α 1 e GABA α 2. Foi verificado um aumento da expressão gênica dos receptores GABA α 1 nos grupos NT e FBM, não significativa entre si, sugerindo que houve uma liberação importante de GABA endógeno, exigindo então seus receptores. Essa expressão foi semelhante ao grupo CTL nos demais grupos (FBM+DZP, FLU+DZP e FLU+FBM) e levemente significativa no grupo DZP. A redução de expressão do receptor GABA α 1 no grupo FBM+DZP em relação ao grupo FBM também foi observada e para explicá-la é necessário avaliar a expressão também do receptor GABA α 2. Neste segundo receptor, a associação da terapia farmacológica e não farmacológica aumentou a expressão do receptor GABA α 2. Neste caso, a presença do DZP poderia direcionar para sua atividade maior nestes receptores. Contudo, as informações sobre esta associação terapêutica ainda são escassas e merecem mais estudos relacionados tanto ao tempo de tratamento farmacológico, quanto a dose utilizada.

Por outro lado, a redução significativa de receptores no grupo FLU+FBM em relação ao grupo FBM sugere que o Flumazenil tenha se antagonizado com os receptores existentes e não houve necessidade de aumentar sua expressão. Essa interação pode ter colaborado com a menor

efetividade desse grupo (FLU+FBM) em relação à alodinia mecânica, visto que seus valores foram semelhantes na sensibilidade ao do grupo NT.

Para Reddy & Patt (1994) e Ralvenius *et al.* (2015), os BZN estão relacionados à melhora da dor relacionada à ansiedade e em doses menores, benzodiazepínicos como o Diazepam não induzem antihiperálgia significativa. O nosso trabalho mostrou sensibilidade dos receptores GABA α ₁ à fotobiomodulação, maior até que o Diazepam (em concordância com o que foi sinalizado por Ettcheto *et al.*, 2020; Zeilhofer *et al.*, 2018; Sigel & Steinmann, 2012; Johnston, 2005; Bateson, 2002), e seu antagonista gabaérgico Flumazenil.

A subunidade α ₁ dos receptores GABA_A são responsáveis pelos efeitos sedativos dos benzodiazepínicos e contribuem muito pouco ou quase nada com a analgesia (Ettcheto *et al.*, 2020; Zeilhofer *et al.*, 2019; Ralvenius *et al.*, 2015; Anseloni & Gold, 2008). Os resultados do nosso trabalho sugerem que a diminuição da sensibilidade dolorosa alcançada na alodinia pela terapia por fotobiomodulação possa ter sido em função do componente ansiolítico da experiência de dor provocada pela inflamação.

Na análise da expressão de receptores GABA α ₂, os resultados obtidos em nosso trabalho não mostraram ação efetiva da fotobiomodulação na expressão de receptores GABA α ₂, receptores estes que seriam os maiores responsáveis por estes efeitos, juntamente com os receptores do subtipo GABA α ₃. Estudos pré-clínicos mostraram que os BZD clássicos não-seletivos, como o Diazepam, são destituídos de eficácia analgésica porque somente quando a atividade em receptores GABA α ₁ é suficientemente reduzida podem altas doses necessárias para analgesia serem alcançadas, sem sedação (Zeilhofer *et al.*, 2019; Ralvenius *et al.*, 2015). A fotobiomodulação pareceu ter seletividade em relação ao receptor GABA α ₁, ao menos nas condições de medicação realizadas neste estudo.

Nossos resultados mostraram que a terapia por fotobiomodulação foi efetiva na redução da dor aguda e o mecanismo envolvido poreria não ser somente sua conhecida ação anti-inflamatório, mas parece que a FBM também age na expressão dos receptores GABA com determinada seletividade para o receptor GABA α ₁. O efeito analgésico da FBM ainda teria relação com outros

receptores de dor, como sobre a expressão de NK-1 e B1. A somatória destes efeitos mostra que a terapia por fotobiomodulação age sobre o processo doloroso em diversas vias, com ação anti-inflamatória e sedativa. No entanto, devido aos raros trabalhos que visem o entendimento deste mecanismo de ação da TFM, mais estudos são necessários. Além disso, seria importante entender os efeitos da associação destas duas terapias (Farmacológica e Fototerapia) na modulação do processo doloroso. Estudos com diferentes concentrações e tempos mais prolongados da associação do BZP com a FBM são necessários, considerando a característica lipofílica deste fármaco o que influencia em sua biodisponibilidade e ação, trazendo novas informações e consequentemente novos caminhos para o controle seguro da dor.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstraram que o modelo experimental de indução da tendinite por collagenase aumentou a percepção da sensibilidade dolorosa associada ao aumento da atividade de mieloperoxidase e expressão de receptores de Bradicinina B1, Neurocinina NK-1, GABA α 1 e GABA α 2.

A terapia por fotobiomodulação, nos parâmetros de irradiação 808nm; 3J; 100 mW foi eficaz na redução da dor, demonstrando efeitos na redução de MPO, da alodinia mecânica, na redução da expressão de receptores B1 e NK-1. Nossos resultados indicam que a terapia por fotobiomodulação apresenta um efeito seletivo sobre os receptores gabaérgicos, justificados pelo aumento da expressão de receptores GABA α 1 e redução dos receptores GABA α 2, somado ao fato da antagonização dos receptores GABA pelo uso do Flumazenil reduzir o efeito da FBM.

A associação das terapias farmacológicas com o uso do Diazepam e não farmacológica, utilizando laser com baixa intensidade promoveu a manutenção da alodinia, semelhante ao tratamento com fotobiomodulação.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pigatto GR, Coelho IS, Aquino RS, Bauermann LF, Santos ARS. Light-emitting diode phototherapy reduces nocifensive behavior induced by thermal and chemical noxious stimuli in mice: evidence for the involvement of capsaicin-sensitive central afferent fibers. *Mol Neurobiol*, 2017; (54):3205-3218. doi: 10.1007/s12035-016-9887-1.
2. Kopf A, Patel NB; International Association for Study of Pain. Guia para o tratamento da dor em contextos de poucos recursos. Cap.3 (p.9-13), Cap.49 (p.377-85), Seattle, 2010.
3. Challoumas D, Clifford C, Kirwan P, Millar NL. How does surgery compare to sham surgery or physiotherapy as a treatment for tendinopathy? A systematic review of randomised trials. *Open Sports Exerc Med*. 2019; 5: e000528. doi: 10.1136/bmjsem-2019-000528.
4. Lipman K, Wang C, Ting K, Soo C, Zheng Z. Tendinopathy: injury, repair, and current exploration. *Drug Des Devel Ther*. 2018; (12):591-603. doi: 10.2147/DDDT.S154660.
5. Snedeker JG, Foolen J. Tendon injury and repair - a perspective on the basic mechanisms of tendon disease and future clinical therapy. *Acta Biomater*. 2017; (63):18-36. doi: 10.1016/j.actbio.2017.08.032.
6. De Jesus JF, Spadacci-Morena DD, Rabelo NDA, Pinfieldi, CE, Fukuda TY, Plapler H. Low-level laser therapy in IL-1 β , COX-2, and PGE2 modulation in partially injured Achilles tendon. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(1):153-58. doi: 10.1007/s10103-014-1636-y.
7. Hong-Yun L, Ying-Hui H. Achilles tendinopathy: current concepts about the basic science and clinical treatments. *BioMed Res Int*. 2016: Article ID 6492597, 9 pages. doi.org/10.1155/2016/6492597.
8. Morita W, Dakin SG, Snelling SJB, Carr AJ. Cytokines in tendon disease. *Bone Joint Res*. 2017 December; 6(12): 656-54. doi: 10.1302/2046-3758.612.BJR-2017-0112.R1.

9. Luke AM, Mathew S, Altawash MM, Madan BM. Lasers: a review with their applications in oral medicine. *J Lasers Med Sci*. 2019 Fall; 10(4): 324-29. doi:10.15171/jlms.2019.52.
10. Akerzoul N, Chbicheb S. Low laser therapy as an effective treatment of recurrent aphthous ulcers: a clinical case reporting two locations. *Pan Afr Med J*. 2018; (30): 205. doi: 10.11604/pamj.2018.30.205.15779.
11. White PF, Zafereo J, Elvir-Lazo OL, Hernandez H. Treatment of drug-resistant fibromyalgia symptoms using high-intensity laser therapy: a case - based review. *Rheumatol Int*. 2018; (38): 517-23. doi.org/10.1007/s00296-017-3856-5.
12. Francio VT, Dima RS, Towery C, Davani S. Prolotherapy and low level laser therapy: a synergistic approach to pain management in chronic osteoarthritis. *Anesth Pain Med*. 2017 October; 7(5): e14470. doi: 10.5812/aapm.14470.
13. Cotler HB, Choe RT, Hamblin MR, Carroll J. The use of low level laser therapy (LLLT) for musculoskeletal pain. *MOJ Orthop Rheumatol*. 2015; 2(5). doi:10.15406/mojor.2015.02.00068.
14. Lins RDAU, Lucena KCR, Granville-Garcia AF, Dantas EM, Catão MHCV, Neto LGC. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol*. 2010; 85(6): 849-55. doi: 10.1590/S0365-05962010000600011.
15. Fallah A, Mirzaei A, Gutknecht N, Demneh AS. Clinical effectiveness of low-level laser treatment on peripheral somatosensory neuropathy. *Lasers Med Sci*. 2017; (32): 721-28. doi: 10.1007/s10103-016-2137-y.
16. Khiavi HÁ, Ebrahimi H, Najafi S, Nakisa M, Habibzadeh S, Khayamzadeh M, Kharazifard MJ. Efficacy of low-level laser, hard occlusal appliance and conventional pharmacotherapy in the management of myofascial pain dysfunction syndrome: a preliminary study. *J Lasers Med Sci*. 2020 Winter; 11(1):37-44. doi:10.15171/jlms.2020.07.
17. Friedman BW, Irizarry E, Solorzano C, Khankel N, Zapata J, Zias E, Gallagher EJ. Diazepam is no better than placebo when added to naproxen for acute low back pain. *Ann Emerg Med*. 2017 Aug; 70(2): 169-76. doi: 10.1010/j.annemergmed.2016.10.002.

18. Naloto DCC, Lopes FC, Barberato-Filho S, Lopes LC, Fiol FSD, Bergamaschi CC. Prescrição de benzodiazepínicos para adultos e idosos de um ambulatório de saúde mental. *Cien Saud Colet.* 2016; 21(4):1267-76; doi: 10.1590/1413-81232015214.10292015.
19. De Santana JM, Perissinotti DMN, Oliveira JO Jr, Correia LMF, Oliveira CM, Fonseca PRB. *BrJP.* São Paulo, 2020 jul-set;3(3):197-8. doi:10.5935/2595-0118.20200191.
20. Chang C, Jiang B, Chen C. Ion channels involved in substance P-mediated nociception and antinociception. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20:1596. doi: 10.3390/ijms20071596.
21. Rosas CMT, Ferreira NA, Silva ACM, Gonçalves ID, Paulino CA. Efeitos do diazepam e do estresse por isolamento social sobre a hipernocicepção em ratos Wistar. *Biológico*, 2006; 68: 262-66.
22. Levashova AI, Myagkova MA. Mechanism of action of anti-opioid peptides at pain syndrome. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* 2018 April; 67(4): 624-35. doi-org.ez345.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11172-018-2116-5.
23. Sousa MVP, Kawakubo M, Ferraresi C, Kaippert B, Yoshimura EM, Hamblin MR. Pain management using photobiomodulation: mechanisms, location, and repeatability quantified by pain threshold and neural biomarkers in mice. *J Biophotonics.* 2018 Jul;11(7): e201700370. doi: 10.1002/jbio.201700370.
24. Mizutani K, Musya Y, Wakae H, Kobayashi T, Tobe M, Taira K, Harada T. A clinical study on serum prostaglandin E₂ with low-laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2004; 22(6):537-539. doi:10.1089/pho.2004.22.537.
25. Ferreira DM, Zângaro RA, Villaverde AB, Cury Y, Frigo L, Picolo G, Longo I, Barbosa DG. Analgesic effect of He-Ne (632,8 nm) low-level laser therapy on acute inflammatory pain. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(2):177-81. doi-org.ez345.periodicos.capes.gov.br/10.1089/pho.2005.23.177
26. Micheli L, Mannelli LDC hh, Lucarini E, Cialdai F, Vignali L, Ghelardini C, Monici M. Photobiomodulation therapy by NIR laser in persistente pain: an analytical study in the rat. *Lasers Med Sci*, 2017; (32): 1835-1846. doi: 10.1007/s10103-017-2284-9.

27. Qaseem A, Wilt TJ, McLean RM, Forciea MA. Noninvasive treatments for acute, subacute, and chronic low back pain: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med.* 2017; 166:514-30. doi:10.7326/M16-2367.
28. Hopkins C, Fu SC, Chua, E, Hu X, Rolf C, Mattila VM, Qin L, Shu-Hang Yung P, Chan KM. Critical review on the socio-economic impact of tendinopathy. *Asia Pac J Sports Med Arthrosc Rehabil Technol.* 2016; (4):9–20. doi: 10.1016/j.asmart.2016.01.002.
29. World Health Organization. Compendium of innovative health technologies for low-resource settings: assistive devices, eHealth solutions, medical devices. 2014.
30. Puri NA, Flatow EL, Soslowky LJ. Tendon basic science: development, repair, regeneration, and healing. *J Orthop Res.* 2015 June; 33(6):780-4. doi: 10.1002/jor.22869.
31. Tang C, Chen Y, Huang J, Zhao K, Chen X, Yin Z, Heng BC, Chen W, Shen W. The roles of inflammatory mediators and immunocytes in tendinopathy. *J Orthop Translat.* 2018; (14):23-33. doi.org/10.1016/j.jot.2018.03.003.
32. Sugg KB, Lubardic J, Gumucio JP, Mendias CL. Changes in macrophage phenotype and induction of epithelial-to-mesenchymal transition genes following acute Achilles tenotomy and repair. *J Orthop Res.* 2014 July; 32(7):944-951. doi: 10.1002/jor.22624.
33. Rees JD, Stride M, Scott A. Tendons – time to revisit inflammation. *Br J Sports Med.* 2014; 48: 1553-57. doi: 10.1136/bjsports-2012-091957.
34. Marcos RL, Leal ECP Jr, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, Demeurie F, Magdalou J, Carvalho MHC, Lopes-Martins RAB. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinites in rats: analyses of biochemical and biochemical aspects. *J Orthop Res.* 2012; 30:1945-51. doi: 10.1002/jor.22156.
35. Khan KM, Cook JL, Maffulli N, Kannus P. Where is the pain coming from in tendinopathy? It may be biochemical, not only structural, in origin. *Br J Sports Med.* 2000;34(2):81–83. doi: 10.1136/bjism.34.2.81.

36. Lemme, NJ, Li NY, DeFroda SF, Kleiner J, Owens B. D. Epidemiology of Achilles tendon ruptures in the United States: athletic and nonathletic injuries from 2012 to 2016. *Orthop J Sports Med.*, 2018; 6(11): 1-7, 2325967118808238. doi:10.1177/2325967118808238.
37. Oh SY, Kim DK, Han SH, Lee HH, Jeong Y, Baek M, Kim H, Ahn W, Lee S. Sustained Exposure of substance P causes tendinopathy. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov; 21(22): 8633. doi.org/10.3390/ijms21228633.
38. De Paula FMS. Avaliação da expressão de substância P, receptores Nk1 e citotoxicidade em cultura de fibroblastos após o contato com cimentos endodônticos [Dissertação]. Piracicaba, SP: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas; 2017.
39. Teodoro FC, Tronco MF Jr, Zampronio AR, Martini AC, Rae GA, Chichorro JG. Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory and neuropathic orofacial pain models. *Neuropeptides.* 2013, June; 47(3): 199-206. doi.org/10.1016/j.npep.2012.10.005.
40. Nyman J, Guo N, Sandström A, Hallberg M, Nyberg F, Yu L. The amino-terminal heptapeptide of the algescic substance P provides analgesic effect in relieving chronic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2021 Feb; 892:173820. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173820.
41. Chen WN, Chen CC. Acid mediates a prolonged antinociception via substance P signaling in acid-induced chronic widespread pain. *Mol Pain.* 2014; 10:30. doi:10.1186/1744-8069-10-30.14.
42. De Oliveira Jr. JO, Portella Jr. CSA, Cohen CP. Inflammatory mediators of neuropathic pain. *Rev Dor.* 2016; 17(Suppl 1): S35-42. doi.org/10.5935/1806-0013.20160045
43. Silva MP, Bortone F, Silva MP, Araújo TR, Costa MS, Silva Jr JA. Inhibition of carrageenan-induced expression of tissue and plasma prekallikreins mRNA by lowlevel laser therapy in a rat paw edema model. *Rev Bras Fisioter.* 2011 Jan/Feb; 15(1):1-7.
44. Manchini MT, Serra AJ, Feliciano RS, Santana ET, Antônio EL, De Carvalho PTC, Montemor J, Crajoinas RO, Girardi ACC, Tucci PJF, Silva Jr JÁ.

Amelioration of cardiac function and activation of anti-inflammatory vasoactive peptides expression in the rat myocardium by low level laser therapy. *Plos One*. 2014 July;9(7): e101270. doi: 10.1371/journal.pone.0101270.

45. Pigatto GR, Silva CS, Parizotto NA. Photobiomodulation therapy reduces acute pain and inflammation in mice. *J Photochem Photobiol B*. 2019 Jul; 196: 1115113. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111513.

46. De Oliveira VLC, Silva JA Jr, Serra AJ, Pallotta RC, Da Silva EAP, Marques ACF, Feliciano RS, Marcos RL, Leal-Júnior ECP, Carvalho PTC. Photobiomodulation therapy in the modulation of inflammatory mediators and bradykinin receptors in a experimental model of acute osteoarthritis. *Lasers Med Sci*. 2017; 32: 87-94. doi: 10.1007/s10103-016-2089-2.

47. Pereira CC; Fonseca LFL, Santos MV, Rodrigues PHM, Borelli P. Avaliação da atividade da mieloperoxidase neutrofílica em bovinos da raça holandesa e sua correlação com níveis plasmáticos de ácido ascórbico. *R Bras Ci Vet*. 2000; 7(3): 148-52.

48. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982 Mar; 78(3): 206-9. doi: 10.1111/1523-1747.ep12506462.

49. Marcos RL. Efeito do Laser de Baixa Potência (810 nm) na Tendinite Induzida por Colagenase em Tendão Calcâneo de Ratos. [Doutorado]. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo, 2010.

50. Pallotta RC, Bjordal J, Frigo L, Leal ECP Jr, Teixeira S, Marcos RL, Ramos L, Messias FM, Lopes-Martins RAB. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci*. 2012; 27:71-8. doi: 10.1007/s10103-011-0906-1.

51. Borin FYY, Zarpelon AC, Ribeiro FAP, Fattori V, Alves JC Filho, Cunha FQ, Cunha TM, Casagrande R. Superoxide anion-induced pain and inflammation depends on TNF α /TNFR1 signaling in mice. *Neurosci Lett*. 2015 Sep;(605): 53-8. doi: 10.1016/j.neulet.2015.08.015.

52. Manchope MF, Calixto-Campos C, Coelho-Silva L, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Georgetti SR, Baracat MM, Casagrande R, Verri WA Jr. Naringenin inhibits superoxide anion-induced inflammatory pain: role of oxidative stress, cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-K_{ATP} channel signaling pathway. *Plos One*. 2016 April; 11(4): 1-20. doi: 10.1371/journal.pone.0153015.
53. Kuedo Z, Sangsuriyawong A, Klaypradit W, Tipmanee V, Chonpathompikunlert P. Effect of astaxanthin from *Litopenaeus vannamei* on carrageenan-induced edema and pain behavior in mice. *Molecules*. 2016; 21, 382. doi:10.3390/molecules21030382.
54. Carvalho RLP, Leal ECP Jr, Petrellis MC, Marcos RL, Carvalho MHC, Nucci G, Martins RABL. Effects of low-level laser therapy (LLLT) and diclofenac (topical and intramuscular) as single and combined therapy in experimental model of controlled muscle strain in rats. *Photochem Photobiol*. 2013; (89):508-12. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01236.
55. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg*. 2015 Apr;33(4):183-4. doi: 10.1089/pho.2015.9848.
56. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophysics*. 2017;4(3): 337-361. doi: 10.3934/biophy.2017.3.337.
57. Hamblin MR. Editorial: Photobiomodulation or low-level laser therapy. *J Biophotonics*. 2016 Dec;9(11-12):1122-1124. doi: 10.1002/jbio.201670113. 54.
58. Cabras M, Cafaro A, Gambino A, Broccoletti R, Romagnoli E, Marina D, Arduino PG. Laser photobiomodulation for a complex patient with severe hydroxyurea-induced oral ulcerations. *Case Rep Dent*. Volume 2016, Article ID 9810480, 4 pages. doi.org/10.1155/2016/9810480.
59. Yousefi M, Mansouri P, Partovikia M, Esmaili M, Younespur S, Hassani L. The effect of low level laser therapy on penphigus vulgaris lesions: a pilot study. *J Lasers Med Sci*. 2017; Autumn; 8(4): 177-180. doi: 10.15171/jlms.2017.32.

60. De Freitas LF, Hamblin MR. Proposed mechanisms of photobiomodulation low-level light therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. May-Jun 2016; 22(3):7000417. doi: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.
61. Alves ACA, Vieira RP, Leal ECP Jr, Santos AS, Ligeiro P, Albertini R, Silva JÁ Jr, Carvalho PTC. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R116. doi: 10.1186/ar4296.
62. Jose JA, Somaiah S, Shetty B, Reddy G, Roopa S. A comparative evaluation of interleukina 1 Beta and prostaglandin E2 with and without low-level therapy during *En masse* retraction. *Contemp Clin Dent*. 2009; (2): 267-75. doi: 10.4103/ccd.ccd_859_17.
63. Pereira FC, Parisi, JR, Maglioni CB, Machado, GB, Barragán-Iglesias P, Silva JRT, Silva ML. Antinociceptive effects of low level laser therapy at 3 and 8 J/cm² in a rat model of postoperative pain: possible role of endogenous opioids. *Lasers Surg Med*, 2017, nov; 49(9):844-51. doi: 10.1002 / lsm.22696.
64. Tomazoni SS, Leal ECP Jr, Pallota RC, Teixeira S, Almeida P, Martins RABL. Effects of photobiomodulation therapy, pharmacological therapy and physical exercise as single and/or combined treatment on the inflammatory response induced by experimental osteoarthritis. *Lasers Med Sci*. 2017; 32:101-8. doi: 10.1007/s10103-016-2091-8.
65. Kisselev SB, Moskvina SV. The use of laser therapy for patients with fibromyalgia: a critical literary review. *J Lasers Med Sci*. 2019 Winter;10(1):12-20. doi:10.15171/jlms.2019.02.
66. Khammas AH, Dawood MR, Kamil AS. Diode laser versus topical triamcilonolone acetonide agent in the pain reduction of minor recurrent aphthous stomatitis. *Mustansiriyah Med J*, 2019; 18: 92-96. doi: 10.4103/MJ.MJ_15_19.
67. Spanemberg JC, Figueiredo MAS, Cherubini K, Salum FG. Low-level laser therapy: a review of its applications in the management of oral mucosal disorders. *Alternative Therapies*, Nov/Dec 2016, 22(6):24-31.

68. Wu S, Chen Y, Zhang J, Chen W, Shao S, Shen H, Zhu L, Ye P, Swensson P, Wang K. Effect of low-level laser therapy on tooth-related pain and somatosensory function evoked by orthodontic treatment. *International Journal of Oral Science*. 2018; 10:22. doi: 10.1038/s41368-018-0023-0.
69. Gür A, Karakoc M, Kemal N, Cevik R, Sarac AJ, Ataoglu S. Effects of low power laser and low dose amitriptyline therapy on clinical symptoms and quality of life in fibromyalgia: a single-blind, placebo-controlled trial. *Rheumatol Int*. 2002; 22: 188-93. Doi: 10.1007/s00296-002-0221-z.
70. Naterstad IF, Rossi RP, Marcos RL, Parizzoto NA, Frigo L, Joensen J, Martins PSELL, Bjordal JM, Martins RABL. Comparison of photobiomodulation and anti-inflammatory drugs on tissue repair on collagenase-induced Achilles tendon inflammation in rats. *Photomed Laser Surg*. 2018; 36(3): 137-45. doi: 10.1089/pho.2017.4364.
71. Farhadi F, Eslami H, Majidi A, Fakhrzadeh V, Ghanizadeh M, KhademNeghad S. Evaluation of adjunctive effect of low-level laser therapy on pain, swelling and trismus after surgical removal of impacted lower third molar: a double blind randomized clinical trial. *Laser Ther*. 2017; 26(3): 181-187. doi: 10.5978/islsm.17-OR-13.
72. Ettcheto M, Olloquequi J, Sánchez-López E, Busquets O, Cano A, Manzine PR, Beas-Zarate C, Castro-Torres RD, Carcia ML, Bulló M, Auladell C, Folch J, Camins A. Benzodiazepines and related drugs as a risk factor in Alzheimer's disease dementia. *Front Aging Neurosci*. 2020 Jan; 11:344. doi: 10.3389/fnagi.2019.00344.
73. Seelhammer TG, DeGraff EM, Behrens TJ, Robinson JC, Selleck KL, Schroeder DR, Sprung J, Weingarten. O uso de flumazenil para depressão respiratória associada ao benzodiazepínico na recuperação pós-anestésica: riscos e resultados. *Rev Bras Anesthesiol*. 2018 Jul-Aug;68(4):329-35. doi: 10.1016/j.bjan.2017.12.012.
74. Lüscher BP, Baur R, Goeldener M, Sigel E. Influence of GABA_A receptor α subunit isoforms on the benzodiazepine binding site. *PLoS One*, 2012; 7(7), e42101. doi: 10.1371/journal.pone.0042101.

75. Bateson AN. Basic pharmacology mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal. *Curr Pharm Des.* 2002; 8: 5-21. doi: 10.2174/1381612023396681.
76. Hauer J, Houtrow AJ. Pain assessment and treatment in children with significant impairment of the central nervous system. *Pediatrics*, 2017; 139(6): e20171002. doi-org.ez345.periodicos.capes.gov.br/10.1542/peds.2017-1002.
77. Richtsmeler AJ, Barkin RL, Alexander M. Benzodiazepines for acute pain in children. *J Pain Symptom Manage.* 1992; 7: 492-495. [doi.org/10.1016/0885-3924\(92\)90136-6](https://doi.org/10.1016/0885-3924(92)90136-6).
78. Reddy S, Patt RB. The benzodiazepines as adjuvant analgesics. *J Pain Symptom Manage.* 1994; 9(8):510-514. [doi.org/10.1016/0885-3924\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0885-3924(94)90112-0).
79. Ralvenius WT, Benke D, Acuña MA, Rudolph U, Zeilhofer HU. Analgesia and unwanted benzodiazepine effects in point-mutated mice expressing only one benzodiazepine-sensitive GABA_A receptor subtype. *Nat Commun.* 2015 Apr; 13; 6: 6803. doi: 10.1038/ncomms7803.
80. De Lima CB, Sakai M, Latorre AO, Moreau RLM, Palermo J Neto. Effects of diferente doses and schedules of Diazepam treatment on lymphocyte parameters in rats. *Int Immunopharmacol.* 2010; 10(11):1335-43. doi: 10.1016/j.intimp.2010.08.015.
81. Monteiro DA, Carlos IZ, Pinto FG. Diazepam, em dose única, inibe a migração celular, a estimulação macrófágica e a atividade de TNF- α na reação inflamatória aguda induzida por LPS em camundongos. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2008 out-dez; 44(4): 613-620. dx.doi.org/10.1590/S1516-93322008000400007.
82. Johnston GAR. GABA_A receptor channel pharmacology. *Curr Pharm Des.* 2005; 11: 1867-85.21. doi: 10.2174/1381612054021024.
83. Sigel E, Steinmann ME. Structure, function, and modulation of GABA_A receptors. *J Biol Chem.* 2012; 287(48): 40224-31. doi: 10.1074/jbc.R112.386664.

84. Zeilhofer HU, Neumann E, Munro G. Spinal GABA_A receptors for pain control: back to the future? *Br J Anaesth*. 2019; 123(2):e176-179. doi: 10.1016/j.bja.2019.01.030.
85. Walters RJ, Hadley SH, Morris KDW, Amin J. Benzodiazepines act on GABA_A receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nat Neurosci*. 2000; 3(12): 1274-1281. doi: 10.1038/81800.
86. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen, Lacapère JJ, Lindemann P, Noremborg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M. Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci*. 2006 Aug;27(8):402-9. doi: 10.1016/j.tips.2006.06.005.
87. Lee Y, Park Y, Nam H, Lee JW, Yu SW. Translocator protein (TSPO): the new story of the old protein in neuroinflammation. *BMB Rep*. 2020 Jan; 53(1):20-27. doi: 10.5483/BMBRep.2020.53.1.273.
88. Tamayo-cabeza G, Madera-Anaya M, González-Martinez. El cáncer bucal y su relación con la proteína translocadora mitocondrial de 18 kda. *Rev CES Odont*. 2017; 30(1): 17-29. doi.org/10.21615/cesodon.30.1.2 ISSN 0120-971X.
89. Lazzarini R, Maiorka PC, Liu J, Papadopoulos V, Palermo J Neto. Diazepam effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats: role of nitric oxide. *Life Sci*. 2006 May 22;78(26):3027-34. doi: 10.1016/j.lfs.2005.11.032.
90. Sun Y, Chen Y, Pang C, Wu N, Li J. Acetazolamide attenuates chemical-stimulated but not thermal-stimulated acute pain in mice. *Acta Pharmacol Sin*. 2014; 35: 41-7. doi: 10.1038/aps.2013.149.
91. Anseloni VCZ, Gold MS. Inflammation-induced shift in the valence of spinal GABA-A receptor mediated modulation of nociception in the adult rat. *J Pain*. 2008 Aug; 9(8): 732–38. doi:10.1016/j.jpain.2008.03.004.
92. Gong F, Cui L, Zhang X, Zhan X, Gong X, Wen Y. Piperine ameliorates collagenase-induced Achilles tendon injury in the rat. *Connect Tissue Res*. 2018; 59(1):21–9. doi.org/10.1080/03008207.2017.1289188.

93. Chen L, Liu JP, Tang KL, Wang Q, Wang GD, Cai XH, Liu XM. Tendon derived stem cells promote platelet-rich plasma healing in collagenase-induced rat Achilles tendinopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2014; 34:2153-68. doi: 10.1159/000369659.
94. Solchaga LA, Bendele A, Shah V, Snel LB, Kestler HK, Dines JS, Hee CK. Comparison of the effect of intra-tendon applications of recombinant human platelet-derived growth factor-BB, platelet-rich plasma, steroids in a rat Achilles tendon collagenase model. *J Orthop Res*. 2014 Jan;32(1):145-50. doi: 10.1002/jor.22483.
95. Lazzarini R, Malucelli BE, Palermo Neto J. Reduction of acute inflammation in rats by Diazepam: role of peripheral benzodiazepine receptors and corticosterone. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2001; 23(2): 253–65. doi: 10.1081/iph-100103864.
96. Massoco CO, Palermo Neto, J. Diazepam effects on peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in balb/c mice. *Life Sci*. 1999 Oct; 65(20): 2157-65. doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00481-6.
97. Tabela de Doses para CEUA e Biotério. Universidade Federal de Alfenas (MG), 2018. <https://www.unifal-mg.edu.br/cebio/wp-content/uploads/sites/45/2018/06/TABELA-DE-DOSES-para-CEUA-e-BIOTERIO-250417.pdf>

ANEXOS

Anexo I: Certificado de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa.



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO EXPERIMENTAL DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO NA RESOLUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO E NO CONTROLE DA DOR EM MODELO DE TENDINITE INDUZIDA POR COLAGENASE", protocolada sob o CEUA nº 2322171019 (ID 000196), sob a responsabilidade de **Rodrigo Labat Marcos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 27/11/2019.

We certify that the proposal "EXPERIMENTAL STUDY OF PHOTOBIMODULATION THERAPY IN RESOLUTION OF THE INFLAMMATORY PROCESS AND CONTROL OF PAIN IN COLLAGENASE-INDUCED TENDINITE", utilizing 55 Heterogenics rats (55 males), protocol number CEUA 2322171019 (ID 000196), under the responsibility of **Rodrigo Labat Marcos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 11/27/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 11/2019 a 12/2022

Área: [Biotônica Aplicada Às Ciências da Saúde](#)

Origem: [Biotério - Unidade Vergueiro](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [3 a 6 meses](#)

N: [55](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [250 a 350 g](#)

Local do experimento: Laboratório de pós graduação 3 subsolo vergueiro Biotério Uninove Vergueiro

São Paulo, 27 de novembro de 2019

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho