

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da
Saúde

EFEITO DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE
MECANISMOS DE DOR EM MODELO EXPERIMENTAL DE
TENDINITE INDUZIDA POR COLAGENASE

Cristina Nunes Capelo

São Paulo
2022

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da
Saúde

Cristina Nunes Capelo

EFEITO DA TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE
MECANISMOS DE DOR, EM MODELO EXPERIMENTAL DE
TENDINITE INDUZIDA POR COLAGENASE

Defesa da Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação da
Universidade Nove de Julho para
obtenção do título de Doutora em
Biofotônica Aplicada às Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos

São Paulo
2022

Capelo, Cristina Nunes.

Efeito da terapia por fotobiomodulação sobre mecanismos de dor, em modelo experimental de tendinite induzida por colagenase. / Cristina Nunes Capelo. 2022.

81 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2022.

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

1. Dor. 2. Nocicepção. 3. Tendinopatias. 4. Fotobiomodulação. 5. Colagenase. 6. Opióide. 7. Naloxone.

I. Marcos, Rodrigo Labat, II. Título.

CDU 615.831

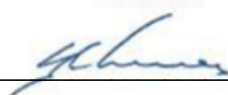
São Paulo, 19 de dezembro de 2022.

TERMO DE APROVAÇÃO

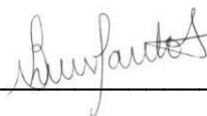
Aluno (a): Cristina Nunes Capeloa

Título da Tese: "Efeito da terapia por fotobiomodulação sobre mecanismos de dor em modelo experimental de tendinite induzida por collagenase".

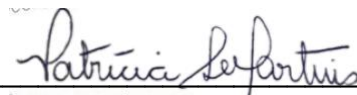
Presidente: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



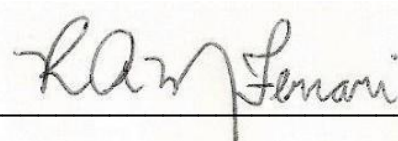
Membro: PROF^a. DR^a. ADRIANA LINO DOS SANTOS FRANCO



Membro: PROF^a. DR^a. PATRÍCIA SARDINHA LEONARDO LOPES MARTINS



Membro: PROF^a. DR^a. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI



Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ



***“Todos os nossos sonhos podem-se realizar, se tivermos a coragem de
persegui-los”***

Walt Disney

Agradecimentos

Agradeço imensamente à Deus, por ter me concedido saúde, força e disposição até o final do curso. Sem ele, nada disso seria possível.

Gratidão ao senhor por ter dado saúde aos meus familiares e tranquilizado o meu espírito nos momentos mais difíceis dessa minha trajetória.

Aos meus amados pais, Albano e Maria, que sonharam junto comigo, me incentivando e encorajando a chegar até o final.

Ao meu querido pai, que pela vontade de Deus não pode estar presente neste mundo para celebrar esse momento ímpar na minha vida acadêmica.

Aos meus queridos irmãos, pela alegria e força nos momentos mais difíceis para nossa família.

Aos meu esposo pela força e motivação

A minha amada filha, pela paciência, união e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos, pela paciência, amizade e ensinamentos. Por me inspirar, mostrar o caminho da pesquisa e me fazer acreditar que somos capazes de ir além. Eu não saberia o que sei hoje sem a sua ajuda.

Às minhas amigas Dra. Patrícia e Dra. Marília pela parceria, paciência e amizade.

A minha amiga Dra. Dominique pela parceria e amizade.

A todos os professores do programa de Biofotônica pelos ensinamentos e inspirações.

Aos técnicos do laboratório pela paciência e ensinamentos.

Às minhas amigas Andréia Sanhudo e Roberta Sudré pela amizade, parceria, força e motivação.

Às minhas queridas coordenadoras Adriana Jordão, Claudia Muniz, Fernanda Pitanga e Wilsa Cabral pela força, amizade, conselhos e motivação, sem vocês eu não teria conseguido.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACh Acetilcolina

AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais

AINEs – Anti-inflamatórios Não-Esteroidais ANOVA Análise de Variância

ANOVA - análise de variância

ANTOP – antagonista receptor opióide

AsGaAl - Arseneto de Gálio e Alumínio

AsGaAl Arseneto de Gálio-Alumínio

ATP Trifosfato de Adenosina

A δ – Fibras A delta

B1 - Receptor de Bradicinina 1

B2 - Receptor de Bradicinina 2

BK-Bradicinina

°C - Graus Celsius

CCO Citocromo C Oxidase

CGRP Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

Cm- Centímetro.

CM² - Centímetro quadrado

cm²- Centímetro quadrado.

COX Ciclooxygenase

CTL Grupo Controle

DE - Densidade de energia

DE Densidade de energia

DIC - Tendinite + anti-inflamatório

D_{max} - Descolamento máximo no momento da ruptura

DNA - complementar/

DP - Densidade de potência

DP Densidade de potência

ERO Espécies reativas de oxigênio

F_{max} - Força de ruptura máxima

I.M. – intramuscular

IL1- β - Interleucina-1 beta

J – Joule

J/cm² - Joules por centímetro quadrado

Kg – Kilograma

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LER – Lesão por esforço repetitivo

Mm – Milímetros

MPO – Mieloperoxidase

MS – Ministério da saúde

mW – MiliWatt

nm– Nanômetro

NT – Tendinite sem tratamento

°C – graus célsius

OP – Opióide

PBM Fotobiomodulação

PLA2 – fosfolipase A2

SNC Sistema Nervoso Central

SNP Sistema Nervoso Periférico

SP Substância P

SUS – Sistema único de saúde

TC Tendão Calcâneo

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

A Alfa

α -Ângulo de relação entre Fmax e Deslocamento (Rigidez secante)

β Beta

Δ Delta

λ - Comprimento de onda

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 – Nocicepção	15
Figura 2 - Mediadores implicados na sensibilização periférica	16
Figura 3 – Estrutura tendão.....	18
Figura 4 – Tendões de Membros inferiores	19
Figura 5 – Impacto no Tendão calcâneo	20
Figura 6 – Inflamação do tendão	22
Figura 7 – Grupos Experimentais	41
Figura 8 – Curso temporal	40
Figura 9 – Avaliação alodinia	46
Figura 10 – Gráfico 1. Alodinia mecânica após indução tendinite.....	49
Figura 11. Gráfico dos Níveis de MPO em tendões calcâneos de ratos com tendinite induzida.....	50
Figura 12 - Gráfico da quantificação de Colágeno Total em lâminas histológicas coradas com <i>Picrosirius</i>	51
Figura 13 - Gráfico da quantificação de Colágeno Tipo I em lâminas histológicas coradas com <i>Picrosirius</i>	52
Figura 14 - Fotomicroscopia do tendão calcâneo de ratos saudáveis	49
Figura 15 - Fotomicroscopia do tendão calcâneo de ratos com tendinite (grupo NT).....	53
Figura 16 - Microscopia do tendão do grupo Grupo PBM.	55
Figura 17 - Microscopia do tendão do Grupo Op	56
Figura 18 - Microscopia do tendão do Grupo PMB+Op.....	57
Figura 19 - Microscopia do tendão do grupo controle Grupo NL + PBM.....	58
Figura 20 - Microscopia do tendão corado com picrosirius. dos grupos CLT (A) NT (B) PBM (C) Op (D) PMB+Op (E) NL+PBM (F).....	60
Figura 21 Microscopia do tendão corado com picrosirius e polarizado dos grupos CLT, NT, PBM, Op, PBM+ Op e NL+PBM. (Objetiva 40X). Corte longitudinal	62
Tabela 1 – Principais efeitos colaterais dos opióides	33
Tabela 2 - Parâmetros dosimétricos da PBM	43

RESUMO

As dores ocasionadas pelas tendinopatias são frequentes e difíceis de serem tratadas, porém, existem diversas terapias para atenuar esse sintoma, onde hoje, a principal é a farmacológica, com o uso de anti-inflamatórios e opióides, dependendo no nível da dor, porém, com conhecidos efeitos adversos no seu uso prolongado. O uso da fotobiomodulação na modulação da dor é uma técnica promissora por apresentar efeitos positivos no controle da dor, sem os efeitos adversos observados com o uso da terapia farmacológica. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o efeito da terapia por fotobiomodulação isolada e associada aos opióides na tolerância a dor, em modelo experimental de tendinite induzida por Colagenase. **Metodologia:** Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 300 e 400g, provenientes do Biotério da UNINOVE Comitê de ética N 23222117019. Os animais foram randomizados e distribuídos em 6 grupos, a saber: Controle, com tendão saudável (CTL) ou com tendinite induzida, sem tratamento (NT); tendinite tratado com Fotobiomodulação (808nm, 3J, 100 mW) (PBM), tendinite tratado com Cloridrato de Tramadol (Op); Tendinite tratado com fotobiomodulação + cloridrato de Tramadol (PBM+Op) e tendinite tratado com Naloxone e fotobiomodulação(NL+PBM). Os animais foram anestesiados e a tendinite foi induzida com injeção transcutânea sobre o tendão calcâneo de Colagenase (100µg/animal). Após a indução da tendinite e dos diversos tratamentos, foi avaliada a alodinia mecânica e então os animais foram eutanasiados e amostras de sangue e tendão recuperadas para análises histológicas e da atividade de MPO. **Resultados:** Foi observado que os animais com tendinite e sem tratamento reduziram a tolerância à dor, bem como aumentaram a presença de infiltrado inflamatório no tecido tendíneo, associado com o aumento da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO), além de reduzir a proporção de colágeno. O grupo tratado com PBM promoveu aumento da tolerância a dor, além de controlar os níveis de MPO e a manutenção de colágeno próximo ao grupo saudável (CTL). Da mesma forma, o grupo tratado com Opióide aumentou a tolerância à dor, porém, sem contribuir para a manutenção dos níveis de MPO ou para a proporção de colágeno. A associação da PBM com Opióide, além de aumentar a tolerância à dor, também reduziu os níveis de MPO e manteve a proporção de colágeno próximo ao grupo saudável. Por fim, os animais que foram pré-tratados com Naloxona, um antagonista opióide e após 15 minutos receberam a PBM, apresentaram redução da tolerância a dor, aumento tanto nos níveis de MPO e

redução da proporção de colágeno **Conclusão:** O tratamento com PBM associada ou não com tratamento opióide promoveu ação analgésica e manteve a proporção de colágeno durante o processo inflamatório induzido. O efeito analgésico da PBM foi reduzido quando utilizado antagonista opióide (Naloxona), sugerindo que a PBM pode ter ação sobre mecanismo opióide, no controle da dor.

Palavras-chave: Dor, Nocicepção, tendinopatias, fotobiomodulação, Colagenase, Opióide e Naloxone.

ABSTRACT

Pain generated by tendinopathies is frequent and difficult to treat, but there are several therapies to alleviate this symptom, today, the most used is anti-inflammatory and when the pain is very intense and disabling, patients are treated with opioids. These drugs are used more frequently because they provide quick but momentary pain relief, presenting a risk due to their adverse effects, causing severe signs and symptoms, even irreversible effects on the individual's health. Therapy with Photobiomodulation appears to be a promising therapy for pain modulation, because until now, no adverse effects have been observed when compared to anti-inflammatories and opioids. The search for new therapies for the treatment of pain assumes a prominent role in the health area. The aim of this study was to evaluate and compare the effect of photobiomodulation therapy alone and associated with opioids on the pain process, in an experimental model of collagenase-induced tendinitis. Methodology: Male Wistar rats weighing between 300 and 400g, from the vivarium at UNINOVE Ethics Committee N 23222117019, were used. The animals were separated into groups: Control, with healthy tendon (CTL), Untreated tendinitis group (NT) Group treated with Photobiomodulation (808nm, 3J, 100 mW) (PBM), group treated with Tramadol Hydrochloride (Op), group treated with photobiomodulation + Tramadol hydrochloride (PBM+Op) and group treated with Naloxone and photobiomodulation (NL+PBM). For tendinitis induction, the animals in the groups were anesthetized and received a transcutaneous injection of Collagenase (100µg/animal) in the posterior region of the right and left paw, in the Achilles tendon. Eight hours after tendinitis induction, mechanical allodynia was assessed using the Radal Selito method and euthanasia was performed to remove the tendons for analysis, histology to check for inflammatory infiltrate and type I collagen; mechanical allodynia and MPO activity. Results: Treatment with PBM reduced MPO activity and maintained high collagen type I values. In mechanical allodynia, the group treated with PBM showed high pain resistance with values similar to the PBM + Op groups. The Op-treated group increased MPO activities and reduced type I collagen values. In mechanical allodynia, it showed a slight decrease in pain resistance when compared to the PBM and PBM + Op groups. The PBM + Op group showed similar values in mechanical allodynia to the PBM group, a decrease in MPO activity when compared to the Op group and a decrease in type I collagen. The NL + PBM group showed a decrease in pain resistance, becoming similar to the group NT and increased MPO activity. Type I collagen

showed increased values when compared to the Op and PMB + Op groups. Conclusion: Our results showed that photobiomodulation had analgesic actions similar to opioids, in addition to decreasing MPO activity and preserving type I collagen in the tendon, suggesting a protective action.

Keywords: Pain, Nociception, tendinopathies, photobiomodulation, Collagenase, Opioid and Naloxone.

SUMÁRIO

1	Contextualização.....	15
1.1	Dor	15
1.2	Receptores Opióides	18
1.3	Tendão	19
1.4	Tendinite	21
1.5	Colágeno	23
1.6	Processo inflamatório	24
1.7	Mediadores inflamatório	25
1.8	Mieloperoxidase	28
1.9	Tratamentos.....	29
1.10	Opióide	30
1.11	Cloridrato de Tramadol	31
1.12	Cloridrato de Naloxona	33
1.13	Fotobiomodulação	34
2-	Justificativa.....	37
3-	Hipótese.....	38
4-	Objetivos.....	39
5-	Materiais e métodos	40
5.1	Animais.....	41
5.2	Indução da Inflamação.....	41
5.3-	Grupos Experimentais.....	42
5.4-	Aplicação da Terapia cm Fotobiomodulação.....	43
5.5	Terapia medicamentosa: Cloridrato de Tramadol	44
5.6	Terapia medicamentosa: Cloridrato de Naloxona	44
5.7	Terapia Associada	44
5.8	Análise de alodinia mecânica.....	45
5.9	Preparação Histológica das Amostras.....	47
5.10	Análise da atividade de Mieloperoxidase (MPO)	47
5.11-	Análise Estatística.....	48

6- Resultados	49
7 – Discussão	63
8 - Conclusão	71
9 – Referencias Bibliográficas	73

1- Contextualização

1.1- Dor

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial. A sensação dolorosa tem um papel importante para o organismo pois é um sinal de alerta para percepção de que algo está ameaçando a integridade física do organismo.¹

Em 1996 houve a necessidade de que a sensação álgica fosse reconhecida como o quinto sinal vital, por se tratar de um sintoma importante na detecção de alguma anormalidade na saúde de um indivíduo. Os profissionais de saúde identificam e tratam a dor como os outros sinais vitais, abordando e promovendo o tratamento adequado da patologia e fornecendo conforto ao paciente.^{1,2}

Entre as diversas funções do sistema nervoso, uma delas é fornecer informações importantes sobre lesões que são expressas por sensações álgicas, denominada como nocicepção.² A dor é dividida em duas grandes classes: a dor nociceptivas, que é resultante da ativação direta dos nociceptores em resposta a danos teciduais e a dor neuropática que é o resultado de uma lesão direta do sistema nervoso periférico ou central.⁴

Quando ocorre uma lesão tecidual, são liberadas substâncias que promovem o processo inflamatório. Tais substâncias estimulam terminações nervosas livres que estão próximas a essa lesão. O reconhecimento e interpretação do estímulo doloroso envolvem processos chamados de transdução, transmissão e modulação denominando a nocicepção.³

Os neurônios sensitivos são do tipo pseudo-unipolar, com o corpo celular localizado nos gânglios das raízes dorsais de onde partem duas fibras: uma para periferia formando as terminações nervosas livres, os nociceptores e, a fibra emergente proximal, do corpo celular que penetra na raiz dorsal da medula.²⁵

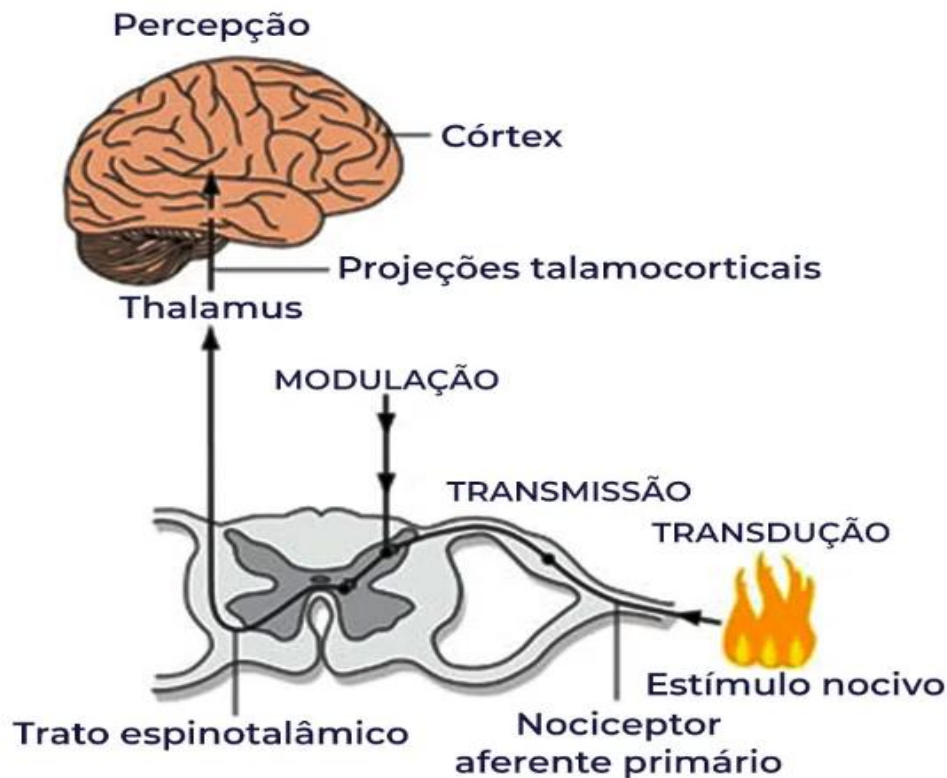


Figura 1. Nocicepção – Fonte: <https://questoesdefisiocomentadas.wordpress.com/tag/dor-nociceptiva/>

Os nociceptores são terminações nervosas livres que compõem os neurônios, cuja função é preservar a homeostasia tecidual e identificar uma lesão tecidual. A captação do estímulo doloroso está organizada em uma cadeia de três neurônios: O de primeira ordem que se origina na periferia e projeta-se para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem, que ascende pela medula espinhal e o neurônio de terceira ordem, projeta-se para o córtex cerebral.²⁶

Os neurônios de primeira ordem são classificados em três grandes grupos devido ao diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução. As fibras são denominadas como A β (beta), A δ (delta) e Fibras C. Fibras A δ (aferentes mielinizadas de baixo calibre) desencadeando a dor rápida e reflexo de retirada frente ao estímulo doloroso e Fibras C, (aferente amielinizada) desencadeando a dor lenta e mal localizada. Os estímulos

nociceptivos são transformados em potencial de ação no receptor de dor no nervo periférico sensitivo e propagado ao sistema nervoso central (SNC), para então ocorrer sua integração cortical e interpretado como dor. Quando os receptores sofrem alterações em sua membrana, abrindo os canais de sódio, despolariza a membrana celular e deflagra o estímulo e promove a sua propagação. Os nociceptores são sensibilizados por substâncias algio gênicas liberados pelas células lesionadas que compreende em mediadores químicos incluindo substância P ²⁹

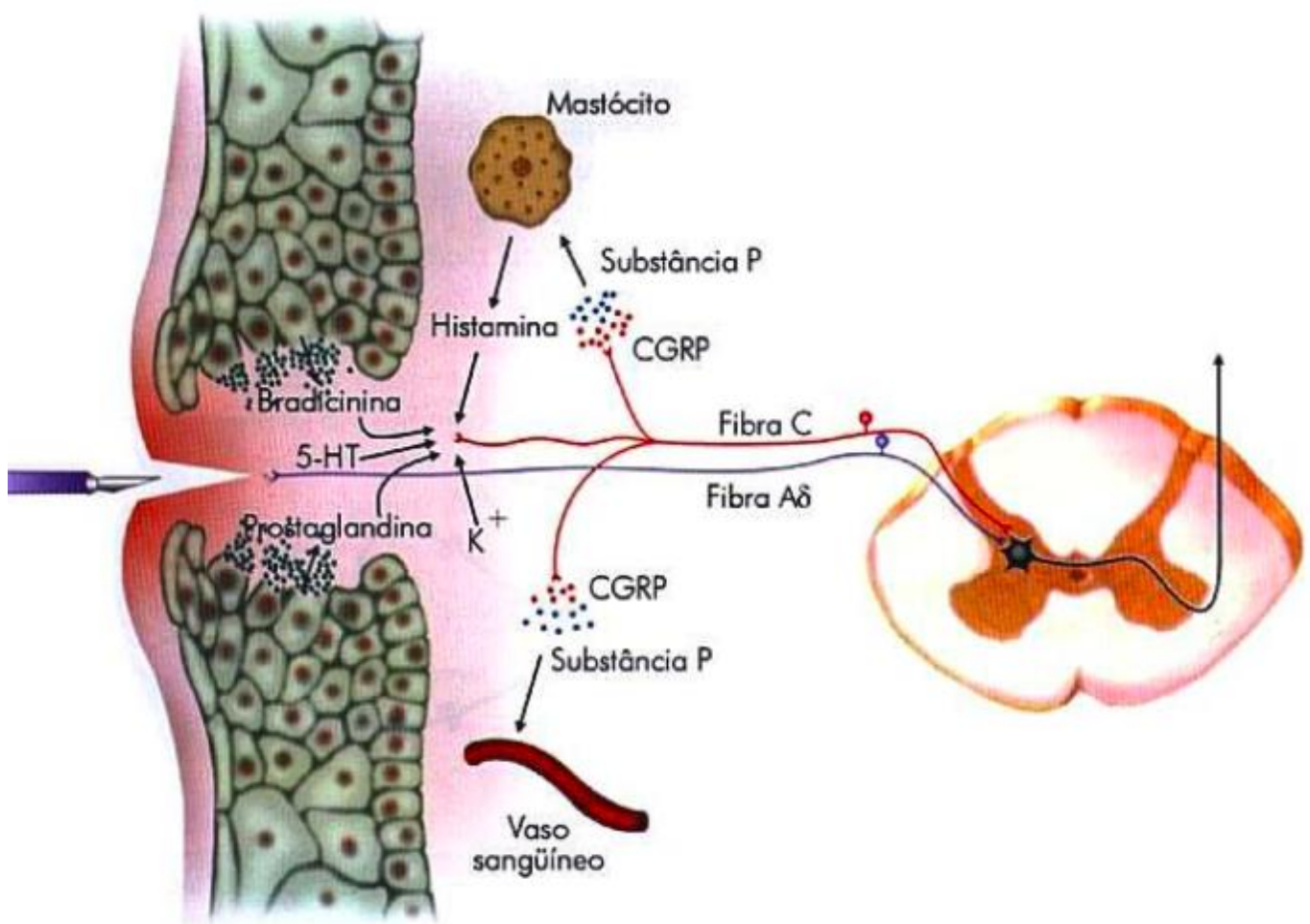


Figura 2 – Mediadores implicados na sensibilização periférica resultante da inflamação.
Puves et al. Neurociências 4^a edição. Artmed, 2010.

1.2- Receptores Opióides

Os receptores de peptídeos opióides estão distribuídos por todo SNC, incluindo o hipocampo uma das áreas cerebrais de grande importância no processo de memória, respostas ao estresse e recompensa. Essas áreas estão correlacionadas com a percepção do estímulo alérgico, modulação de comportamento, regulação do sistema nervoso autônomo e funções neurodegenerativas, inibindo de maneira direta a transmissão ascendente das informações nociceptivas provenientes do corno dorsal da medula espinhal, suprimindo as respostas nociceptivas na periferia na medula espinhal e no cérebro. São três tipos de receptores opióides: μ (μ), delta (δ) e Kappa (K) sendo todos eles acoplados à proteína G. Os peptídeos opióides são neurotransmissores e neuromoduladores naturais da dor constituído o sistema de controle endógeno que constituem em três grupos: Enkefalinas seletivas para os receptores delta, dinorfinas, seletivas para os receptores tipo kappa e as endorfinas a qual possuem uma grande afinidade para os receptores delta e μ e baixa afinidade para os receptores kappa.⁴⁹ O sistema de modulação opióides não é exclusivamente central, esse sistema apresenta componentes periféricos e foram encontrados em macrófagos, mastócitos e nas fibras sensitivas que inervam os nociceptores.⁴⁸

Acredita-se que o efeito analgésico dos opióides na dor inflamatória seja desenvolvido pela ativação dos receptores μ k δ , no processo inflamatório e é liberado diversas substâncias, dentre elas, as prostaglandinas, que ativam a adenilciclase via proteína G causando uma sensibilização do nociceptor. A ativação dos receptores interrompe esse processo pela ativação da proteína G inibitória, prevenindo a sensibilização de nociceptores. Estudos elucidam que os receptores MOR que medeiam a analgesia periférica estejam situados em neurônios simpáticos e impeçam a liberação de mediadores tóxicos, essas observações justificam os efeitos positivos na administração de morfina intra-articular no pós-operatório de cirurgias ortopédicas⁴⁴. Os Inter neurônios que expressam as Enkefalinas e as dinorfinas inibem pré-sinápticamente a liberação de glutamato e substância P, a partir do aferente nociceptivas primário interagindo com os receptores μ k δ .⁴⁹

A via inibitória descendente provavelmente é um local importante de ação para analgésicos opióides. A área cinzenta periaquedutal (CPA) é particularmente rica em neurônios contendo Enkefalinas. Os Inter neurônios no corno dorsal liberam GABA que inibe a transmissão pelos terminais primários aferentes. Uma outra via conhecida é a noradrenérgica, que apresenta efeito inibitório semelhante sobre a transmissão no corno dorsal, surpreendentemente, os opióides inibem esta via em vez de ativá-la. ⁷⁶

Após a descoberta e caracterização anatômica e bioquímica do sistema endógeno na modulação da dor, surgiram inúmeras investigações na tentativa de esclarecer a farmacologia deste importante sistema de modulação da dor, visando principalmente o emprego de novos fármacos de maior seletividade e potencialidade analgésica e os opióides estão nesse grupo com grande expansão até os dias atuais ⁴⁹.

1.3- Tendão

São estruturas anatômicas interpostas entre os músculos e ossos formados por tecido conjuntivo, fibras de colágeno do tipo I, se entrelaçam para permitir às forças geradas pelos músculos para os ossos, tornando possível a movimentação articular. ⁷⁵

Compostos por tecidos conectivos e constituídos de fibras de colágeno, células e matriz extracelular, uma substância rica em proteoglicana, essas estruturas permitem que os tendões resistam e transmitem grandes forças entre os músculos e os ossos, mas são propensos a lesões agudas e crônicas devido a movimentos bruscos e repetitivos ⁷¹.

Quando os tendões são lesionados, o corpo inicia um processo de reparação envolvendo as fases de inflamação, proliferação e remodelamento. A Inflamação inicia-se imediatamente após a lesão, sendo uma resposta natural do organismo por responder ao trauma lesivo e é um pré-requisito para que o reparo se inicie. Esse processo ativa mediadores no local da lesão, entre tantas, as cininas que provocam os cinco sinais cardinais da inflamação que são, dor, rubor, calor e edema, além de estimular a produção de prostaglandinas que está intimamente ligada à dor. ⁷²

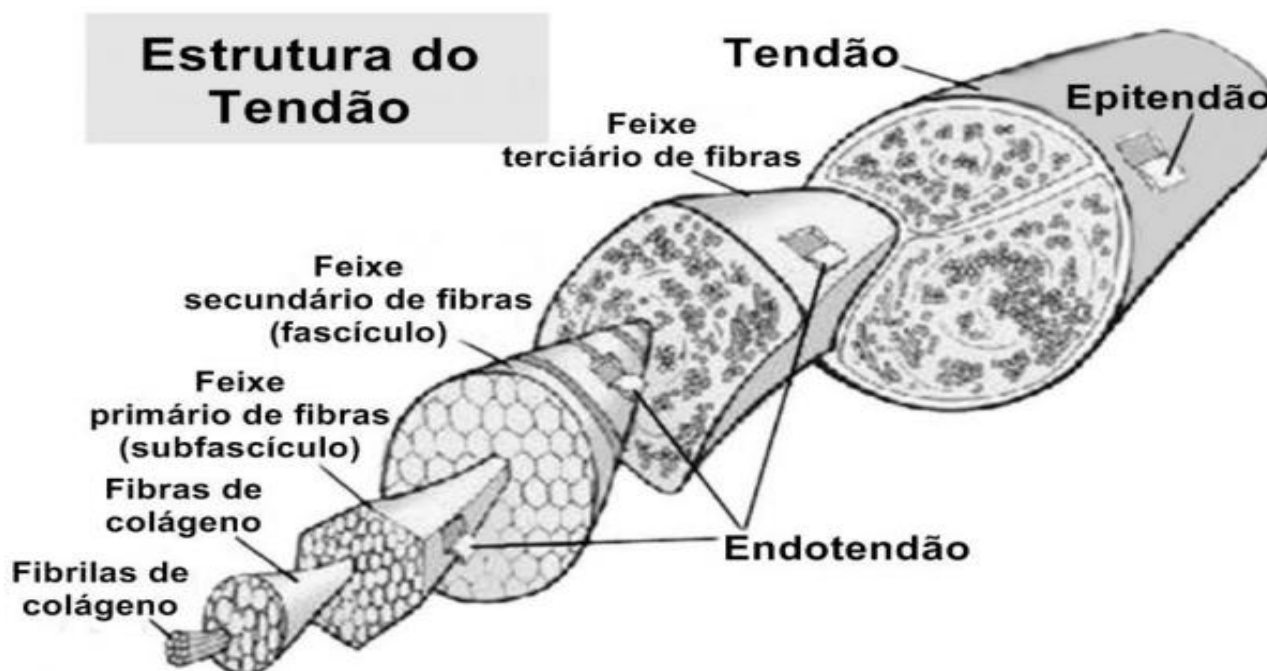


Figura 3 – Estrutura do tendão. Fonte: SHARMA, MAFFULLI. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. The Journal of Bone & Joint Surgery, v. 87A, n. 1, p. 187-202, 2005b.

As tendinopatias têm sido consideradas um grande problema de saúde pública na maioria dos países industrializados, estatísticas dos serviços de saúde públicos e privados no Brasil comprovam que as lesões por esforços repetitivos (LER) estão em um lugar de destaque entre a demanda da população. O crescimento dos atendimentos a pacientes com LER, está relacionado com a dor e tem sido pauta do ministério da saúde. Em 2002 o Ministério da Saúde (MS) instituiu no âmbito do sistema único de saúde (SUS) o programa nacional da assistência à dor e cuidados paliativos, através da portaria GM /MS n 19 de 3 de janeiro de 2002 e relata que de 75 a 80 % dos atendimentos nos hospitais são de origens álgicas, além de ser a principal causa de elevação de absenteísmo nas empresas, licenças médicas prolongadas, aposentadorias por doenças crônicas, indenizações trabalhistas e baixa produtividade.⁷³

A procura do tratamento está relacionada a dor limitante que a tendinite causa e os principais fármacos administrados são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e em

casos mais intensos os opióides, porém seus efeitos adversos são preocupantes podendo causar problemas irreversíveis a saúde do indivíduo.⁷⁴

A Fotobiomodulação por ser uma terapia não invasiva está em evidência em muitos estudos devido a modulação da dor, no entanto não existem muitos trabalhos que elucidam as vias analgésicas que proporcionam o alívio da dor rápida.⁷⁵

1.4- Tendinite

A tendinite, uma das causas de tendinopatia é uma alteração na saúde do tendão devido ao um processo inflamatório agudo, geralmente frequentes e difíceis de serem tratadas, especialmente quando consideramos o tendão calcâneo, o patelar e o do cotovelo onde a cronificação destas doenças é comum, incapacitando desde atletas até pessoas que exercem atividades laborais de repetição. ²⁶



Figura 4 – Tendões de Membros inferiores- <https://drfernandooliveira.com.br/ruptura-do-tendao-de-aquiles/>

Além da sobrecarga mecânica podem ocorrer processos lesivos repentinos, assim como o próprio envelhecimento natural que também contribuem para a degeneração do tendão.¹⁷

No caso da tendinite, a causa mais comum é o esforço exagerado de extensão sobre os tendões, responsável por 30% das lesões⁸, podendo ocorrer também a distensão das fibras de colágeno, que por não suportarem a tração mecânica, acabam apresentando rupturas parciais com desenvolvendo de intensa e dolorosa reação inflamatória local, contribuindo para a degradação de colágeno e outras deficiências teciduais, que se não forem tratadas leva ao estado crônico da doença.¹⁷

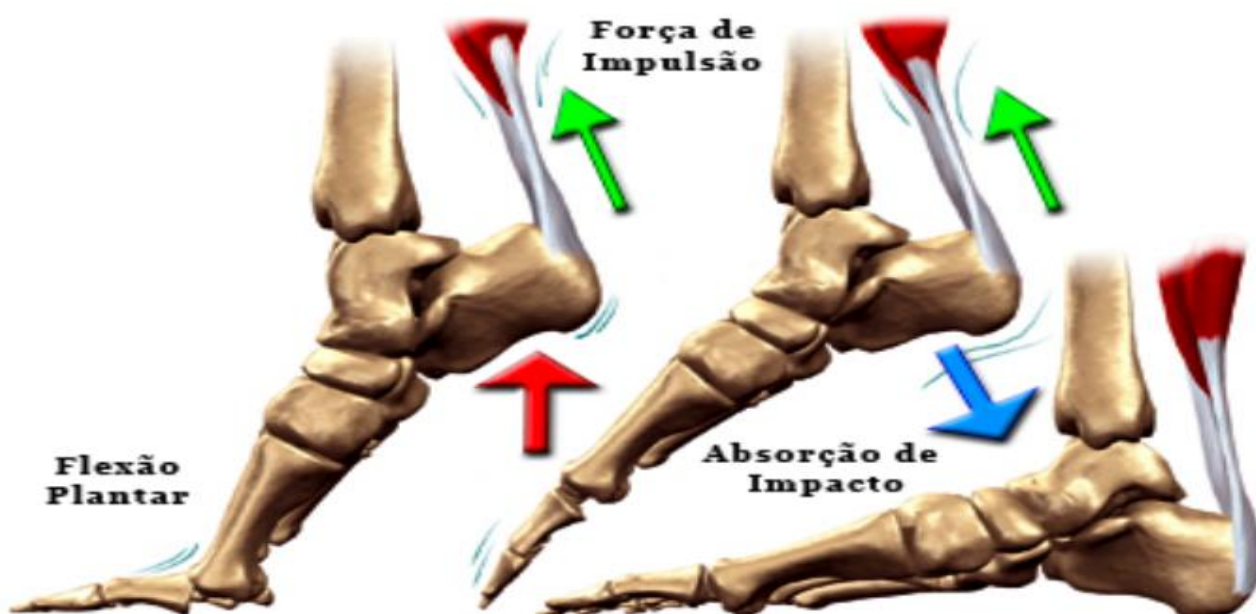


Figura 5: Impacto no Tendão calcâneo. <https://www.clinicaecirurgiadope.com.br/artigo?c=13>

Com o processo inflamatório crônico, ocorre o remodelamento da bainha tendínea e do tecido sinovial, enchendo o espaço sinovial de células inflamatórias, essas alterações no tecido conduzem a um distúrbio maciço do tendão reduzindo sua funcionalidade além de potencializar a migração do processo inflamatório para estruturas vizinhas, como ossos e cartilagens iniciando um quadro pré-artrítico.³⁵

O desenvolvimento de novos tratamentos e terapias para a tendinopatia são tão importantes quanto a prevenção da doença e existe a necessidade de definir inteiramente a etiologia da patologia do tendão.³⁵

1.5- Colágeno

O colágeno é uma proteína que constitui a matriz extracelular do tecido conjuntivo. Suas fibras organizadas de característica insolúvel proporcionam maior força tênsil dando-lhe a maior função principal de tensor dos tecidos conjuntivos. Compõe cerca de 25 a 30% das proteínas de um organismo e seu desenvolvimento começa no período embrionário.¹¹

Uma das funções dos fibroblastos presente no tendão, é a sintetização de colágeno, através da cadeia polipeptídica individuais, chamadas de pró colágeno, essas moléculas precursoras, após a sua liberação para o meio extracelular, passam por um processo de clivagem através da interação com as enzimas de Colagenase, formando moléculas de colágeno. Essas moléculas se polimerizam formando as fibrilas e conseqüentemente se agregam formando as fibras de colágeno. As fibrilas de colágeno são longas e cristalinas e em tendões, as fibrilas e fibras são altamente alinhadas, o que confere alta resistência mecânica para forças de tração.¹²

O colágeno do tipo I é a forma predominante nos tendões e representa cerca de 90% dos colágenos existentes nos seres vivos. Sua arquitetura de fibrilas estriadas agrupadas com fibras de colágeno favorece a resistência e capacidade tênsil.¹⁰

O colágeno do tipo III é denominado de fibrilas reticulares onde sua maior função é a de sustentação de órgãos expansíveis, como, por exemplo os vasos sanguíneos e o sistema gastrointestinal, devido a sua característica mais fina e menor proporção tênsil. No processo de cicatrização é esse tipo de colágeno que podemos encontrar com maior proporção sendo de extrema importância na recuperação de feridas cirúrgicas.¹³

A distribuição dos tipos de colágeno em um tecido depende da especificidade e do tamanho das fibrilas de colágeno composto nesse tecido. Nos tendões os colágenos mais predominantes são do tipo I e tipo III, sendo o do tipo I em maior quantidade.¹⁵

O tendão, após uma lesão, apresenta alterações na sua propriedade mecânica devido à degradação do colágeno presente no tecido. O processo de reparação torna-se o principal objetivo para que as funções sejam recuperadas. O remodelamento da matriz é um fator importante para a restauração da função tênsil deste tendão.¹³

A degradação do colágeno se torna possível devido à ação de mediadores químicos presentes no processo inflamatório. Esse processo é mediado pela Colagenase específica e sérica controladas por células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos.¹²

No processo de reparo tecidual do tendão os colágenos do tipo I e III são sintetizados para promover tal fenômeno. As fibras de colágeno do tipo III por serem finas e extensíveis possuem uma habilidade mais rápida de ligações transversais durante o processo de cicatrização promovendo assim uma estabilização no local da lesão, porém pode causar uma diminuição na resistência à tração do tecido. Durante o processo de cicatrização o colágeno do tipo III é substituído pelo colágeno do tipo I, devolvendo ao tendão sua característica tênsil, porém essa transição entre os colágenos influencia a característica do tendão.¹¹

1.6- Processo Inflamatório no Tendão

Em geral, a resposta inflamatória visa combater o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular, promovendo condições ideais para o reparo do tecido lesionado¹⁵ e os tendões apresentam maiores risco de ruptura, quando uma força é aplicada de forma rápida e indireta, como exemplo, as contrações musculares, durante o exercício excêntrico.⁷ Estas rupturas resulta em hemorragia de arteríolas e capilares locais e formação de hematoma no seu interior, podendo estender-se para o paratendão. O resultado imediato é a deposição de fibrina, que atrai neutrófilos para a região, a congestão e acúmulo de fluidos no local da agressão levando a uma isquemia tecidual e morte celular progredindo para uma necrose tecidual, de acordo com o grau de comprometimento vascular.¹³

O processo inflamatório nestes tecidos tem gerado controvérsias devido a sua atipicidade relacionada à baixa vascularização dos tendões. Na porção central do tendão, grandes vasos formam plexos vasculares menores atingindo as bainhas sinoviais e fornecendo suprimento sanguíneo para o epitendão, mesotendão e endotendão.²⁹ No entanto, existem algumas regiões do tendão onde este suprimento é comprometido. Assim, determinados fatores, tais como, o envelhecimento associado à presença de cargas mecânicas pode comprometer ainda mais este suprimento, reduzindo em até 20% o fluxo sanguíneo no tendão.¹³

Inflamação do Tendão de Aquiles



Figura 6 –<https://www.centraldafisioterapia.com.br/tratamentos/fisioterapia-desportiva-tendinite-de-aquiles/> - Imagem do Tendão Inflamado.

O recrutamento de células fagocitárias para o sítio de injúria promove a liberação local de substâncias pró-inflamatórias, citocinas que possuem propriedades tróficas, miogênica e quimiotáticas. Destas citocinas as mais importantes são as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral (TNF) por produzirem as respostas pró-inflamatórias, mobilização, ativação de leucócitos polimorfonucleares e indução da enzima ciclo-oxigenase^{27, 36,47}

1.7- Mediadores inflamatórios nas tendinites

O ácido araquidônico (AA) é o principal precursor de eicosanoides, componente básico de todas as células presentes nos fosfolipídios de membrana celular que são liberados devido a atividade de várias enzimas e de estímulos químicos ou mecânicos, promovendo sua liberação e consequente metabolização, tais estímulos ativam receptores de membrana, acoplados a uma proteína regulatória ligada a um nucleotídeo guanínico

(proteína G) e a partir dessa ligação a fosfolipase A libera o (AA) que quando metabolizado forma as prostaglandinas (PGs); tromboxanos e leucotrienos (coletivamente denominados prostanóides), pela ação da ciclooxigenase dos tipos 1, 2 e 3 (COX1 COX 2 E COX3).²⁷

A ciclooxigenase 1 (COX-1) denominada como citoprotetora, é expressa por células que regulam funções fisiológicas e estão presentes na proteção de diversos órgãos como mucosa gástrica, agregação plaquetária, rim, pulmão, útero etc. A COX-2 considerada essencial, sua expressão fisiológica está presente em tecidos cerebrais, pulmonar e renal, mas atua predominantemente no local de inflamação, sua indução resulta na produção de prostaglandinas (PGE2) que está diretamente ligada a dor, pois ativam os nociceptores, facilitando a transmissão dolorosa e consequentemente o quadro de hiperalgesia primária (no local da lesão) e secundária (nos tecidos ao redor da lesão).^{25,26,27}

As prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, por estímulos nas membranas celulares, que podem ser de natureza fisiológica, farmacológica ou patológica aumentando a sensibilidade das terminações nervosas, interferindo na alodinia.²⁵

A IL-1 é primeiramente produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, tais como fibroblastos e células endoteliais ativadas durante a lesão celular, invasão e inflamação. A IL 1 β é expressa em neurônio nociceptivo do gânglio da raiz dorsal e produz inflamação sistêmica através da ativação da COX 2 formando a PGE2 no hipotálamo anterior, causando febre além de produzir substância P, óxido nítrico e moléculas de adesão endotelial tendo uma importância no desenvolvimento e manutenção da dor pós-operatória.²⁷

A IL-6 é uma glicoproteína secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e da glia induzida potentemente por TNF- α e IL-1 como demonstrado na figura 1. É uma citocina pró-inflamatória e uma das mais precoces e importantes mediadoras de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante um estímulo doloroso, como trauma, infecção, cirurgia e queimadura. Promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/ manutenção de linfócitos T.²⁶ Após a lesão, a concentração de IL-6 no plasma são detectáveis em 60 minutos, com pico entre 4 e 6 horas, podendo persistir por 10 dias.²⁹

A IL-10 é um polipeptídeo não glicosilado sintetizado em células imunológicas e tecidos neuroendócrinos e neurais. Essa citocina inibe citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF α , IL-1 e IL-6 estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias aumentando a proliferação de mastócitos impedindo a produção de IFN γ controlando o processo inflamatório.²⁹

A Substância P é a principal neurocinina liberada no processo inflamatório é um neuropeptídeo e atua como um neurotransmissor, neuromodulador ou fator trófico por meio da ligação aos receptores neurocinina-1 (NK1). Este neuropeptídeo pode ser sintetizado não somente pelos neurônios sensoriais, mas também por células imunes e outras fontes não neurais, e quando liberadas pelas terminações nervosas periféricas agem nos receptores (NK1), desencadeando alterações intracelulares envolvidas em diversos mecanismos dentre eles, a transmissão da dor.³⁸

A nocicepção, um componente do processo inflamatório, está intimamente ligada ao extravasamento plasmático e com a ativação de neutrófilos podem aumentar os níveis de SP que regulam a transcrição e liberação de TNF – α , ajudando na ativação dos seus receptores⁴⁷.

A SP é biologicamente ativa em concentrações extremamente baixas e participa da patofisiológica de doenças inflamatórias do sistema respiratório, gastrointestinal e musculoesquelético. No SNC, acredita-se que a SP participe de várias respostas comportamentais, na regulação da sobrevivência e degeneração neuronal, na função cardiovascular, 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 geniturinário⁴⁹.

A SP estimula a liberação de endorfinas em baixas doses, mas em altas doses, excita diretamente os neurônios no cérebro, provocando hiperalgesia. O papel anti-nociceptivo da SP já foi confirmado no SNC e no SNP. No SNC o efeito analgésico está associado principalmente com padrões opióide- dependentes, embora outros estudos tenham demonstrado o envolvimento do GABAAR (receptor de GABAA) e receptores de glicina na lâmina V da coluna espinhal.⁴⁸

Os receptores NK1 são distribuídos por todo o corpo, principalmente nas células endoteliais e quando ativados pela SP, podem atuar como mediador pró-inflamatório, aumentando a permeabilidade vascular e a migração leucocitária durante o processo inflamatório.³⁵ São acoplados a proteínas G e que sinalizam os efeitos da SP, sendo expressos em várias células como linfócitos T e B, monócitos, macrófagos e neutrófilos durante o processo inflamatório ou imunológico.³⁵

A degranulação de mastócitos, liberam 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 tromboxanos, 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.⁴⁵

1.8- Mieloperoxidase (MPO)

Os neutrófilos são as células fagocíticas que geralmente são as primeiras a serem ativadas na defesa pelo sistema imunológico inato contra infecções, estas células são de curta duração, totalmente diferenciadas, cuja principal função é encontrar, ingerir e destruir uma grande variedade de agentes patogênicos invasores. Para realizar suas funções, fagocitam patógenos e com o compartimento fagolisossomal formado pela fusão do fagossomo com os grânulos intracelulares, liberam vários componentes bactericidas, como diversas enzimas e espécies reativas de oxigênio (ERO). Os Neutrófilos contêm pelo menos três tipos diferentes de grânulos, destacando-se o grânulo primário, também conhecido como grânulo azurófilo.^{33,51}

A Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que desempenha papel fundamental nos mecanismos bactericidas dos mamíferos, sendo encontrada principalmente em leucócitos

polimorfo nucleares dos neutrófilos. A MPO está diretamente relacionada com os mecanismos bactericidas dependentes de O_2 , 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.³⁸

Embora a geração de oxidantes pela MPO seja benéfica em termos da resposta imunitária, existem evidências consideráveis de que a estimulação inapropriada da formação de oxidantes por esta enzima, podem resultar em danos nos tecidos afetados. A MPO liberada no meio extracelular, através de neutrófilos mortos ou altamente estimulados em condições patológicas de inflamação, é capaz de exercer uma atividade oxidante prejudicial sobre as células e os tecidos vizinhos. A avaliação da atividade da MPO é crucial para entender seus efeitos na inflamação, estudos recentes utilizando modelos animais de várias doenças inflamatórias, demonstraram que a deficiência de MPO resulta no exagero da resposta inflamatória e afeta as funções neutróficas, incluindo a produção de citocinas.⁴⁸

1.9- Tratamento

Em virtude de sua ocorrência, do custo do tratamento, da redução da funcionalidade laboral e do desencadeamento de co-morbididades, as tendinopatias necessitam de recursos financeiros consideráveis, direcionados ao acompanhamento da saúde dos indivíduos portadores destas patologias, principalmente nos casos em que a incapacidade no trabalho persiste além do tempo médio para o retorno às atividades laborativas, tornando-se um grande problema socioeconômico onde as intervenções médicas e terapias para a reabilitação são ainda limitadas ^{27 30}

Existem diversas 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. ⁵⁸ Os principais objetivos do tratamento das tendinites são: redução da dor, prevenção da recorrência e retorno as atividades

recreativas ou laborais. A falha dos tratamentos conservadores, levam à intervenção cirúrgica para excisão do tecido tendinopático e reparação da ruptura do tendão ⁵⁸.

As terapias mais comuns e usuais são as medicamentosas, tanto com os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e com os opióides ⁵⁵. Os AINES conhecidos pela humanidade por mais de cem anos, são agentes farmacológicos mais utilizados na prática médica, pois apresentam um amplo aspecto de indicações, como: analgesias, profilaxia de doenças cardiovasculares, antipirético e diminuição do processo inflamatório. ⁸⁰

1.10- Opioides

A dor é uma experiência única e individual, modificada pelo conhecimento prévio de um dano que pode ser existente ou presumido, portanto, em qualquer situação a dor é o que o indivíduo refere e descreve e os opióides permanecem como os fármacos mais efetivos e mais comumente utilizados no tratamento de dores moderadas a intensas ⁴⁹.

Os analgésicos “clássicos”, notavelmente opióides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), têm suas origens em produtos naturais que vêm sendo utilizados há séculos. O ópio, substância original desse grupo farmacológico, é extraído da papoula, nome popular do *Papaver somniferum*, uma das muitas espécies da família das Papaveráceas, que se caracteriza por apresentar folhas solitárias. O termo opiáceo refere-se aos compostos relacionados estruturalmente com os produtos encontrados no ópio.⁴⁷

Os opióides são classificados em naturais, onde a substância é extraída diretamente da folha; os semissintéticos que são resultado da modificação parcial da substância natural e os sintéticos que são produzidos em laboratórios. ³

O alívio da dor gerado pela morfina é relativamente seletivo, diferentemente dos anti-inflamatórios que se limitam pela dose máxima administrada para obter os efeitos analgésicos, porém o aumento da dose dos opióides está associado aos efeitos colaterais que eles produzem incluindo sedação, confusão mental, náuseas e vômitos, depressão respiratória, retenção urinária e dependência ⁵⁰.

A terapia medicamentosa é importante para o bem-estar social, sua utilização pela população brasileira é alta e influenciada por vários fatores fisiológicos e fisiopatológicos e o uso correto e com acompanhamento médico ocasiona o aumento e melhora da

expectativa de vida da população ⁴³. As terapias mais utilizadas para a diminuição da dor ocasionado pelas tendinites são os opióides, porém seus efeitos colaterais são indesejáveis podendo causar danos irreversíveis ⁵.

A automedicação é definida pela Organização mundial de saúde como a seleção e o uso de medicamentos sem prescrição ou supervisão de um médico ou dentista de forma indiscriminada e é um fenômeno mundial onde o indivíduo procura um tratamento medicamentoso para reduzir ou curar algum sintoma e/ou patologia, desconhecendo os efeitos adversos e as doses limites recomendadas. ³

Os opióides produzem alterações de humor, incluindo o controle da ansiedade, euforia e disforia. Indivíduos com dor crônica que utilizam opióides referem inicialmente uma melhora da depressão, porém leva a exacerbação dos sintomas após algumas semanas de uso prolongado de opióides ⁵⁰.

A depressão respiratória é o efeito adverso mais sério que os opióides produzem doses terapêuticas de morfina, por exemplo, deprimem todas as fases da atividade respiratória (frequência, volume minutos e volume total) ⁴⁸.

1.11- Cloridrato de Tramadol

O cloridrato de Tramadol é um analgésico da classe dos opióides, um agonista puro não seletivo dos receptores opióides: m (mi), d (delta), k (kappa), com uma afinidade maior pelo receptor Mi, sua ação é de nível central e outros mecanismos de ação são descritos na literatura, como a analgesia via inibição da recaptação neuronal de noradrenalina e aumento da liberação de serotonina ⁶².

Quando comparado aos efeitos da morfina, o cloridrato de Tramadol apresenta efeitos colaterais de menor intensidade. O fármaco não apresenta efeito depressor do sistema respiratório, a motilidade gastrointestinal é menos prejudicada e os efeitos deletérios do sistema cardiovascular apresentam-se de forma leve. ⁶².

A substância atravessa a barreira placentária e hematoencefálica, apresentando pequenas quantidades no leite materno. Após administrado sua absorção é rápida e seu

pico de ação é de aproximadamente 45 minutos, atingindo uma biodisponibilidade de 100%. A excreção é via renal em aproximadamente 6 horas após a administração. Em pacientes idosos e com deficiências renais e hepáticas, a eliminação poderá sofrer interferências tornando-se mais demorada.⁷⁶

Testes clínicos em animais para testar a segurança do fármaco não apresentaram efeitos deletérios significativos em cães. Nos ratos, quando submetidos a doses altas, acima das doses terapêuticas recomendadas, apresentaram manifestações no sistema nervoso central como agitação, salivação, espasmos musculares e perda de peso.^{76,77}

Doses seguras em ratos são evidentes em literaturas nos valores de 20mg/kg/dia e as doses que causaram toxicidade foram acima de 50mg/kg/dia, principalmente em ratas gestantes evidenciando maiores óbitos neonatais. Estudos sobre o potencial tumorigênico do fármaco, foi feito em ratos e em camundongos. Nos ratos não houve evidências de tumores associados ao fármaco e em camundongo, houve uma evidência de adenomas hepáticos em animais machos com doses de 15mg/kg/dia.⁷⁴

Considerando o duplo mecanismo de ação do Tramadol, estudos levantaram a hipótese de ação específica e não específica de alguns opióides na medida que analisaram a ação em modelos de dor central (medula) e periférica (nervo ciático) após a administração sistêmica dos opióides como metadona, morfina e codeína.⁶³

Quando descoberto na década de 70, pensava-se que o Tramadol agia somente nos receptores opióides, porém estudos complementares descrevem que o fármaco atua em outras vias sinalizadoras.⁶²

O cloridrato de Tramadol aumenta a efetividade das vias descendentes inibitórias à medida que induz o aumento da concentração de neurotransmissores inibitórios no corno dorsal da medula espinhal. Apesar de ser um fármaco com uma afinidade muito grande com os receptores opiáceos, ele não deve ser utilizado em pacientes com a síndrome de abstinência por opióides.⁶³

Tabela 1 – Principais efeitos colaterais dos opióides

Sistema nervoso central	Dependência Sonolência Agitação Euforia Disforia Alucinações
Sistema Cardiovascular	Bradicardia hipotensão
Sistema Respiratório	Depressão respiratória Diminuição do reflexo da tosse Broncoespasmo
Sistema gastrointestinal	Constipação Retenção urinária
Sistema Imune	Depressão do sistema imunológico após uso prolongado
Gestação	Depressão respiratório no Neonato Dependência química fetal

Fonte: Schiffer F, Khan A, Bolger E, et al.

1.12- Cloridrato de Naloxona

A Naloxona é um antagonista de receptor opióide inespecífico, apresentando maior afinidade sobre os receptores μ e κ ; e menor em receptores δ . Após administração, a substância liga-se aos Receptores Opióides no sistema Límbico, o início de ação é dependente da entrada no SNC e a distribuição entre o cérebro e a corrente sanguínea, mas alguns estudos elucidam e afirmam que seu início é rápido, devido a essa facilidade. Após a administração endovenosa alguns dos efeitos já começam a aparecer, cerca de 1 a 2 min, com duração de 45 a 90 min, embora existam evidências literárias que relatam uma duração em duração de 3 a 4 h.⁷⁶

Sua empregabilidade atualmente tem sido explorada devido á presença de substâncias endógenas semelhantes aos opiáceos no sistema nervoso central e outros

tecidos estão envolvidas na regulação de fenômenos fisiológicos e abre uma grande possibilidade terapêutica para a naloxona.⁷⁷

Indicado no tratamento de emergências por intoxicação exógenas causadas opióides e tem manifestações comprovadas na atuação nas depressões respiratórias ou no sistema nervoso central ocasionada pelos opióides. Tem ações efetivas e eficazes de reverter manifestações ocasionadas pela superdose de morfina, metadona, tramadol, nalbufina, buprenorfina e sufentanila.⁷⁴

Apesar de o fármaco ser indicado para a reversão das manifestações dos opioides, um estudo randomizado realizado para avaliar a reversão da ação de constipação ocasionada pelos opióides evidenciou que alguns pacientes, submetidos a doses baixas de antagonistas apresentou a reversão do efeito analgésico do opióide.⁷⁵

1.13- Terapia Fotobiomodulação (PBM)

A luz tem sido utilizada como agente terapêutico por séculos. Em 1916 Albert Einstein elucidou a emissão estimulada de radiação, quando expôs os princípios físicos da emissão estimulada. Desde o final da década de 60 houve um grande avanço nos equipamentos de laser e em suas aplicabilidades na área da saúde.³⁷

O termo “terapia por fotobiomodulação” pode ser mais bem 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 tecidual¹⁸

Sabe-se agora que ambos os LASERs (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) como os LEDs (*non-coherent light-emitting diodes*) possuem resultados biológicos positivos em diversos processos de reparo tecidual. 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.⁶⁶

A Fotobiomodulação incide sobre as reações não térmicas da luz com o tecido, gerando efeitos fotoquímicos, bioestimulantes, anti-inflamatórios, anti-edematoso, algico dentre outros benefícios ^{45,53}.

A aplicação da fotobiomodulação é baseada no uso de uma fonte de luz monocromática com efeito não térmico onde a luz é absorvida mais especificamente pelas mitocôndrias, ocasionando aumento da respiração mitocondrial e produção de ATP, bem como o início das vias de sinalização mediadas por espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico (NO) E AMP cíclico, com consequente ativação de vários fatores de transição ⁴⁵.

Os principais mecanismos do laser na ação anti-inflamatória é a modulação desencadeada pela radiação do laser, que promove o aumento da microcirculação, promoção da angiogênese, vasodilatação, inibição dos mediadores inflamatórios, como a PGE2, ativação de células de defesa, efeitos antioxidantes e aceleração da cicatrização celular, todos esses efeitos podem ocorrer simultaneamente resultando no efeito modulador na resposta inflamatória, que envolve ações pró-inflamatórias e antiinflamatórias.^{20,37,38}

A ação analgésica da fotobiomodulação pode ser explicada a partir de algumas hipóteses como a modulação do processo inflamatório, alterações da excitação e condução nervosa dos neurônios periféricos, liberação de opióides endógenos e aumento da síntese de serotonina ³⁸.

A terapia com o PBM é uma alternativa de substituição para analgésicos e Anti-inflamatórios, pois o mecanismo de ação do laser é atribuído a múltiplas ações, incluindo, remoção de substâncias causadoras de dor através do aumento da circulação local, inibição da produção de fatores inflamatórios, estimulação da respiração celular e liberação de neurotransmissores no tecido inflamado⁵³.

O uso de lasers na prática clínica objetivando o efeito Anti-Inflamatórios e analgésico em diferentes doenças, baseia-se em um número já razoável de publicações de caráter científico. Nos últimos anos, inúmeros estudos clínicos aleatorizados, placebo-controle foram realizados, fazendo com que a terapia com o laser já seja considerada como alternativa terapêutica para várias doenças. ^{8 14}

No entanto, é muito importante ressaltar que pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação do laser. Neste sentido, existem evidências que o laser pode reduzir a

expressão gênica de alguns mediadores inflamatórios como PGE2, IL, TNF- α e aumentar a expressão de outros mediadores anti-inflamatórios como o IL-10.⁵⁵

Alguns trabalhos mostraram o aumento na produção de colágeno, redução de estresse oxidativo e da fibrose, redução do edema pós-operatório, redução da dor e melhora funcional e estes efeitos estariam relacionados também a redução de mediadores inflamatórios observados após o tratamento com o laser de baixa potência.⁵¹

A PMB diminui a liberação de substâncias algigênicas e aumenta significativamente os limiares de dor pela estimulação da síntese de endorfinas, reduzindo assim a sensação dolorosa, além da redução da velocidade de condução do nervo e seus potenciais de ação, assim como a supressão de estímulos nocivos. Na dor aguda, a atuação do laser está na inibição de PGE2 e outros marcadores pela inibição direta nos terminais aferentes periféricos, que suprimem a sensibilidade periférica e limitam a liberação de neurocinina²⁵.

Poucos trabalhos são encontrados referente a ação da fotobiomodulação e os receptores opióides. Um trabalho evidenciou a atuação da fotobiomodulação aplicada via transcraniana unilateral em pacientes dependentes de opióides e o resultado foi a redução de 40% nos desejos pelo uso da substância nas 4 semanas de tratamento, que foi realizado 2 x por semana.⁵⁶

2. JUSTIFICATIVA

A dor ocasionada por tendinopatia conduz a uma diminuição da capacidade física e psicológica de um indivíduo, prejudicando a qualidade de vida da pessoa acometida por essa sintomatologia. As tendinopatias promovem um impacto socioeconômico importante, sendo uma das principais causas de afastamentos de atividades físicas laborais ^{45,46}.

Para o controle da dor os analgésicos “clássicos”, que são prescritos e administrados nas unidades de saúde são os opióides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), porém essas classes farmacêuticas possuem diversos efeitos colaterais, muitas vezes letais à saúde de um indivíduo. ⁴¹

Considerando que a dor ocasionada pela tendinopatia causa um efeito incapacitante para os indivíduos, compreendemos que o efeito da PBM diminui a liberação de substâncias algigênicas e aumento da tolerância da dor pela estimulação da síntese de endorfinas endógena, reduzindo assim a sensação dolorosa. Outro mecanismo proposto está relacionada com a redução da velocidade de condução do nervo e seus potenciais de ação, assim como a supressão de estímulos nocivos.³¹

A associação das terapias e sua compreensão é de extrema importância, a fim de verificar a existência de efeitos somatórios ou inibitórios sobre a tolerância da dor, surgindo novas perspectivas no tratamento da dor de uma forma segura, minimizando efeitos deletérios ao organismo.

3 HIPÓTESE

A terapia por fotobiomodulação associada ao uso de opióides promove um efeito positivo sobre a redução algica e na proteção do tendão e o mecanismo de ação para este efeito pode ser o conhecido mecanismo anti-inflamatório além de participação da PBM no mecanismo opióide.

4. OBJETIVOS

4.1- Objetivo Geral

Estudar o efeito da terapia por fotobiomodulação associado com terapia medicamentosa agonista de receptores opióide (Cloridrato de Tramadol) e antagonista de receptores opióides (Cloridrato de Naloxona) no controle da sensibilidade dolorosa (alodinia) em modelo experimental de tendinite induzida por Colagenase.

4.2- Objetivos específicos

Investigar o efeito da fotobiomodulação associada ou não com tratamento farmacológico (opióide):

- Na modulação da sensibilidade a dor.
- Na manutenção da proporção de Colágeno total e tipo I
- Infiltrado inflamatório.
- Nos níveis de MPO

5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250 e 400g nascidos entre novembro de 2019 e julho de 2021, com livre acesso a água e ração, provenientes do Biotério da Universidade Nove de Julho. Os animais eram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas. Este protocolo experimental, de indução da tendinite pela injeção de Colagenase, já possui a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Nove de Julho, sob o número 2322171019.

5.2- Indução da Inflamação em Tendão Calcâneo de Ratos

Para que fosse realizada a aplicação da Colagenase, os animais dos grupos controle, tendinite não tratado, tendinite tratado com luz, foram levemente sedados (sedação inalatória) com Isoflurano (BioChimico®, Lote 008694).

Em seguida, os animais do grupo controle receberam como veículo uma injeção transcutânea com 100 µl de solução salina estéril 0,9% NaCl na região posterior da pata direita e esquerda, no tendão calcâneo. Os animais dos demais grupos receberam 100 µl de injeção transcutânea de Colagenase (1 mg/ml; Sigma Chemical Co, Cat. C-6885) na mesma região do tendão calcâneo. A seguir, os animais retornaram para as caixas de contenção separados em diferentes grupos experimentais. Após 8 horas de indução do processo inflamatório pela injeção de Colagenase e os específicos tratamentos, os animais foram eutanasiados com superdose da mesma associação de anestésicos (cloridrato de cetamina 180 mg/Kg e cloridrato de xilasina 30mg/Kg). O tecido do tendão foi dissecado e removido para análises.

5.3- Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos com 5 animais cada, conforme descrito abaixo na figura 1:

- **Grupo Controle (CTL):** Foi injetado 100µl de solução salina estéril (0,9%) na região Peritendínea do tendão calcâneo. N= 5
- **Grupo Tendinite não tratado (NT):** Foi injetado 100µl de Colagenase (1mg/ml) na região peritendínea do tendão calcâneo. N= 5
- **Grupo Irrradiado (PBM):** injetado 100µl de Colagenase (1mg/ml) na região peritendínea do tendão calcâneo. Os tendões foram irradiados com PBM, no comprimento de onda infravermelho (830nm) e potência de 100mW, único ponto, por contato, recebendo energia de 3J, por 30 Seg. N= 5
- **Grupo tratado com Opióide (Op):** Injetado 100µl de Colagenase (1mg/ml) na região peritendínea do tendão calcâneo. Administrado Cloridrato de Tramadol 5mg/kg via sistêmica. N= 5
- **Grupo tratado com Opióide e associado com a fotobiomodulação (PBM + Op):** Foi injetado 100µl de Colagenase (1mg/ml) na região peritendínea do tendão calcâneo. Irradiado com PBM, único ponto, por contato, recebendo uma energia de 3J por 30 seg. Após foi administrado Cloridrato de Tramadol 5mg/kg. N= 5
- **Grupo tratado com Naloxona e associado com a fotobiomodulação (NL+PBM):** Foi injetado 100µl de Colagenase (1mg/ml) na região peritendínea do tendão calcâneo. Administrado cloridrato de Naloxona 0.1mg/kg e após 15 minutos irradiado com PBM único ponto, por contato, recebendo uma energia de 3J por 30 seg N= 5.

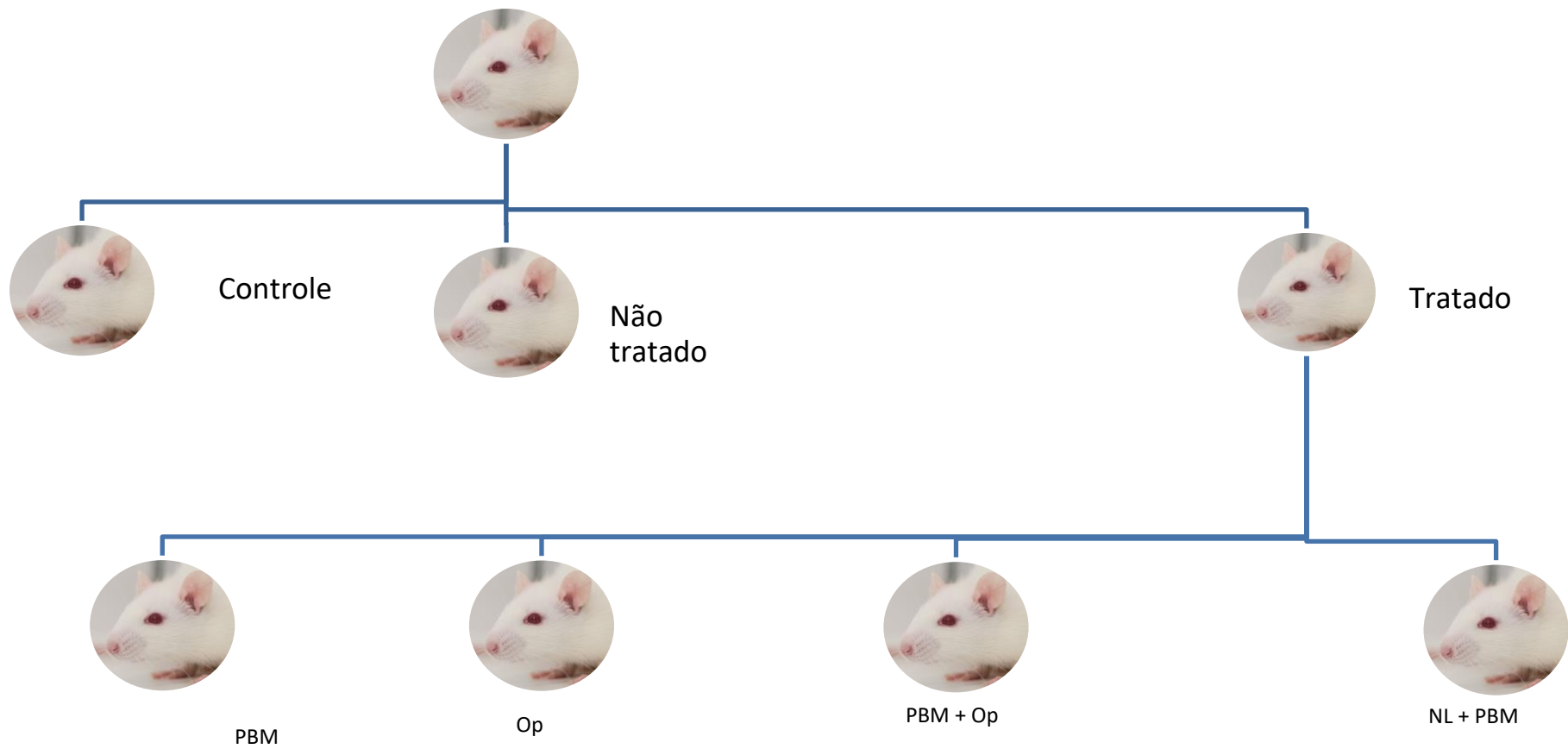


Figura 7 – Grupos Experimentais

5.4- Aplicação da Terapia com Fotobiomodulação (PBM)

Após serem submetidos ao modelo de inflamação pela injeção de Colagenase, os animais acondicionados no contensor, receberam o tratamento com PBM 808nm, potência de 100mW, na região da injeção, em um único ponto e por contato, recebendo energia de 3J.

Tabela 2 - Parâmetros dosimétricos da PBM

Comprimento de onda (nm)	808
Modo de funcionamento	contínuo
Potência (mW)	100
Diâmetro de abertura (cm²)	0.028
Irradiância na abertura (W/cm²)	3.5
Área do feixe (cm²)	0.028
Tempo de exposição (s)	30
Exposição radiante (J/cm²)	107.14
Energia total irradiada (J)	3 J
Técnica de aplicação	Contato direto

5.5 – Tratamento com Cloridrato de Tramadol (Op)

Utilizado cloridrato de Tramadol do fabricante união química 50mg/ml, ampola com 2 ml. Administrado 5mg/kg de fármaco em região intraperitoneal 30 min antes da mensuração de alodinia e em seguida a eutanásia.

5.6 Fotobiomodulação associado com Naloxona (NL + PBM)

Utilizado cloridrato de Naloxona do fabricante cristalia 0.4mg /ml, ampola com 1 ml. Administrado 0.1 mg/kg do fármaco em região intraperitoneal 15 min antes da terapia com fotobiomodulação.

5.7 Fotobiomodulação associado ao Tramadol. (PBM + Op)

Utilizando os parâmetros de PBM citados acima, logo em seguida é administrado o Tramadol 30 minutos antes das 8 horas após a indução.



Figura 8 – Curso temporal do experimento.

5.8 Análise de Alodinia Mecânica

Para a avaliação da alodinia mecânica, foi utilizado o teste de Randall Selito que é um método para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico.

Segundo 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.⁷⁷

O experimento foi realizado com um Algesímetro de pressão eletrônico, que consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a região calcânea do animal foi realizado através de uma ponta de polipropileno. Os animais foram contidos manualmente e posicionados a pata debaixo da ponteira e o peso era acionado por um pedal. As alterações nos limiares nociceptivos foram avaliados exercendo-se uma pressão linearmente crescente na região calcânea do animal até a produção de uma resposta caracterizada de dor, normalmente com a retirada da pata pelo animal (Figura 3). Os valores foram apresentados como variação do limiar de alodinia para cada grupo experimental.

A intensidade de nocicepção é quantificada como a variação na pressão obtida e registrada pelo aparelho valores expressos em gramas.

Inicialmente foi realizado um curso temporal com o grupo não tratado sendo dividido em 5 grupos com 4 animais cada. Os grupos foram divididos em 1 horas, 2 horas, 4 horas, 6 horas e 8 horas, onde induzimos a tendinite e realizamos os testes de alodinia nos tempos estipulados para cada grupo. Foi observado que no grupo de 8 horas os sinais de inflamação e dor eram maiores quando comparados aos outros grupos.

Após determinar o tempo de indução foram realizadas 4 leituras em dias alternados para ambientalização dos animais no aparelho. Após 8h da indução da tendinite, foi realizada a quinta medida.

As medidas de alodinia nos grupos tratados e não tratados 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).

Os valores da média das medidas iniciais foram subtraídos da média das medidas finais, tais valores foram apresentados como variação do limiar de alodinia para cada grupo experimental representadas nos gráficos.

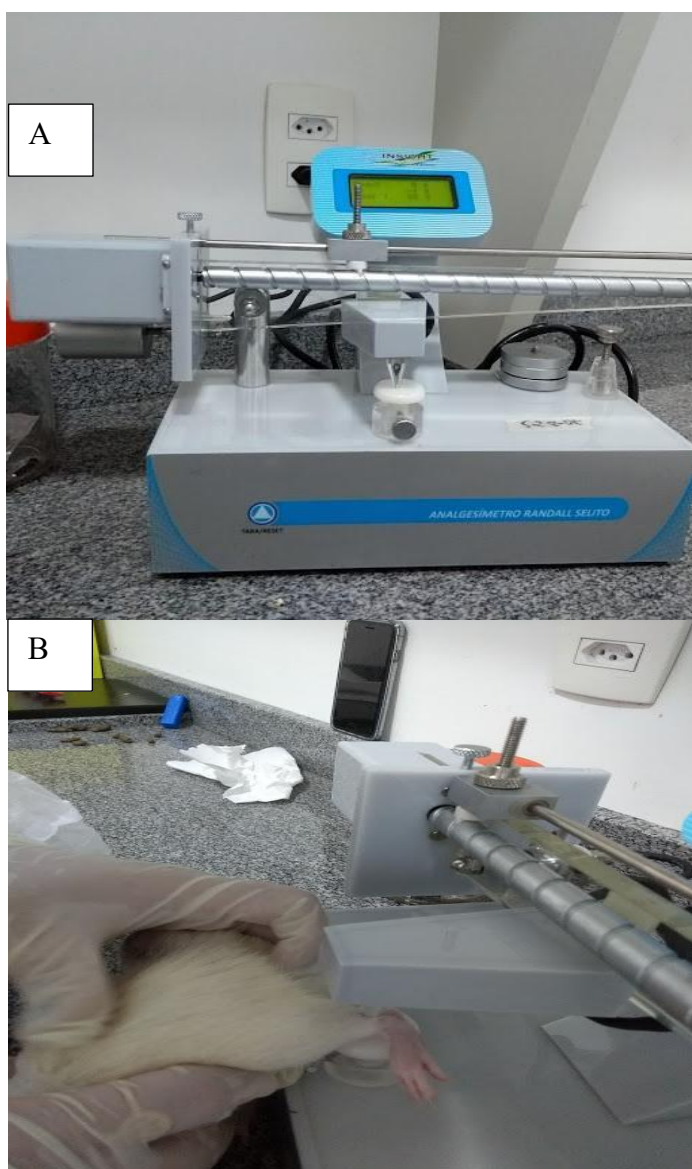


Figura 9 - Avaliação da alodinia mecânica. Em (A) Analgesímetro Randall Selito; Em (B) esquema de posicionamento do animal e leitura da alodinia.

5.9- Preparação histológica das amostras

As amostras de tendão passaram por preparações histológicas padrão, começando pela fixação do tecido em formol (10%) durante 24h. Logo após os tendões foram lavados em água corrente e então desidratados em soluções crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%), 1h em cada solução. Em seguida os tendões foram diafanizados em solução de álcool/xilol 1:1 por 1h, em seguida passaram por 2 banhos de xilol puro, 1h cada. Os tendões foram retirados do xilol e colocados imediatamente em parafina líquida (60°C), dentro de uma estufa, por 2h. Posteriormente os blocos foram confeccionados para obtenção dos cortes histológicos. Os tendões incluídos nos blocos de parafina foram cortados longitudinalmente em cortes na espessura de 5µm e transferidos para lâminas histológicas que foram desparafinizados e hidratados. Foi utilizada coloração por Hematoxilina e Eosina (H.E) para avaliação do infiltrado inflamatório e Picrosirius red, para visualização do colágeno.

As lâminas histológicas foram fotografadas e analisadas utilizando o programa “Image Pro Plus 6”.

5.10 Análise da atividade de Mieloperoxidase (MPO)

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. 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.³¹

Neste ensaio, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 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 (AH₂), 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.⁷⁸

Após 8 horas da indução da tendinite, os animais foram eutanasiados com superdose de anestésicos. A pele da região do tendão foi retirada e o tendão calcâneo cuidadosamente foi dissecado com uma lâmina de bisturi e transferido para uma cuba e adicionamos igual volume de brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB, Sigma Chem. Co., EUA), seguido de homogeneização em vórtex (Heidolph Diax 900, Alemanha) 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 12.000g durante 2 min. Dez microlitros do sobrenadante foram pipetados (em duplicata) em microplaca de 96 poços e acrescidos com 200 µL de uma solução de tampão fosfato de potássio (pH=6) contendo 0,164 mg/mL de dihidroclorato de o-dianisidina (Sigma Chemical Co., EUA) e 0,0005% de peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha). A mudança de absorbância a 460 nm foi medida em um leitor de microplacas (Espectra Max plus 384, EUA) durante 10 min., e a atividade de MPO foi 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 µmol de H₂O₂ degradado por minuto.

5.11 Análise Estatística

Os dados foram descritos em valores médios com os respectivos desvios-padrão. Para o teste de normalidade, foi realizado Shapiro-Wilk. 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.

6- RESULTADOS

6.1 Avaliação da alodinia mecânica após a indução da tendinite.

No gráfico da figura 9 podemos observar a alodinia mecânica após 8 horas da indução da tendinite. O grupo NT apresentou uma redução da tolerância à dor quando comparado aos grupos CTL, PBM, Op e PBM + OP. O Grupo PBM apresentou valores similares ao grupo PBM+Op. O grupo Op apresentou uma discreta redução da tolerância à dor quando comparamos aos grupos PBM e PBM + Op. O grupo NL+PBM apresentou uma redução na tolerância à dor, similar ao grupo NT, quando comparado com todos os grupos estudados.

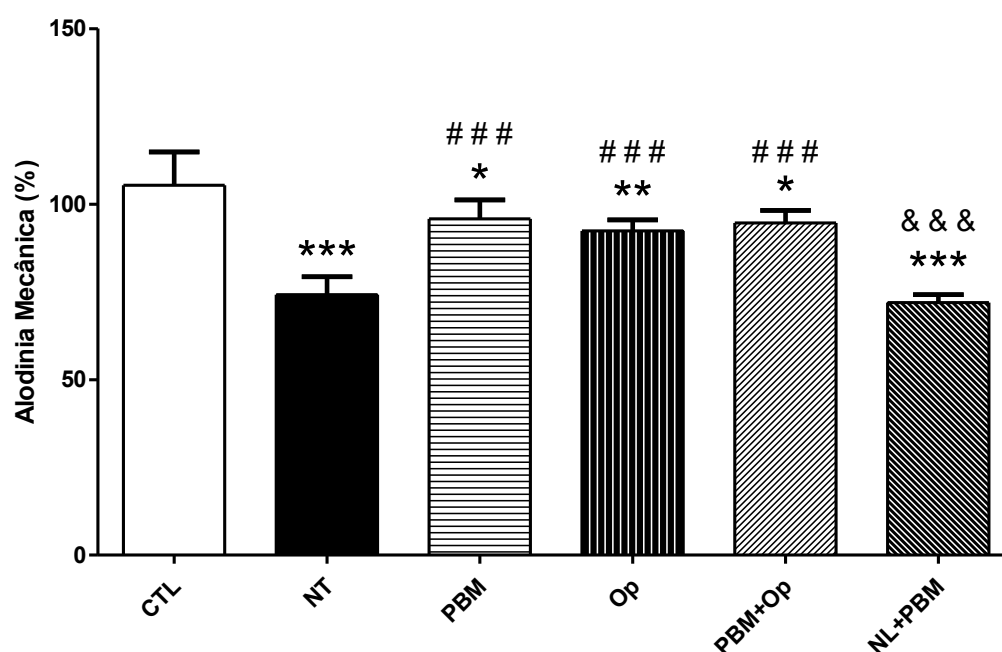


Figura 10. Gráfico da alodinia mecânica em tendões calcâneos de ratos com tendinite induzida. Grupos Experimentais: CTL: Controle; NT: Tendinite sem tratamento; PBM: Tendinite tratada com Fotobiomodulação (3J, 100mW em 808nm); Op: Tendinite tratada com Opióide Injetável; PBM+Op: Com tendinite e tratado com associação de Fotobiomodulação e Opióide; NL+PBM: Tendinite tratado com Naloxona e Fotobiomodulação. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ VS CTL. ### $p < 0,001$ VS NT. &&& $p < 0,001$ VS PBM

6.2 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

No gráfico da figura 10 observamos a atividade da enzima MPO após 8 horas de indução da tendinite. Observamos que o grupo NT apresentou um aumento quando comparado ao grupo CTL. O grupo PBM reduziu a atividade de MPO quando comparada com o grupo NT, Op, PBM + Op e NL + Op. O grupo Op apresentou um aumento na atividade de MPO quando comparamos com os grupos Op + PMB e NL + PBM, porém valores próximos ao grupo NT. O Grupo PBM + Op apresentou uma queda na atividade de MPO quando comparamos com o grupo NT e Op, porém mais elevado quando comparamos com o grupo PBM. O grupo NL + PBM teve uma discreta redução na atividade de MPO quando comparado com os grupos NT, Op e PBM+Op.

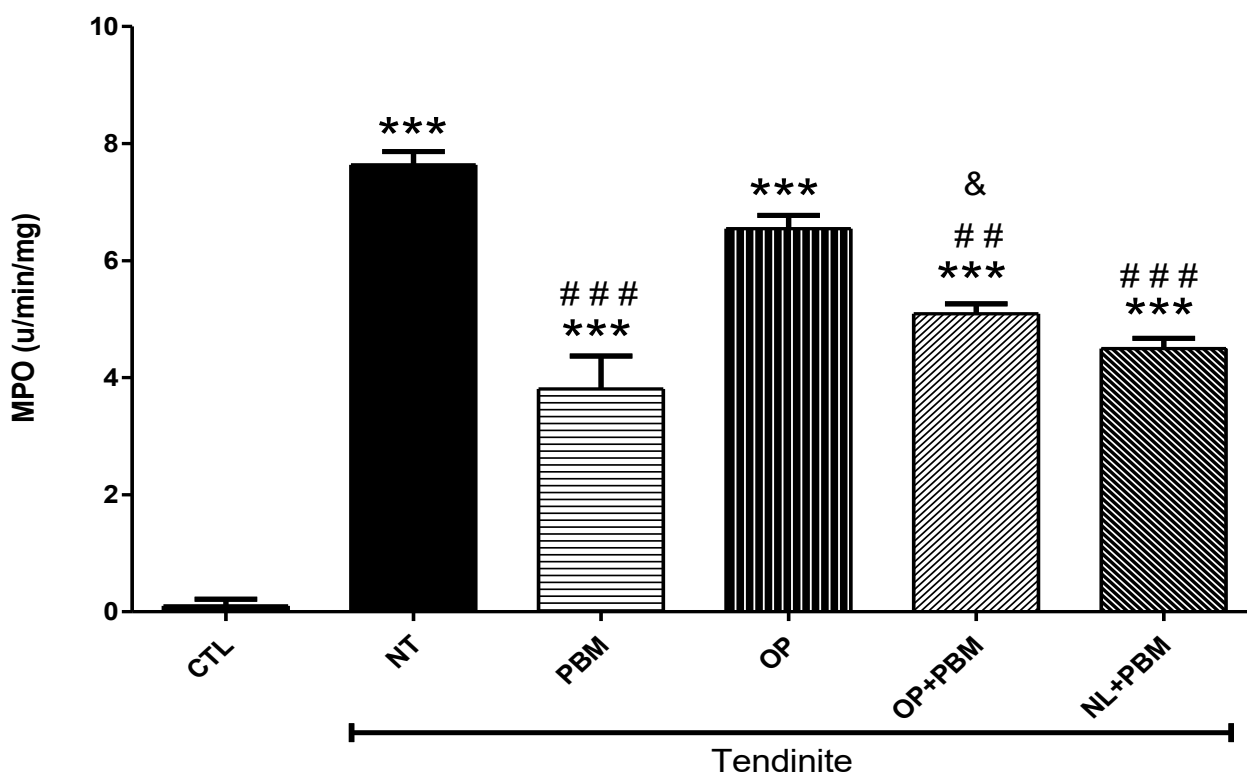


Figura 11. Gráfico dos Níveis de MPO em tendões calcâneos de ratos com tendinite induzida. Grupos Experimentais: CTL: Controle; NT: Tendinite sem tratamento; PBM: Tendinite tratada com Fotobiomodulação (3J, 100mW em 808nm); Op: Tendinite tratada com Opióide Injetável; PBM+Op: Com tendinite e tratado com associação de Fotobiomodulação e Opióide; NL+PBM: Tendinite tratado com Naloxona e Fotobiomodulação. *** $p < 0,001$ VS CTL. ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ VS NT. & $p < 0,05$ VS PBM

6.3 Avaliação de Colágeno Total, pela análise de imagens histológicas coradas com *Picrosirius*

No gráfico 11 podemos observar que no grupo NT o colágeno total diminuiu quando comparamos ao grupo controle. Nos grupos PBM, PBM + Op e NL+PBM os valores de colágeno total mantiveram com valores similares entre si, porém menores quando comparado ao grupo CTL. No grupo Op observamos a diminuição dos valores do colágeno total quando comparado a todos os grupos estudados.

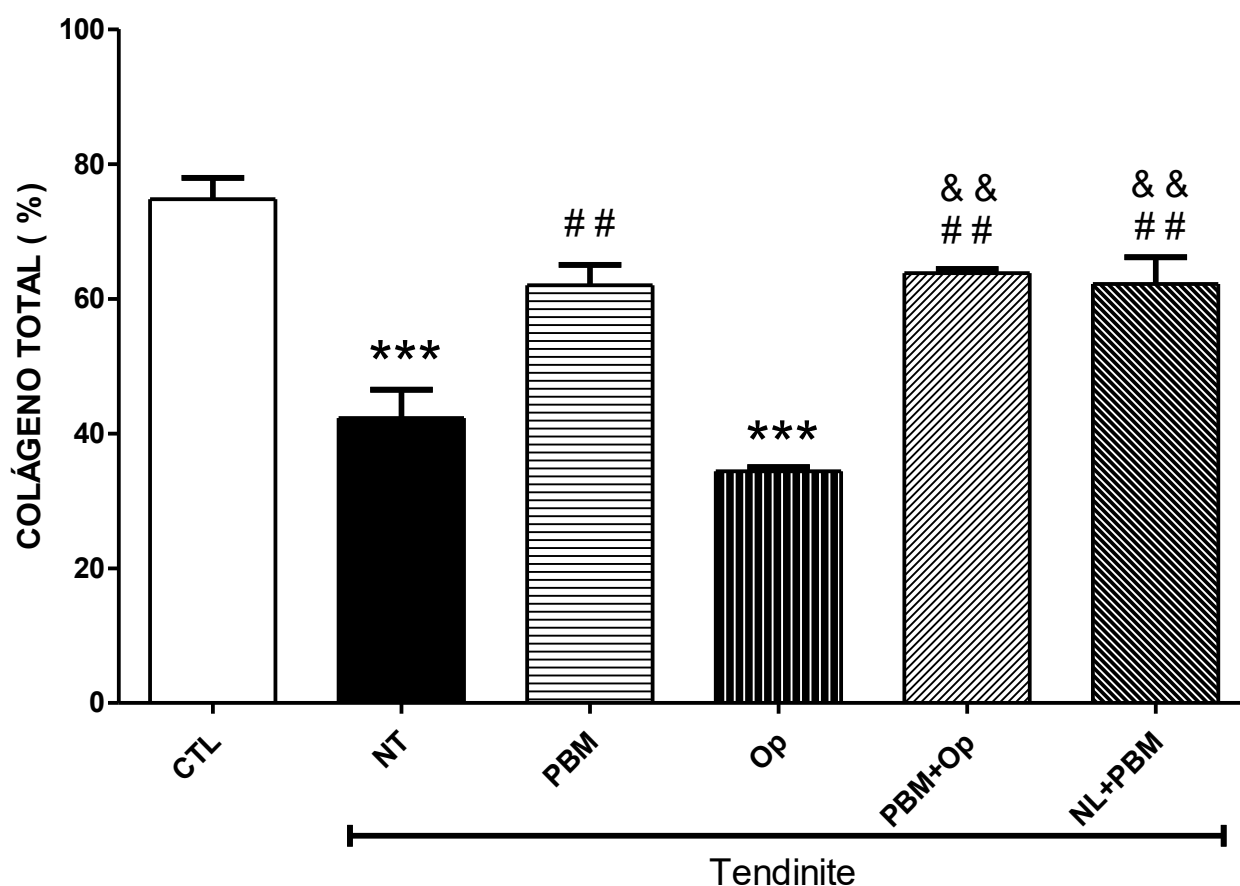


Figura 12 : Gráfico da quantificação de Colágeno Total em lâminas histológicas coradas com *Picrosirius*. Grupos Experimentais: CTL: Controle; NT: Tendinite sem tratamento; PBM: Tendinite tratada com Fotobiomodulação (3J, 100mW em 808nm); Op: Tendinite tratada com Opióide Injetável; PBM+Op: Com tendinite e tratado com associação de Fotobiomodulação e Opióide; NL+PBM: Tendinite tratado com Naloxona e Fotobiomodulação. *** $p < 0,001$ VS CTL. ## $p < 0,01$ VS NT. && $p < 0,01$ VS PBM.

6.4 Avaliação de Colágeno Tipo I, pela análise de imagens histológicas coradas com *Picrosirius*, em microscópio com luz polarizada

Na figura abaixo podemos observar que no grupo NT os valores de colágeno do tipo 1 apresentou-se reduzido quando comparamos com o grupo CTL. O grupo PBM os valores do colágeno do tipo 1 apresentou números elevados quando comparado a todos os grupos estudados. O grupo Op apresentou valores similares ao grupo NT, porém em menor quantidade quando comparado com o NL + PBM e maior quantidade quando comparado com o grupo PBM+ Op. O grupo PBM + Op apresentou valores menores quando comparado aos grupos estudados. O grupo NL + PBM apresentou valores maiores quando comparado com os grupos NT, OP e PBM + Op.

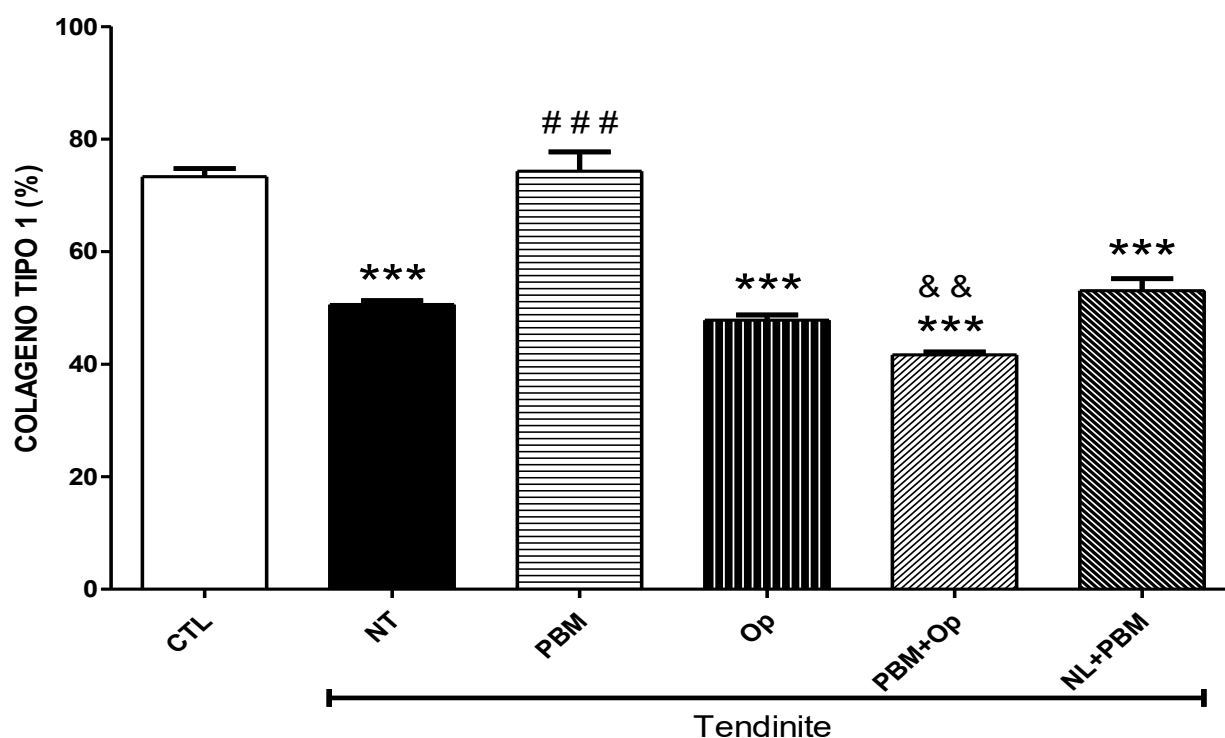


Figura 13: Gráfico da quantificação de Colágeno Tipo I em lâminas histológicas coradas com *Picrosirius*. Grupos Experimentais: CTL: Controle; NT: Tendinite sem tratamento; PBM: Tendinite tratada com Fotobiomodulação (3J, 100mW em 808nm); Op: Tendinite tratada com Opióide Injetável; PBM+Op: Com tendinite e tratado com associação de Fotobiomodulação e Opióide; NL+PBM: Tendinite tratado com Naloxona e Fotobiomodulação. *** $p < 0,001$ VS CTL. ### $p < 0,001$ VS NT. && $p < 0,01$ VS PBM.

6.5 Imagens histológicas de tendão calcâneo de ratos corado com HE em diferentes tratamentos

Foram analisados tendões saudáveis e tendões submetidos a indução da tendinite com tratamento e sem tratamento.

Na figura 14 observamos o tendão do grupo Controle (CTL), as fibras encontram-se onduladas, organizadas, com fibras frouxas longitudinais, com fileiras dispersas e células inflamatórias naturais em pouca quantidade.

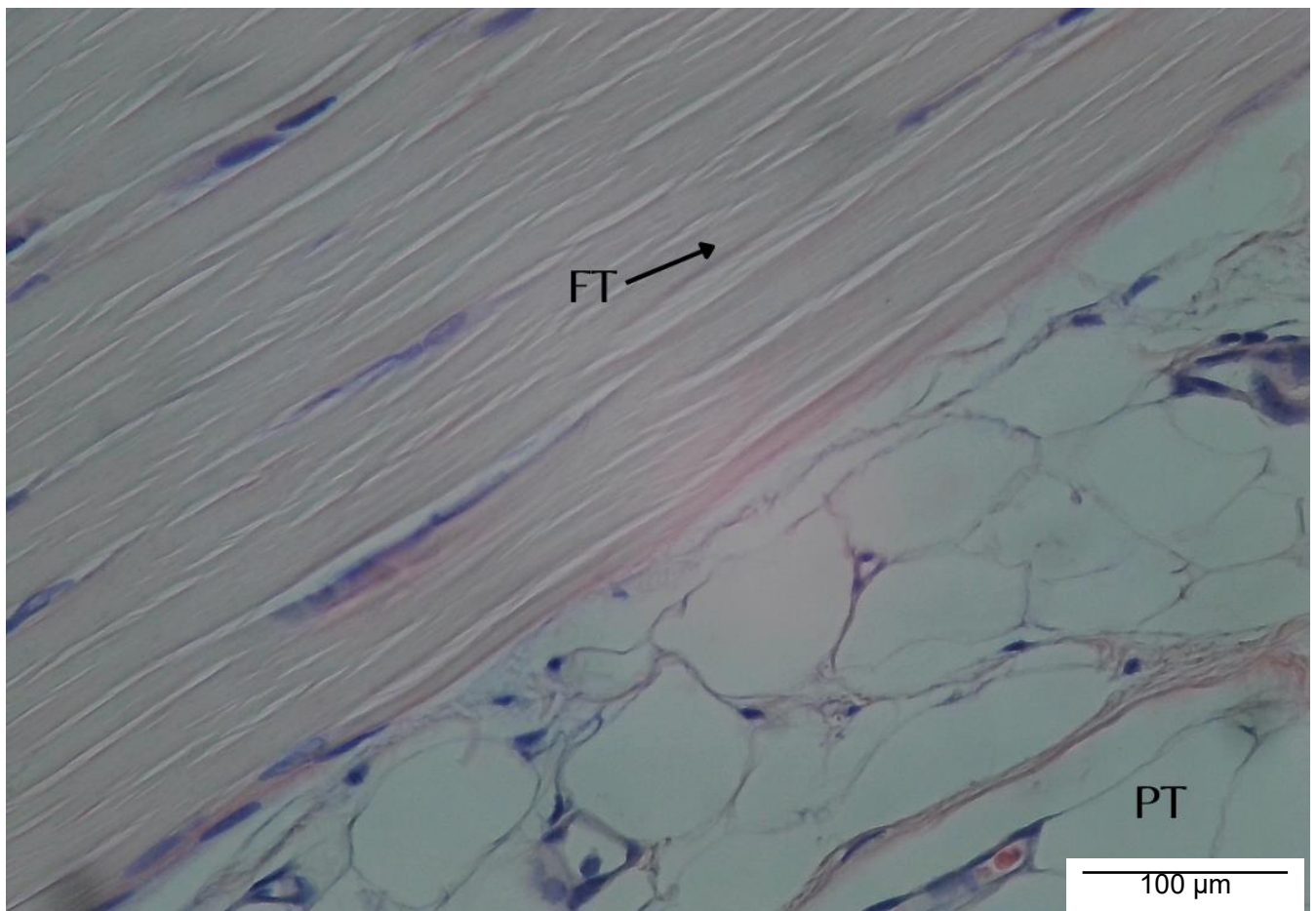


Figura 14 : Fotomicroscopia do tendão calcâneo de ratos saudáveis (Grupo CTL). Corte longitudinal com objetiva de 40X. PT (Região peritendínea); FT (Fibras tendíneas);

Na figura 15 representa o grupo Não Tratado (NT) e podemos observar fibras mais desorganizadas, fragmentadas, aumento do infiltrado inflamatório, presença de linfócitos e aumento dos vasos sanguíneos na região peritendínea.

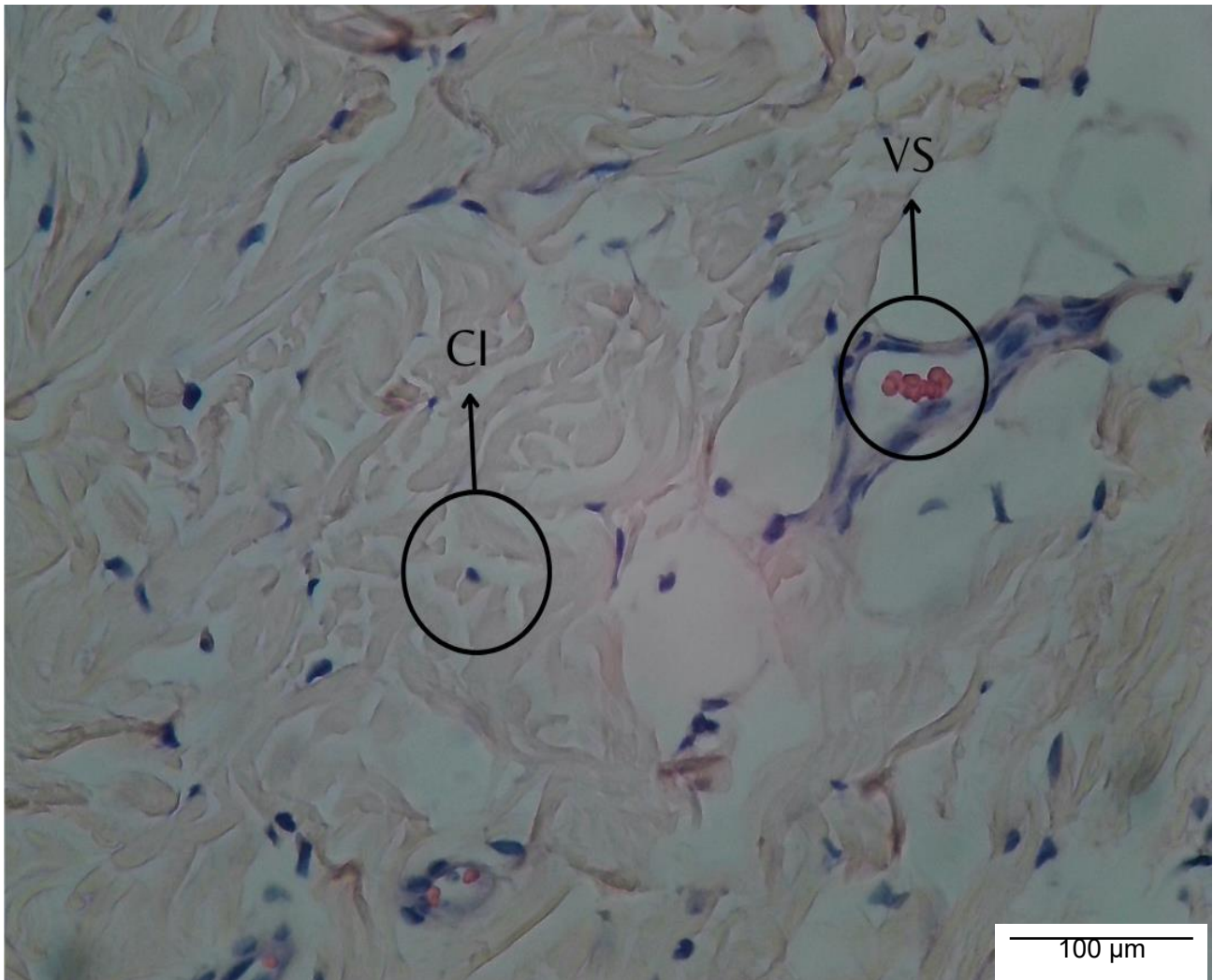


Figura 15: Fotomicroscopia do tendão calcâneo de ratos com tendinite não tratado (Grupo NT). Corte longitudinal com objetiva de 40X. CI (células inflamatórias); VS (vaso sanguíneo);

A figura 16 representa a foto histológica do tendão com tendinites tratados com PBM 3 J, observamos melhora significativa do infiltrado inflamatório, diminuição de células inflamatórias na região peritendínea e reorganização das fibras.

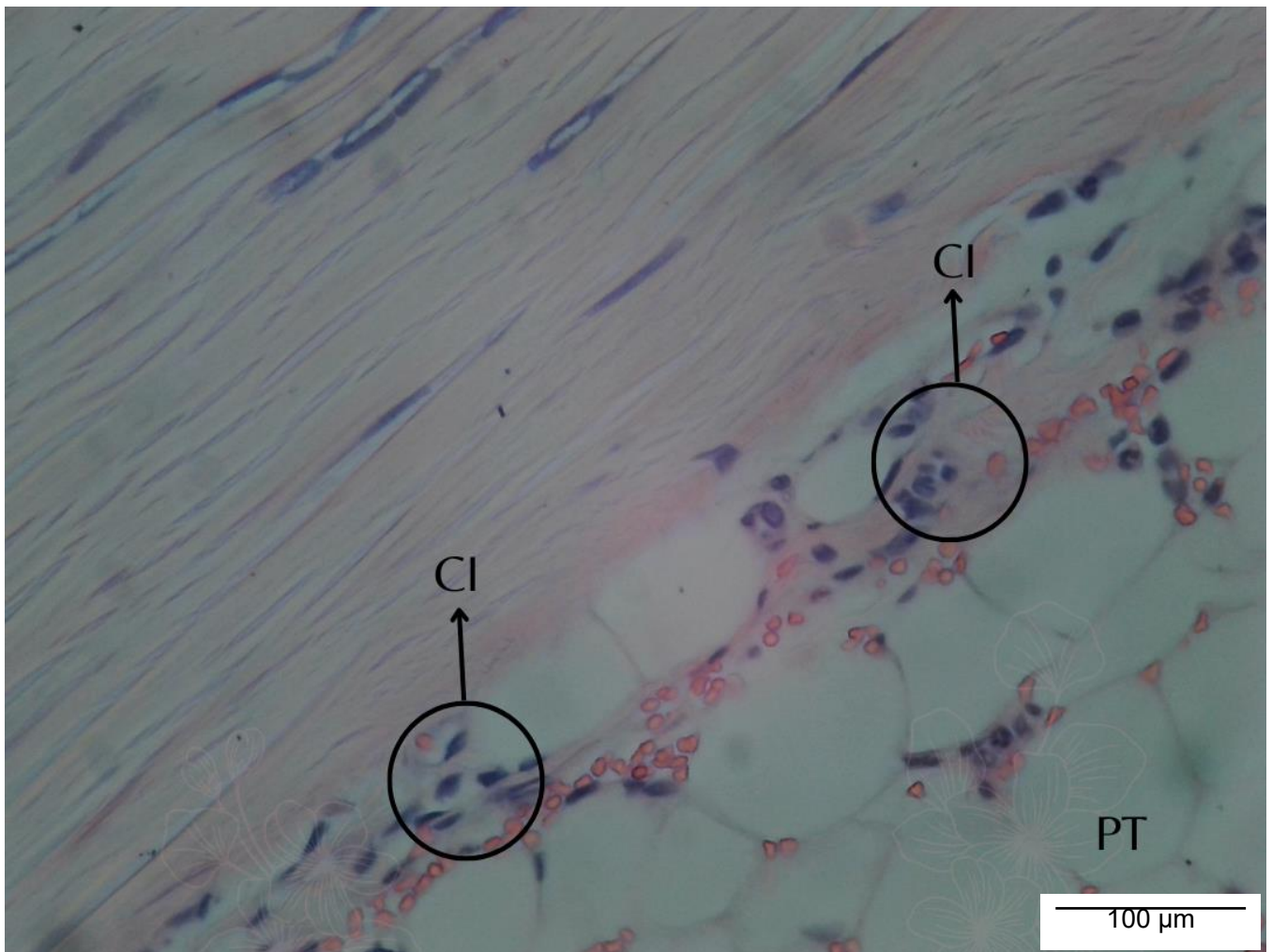


Figura 16: Microscopia do tendão do grupo Grupo PBM (Objetiva 40X) Corte longitudinal.
PT: região peritendínea; CI: células inflamatórias.

A figura 17 abaixo representa o grupo tratado com Opióide, podemos observar células inflamatórias em maior concentração na região peritendínea, fibras mais organizadas quando comparamos com o grupo NT.

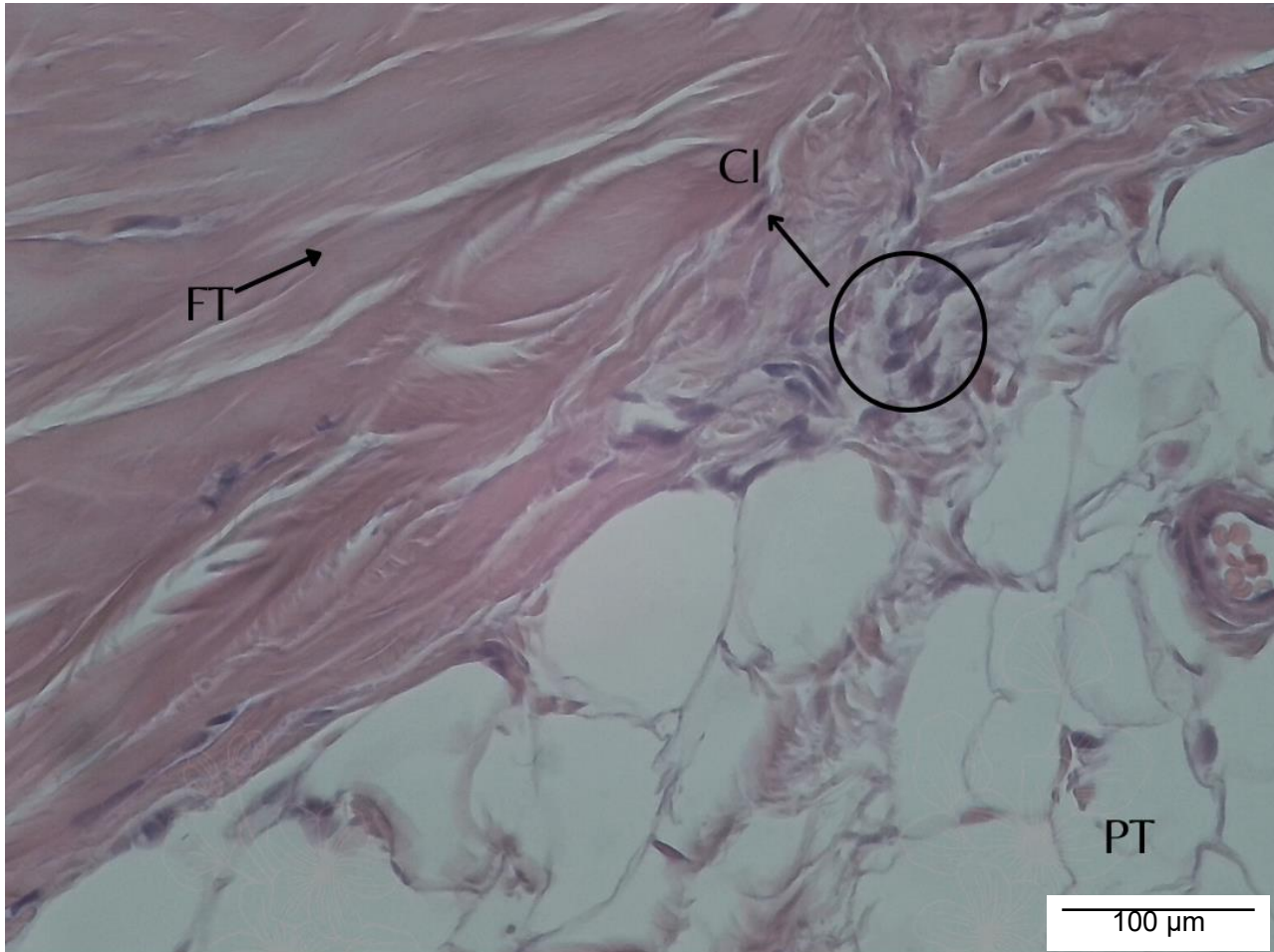


Figura 17: Microscopia do tendão do Grupo Op (Objetiva 40X). Corte longitudinal. FT (fibras tendíneas) PT: região peritendínea CI (células inflamatórias)

Na figura abaixo representa o grupo PBM associado ao opióide. Podemos observar melhora no infiltrado inflamatório em região peritendínea e reorganização das fibras no tendão propriamente dito.



Figura 18: Microscopia do tendão do Grupo PMB+Op (Objetiva 40X). Corte longitudinal FT (fibras tendíneas) CI (células inflamatórias) VS (vaso sanguíneo)

Na figura abaixo representada pelo grupo NL + PBM, podemos observar que o infiltrado inflamatório se encontra aumentado principalmente em região peritendínea e as fibras do tendão propriamente dito encontram-se desorganizadas próximo a região peritendínea e mais organizada na região central do tendão.

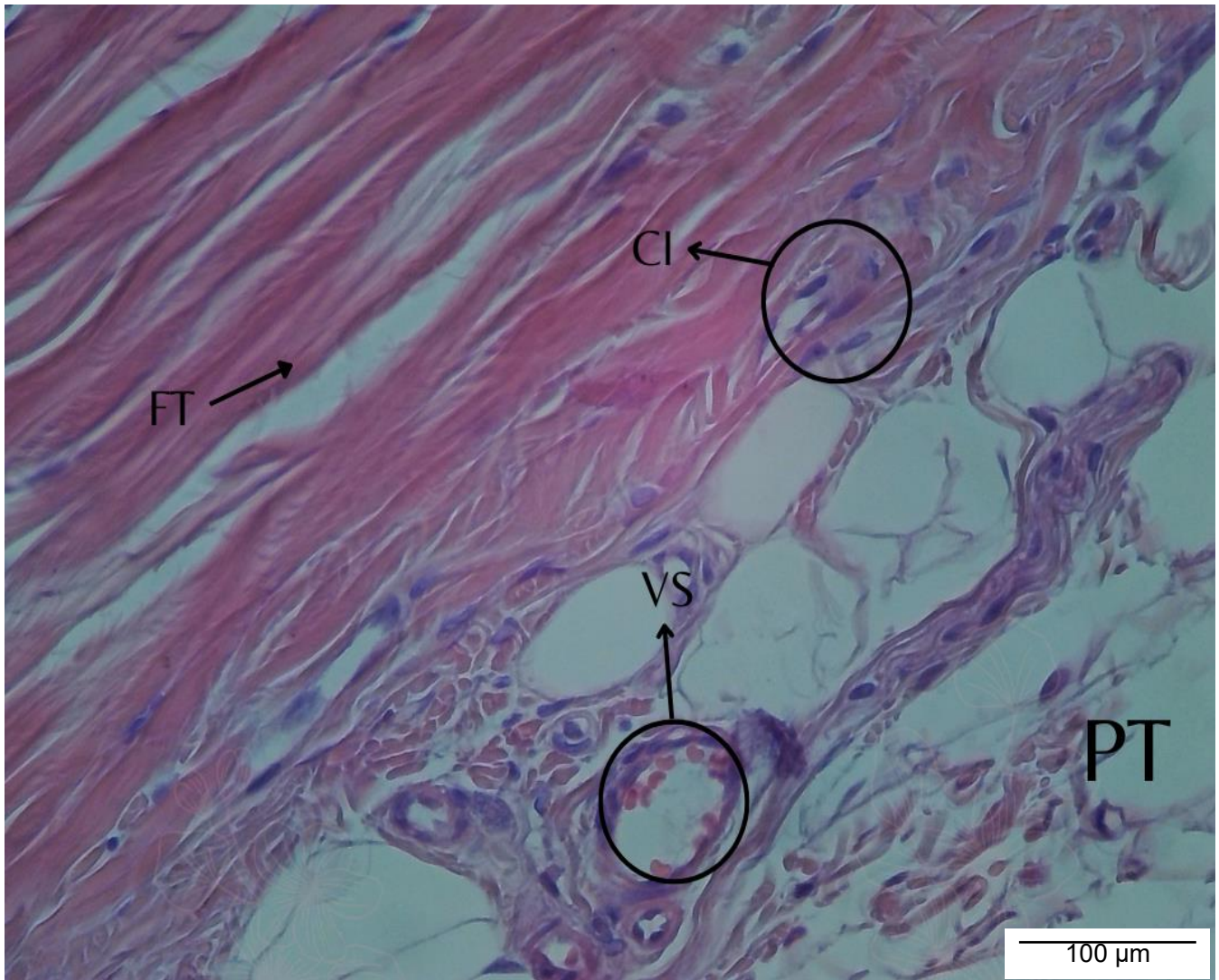


Figura 19: Microscopia do tendão do grupo controle Grupo NL + PBM (Objetiva 40X). Corte longitudinal PT (peritendínea) FT (fibras tendíneas) CI (célula inflamatório)

6.6 Imagens histológicas de tendão calcâneo de ratos corado com Picrosirius em diferentes tratamentos.

Nas imagens abaixo para identificação das fibras colágenas, o método de coloração de Picrosirius permitiu avaliação qualitativa da área e diferenciação do colágeno total.

A imagem A representa o grupo controle e podemos observar toda extensão das fibras do tendão corada em vermelho e organizadas.

A imagem B representa o grupo NT, podemos observar que a coloração vermelha que indica o colágeno está fragmentada impossibilitando de identificar a extensão da fibra do tendão propriamente dito. A presença de outras cores pode representar outras estruturas.

A imagem C está representada pelo Grupo PBM, observamos a presença da coloração vermelho intenso predominante em toda a imagem. Identificamos as fibras e sua organização.

Na imagem D representada pelo grupo Op podemos observar a presença de outras colorações, indicando outras estruturas e ou tecidos. A representação do vermelho intenso está presente, porém em menor evidência quando comparado a outros grupos.

A imagem E está representada pelo grupo PBM + Op podemos observar maior quantidade de estruturas coradas em vermelho intenso. Outras colorações também estão presentes, mas em menor quantidade quando comparamos com o grupo Op.

A imagem F está representada pelo grupo NL + PBM, podemos observar a presença de outras colorações, porém a coloração vermelha predomina a imagem, indicando a presença de colágeno total em maior quantidade quando comparado ao grupo Op.

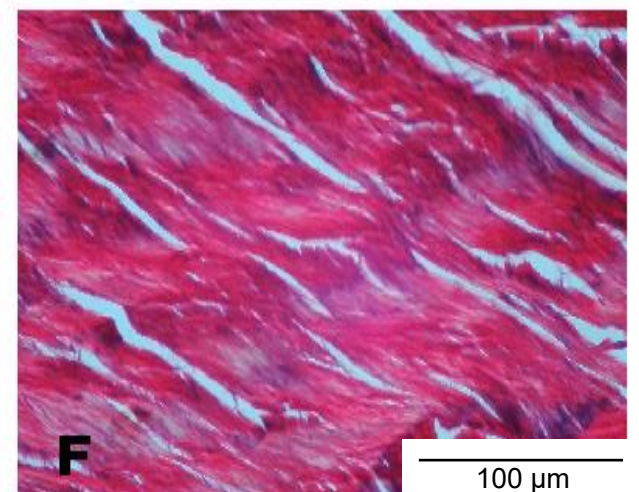
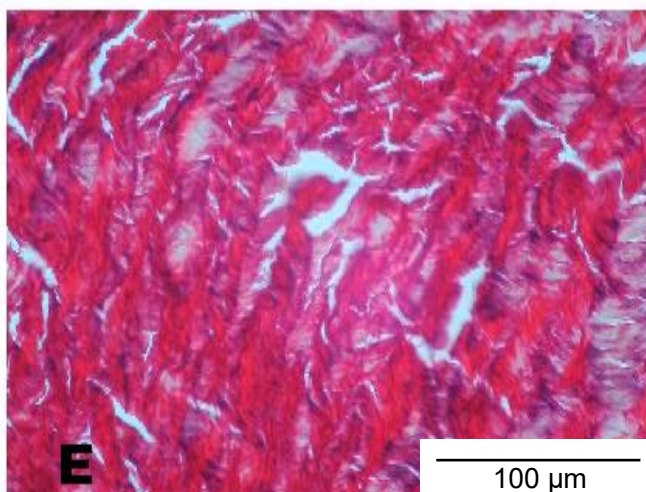
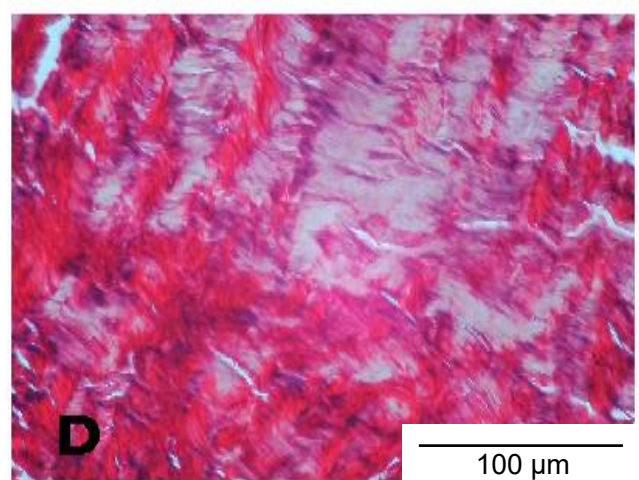
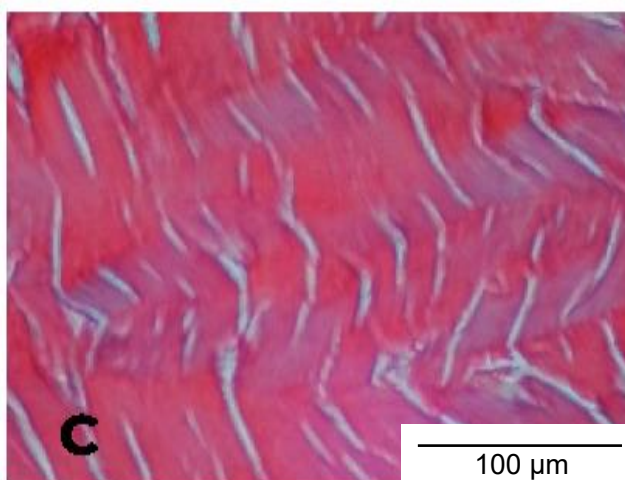
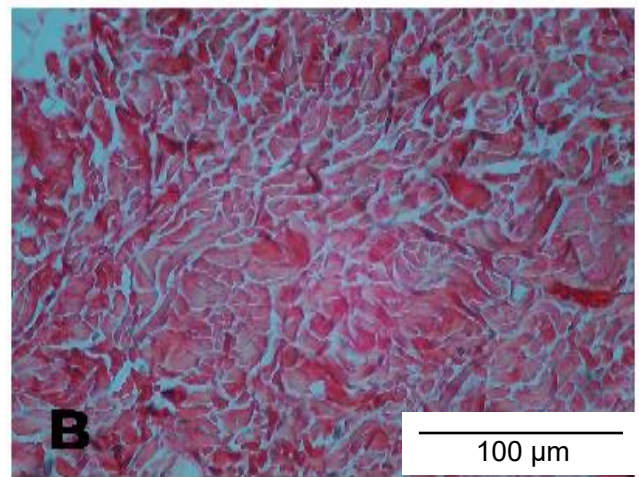
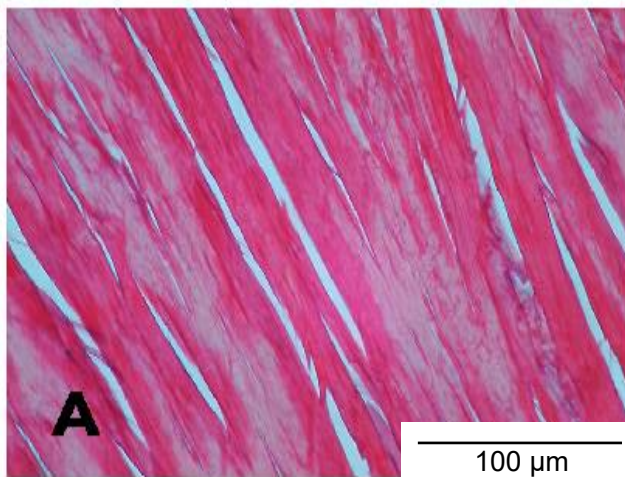


Figura 20: : Microscopia do tendão dos grupos CLT (A) NT (B) PBM (C) Op (D) PMB+Op (E) NL+PBM (F) (Objetiva 40X). Corte longitudinal corado com picrosirius para identificação das fibras de colágeno total, representado pela coloração vermelho intenso.

6.7 Imagens histológicas de tendão calcâneo de ratos corado com Picrosirius em luz polarizada, após diferentes tratamentos.

A coloração histológica pelo picrosirius identifica a presença de colágeno no material estudado, as fibras, quando visualizadas ao microscópio óptico com lente polarizadora, assumem colorações distintas, ficando alaranjadas, se forem fibras de colágeno tipo I, ou esverdeadas, se forem colágenos do tipo III.

A imagem (A) representa o grupo CLT, podemos observar que a coloração vermelho brilhante está em maior quantidade quando comparado com a coloração verde, indicando pouca presença de colágeno do tipo III e maior presença de colágeno do tipo I.

A imagem (B) está representada pelo grupo NT, podemos observar que a presença de colágeno tipo III aumentou quando comparamos com o grupo CTL, tal fato está evidenciado pelo aumento da coloração verde em diversos pontos da imagem.

A imagem (C) representa o grupo PBM, podemos observar que houve um aumento na coloração laranja, indicando que o colágeno tipo I está mais evidente nesse tecido. A coloração esverdeada está presente em focos difusos e em menor quantidade.

A imagem (D) está representada pelo grupo Op, podemos observar o aumento da coloração esverdeada, indicando a presença de colágeno tipo III em maior quantidade quando comparado com os outros grupos.

Na imagem (E) temos a representação do grupo PBM + Op e podemos observar o predomínio da coloração esverdeada, indicando a presença de maior quantidade de colágeno do tipo III.

A imagem (F) representa o grupo NL + PBM e podemos observar que a coloração vermelho brilhante aumentou, indicando que a quantidade de colágeno tipo I aumentou nesse grupo, quando comparado com os grupos OP e PBM+ Op.

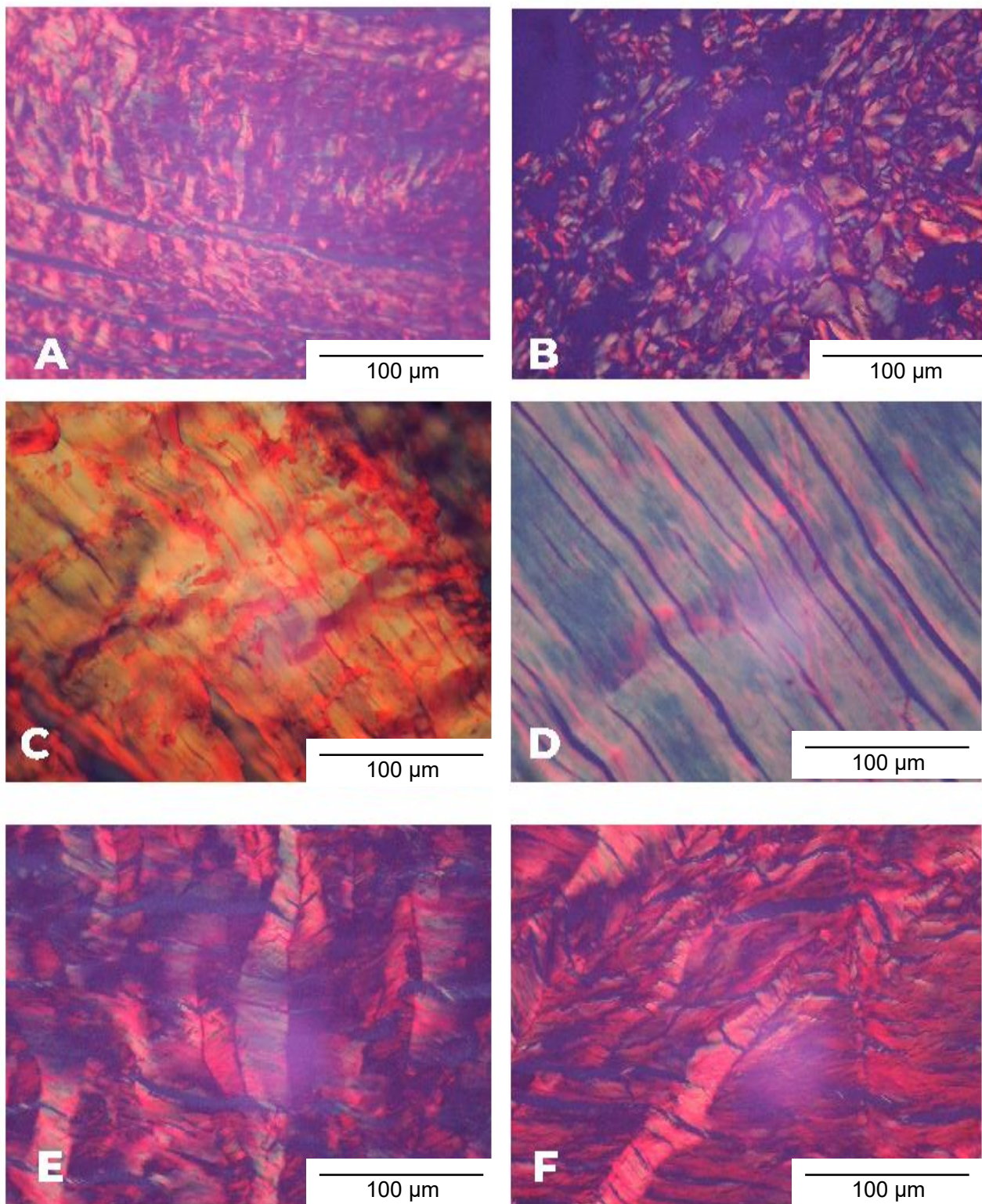


Figura 21: Microscopia do tendão do grupo controle Grupo CLT (A) NT (B) PBM (C) Op (D) PBM+ Op (E) e NL+PBM F) (Objetiva 40X). Corte longitudinal corado com picrosirius e polarizado para identificação e diferenciação dos tipos de colágeno I e III. A coloração esverdeada representa o colágeno do tipo III e o vermelho brilhante o colágeno do tipo I.

7 – DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de investigar o efeito analgésico da terapia por Fotobiomodulação (PBM) associada com o uso de Cloridrato de Tramadol, um analgésico da classe dos opióides, no processo doloroso. Foi utilizado o modelo de tendinite induzida por Colagenase, por simular um processo inflamatório com a degradação de colágeno na região de indução da lesão¹⁶. Neste trabalho, foi observado que os animais com tendinite e sem tratamento reduziram a tolerância à dor, bem como aumentaram a presença de infiltrado inflamatório no tecido tendíneo, associado com o aumento da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO), além de reduzir a proporção de colágeno. O grupo tratado com PBM promoveu aumento da tolerância a dor, além de controlar os níveis de MPO e a manutenção de colágeno próximo ao grupo saudável (CTL). Da mesma forma, o grupo tratado com Opióide aumentou a tolerância à dor, porém, sem contribuir para a manutenção dos níveis de MPO ou para a proporção de colágeno. A associação da PBM com Opióide, além de aumentar a tolerância à dor, também reduziu os níveis de MPO e manteve a proporção de colágeno próximo ao grupo saudável. Por fim, os animais que foram pré-tratados com Naloxona, um antagonista opióide e receberam a PBM 15 minutos após, apresentaram redução da tolerância a dor, aumento nos níveis de MPO e redução da proporção de colágeno, sugerindo que parte do efeito analgésico da PBM pode ter relação com mecanismos opióides.

Os resultados discutidos neste espaço são referentes a: I) Alodinia Mecânica; II) Infiltrado Inflamatório; III) Níveis de MPO; IV) Colágeno Total e V) Colágeno Tipo I. Em I, referente a alodinia mecânica, são apresentados resultados da sensibilidade a dor e os valores descritos como tolerância a dor para os grupos que suportaram mais a pressão no tendão, durante este teste funcional. Em II, a partir das lâminas histológicas, coradas com HE (Hematoxilina e Eosina) foram identificadas regiões com infiltrado inflamatório, mais especificamente na região periférica ao tendão propriamente dito (Peritendão). Em III é apresentado os níveis de MPO, referente a enzima Mieloperoxidase, relacionada diretamente com a atividade fagocitária de Neutrófilos e Macrófagos. Por último, em IV e V são apresentadas imagens de lâminas histológicas coradas com *Picrosirius* e fotografadas sem polarização da Luz, indicando Colágeno Total ou com polarização da Luz, indicando Colágeno Tipo I para as imagens com tons de rosa e vermelho.

Os parâmetros de irradiação escolhidos neste estudo foram os descritos a seguir: Laser de Baixa Intensidade; 808 nm; 3J; 100 mW e 30s; por contato. Estes parâmetros já foram utilizados em outros estudos experimentais e clínicos^{38 69 68}. O uso da terapia por Fotobiomodulação, na energia radiante entre 3 a 8 J/cm² já foram citados em diversos trabalhos, com resultados positivos na redução de mediadores inflamatórios como IL1- β e TNF- α , com hipótese que a PBM nesta faixa de irradiação poderia modular primariamente o sistema opióide endógeno⁷⁴.

Considerando os resultados obtidos a partir da alodinia mecânica, o grupo NT, ou seja, onde foi induzida a tendinite e não houve nenhum tratamento, a tolerância à dor foi reduzida, refletindo no aumento da sensibilidade no local da lesão. Ao contrário, os grupos com tendinite com tratamento único (PBM ou Op) além do grupo onde houve a associação dos tratamentos (PBM+Op) houve significativo aumento da tolerância à dor. Um resultado interessante observado neste trabalho foi a redução da tolerância a dor no grupo com PBM e pré-tratados com Naloxona (NL+PBM). Neste caso, foi observada uma redução da ação analgésica da PBM quando os animais foram pré-tratados com o antagonista opióide, sugerindo outros mecanismos da PBM para além dos efeitos anti-inflamatórios.

A Naloxona já foi utilizada em outros trabalhos para avaliação de dores relacionadas aos mecanismos opioides⁷⁵, porém até o momento da apresentação deste trabalho, não foram estudados o uso deste antagonista opióide associado a PBM na tolerância à dor (NL e PBM).

A redução da analgesia pelo uso de Naloxona também já foi demonstrado. Em um estudo clínico, duplo cego em pacientes com constipação, observou-se que a Naloxona não só reverteu o quadro de constipação, como reduziu o efeito analgésico dos opioides⁷⁷. Esta redução da analgesia também foi observada em nosso estudo, onde os animais tratados com PBM e pré-tratados com Naloxona, apresentaram redução da tolerância a dor, fortalecendo a ideia que a PBM poderia atuar não só pelos mecanismos anti-inflamatórios, mas também nos mecanismos opióides para o controle da dor.⁷⁰

Neste trabalho também foi avaliado o infiltrado inflamatório tecidual na região periférica ao tendão propriamente dito, conhecida como peritendão. As imagens histológicas coradas com HE mostraram um aumento de células inflamatórias no grupo NT

(Tendinite sem tratamento) quando comparado ao grupo saudável (CTL). Ao mesmo tempo, foi observado acentuado aumento dos níveis de MPO (Mieloperoxidase) também no grupo NT quando comparado novamente com o grupo CTL. Por outro lado, todos os grupos tratados, entre eles o PBM, Op ou ainda o grupo com associação de tratamentos (PBM+Op) apresentaram redução do infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo NT. Mais uma vez, o grupo NL+PBM manteve o infiltrado inflamatório semelhante ao grupo NT. Curiosamente, o grupo PBM+Op apresentou redução na presença de células inflamatórias, com imagens semelhantes ao grupo saudável (CTL).

Ao analisar os níveis de Mieloperoxidase nos grupos tratados, observamos que o grupo PBM e PBM+Op reduziu de maneira expressiva a MPO quando comparado ao grupo NT. O grupo NL+PBM não alterou este efeito comparado ao grupo PBM. Contudo, o tratamento único com opióide (Op) não foi capaz de reduzir os níveis de MPO quando comparado ao grupo NT.

Para auxiliar o entendimento do processo inflamatório no tendão, é importante a reflexão sobre as características deste tecido. Sua baixa vascularização, reduzida à região do peritendão promove uma migração mais lenta de células inflamatórias, quando comparada com tecidos mais vascularizados. Da mesma forma, os níveis de MPO indica um aumento da atividade fagocitária na região do tecido lesado. A Mieloperoxidase é uma enzima importante na atividade inflamatória, por ser encontrada principalmente em leucócitos polimorfonucleares, neutrófilos e macrófagos. O aumento da atividade desta enzima pode significar uma tecidual decorrente do processo inflamatório ¹⁶, com aumento do processo inflamatório e da degradação tecidual como, por exemplo, de fibras de colágeno ^{38 70 71}.

Uma das formas de quantificar o colágeno é a partir de lâminas histológicas coradas com *Picrosirius*, onde se observa colorações com tons de vermelho e rosa, sendo quantificadas a partir da utilização de programas de imagem. Também é possível realizar análise semiquantitativa de Colágeno tipo I e III a partir da polarização da luz no microscópio óptico, e desta forma, produzir uma imagem com tons de verde (referente ao colágeno tipo III) e rosa (Referente ao colágeno tipo I). Neste estudo, foi observado que o grupo NT apresentou redução tanto de Colágeno Total, como de Colágeno Tipo I,

comparado ao grupo CTL. Para a mesma análise, a terapia por fotobiomodulação manteve o Colágeno Total e Tipo I próximo aos valores do grupo saudável (CTL). Ao contrário, o grupo Op manteve a quantificação de colágeno total e tipo I similar ao grupo NT. O conjunto destes resultados nos mostra que a PBM pode ter um efeito protetor, evitando a degradação tecidual durante a inflamação aguda no tendão. Este efeito não foi observado no tratamento com Opióide, contudo, na associação dos tratamentos PBM+Op manteve o efeito protetor evitando a redução acentuada de colágeno.

Colágeno do tipo I e III são os principais componentes dos tendões, correspondendo de 65 a 95 % do tipo I e 5 a 10 % do tipo III. A síntese do colágeno do tipo III pode aumentar durante a fase de reparo tecidual, sendo o responsável por transmitir a sustentabilidade ao tecido a ser reparado. Após o período de reparo o colágeno do tipo III é substituído pelo colágeno do tipo I.¹¹

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. A terapia com PBM vem sendo explorada desde a década de 60, e aparece com uma terapia não medicamentosa de destaque em tratamentos para alívio da dor e diminuição do processo inflamatório, pois atua diminuindo mediadores inflamatórios envolvidos no processo algico. Alguns estudos elucidaram a atuação da PBM em associação com fármacos anti-inflamatórios diminuindo citocinas pró-inflamatórias e aumentando a expressão de citocinas anti-inflamatórias¹⁵.

Estudos experimentais em animais com câncer ósseo ou com lesões de joelho evidenciaram que durante o processo inflamatório são liberados peptídeos opióides, responsáveis também pelo controle da dor e estas moléculas consideradas endorfinas endógenas teriam sua ação analgésica principal sobre receptores opioides⁶⁶. Sabe-se também que durante a inflamação, células inflamatórias, como mastócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos produzem estes peptídeos, apresentando um suporte analgésico além dos conhecidos mecanismos relacionados com o controle da inflamação, como o controle das cicloxigenases e prostaglandinas⁶⁷. No caso do modelo de tendinite induzida

por Colagenase, a presença de células inflamatórias como linfócitos, monócitos e neutrófilos na região do peritendão permitiria a presença destas endorfinas com ação em receptores opióides. Neste caso, a antagonização destes receptores pela Naloxona não só poderia interferir na sensibilidade do tendão, como também na atividade das células inflamatórias.⁶⁶

Como comentado anteriormente, o modelo de indução da tendinite utilizado neste trabalho já é conhecido e o seu reflexo no processo inflamatório e da degradação do tendão também.³¹ Contudo, os trabalhos anteriores utilizaram tempos de tratamentos com o objetivo de reduzir o processo inflamatório, associado não só a redução de mediadores inflamatórios, mas consequentemente a redução da dor inflamatória.²¹

Neste trabalho foi utilizado tempos de tratamentos diferentes dos estudos anteriores. A escolha do tempo para a mensuração da dor foi a partir da análise do curso temporal da alodinia mecânica, onde foi escolhido 8 horas após a indução para a leitura do pico de sensibilidade a dor. Contudo, todos os tratamentos (Opióide e PBM) foram realizados apenas 30 minutos antes da leitura da alodinia. Assim, os resultados da alodinia mecânica, nos diferentes tratamentos (Farmacológicos ou Fotobiomodulação) poderiam ser relacionados com outros mecanismos centrais mais imediatos.

Neste estudo, sugerimos que a terapia por fotobiomodulação teria um papel importante no controle da dor periférica e que este controle poderia não ser apenas pela modulação de mediadores inflamatórios, mas também pela ação da Fotobiomodulação nos receptores opióides. A escolha dos grupos experimentais foi propositiva para realizar esta relação. Por exemplo, a inclusão do grupo pré-tratado com antagonista opióide Naloxona e tratado posteriormente com PBM poderia nos esclarecer sua ação sobre mecanismos opióides.

Desta forma, a constatação da redução da dor 30 minutos após a utilização da PBM sugere que a via de analgesia pode não ser a inflamatória. Ademais, a inibição de parte dos efeitos analgésicos da PBM quando pré-tratado com Naloxona fortalece a hipótese de que a PBM poderia ter ação sobre receptores opióides, mesmo em regiões periféricas, como demonstradas na literatura.

Outro resultado importante foi com a associação de PBM e Opióide. Como é conhecido, o uso de opioides está diretamente relacionado a redução da qualidade de vida, uma vez que estes medicamentos possuem relações de dependência e tolerância.¹ Assim, a possibilidade de utilização de Opióide associados com a Fotobiomodulação poderia de certa forma reduzir a concentração do fármaco e reduzir seus efeitos adversos, favorecendo a qualidade de vida do paciente.

Os fármacos que promovem a analgesia 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 COX. O segundo mecanismo é pelo bloqueio direto da hiperalgesia, como em medicações opioides e drogas que promovem o aumento do óxido nítrico.⁷⁹

É importante acrescentar que não só a via inflamatória ou a via dos opioides são responsáveis pelo controle da dor. Sabe-se também que outras moléculas como a Bradicinina e neurocinina como a Substância P, além de seus receptores, possuem grande influência não só na hiperalgesia, como também na manutenção do processo inflamatório, uma vez que estas moléculas estão relacionadas com aumento de mediadores inflamatórios, como IL1-b e TNF-a.⁶⁵

A ideia de que a PBM poderia estimular a transcrição de receptores opioides periféricos pode ter sua explicação no processo inflamatório, em que, em uma situação de inflamação, a regulação de receptores opióides no corno dorsal na medula espinhal mantém-se ascendente, ocasionando um aumento do transporte axonal de receptores para a periferia, estimulado por citocinas, principalmente IL-1, IL-6 e TNF-a e pelo fator de crescimento neuronal, provindo do local inflamado. A alta concentração de MOR nos terminais nervosos periféricos está relacionada com o aumento das citocinas que regulam o crescimento e a proliferação das células gliais, modulando a atividade de peptídeos opióides endógenos⁶³.

Em resumo, nossos estudos demonstraram que o efeito analgésico da fotobiomodulação está associado à via opióide, evidenciada pelos testes de alodinia, quando administrado antagonista dos receptores opióides, a tolerância à dor se assemelha ao grupo não tratado e às terapias combinadas entre a PBM e OP evidenciaram efeitos

68

aditivos na redução de MPO e manutenção do colágeno. A terapia por fotobiomodulação é promissora no tratamento das dores agudas e crônicas e já tem evidências elucidativas da resolução do processo inflamatório, contribuindo para a preservação do colágeno do tipo I,³¹ que se encontra em maior quantidade nesse tipo de tecido, prevenindo lesões futuras. No entanto, nosso estudo possui limitações, como evidências de outras vias de dor, além da avaliação molecular da expressão destes receptores opioides.

A utilização de medicamentos anti-inflamatórios e opióides no controle das dores agudas e crônicas têm sido bastante estudadas. A despeito da eficiência que possam alcançar, 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 que promovam menos efeitos colaterais, com menores custos, a fim de melhorar a qualidade de vida do paciente ⁶⁰.

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

O grupo Op foi efetivo na tolerância a dor devido a sua alta performance analgésica, porém com uma discreta queda na tolerância a dor quando comparamos com os grupos PBM e PBM + Op. O cloridrato de Tramadol é um analgésico da classe dos opióides, um agonista puro não seletivo dos receptores opióides, sua ação é de nível central e envolve outros mecanismos de ação que são descritos na literatura, o tempo de ação analgésica é rápida, chegando no pico de ação após 45 min. ³⁸

Nossos resultados mostraram que a terapia por fotobiomodulação foi efetiva no aumento a tolerância a dor quando comparamos com o grupo NT e NL + PBM e valores similares quando comparamos com o grupo PMB + Op. Sugerindo que o mecanismo envolvido poderia não ser somente pela conhecida ação anti-inflamatória, mas também, possivelmente, via opióide. No entanto, devido aos raros trabalhos que visem o entendimento destes mecanismos de ação da terapia por fotobiomodulação, mais estudos

são necessários. Além disso, seria importante entender os efeitos da associação destas duas terapias (farmacológica e PBM) na modulação do processo doloroso.

Como apresentado nesta contextualização, os trabalhos associando fármacos opióides com terapia por fotobiomodulação são escassos e o estudo da luz nos mecanismos envolvendo receptores opióides 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 opióides, o que levaria ao uso destas terapias no tratamento de processos dolorosos, além do efeito anti-inflamatório já conhecido pela PBM em vários trabalhos científicos.³¹

Considerando os resultados apresentados nesse estudo, tornam-se necessário mais trabalhos com modelos antagonizados isoladamente e tempos mais prolongados de acompanhamento associando os opióides com a fotobiomodulação, trazendo novas informações e caminhos para o controle seguro da dor. Como parte dos resultados apresentados em outros trabalhos avaliaram a ação da fotobiomodulação na tolerância a dor e nos processos inflamatórios, seria importante em trabalhos futuros avaliar os mecanismos de dor via opióide estudando a associação das terapias e a durabilidade da analgesia fornecida pelas terapias.

8 - CONCLUSÃO

Conclui-se que a terapia por fotobiomodulação, nos parâmetros de irradiação 808nm, 3J, 100 mW, foi eficaz na redução da dor aguda, evidenciados no teste de alodinia mecânica, reduziu a atividade de MPO, reduziu o infiltrado inflamatório e manteve os níveis de colágeno do tipo I elevadas. A efeito analgésico pode ter relação com os mecanismos opioides.

A PBM associada ao uso de opioides promove ações analgésicas além de reduzir a degradação do tecido lesionado.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. INTURRISI, C. E.; LIPMAN, A. G. opioid analgesics. In: Fishman SM, Ballantyne JC e Rathmell JP. Bonica's Management of Pain. 4a ed. Lippincott, Philadelphia, 2010, 1172-1186.
2. SCHERRER, N. H. B. et al. Laser Photobiomodulation in the acute inflammatory response of the calcaneal tendon injury in rats exposed to cigarette smoke. *Fisioterapia e Pesquisa*. vol.26 no.2 São Paulo Apr./June 2019 Epub July 18, 2019
3. VALENTINO. R. J. VOLKOW. N. D. Untangling the complexity of opiod receptor function. *Neuropsychopharmacology*.vol.43.USA.2514-2520,2018
4. BJORDAL JM, LOPES-MARTINS RA. Lack of adherence to the laser dosage recommendations from the World Association for Laser Therapy in Achilles study. *Arch Phys Med Rehabil*. 2013 Feb;94(2):408
5. BOJSEN-MOLLER J, KALLIOKOSKI KK, SEPPANEN M, KJAER M, MAGNUSSON SP. Low-intensity tensile loading increases intratendinous glucose uptake in the Achilles tendon. *J Appl Physiol*. v. 101, p. 196–201, 2006.
6. KILSZTAJN S, ROSSBACH A, da CÂMARA MB, do CARMO MSN. Serviços de saúde, gastos e envelhecimento da população brasileira. *Revista Brasileira de Estudos de População*, v20, n1. 2003.
7. LOPES-MARTINS, R. A.; ALBERTINI, R.; MARTINS, P. S.; BJORDAL, J. M.; FARIA NETO, H. C. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carrageenan. *Photomed. Laser Surg.*, v. 23, n. 4, p. 377-381, 2005.
8. MARCOS, R.L. Efeito do laser de baixa intensidade (810nm) na tendinite induzida por collagenase em ratos. Tese de Doutorado – USP. 2010.

9. MARCOS, RL; LEAL JR, ECP; BJORDAL, JM; LOPES-MARTINS, RAB. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in rat Achilles tendinitis: A consistent alternative to drugs. *Photochemistry and Photobiology*. 2011.
10. Marcos RL, Leal-Junior EC, Arnold G, Magnenet V, Rahouadj R, Wang X, Demeurie F, Magdalou J, de Carvalho MH, Lopes-Martins RÁ. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. *J Orthop Res*. 30(12):1945-51, 2012.
11. MARCOS RL, ARNOLD G, MAGNET V, RAHOUDJ R, MAGDALOU J, LOPES-MARTINS RA. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for Achilles tendinitis. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2013 Sep 9;29C:272-285.
12. OLIVEIRA FS, PINFILDI CE, PARIZOTO NA, LIEBANO RE, BOSSINI PS, GARCIA EB, FERREIRA LM. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. *Lasers Surg Med*.41(4):271-6. 2009.
13. PALLOTTA RC, BJORDAL JM, FRIGO L, LEAL JUNIOR EC, TEIXEIRA S, MARCOS RL, RAMOS L, DE MOURA MESSIAS F, LOPES-MARTINS RA. Infrared (810-nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci*. 2011 Apr 12. [Epub ahead of print]
14. PELOSO, P. M.; SCHEIMAN, J. M. The Economic Implications of Cyclooxygenase-2-Specific Inhibitors. *Am. J. Med.*, v. 110, n. 3A, p. 50-54, 2001.
15. PIRES D, XAVIER M, ARAÚJO T, SILVA JA JR, AIMBIRE F, ALBERTINI R. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. *Lasers Med Sci*. 2011 Jan;26(1):85-94.
16. STERGIOULAS, A.; STERGIOULA, M.; AARSKOG, R.; LOPES-MARTINS, R. A.; BJORDAL, J. M. Effects of low-level laser therapy and eccentric exercises in the treatment of recreational athletes with chronic achilles tendinopathy. *Am. J. Sports Med.*, n. 36, v. 5, p. 881-887, 2008.

17. YANG G, IM HJ, WANG JH. Repetitive mechanical stretching modulates IL-1 beta induced COX-2, MMP-1 expression, and PGE2 production in human patellar tendon fibroblasts. *Gene*. v. 363, p. 166–172, 2005.
18. KRAYCHETE,DC.;CALASANS MTA.;VALENTE,CMT. Citocinas pró-inflamatórias e Dor. *Rev Bras Reumatol*, v 46 n.3 199-206, mai/junh, 2006.
19. CARVALHO, WA., LEMONICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da Dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. *Ver Bras. Anesthesiol*, 1998 48:137 – 158.
20. OLIVEIRA, CMB.; SAKATA, RK.; ISSY, AM.; GEROLA, LR. Citocina e Dor. *Ver Bras Anesthesiol*, 61:2:255-265, 2011.
21. CARVALHO, LPR. Avaliação do efeito da radiação PBM sobre a absorção do anti-inflamatório diclofenaco aplicado topicamente em modelo experimental de lesão muscular por estiramento passivo em ratos. Tese de Doutorado, 2012.
22. PONTE, EL.; VITOR, AO. Psicologia da dor: uma revisão bibliográfica.*reciis.v.2n.1*, p.87-96, jan-jun.,2008.
23. BISPO, LB. A nova tecnologia do laser terapêutico no controle da dor.*Rev.bras.odontol,rio de janeiro,v.66n.1,p.107-111*, jan-jun, 2009.
24. VALE, FM. Dor. Novos aspectos fisiopatológicos e consequentes estratégias farmacológicas. *Rfmlv.5n.5p.291-304*,2003.
25. KLAUMANN, PR.; WOUK, AFPF.; SILLAS, T. Patologia da dor. *Veterinary Science,v.13,n.1,p.1-12*,2008
26. KUMMER, CL.; TERESA, CRB.; COELHO, TSA. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid Anti-inflammatory drugs:\current issues. *Ver Bras Anesthesiol V52*, n.4, p.498-512, 2002.
27. OLIVEIRA, MX. Efeitos da terapia LED de baixa intensidade em tendinites em modelo experimental. Tese Doutorado, 2009

28. MENEGUZZO, DT. Fototerapia com laser em baixa intensidade em processo inflamatório agudo induzido por carragenina em pata de camundongos- estudos de dosimetria. Tese de Doutorado, 2010.
29. VOLP, ACP. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. Arq Bras Endocrinol Metab vol.52 no.3 São Paulo Apr. 2008.
30. TORRES-SILVA R, et al. The low level laser therapy (LLLT) operating in 660 nm reduce gene expression of inflammatory mediators in the experimental model of collagenase-induced rat tendinitis. Lasers Med Sci. 2015 Sep;30(7):1985-90.
31. MARCOS RL, LEAL-JUNIOR EC, ARNOLD G, MAGNET V, RAHOUADJ R, WANG X, DEMEURIE F, MAGDALOU J, DE CARVALHO MH, LOPES-MARTINS RÁ. Low-level laser therapy in collagenase-induced Achilles tendinitis in rats: analyses of biochemical and biomechanical aspects. J Orthop Res. 2012 Dec;30(12):1945-51.
32. TOMAZONI SS, FRIGO L, DOS REIS FERREIRA TC, CASALECHI HL, TEIXEIRA S, DE ALMEIDA P, MUSCARA MN, MARCOS RL, SERRA AJ, DE CARVALHO PTC, LEAL-JUNIOR ECP. Effects of photobiomodulation therapy and topical non-steroidal anti-inflammatory drug on skeletal muscle injury induced by contusion in rats-part 1: morphological and functional aspects. Lasers Med Sci. 2017 Dec;32(9):2111-2120.
33. SANTOS LS, SALTORATO JC, MONTE MG, MARCOS RL, LOPES-MARTINS RÁB, TOMAZONI SS, LEAL-JUNIOR ECP, DE PAIVA CARVALHO RL. PBMT and topical diclofenac as single and combined treatment on skeletal muscle injury in diabetic rats: effects on biochemical and functional aspects. Lasers Med Sci. 2018 Jul 10.
34. HAMBLIN, M.R. Can osteoarthritis be treated with light? Arthritis Research & Therap. v.15, p.120, 2013.
35. BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 2017. Disponível em:<<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=354850>>. Acesso em: 02. maio. 2020.

36. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. *Protocolo de investigação, diagnóstico, tratamento e prevenção de lesões por esforços repetitivos/distúrbios osteomusculares relacionados ao trabalho*. Brasília, 2012
37. BARON, R.; BLINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic Pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurology*. 9:807-819, 2010
38. ALGHADIR, Ahmad et al. Effect to flow-level laser therapy in patients with chronic knee osteoarthritis: a single-blinded randomized clinical study. *Lasers In Medical Science*, [s.l.], v. 29, n. 2, p.749-755, 3 ago. 2013.
39. MIRANDA, G. M. D. et al. Population aging in Brazil: current and future social challenges and consequences. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*, v. 19, n. 3, p. 507– 519, 2016.
40. SCHERRER, N. H. B. et al. Laser Photobiomodulation in the acute inflammatory response of the calcaneal tendon injury in rats exposed to cigarette smoke. *Fisioterapia e Pesquisa*. vol.26 no.2 São Paulo Apr./June 2019 Epub July 18, 2019
41. VALENTINO. R. J. VOLKOW. N. D. Untangling the complexity of opiod receptor function. *Neuropsychopharmacology*.vol.43.USA.2514-2520,2018
42. INTURRISI, C. E.; LIPMAN, A. G. opioid analgesics. In: Fishman SM, Ballantyne JC e Rathmell JP. *Bonica's Management of Pain*. 4a ed. Lippincott, Philadelphia, 2010, 1172-1186.
43. KING, T.; PORRECA, F. Opioids in cancer pain: new considerations. *Pain Clinical Updates*, IASP, February 2010, 1-5.
44. ARATAMI.Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense inflammation and neutrophil function. *Archives os Biochemistry and Biophysics*.v.640.2018.
45. AGUIAR, Grazielle Cordeiro et al. Effects of an exercise therapy protocol on inflammatory markers, perception of pain, and physical performance in individuals with knee osteoarthritis. *Rheumatology International*, [s.l.], v. 35, n. 3, p.525-531, 10 out. 2014.
46. PALLOTTA, R. et al. Infrared (810nm) low-level laser therapy on rat experimental knee inflammation. *Lasers Med Sci*, v. 27, n. 1, p. 71-78, jan. 2012.

47. FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.. Opiáceos, Opióides de ação analgésica e antagonistas. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 26, n. 2, p.125-136, dez. 2005.
48. BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman. 12. ed. Amgh, 2012. 2112 p.
49. Schiffer F, Khan A, Bolger E, Flynn E, Seltzer WP, Teicher MH. An Effective and Safe Novel Treatment of Opioid Use Disorder: Unilateral Transcranial Photobiomodulation. *Front Psychiatry*. 2021 Aug 10; 12:713686. doi: 10.3389/fpsy.2021.713686. PMID: 34447323; PMCID: PMC8382852.
50. 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.
51. 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.
52. De Jesus JF, Spadacci-Morena DD, Rabelo NDA, Pinfildi, 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.
53. 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.
54. 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.
55. Shen Q, Qian YY, Xu XJ, Li W, Liu JG, Fu W. Projeto, síntese e avaliação biológica de derivados de tramadol N-fenilalquil-substituídos como novos ligantes do

receptor opioide μ . *Acta Pharmacol Sin*. 2015; 36 (7): 887-894. doi: 10.1038 / aps.2014.171

56. Helle, Jing-Xia et al. Comparative actions of opioid analgesic morphine, methadone and coeine in rat peripheral and central neuropathic pain. *Pain* 2005; 116:347 – 358

57. 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.

58. 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

59. Machelska H, Mousa SA, Brack A et al. – Opioid control of inflammatory pain regulated by intercellular adhesion molecule-1. *J Neurosci*, 2002;22:5588-5596.

60. Garcia JBS, Cardoso MGM, Santos MCD. Opioides e o sistema Imunológico: Relevancia Clínica. *Rev. Bras. Anesthesiolol*. 2012; 62:5:709-718.

61. 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.

62. 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.

63. 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.

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. 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.

66. 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.

67. 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.

68. Meireles A; Rocha BP; Rosa CT. et al. Role of endogenous opioids in 820nm low power laser analgesia in the knees os wister rats. *rev. dor*, 2012.

69. Meissner W, Ullrich K. Re: naloxone, constipation and analgesia. *J Pain Symptom Manage.* 2002 Sep;24(3):276-7; author reply 277-9. doi: 10.1016/s0885-3924(02)00483-9. PMID: 12458100.

70. Merchan C, Altshuler D, Papadopoulos J: Metilnaltrexona versus naloxona para constipação induzida por opioides na unidade de terapia intensiva médica . 2017, 51:203-208.

71. BERTOLINI, GRF; SILVA, TS; CIENA, AP; TRINDADE, DL. Effects of the low Level Laser Over pain and Edema in Tendon trauma of rats. *Ver Bras Med Esporte Vol* 14, n° 4 Julh-Ago 362-366, 2008.

72. KERPPRS, II.; MARTINS, EJ.; VIEIRA, FF.; FERREIRA, LAB.; THOME, MR.; PEREIRA, WM. Ação do Laser de Baixa Potencia na Redução de Edema após indução de Acido Araquidônico em pata de cobaias. 2009 1123-1126.

73. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dor relacionada ao trabalho: Lesões por esforços repetitivos e distúrbios osteomusculares. Brasília DF, 2012.
74. MEIRELES, A.; ROCHA, BP.; ROSA, CT.; SILBA, LI.; BERTOLINI,GRF.Avaliação do papel de opioides endógenos na analgesia do PBM, 820 nm, em joelhos de ratos Wister. Ver Dor. SP, 2012 abr-junh; 152-155.
75. SHILO, Y. Pharmacokinetic of tramadol in horse after intravenous, intramusc and oral administration. Journal of veterinary therapy. V 31 p 60 – 65 2007
76. MANSON, D. Anesthetics, tranquilizer and opioid analgesics. IEquine clinical pharmacology. 1 ed. London: saunders, p 276 – 282, 2004.
77. 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.
78. Bradley PP, Priebe 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.
79. 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

10- ANEXOS

10.1: Certificado do Comitê de Ética

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