

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

IAGO HENRIQUE SILVA MALTA

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO ESPINAL DOS SISTEMAS
ENDOCANABINOIDE E OPIOIDE NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA
TERAPIA POR ONDAS DE CHOQUE EM CAMUNDONGOS COM DOR PÓS-
OPERATÓRIA**

ALFENAS/MG

2023

IAGO HENRIQUE SILVA MALTA

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO ESPINAL DOS SISTEMAS
ENDOCANABINOIDE E OPIOIDE NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA
TERAPIA POR ONDAS DE CHOQUE EM CAMUNDONGOS COM DOR PÓS-
OPERATÓRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas, pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Malta, Iago Henrique Silva.

Avaliação da participação espinal dos sistemas endocanabinoide e opioide na antinocicepção induzida pela terapia por ondas de choque em camundongos com dor pós-operatória / Iago Henrique Silva Malta. - Alfenas, MG, 2023.

129 f. : il. -

Orientador(a): Giovane Galdino de Souza.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Dor pós-operatória. 2. Terapia por ondas de choque extracorpórea. 3. Receptor canabinoide CB1. 4. Receptor canabinoide CB2. 5. Receptores opioides. I. Souza, Giovane Galdino de, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

IAGO HENRIQUE SILVA MALTA

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS SISTEMAS ENDOCANABINOIDE E OPIOIDE NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA TERAPIA POR ONDAS DE CHOQUE EM CAMUNDONGOS COM DOR PÓS-OPERATÓRIA

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia da dor.

Aprovada em: 05 de maio de 2023

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza
Instituição: Universidade federal de Alfenas
UNIFAL -MG

Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto
Instituição: Universidade Federal de São Carlos
UFSCar

Prof. Dr. Pedro Henrique Gobira Nunes
Instituição: Universidade de São Paulo
USP

Prof. Dr. Fabricio de Araújo Moreira
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais
UFMG

Prof. Dr. Tayllon dos Anjos Garcia
Instituição: Universidade federal de Alfenas
UNIFAL -MG



Documento assinado eletronicamente por **Tayllon dos Anjos Garcia, Professor do Magistério Superior**, em 04/05/2023, às 07:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giovane Galdino de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 08/05/2023, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nivaldo Antonio Parizotto, Usuário Externo**, em 08/05/2023, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabrcício de Araújo Moreira, Usuário Externo**, em 08/05/2023, às 21:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Henrique Gobira Nunes, Usuário Externo**, em 09/05/2023, às 03:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0969479** e o código CRC **9EF97405**.

AGRADECIMENTOS

De forma breve, gostaria de deixar os meus agradecimentos a todos(as) que, de alguma forma, contribuíram para que a minha formação, e conseqüentemente esta tese, tenha se tornado possível.

Em primeiro lugar, à minha amada companheira, Suellen de Azevedo Moreira, que esteve comigo em cada etapa deste processo, com carinho e ternura, apoiando e motivando. Sem ela, nada disso seria possível. Minha completa gratidão.

Aos meus pais, Cláudia Emília da Silva e José Lúcio Malta, que, com infindável comprometimento, se dedicaram a me educar e a mostrar o caminho do conhecimento, com compreensão e, acima de tudo, amor. MUITÍSSIMO OBRIGADO.

Aos meus colegas de laboratório, Livia, Gabriela, Thamyris, Fernanda e Bruno, com os quais compartilhei momentos inesquecíveis no dia a dia do laboratório, e que levarei comigo, com carinho, na lembrança por terem sido os melhores companheiros nessa longa caminhada em busca de conhecimento. Meus agradecimentos.

À Universidade Federal de Alfenas, que me acolheu e foi responsável por todas as etapas da minha formação profissional, com ensino de qualidade e, acima de tudo, gratuito. Aproveito para agradecer as instituições parceiras que tenham contribuído tanto para a minha formação, seja com disciplinas, palestras e outros eventos, ou que tenham contribuído diretamente para a realização desta tese. Muito obrigado!

A todos os professores, servidores e funcionários da UNIFAL, sem os quais a instituição não poderia funcionar, e que contribuíram direta e indiretamente para a minha caminhada acadêmica. Meus sinceros agradecimentos.

Em especial, ao Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza, por ter me recebido para orientação, desde o mestrado, e por lutar para manter um laboratório preparado para a produção de ciência de alta qualidade, mesmo em momentos de adversidade. Sem a sua orientação e seu empenho, essa tese não existiria. Obrigado!

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro ao longo do doutorado. Obrigado!

Por fim, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A dor pós-operatória (DPO) ocorre após procedimentos cirúrgicos e, apesar de ser um evento esperado, afeta a qualidade de vida e funcionalidade do indivíduo. Se não for corretamente controlada, essa dor pode se tornar crônica, causando um problema persistente. O tratamento de escolha para esse tipo de dor é a terapia farmacológica e, apesar de sua eficácia, essa modalidade apresenta efeitos adversos indesejados. Assim, as terapias não farmacológicas, como a terapia por ondas de choque (TOC), atenuam a dor de origem musculoesquelética com menos efeitos adversos. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos antinociceptivos da TOC, principalmente no sistema nervoso central. Portanto, o objetivo foi investigar, a nível espinal, a participação do sistema endocanabinoide (SEC) e do sistema opioide (SOP) no efeito antinociceptivo da TOC em camundongos com DPO. Para isso, camundongos C57BL/6 machos foram submetidos à cirurgia de incisão e retração de pele e músculo (IRPM) na coxa direita para indução de DPO. O limiar nociceptivo mecânico desses animais foi avaliado pelos monofilamentos de von Frey. A cirurgia de IRPM induziu DPO do 1º ao 28º dia pós-operatório. Os animais receberam então duas aplicações, no 14º e no 16º dia pós-operatório, com 100, 200 ou 400 pulsos da TOC, com densidade de fluxo de energia de 0,11 mJ/mm², 10 Hz e área de aplicação de 5 mm na região medial da coxa direita, ou tratamento sham. No 16º dia, após a segunda aplicação da TOC, o limiar nociceptivo foi avaliado novamente. As doses de 100 e 200 reduziram a DPO por 60 minutos. A participação dos receptores CB₁ e CB₂ foi avaliada pela pré-administração no 16º dia (antes da segunda aplicação de TOC) dos antagonistas seletivos de CB₁ AM251 (0,1, 1 e 10 µg), CB₂ AM630 (3,6 e 12 µg), e houve uma redução dose-dependente da antinocicepção da TOC. Por outro lado, a pré-administração do inibidor da recaptção de anandamida (AEA) VDM11 (1,2 e 4 µg) e o inibidor da enzima monoacilglicerol lipase (MAGL) JZL184 (0,5, 1 e 2 µg) potencializaram e prolongaram a antinocicepção da TOC. Similarmente, a pré-administração de Naloxona (1,2 e 4 µg), antagonista não seletivo dos receptores opioides, Cloccinamox (1,2 e 4 µg), antagonista seletivo dos receptores opioides µ e Nor-binaltorfimina (1,25, 2,5 e 5 µg), antagonista seletivo dos receptores opioides κ, mostrou que a antagonização dos receptores opioides, não seletivamente e seletivamente, diminuiu de forma dose-dependente a antinocicepção da TOC. A avaliação no 16º dia dos níveis espinais de AEA e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) por cromatografia líquida/espectrometria de massa revelou um aumento nos níveis somente de 2-AG nos animais tratados. A análise de Western Blot mostrou uma diminuição na expressão espinal de MAGL, porém não houve alteração na expressão entre os grupos da expressão de CB₁, CB₂ e da enzima hidrolase de amidas de ácidos graxos (FAAH). Adicionalmente, a avaliação espinal da expressão dos receptores µ, κ e δ opioides não apresentou diferença estatística entre os grupos. Finalmente, a avaliação espinal dos níveis das citocinas IL-1β, TNF-α e IL-10 pela técnica de ELISA evidenciou uma redução dos níveis de IL-1β nos animais com DPO tratados com TOC em comparação com os animais não tratados, mas nenhuma diferença entre os grupos foi identificada para as outras citocinas. Com base nos achados do presente estudo, é possível sugerir que a TOC atenua a DPO e que tanto o SEC como o SOP possam participar do efeito antinociceptivo dessa terapia.

Palavras-chave: dor pós-operatória; terapia por ondas de choque extracorpórea; receptor canabinoide CB₁; receptor canabinoide CB₂; receptores opioides.

ABSTRACT

Post-operative pain (POP) occurs after surgical procedures and, despite being an expected event, it affects the individual's quality of life and functionality. If not managed properly, this pain can become chronic, causing a persistent problem. The treatment of choice for this type of pain is pharmacological therapy and, despite its effectiveness, this modality has adverse effects. Thus, non-pharmacological therapies, such as shock wave therapy (SWT), attenuate musculoskeletal pain with fewer adverse effects. However, little is known about the antinociceptive effect of SWT, specially in the central nervous system. Therefore, the objective was to investigate the spinal participation of the endocannabinoid system (ECS) and the opioid system (OPS) in the antinociceptive effect of SWT in mice with POP. For this, male C57BL/6 mice were submitted to skin and muscle incision and retraction surgery (SMIR) in the right thigh for POP induction. The nociceptive threshold of these animals was evaluated using von Frey monofilaments. SMIR surgery induced POP from the 1st to the 28th postoperative day. The animals then received two applications, on the 14th and 16th postoperative days, of 100, 200, or 400 SWT pulses, with an energy flux density of 0.11 mJ/mm^2 , 10 Hz, on an application area of 5 mm of the medial region of the right thigh, or sham treatment. On the 16th day, after the second application of SWT, the nociceptive threshold was evaluated again. 100 and 200 pulses of SWT reduced POP for 60 minutes. The participation of CB_1 and CB_2 receptors was evaluated by pre-administration on the 16th day (right before the second SWT application) of the selective antagonists for CB_1 , AM251 (0.1, 1, and 10 μg), and CB_2 , AM630 (3, 6, and 12 μg), and there was a dose-dependent reduction in SWT antinociception. On the other hand, pre-administration of the anandamide (AEA) reuptake inhibitor VDM11 (1, 2, and 4 μg) and the monoacylglycerol lipase (MAGL) enzyme inhibitor JZL184 (0.5, 1 and 2 μg) potentiated and prolonged the antinociception of SWT. Likewise, the pre-administration of Naloxone (1, 2, and 4 μg), a non-selective opioid receptor antagonist, Cloccinamox (1, 2, and 4 μg), a selective μ opioid receptor antagonist, and Norbinaltorphimine (1.25, 2.5, and 5 μg), a selective antagonist of opioid κ receptors, showed that the antagonization of opioid receptors, non-selectively and selectively, decreased in a dose-dependent manner the antinociception induced by SWT. Assessment in the 16th day of spinal AEA and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) levels by liquid chromatography/mass spectrometry revealed an increase in 2-AG levels only in treated animals. Western Blot analysis showed a decrease in the spinal expression of MAGL, but there was no change between groups in the expression of CB_1 , CB_2 , and the enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH). In addition, spinal evaluation of μ , κ , and δ opioid receptor expression showed no statistical difference between groups. Finally, spinal evaluation of IL-1 β , TNF- α , and IL-10 cytokine levels by ELISA technique showed a reduction in IL-1 β levels in SWT-treated animals with POP when compared to untreated animals, but no difference between groups was identified for the other cytokines. Based on the findings of the present study, it is possible to suggest that SWT attenuates POP and that both ECS and OPS may participate in the antinociceptive effect of this therapy.

Key-words: post-operative pain; extracorporeal shockwave therapy; CB_1 cannabinoid receptor; CB_2 cannabinoid receptor; opioid receptors.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1 — Representação esquemática da via nociceptiva e regiões importantes para o processamento nociceptivo..... | 23 |
| Figura 2 — Representação esquemática dos mecanismos que contribuem para a dor pós-operatória (DPO) e possivelmente para a sua cronificação | 28 |
| Figura 3 — Características físicas e efeitos biológicos da terapia por ondas de choque (TOC)..... | 39 |
| Figura 4 — Diagrama esquemático ilustrando a estrutura e funcionamento do sistema endocanabinoide..... | 43 |
| Figura 5 — Passo a passo da cirurgia de IRPM..... | 54 |
| Figura 6 — Imagem representativa do microrretrator utilizado na cirurgia de IRPM | 55 |
| Figura 7 — Avaliação da DPO e do efeito antinoceptivo da TOC por meio do teste de von Frey..... | 57 |
| Figura 8 — Imagem representativa da administração de substâncias por via intratecal..... | 59 |
| Figura 9 — Imagem representativa da aplicação da TOC na região medial da coxa direita dos animais..... | 60 |
| Figura 10 — Diagrama resumindo o delineamento dos experimentos..... | 68 |
| Figura 11 — Imagens radiográficas representativas de cada grupo | 105 |
| Figura 12 — Diagrama esquemático sintetizando os principais resultados a respeito da participação do SEC e SOP no efeito antinociceptivo induzido pela TOC..... | 119 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 — Avaliação da DPO induzida pela cirurgia de incisão e retração de pele e músculo (IRPM) durante 28 dias..... | 71 |
| Gráfico 2 — Avaliação do efeito antinociceptivo do tratamento com 3 diferentes doses da TOC (100, 200 e 400 pulsos) sobre a DPO induzida pela cirurgia de IRPM no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito antinociceptivo da TOC (B)..... | 73 |
| Gráfico 3 — Avaliação dos níveis de AEA (A) e 2-AG (B) nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 16º dia após a cirurgia de IRPM para indução da DPO, 1 hora após o segundo tratamento com a TOC..... | 74 |
| Gráfico 4 — Avaliação da influência do aumento da disponibilidade espinal de AEA no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e gráfico de área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito do VDM11 e a antinocicepção da TOC (B)..... | 76 |
| Gráfico 5 — Efeito da injeção i.t. de VDM11 ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais..... | 77 |
| Gráfico 6 — Avaliação da influência do aumento da disponibilidade espinal de 2-AG no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e gráfico de área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito do JZL184 e a antinocicepção da TOC (B)..... | 79 |
| Gráfico 7 — Efeito da injeção i.t. de JZL184 ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais Co ou com DPO induzida pela IRPM, no 16º dia pós-operatório..... | 80 |
| Gráfico 8 — Expressão de DAGL α (A), FAAH (B) e MAGL (C) nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 16º dia após a cirurgia de IRPM para indução da DPO, 1 hora após o segundo tratamento com a TOC..... | 82 |
| Gráfico 9 — Avaliação da participação dos receptores CB1 espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar | |

| | |
|--|----|
| nociceptivo durante o efeito do AM251 e a antinocicepção da TOC (B)..... | 84 |
| Gráfico 10 —Efeito da injeção i.t. de AM251 ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais controle ou com DPO induzida pela IRPM, no 16º dia pós-operatório. | 86 |
| Gráfico 11 —Avaliação da participação dos receptores CB2 espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito do AM630 e a antinocicepção da TOC (B)..... | 88 |
| Gráfico 12 —Efeito da injeção i.t. de AM630 ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais Co ou com DPO induzida pela IRPM, no 16º dia pós-operatório. | 89 |
| Gráfico 13 —Expressão dos receptores canabinoides CB1 (A) e CB2 (B) nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 16º dia após a cirurgia de IRPM para indução da DPO, 1 hora após o segundo tratamento com a TOC | 90 |
| Gráfico 14 —Avaliação não seletiva da participação dos receptores opioides espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito da Naloxona e a antinocicepção da TOC (B). | 92 |
| Gráfico 15 —Efeito da injeção i.t. de Naloxona ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais Co ou com DPO induzida pela IRPM, no 16º dia pós-operatório | 93 |
| Gráfico 16 —Avaliação da participação dos receptores opioides μ espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito do Cloccinamox e a antinocicepção da TOC (B). | 95 |

| | |
|---|-----|
| Gráfico 17 —Efeito da injeção i.t. de Cloccinamox ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais Co ou com DPO induzida pela IRPM, no 16º dia pós-operatório | 96 |
| Gráfico 18 —Avaliação da participação dos receptores opioides κ espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito da Nor-binaltorfimina e a antinocicepção da TOC (B)..... | 98 |
| Gráfico 19 —Avaliação da participação dos receptores opioides μ espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito do Naltrindole e a antinocicepção da TOC (B)..... | 100 |
| Gráfico 20 —Expressão dos receptores μ (A), κ (B) (C) e δ opioides nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 16º dia após a cirurgia de IRPM para indução da DPO, 1 hora após o segundo tratamento com a TOC..... | 102 |
| Gráfico 21 —Avaliação dos níveis das citocinas IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 16º dia após a cirurgia de IRPM para indução da DPO, 1 hora após o segundo tratamento com a TOC..... | 104 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| 2-AG | 2-araquidonoilglicerol |
| AEA | Anandamida/N-araquidonoiletanolamina |
| AMPA | Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico |
| AMPc | monofosfato de adenosina cíclico |
| ASC | Área sob a curva |
| ASIC | Canal iônico sensível a ácido |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| BC | Bradicinina |
| BDNF | Fator de crescimento derivado do cérebro |
| CB ₁ | Receptor canabinoide do tipo 1 |
| CB ₂ | Receptor canabinoide do tipo 2 |
| CBD | Canabidiol |
| CCI | Lesão de constrição crônica do nervo ciático |
| CDME | Corno dorsal da medula espinal |
| CEUA | Comissão de Ética em Experimentação Animal |
| CFA | Adjuvante completo de Freund |
| CGRP | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina |
| CLR | Receptor similar ao receptor de calcitonina |
| Co | Controle |
| COX | Ciclooxigenase |
| DAG | Diacilglicerol |
| DAGL | Diacilglicerol lipase |
| DFE | Densidade de fluxo de energia |
| DPO | Dor pós-operatória |
| EC | Endocanabinoide |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| FAAH | Hidrolase de amidas de ácidos graxos |
| FR | Formação reticular |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GPCR | Receptor acoplado à proteína G |
| GRD | Gânglio da raiz dorsal |
| IASP | Associação Internacional para o Estudo da Dor |

| | |
|------------------|--|
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 |
| IL | Interleucina |
| IL-1R1 | Receptor para IL-1 tipo 1 |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzível |
| IRPM | Incisão e retração de pele e músculo |
| LC | <i>Locus coeruleus</i> |
| MAGL | Monoacilglicerol lipase |
| MAPK | Proteínas quinase ativadas por mitógeno |
| mGluR | Receptores metabotrópicos para glutamato |
| MMP | Metaloproteinases de matriz |
| MRMHR | Monitoramento de reação múltipla de alta resolução |
| NAPE | N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina |
| NAT | N-acetiltransferase |
| Na _v | Canais para sódio dependentes de voltagem |
| NF-κB | Fator nuclear-κB |
| NGF | Fator de crescimento do nervo |
| NK1 | Receptor de neurocinina-1 |
| NMDA | Receptor N-metil-D-aspartato |
| NO | Óxido nítrico |
| OC | Ondas de choque |
| PA | Potencial de ação |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| PCNA | Antígeno nuclear de célula proliferante |
| PDYN | Preprodinorfina |
| PENK | Preproencefalina |
| PG _{E2} | Prostaglandina E2 |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-quinase |
| PKA | Proteína quinase A |
| PLC | Fosfolipase C |
| PLD | Fosfolipase D |
| POMC | Pro-opiomelanocortina |
| PPAR | Receptor ativado por proliferador de peroxissoma |
| RIPA | Tampão de ensaio radioimunoprecipitador |
| RVM | Bulbo rostral ventromedial |

| | |
|---------------|---|
| SC | Sensibilização central |
| SCP | Substância cinzenta periaquedutal |
| SEC | Sistema endocanabinoide |
| SOP | Sistema opioide |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNP | Sistema nervoso periférico |
| Sub P | Substância P |
| TENS | Estimulação elétrica transcutânea do nervo |
| TGF- β | Fator de crescimento transformador- β |
| THC | Δ^9 -tetra-hidrocanabinol |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral |
| TNFR1 | Receptor para fator de necrose tumoral tipo 1 |
| TOC | Terapia por ondas de choque |
| TrkA | Receptor de tropomiosina relacionado à quinase A |
| TrkB | Receptor de tropomiosina associado à quinase B |
| TRP | Receptores de potencial transitório |
| TRPM1 | Receptor de potencial transitório M tipo 1 |
| TRPV1 | Receptor de potencial transitório vaniloide do tipo 1 |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |
| VPL | Núcleo ventral posterolateral do tálamo |
| VPM | Núcleo ventral posteromedial do tálamo |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1 | DOR | 20 |
| 2.1.1 | Considerações gerais sobre a dor | 20 |
| 2.1.2 | Dor pós-operatória | 26 |
| 2.1.2.1 | DPO crônica | 28 |
| 2.1.2.2 | Sensibilização periférica na DPO crônica | 30 |
| 2.1.2.3 | Sensibilização central na DPO crônica | 31 |
| 2.2 | TERAPIA POR ONDAS DE CHOQUE..... | 34 |
| 2.2.1 | Princípios físicos da TOC | 34 |
| 2.2.1.1 | Tipos de OC | 35 |
| 2.2.1.2 | Parâmetros importantes da TOC | 36 |
| 2.2.2 | Efeitos das OC nos tecidos biológicos | 37 |
| 2.2.3 | A TOC no tratamento da dor | 40 |
| 2.3 | SISTEMA ENDOCANABINOIDE | 41 |
| 2.3.1 | Estrutura e funcionamento do SEC | 42 |
| 2.3.1.1 | Os endocanabinoides: síntese e metabolismo..... | 42 |
| 2.3.1.2 | Os receptores canabinoides..... | 43 |
| 2.3.2 | A influência do SEC na nocicepção | 45 |
| 2.4 | SISTEMA OPIOIDE..... | 47 |
| 2.4.1 | Estrutura e funcionamento do SOP | 48 |
| 2.4.1.1 | Os peptídeos opioides..... | 48 |
| 2.4.1.2 | Os receptores opioides | 49 |
| 3 | OBJETIVOS | 52 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 52 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 52 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 53 |
| 4.1 | ANIMAIS..... | 53 |
| 4.2 | MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA (DPO) | 53 |
| 4.3 | SUBSTÂNCIAS | 55 |
| 4.4 | AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO | 56 |
| 4.5 | VIAS DE ADMINISTRAÇÃO | 58 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.5.1 | Intramuscular..... | 58 |
| 4.5.2 | Intratecal | 58 |
| 4.6 | APLICAÇÃO DA TOC | 59 |
| 4.6.1 | Avaliação por radiografia da integridade femoral após o tratamento..... | 60 |
| 4.7 | AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS ESPINAIS DE ENDOCANABINOIDES ... | 61 |
| 4.8 | QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CANABINOIDES, OPIOIDES E DAS ENZIMAS FAAH E MAGL NA MEDULA ESPINAL | 62 |
| 4.9 | AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS ESPINAIS DE CITOCINAS | 63 |
| 4.10 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 64 |
| 4.10.1 | Avaliação da DPO induzida pelo modelo de IRPM..... | 64 |
| 4.10.2 | Avaliação do efeito antinociceptivo da TOC na DPO induzida pela IRPM | 65 |
| 4.10.3 | Avaliação da participação dos receptores canabinoides e opioides a nível espinal e da influência dos níveis espinais de AEA e 2-AG na antinocicepção induzida pela TOC | 65 |
| 4.10.4 | Avaliação dos níveis de ECs, expressão de receptores canabinoides, opioides e níveis de citocina na medula espinal após aplicação da TOC..... | 67 |
| 4.11 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 68 |
| 5 | RESULTADOS..... | 70 |
| 5.1 | AVALIAÇÃO DA DPO INDUZIDA PELA CIRURGIA DE IRPM | 70 |
| 5.2 | AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA TOC NA DPO INDUZIDA PELA IRPM | 71 |
| 5.3 | AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SEC A NÍVEL ESPINAL NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA TOC | 74 |
| 5.3.1 | Avaliação dos níveis espinais de endocanabinoides após a TOC..... | 74 |
| 5.3.2 | Avaliação da influência dos níveis espinais de AEA e 2-AG na antinocicepção induzida pela TOC..... | 75 |
| 5.3.3 | Avaliação da influência da TOC na expressão espinal de DAGLα, FAAH e MAGL | 81 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 5.3.4 | Avaliação da participação dos receptores CB1 e CB2 espinais na antinocicepção induzida pela TOC..... | 83 |
| 5.3.5 | Avaliação da influência da TOC na expressão espinal dos receptores CB1 e CB2..... | 90 |
| 5.4 | AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SOP A NÍVEL ESPINAL NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA TOC | 91 |
| 5.4.1 | Avaliação da participação dos receptores opioides espinais na antinocicepção induzida pela TOC..... | 91 |
| 5.4.2 | Avaliação da influência da TOC na expressão espinal dos receptores opioides | 101 |
| 5.5 | AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TOC NOS NÍVEIS ESPINAIS DE CITOCINAS..... | 103 |
| 5.6 | AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DA INTEGRIDADE FEMORAL APÓS O TRATAMENTO COM A TOC | 105 |
| 6 | DISCUSSÃO | 106 |
| 7 | CONCLUSÃO | 118 |
| | REFERÊNCIAS..... | 120 |

1 INTRODUÇÃO

A função da dor no organismo humano é imprescindível. Seu papel é alertar a ocorrência de um estímulo potencialmente lesivo ou de uma lesão propriamente, além de promover respostas comportamentais apropriadas para evitar tais estímulos nocivos (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). A Associação internacional para o Estudo da Dor (IASP) descreve a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada ao dano potencial ou real (RAJA *et al.*, 2020). Entretanto, em situações patológicas a percepção dolorosa pode perder seu caráter protetor devido a alterações na via nociceptiva e tornar-se um fardo para o indivíduo. Dessa forma, é de suma importância a investigar os mecanismos envolvidos com a dor assim como novas formas de terapia para tratamento deste sintoma.

Dentre os tipos de dor, a dor pós-operatória (DPO) é uma resposta normal de dor induzida pelo trauma cirúrgico, acompanhada de uma resposta inflamatória e elevada ativação da via nociceptiva. Porém, ela pode ser crônica se passar de 2 meses após o procedimento cirúrgico. Ela se desenvolve principalmente após cirurgias de grande porte, como cirurgias de toracotomia, reparo de hérnias inguinais e cesarianas, podendo afetar até 30% desses indivíduos (FLATTERS, 2008). Este tipo de dor é de difícil tratamento, devido à simultaneidade de vários fatores que contribuem para sua ocorrência. Levando em conta o número elevado de procedimentos cirúrgicos que ocorrem atualmente como forma de intervenção, a DPO afeta a qualidade de vida de inúmeras pessoas e, conseqüentemente, sobrecarrega o sistema de saúde, que tem de arcar com o tratamento desse sintoma (BRUCE; QUINLAN, 2011). Portanto, o estudo de formas eficazes de tratamento é essencial para a resolução dessa dor.

Para o controle deste tipo de dor, diferentes estratégias farmacológicas e não-farmacológicas têm sido empregadas. Todavia, principalmente as estratégias não farmacológicas têm ganhado evidência e crescido muito nos últimos anos, devido ao fato de apresentarem boa efetividade no tratamento deste sintoma, por serem economicamente mais acessíveis e por desencadearem menos efeitos colaterais adversos, quando comparadas às terapias farmacológicas (PAK *et al.*, 2015).

Sendo assim, dentre as terapias não-farmacológicas, estudos têm demonstrado que a terapia por ondas de choque (TOC) apresenta eficácia

principalmente no controle da dor de origem musculoesquelética (WANG, 2012). O tratamento por TOC consiste na geração e aplicação de pulsos sonoros sobre os tecidos, caracterizados pela alternância entre alta pressão positiva e períodos de queda brusca na pressão a valores negativos. Devido à rápida duração dos pulsos, a absorção tecidual é limitada e a geração de calor é mínima (THIEL, 2001). Entretanto, embora a literatura tenha demonstrado a efetividade dessa terapia no tratamento da dor em diversos distúrbios musculoesqueléticos, os mecanismos endógenos envolvidos no efeito antinociceptivo da TOC não foram completamente elucidados, principalmente no sistema nervoso central (SNC).

Pensando em mecanismos centrais que podem mediar o efeito antinociceptivo da TOC, um sistema endógeno promissor nesse aspecto é o sistema endocanabinoide (SEC). Esse sistema participa da regulação de diversas funções fisiológicas, como funções cognitivas, metabolismo, atividade do sistema imune, inflamação e especialmente a nocicepção. Além de suas funções fisiológicas, esse sistema também pode ter um papel importante em algumas patologias, tais como epilepsia, comportamento associado ao vício, entre outras (GUINDON; HOHMANN, 2009). O SEC exerce essas funções por meio de substâncias endógenas como a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), derivados lipídeos da membrana plasmática produzidos sob demanda. Essas substâncias promovem seus efeitos principalmente pela ativação dos receptores canabinoides do tipo 1 (CB₁) e do tipo 2 (CB₂), que são receptores do tipo acoplados da proteína G (GPCR), expressos em diversos tecidos do corpo (GUINDON; HOHMANN, 2009). Em especial, esses receptores são expressos em diversas áreas envolvidas com a modulação de dor como núcleo magno da rafe, núcleo reticular paragigantocelular e corno dorsal da medula espinal (CDME), destacando a importância desse sistema principalmente na atenuação da nocicepção (HERKENHAM *et al.*, 1991).

Outro sistema que poderia estar envolvido no efeito antinociceptivo da TOC é o sistema opioide (SOP). Este sistema constitui uma peça-chave da modulação descendente da dor. Este sistema participa em grande parte da atenuação da dor por meio de vias descendentes, que suprimem principalmente a nível espinal a ascensão de impulsos nociceptivos para as áreas supraespinais de processamento doloroso (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005). Os peptídeos opioides que fazem parte deste sistema funcionam como neurotransmissores e neuromoduladores, e são produzidos em diversas populações de neurônios no SNC, além de também serem expressos por

células imunes na periferia (MILLAN, 2002). Dentre os principais peptídeos que constituem esse sistema, destacam-se as encefalinas, dinorfinas e endorfinas, os quais apresentam origens distintas com base nos precursores. Esses opioides endógenos exercem seus efeitos por meio da ativação de GPCRs, os receptores opioides dos tipos μ , κ e δ . (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005). O efeito analgésico advindo da ativação dos receptores opioides está associado com o mecanismo de transdução desses receptores, inibindo adenilato ciclase, o que leva ao aumento do efluxo de K^+ e redução do influxo de Ca^{2+} , culminando com a hiperpolarização dos neurônios (MILLAN, 2002).

No contexto da modulação da dor, estudos prévios já demonstraram que o SEC e o SOP estão envolvidos, por exemplo, com a analgesia induzida pela estimulação elétrica transcutânea do nervo (TENS) de alta e de baixa frequência, a nível central (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; KALRA; URBAN; SLUKA, 2001; SLUKA *et al.*, 1999). Portanto, considerando a importância do SEC e do SOP na modulação nociceptiva endógena e a sua participação na antinocicepção induzida por outras terapias não farmacológicas, é de interesse investigar a possível participação desses sistemas como mecanismos mediadores dos efeitos antinociceptivos da TOC.

Sendo assim, o presente estudo hipotetiza que o SEC e o SOP, a nível espinal, possam ser mecanismos responsáveis por mediar o efeito antinociceptivo induzido pelo tratamento com a TOC no SNC, atenuando assim a DPO em camundongos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOR

2.1.1 Considerações gerais sobre a dor

A dor é um mecanismo básico de proteção do nosso corpo. Por definição, a dor é uma experiência sensorial e emocional associada ou similar àquela associada ao dano tecidual real ou potencial, de acordo com a definição mais recente da Sociedade Internacional para o Estudo da Dor (do inglês IASP) (RAJA *et al.*, 2020). Assim, a dor é uma modalidade sensorial específica que é acionada toda vez que um indivíduo entre em contato com um estímulo nocivo, capaz de provocar lesão no seu organismo. Como um mecanismo protetor, ela permite que o indivíduo evada e evite estímulos nocivos, a fim de proteger o seu organismo, além de permitir que o indivíduo assuma comportamentos defensivos para possibilitar a regeneração dos tecidos lesionados. Portanto, a dor é uma resposta fisiológica do nosso corpo que se desenvolveu adaptativamente para exercer um propósito de sobrevivência. Sem a dor, o indivíduo perde a capacidade de reconhecer os riscos do ambiente ou de certas situações nocivas, podendo sofrer danos irreversíveis ao seu corpo, como é no caso de síndromes em que o indivíduo é incapaz de sentir dor (LISCHKA *et al.*, 2022). Sendo assim, apesar da característica desagradável dessa modalidade sensorial, ela é imprescindível para a manutenção da integridade do nosso corpo e para a nossa sobrevivência.

Fisiologicamente, a dor aguda ocorre a partir do momento em que um estímulo nocivo ocorre, ou entra em contato com os tecidos. A dor inicialmente depende da nocicepção, que é o processo neural de codificação e organização dos estímulos nociceptivos no sistema nervoso (RAJA *et al.*, 2020). Em primeiro lugar, esses estímulos nocivos são detectados pelas terminações nervosas livres de neurônios aferentes de primeira ordem, localizados nos tecidos periféricos, que também recebem o nome de nociceptores (pelo seu envolvimento com a nocicepção). Quando ocorre um estímulo nocivo, independentemente do seu tipo (seja um estímulo físico mecânico ou térmico, químico ou elétrico), ele deve inicialmente ser transduzido em potencial de ação (PA) para que seja percebido. Canais iônicos na membrana plasmática dos nociceptores são sensíveis a diferentes tipos estímulos nocivos. Por exemplo, receptores da família dos receptores de potencial transitório (TRP), como o

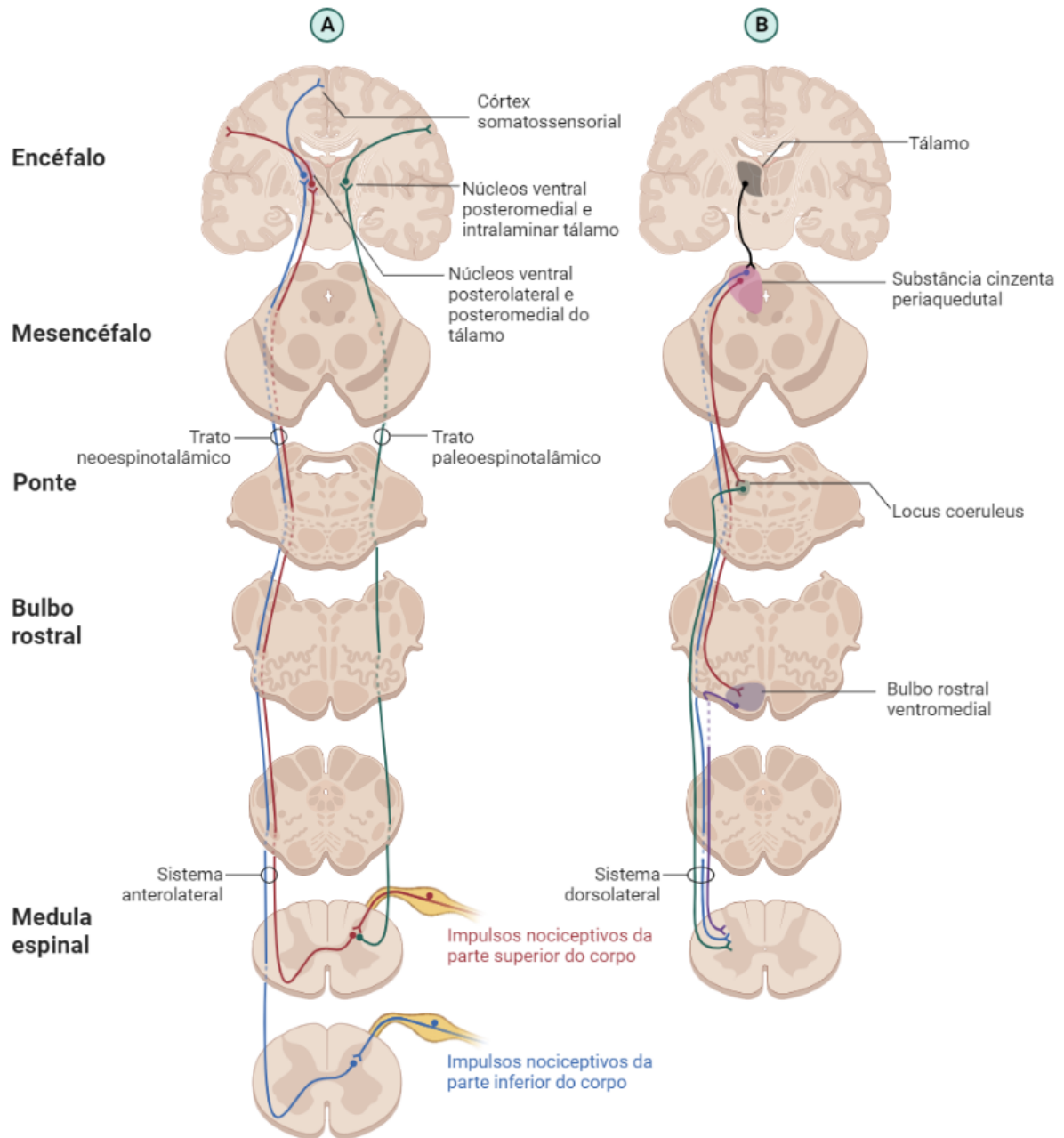
vaniloide do tipo 1 (TRPV1), estão associados com a transdução de calor e calor nocivo, enquanto o da subfamília M tipo 1 (TRPM1) está associado com a detecção de frio nocivo. Alguns TRPs e outros canais como, o canal iônico sensível a ácido (do inglês ASIC), são também sensíveis a estímulos mecânicos nocivos, embora o ASIC também seja capaz de detectar outros irritantes químicos e variações acentuadas do pH no local (MCENTIRE *et al.*, 2016). A partir da detecção do estímulo nocivo, esses canais iônicos se abrem, permitindo o influxo de cátions que será responsável pela despolarização e a geração de PA no nociceptor, concluindo assim o processo de transdução e dando início à nocicepção. Em seguida, iniciando o processo de transmissão, canais para sódio dependentes de voltagem da família Nav são abertos quando o limiar de excitação é atingido, amplificando o PA e permitindo a sua propagação pelo axônio (BENNETT *et al.*, 2019).

O processo nociceptivo que resultará em dor continua com a transmissão desse PA através da via nociceptiva. O PA se propaga pelos axônios das fibras nociceptivas do tipo A δ e do tipo C, cujos corpos celulares localizam-se nos gânglios da raiz dorsal (GRD), até chegarem no corno dorsal da medula espinal (CDME), onde a outra extremidade do nociceptor fará sinapse com um neurônio aferente de segunda ordem. Diferentemente das fibras do tipo A β , que são calibrosas e comumente transmitem impulsos de outras modalidades sensoriais como tato, vibração e pressão, as fibras A δ e C transmitem impulsos relacionados à nocicepção e dor, são mais delgadas e transmitem os potenciais de forma mais lenta. As fibras A δ apresentam uma camada fina de mielina e são de calibre médio, transmitindo PAs em uma velocidade de até 30 m/s. Por outro lado, as fibras C são amielinizadas e delgadas, transmitindo PAs em uma velocidade máxima de apenas 5 m/s. Assim, de acordo com essas características, as fibras A δ são responsáveis pela dor aguda imediata frente ao estímulo nocivo, enquanto as do tipo C são responsáveis pela dor insidiosa subsequente ao estímulo inicial (PURVES, 2018a). As fibras A δ respondem primariamente a estímulos mecânicos de alta intensidade, e a maioria fibras C são conhecidas como polimodais, pois respondem a estímulos nocivos químicos, térmicos e mecânicos (MILLAN, 1999).

Essas fibras também se diferem quanto aos neurotransmissores liberados na sinapse a nível da medula espinal. As fibras do tipo A δ liberam principalmente aminoácidos excitatórios como glutamato e aspartato, ao passo que as fibras do tipo C liberam ainda os neuropeptídeos substância P (Sub P) e o peptídeo relacionado ao

gene da calcitonina (CGRP). Essa diferença também influencia no quão rápido o impulso nociceptivo é transmitido, uma vez que o glutamato, oriundo principalmente das fibras A δ , exerce seu efeito pela ativação dos receptores ionotrópicos α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) e cainato, promovendo a abertura desses canais e o rápido influxo de cátions na célula pós-sináptica. Em contrapartida, a Sub P e o CGRP atuam sobre receptores metabotrópicos do tipo acoplados à proteína G (GPCR), como o receptor de neurocinina-1 (NK1) e o receptor similar ao receptor de calcitonina (CLR) respectivamente. A ativação desses receptores despolariza o neurônio pós-sináptico, entretanto de forma mais lenta, devido à dependência de segundos mensageiros intracelulares, tais como o aumento do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), ativação da proteína quinase A (PKA) e subsequente abertura de canais para Na⁺ na membrana plasmática, em conjunto com a elevação da concentração de Ca²⁺ intracelular por outras vias (MILLAN, 1999; RUSSELL *et al.*, 2014).

Figura 1 — Representação esquemática da via nociceptiva e regiões importantes para o processamento nociceptivo.



Fonte: Autor.

Legenda: A) Tratos ascendentes da via nociceptiva, responsáveis pela transmissão do impulso nociceptivo dos tecidos periféricos até o córtex. O trato neoespinalâmico transmite impulsos associados a aspectos sensoriais-discriminativos da experiência dolorosa. O trato paleoespinalâmico transmite os impulsos e redistribui para regiões associadas com o caráter afetivo-emocional da experiência dolorosa. B) A via descendente modulatória, responsável por modular a excitabilidade dos neurônios ascendentes da via nociceptiva de acordo com a situação.

Na substância cinzenta do CDME, os corpos celulares dos neurônios aferentes de segunda ordem são organizados funcionalmente em lâminas. As projeções dos nociceptores são encaminhadas principalmente para as lâminas I, II e V do CDME, estabelecendo sinapses com os neurônios de segunda ordem nessas regiões. A partir

da excitação do neurônio de segunda ordem, o impulso nociceptivo será conduzido por meio dos axônios destes neurônios por vias saindo da medula espinal em direção a centros superiores de processamento nociceptivo. A primeira é a via espinotalâmica, que é dividida nos tratos neo e paleoespinotalâmico de acordo com as suas características (Figura 1A). O trato neoespinotalâmico é filogeneticamente mais recente. Então, os axônios dos neurônios de segunda ordem partem principalmente da lâmina I do CDME, cruzam para o lado contralateral da medula espinal e ascendem pelo funículo anterolateral da medula espinal até o tálamo, onde há uma sinapse com um neurônio aferente de terceira ordem localizado principalmente nos núcleos ventral posterolateral (VPL) e ventral posteromedial (VPM). Em seguida, o impulso nociceptivo é encaminhado para o córtex somatossensorial, onde será integrado, processado, e percebido como dor. Esta via possibilita a transmissão de aspectos sensoriais-discriminativos da dor, como tipo, localização e intensidade da dor (PURVES, 2018a).

O trato paleoespinotalâmico, por outro lado, é filogeneticamente mais antigo. Nesse trato, neurônios originários da lâmina II emitem projeções em diferentes feixes, que podem ou não cruzar para o lado contralateral da medula. Esses feixes ascendem tanto pelo funículo anterolateral como pelo posterolateral bilateralmente, enviando projeções para os complexos posteromedial e intralaminar do tálamo, o qual retransmite os impulsos nociceptivos para córtices relacionadas com o processamento de aspectos afetivo-motivacionais da dor. Adicionalmente, neurônios de segunda ordem no CDME formam outros tratos aferentes, dentre eles: a) trato espinorreticular, que se projeta para a formação reticular pontina e mesencefálica; b) trato espinomesencefálico, que se projeta para a substância cinzenta periaquedutal (SCP) no mesencéfalo; c) e trato espinoparabraquial, que envia projeções para o núcleo parabraquial na ponte. Esses tratos, em conjunto, são responsáveis por respostas afetivas à sensação dolorosa, pelo recrutamento da modulação nociceptiva endógena e por respostas comportamentais e autonômicas em decorrência da dor (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

Um aspecto importante da nocicepção, e conseqüentemente da dor, é a modulação que ocorre na via nociceptiva. A sua importância é fazer um ajuste fino do funcionamento dessa via a fim de permitir uma resposta de dor adequada à situação. Essa modulação ocorre em vários níveis da via nociceptiva, porém culmina principalmente na modulação a nível espinal, mais especificamente na sinapse entre

o nociceptor e o neurônio de segunda ordem. Um mecanismo modulatório clássico a nível da medula espinal foi inicialmente postulado por Melzack e Wall na década de 1960, revolucionando o entendimento da nocicepção e das vias somestésicas que se tinha na época. Eles descreveram em conjunto uma circuitaria neural em que impulsos oriundos de fibras A β , que transportam informações mecânicas inócuas, poderiam exercer uma espécie de modulação colateral da excitabilidade dos neurônios de segunda ordem da via nociceptiva, por intermédio de interneurônios (MELZACK; WALL, 1965). Esse mecanismo foi nomeado de portões da dor, pois a passagem do impulso de origem mecânica “fechava o portão” para a passagem do impulso nociceptivo, impedindo sua ascensão pela via nociceptiva. Essa teoria propunha que as fibras A β , por meio de ramificações, estimulavam interneurônios inibitórios que, por sua vez, liberavam neurotransmissores inibitórios (ácido γ -aminobutírico (GABA) e glicina) responsáveis por hiperpolarizar os neurônios de segunda ordem dos tratos nociceptivos. A resultante, isto é, a sensação final percebida pelo indivíduo seria definida pelo equilíbrio entre a entrada de impulsos nociceptivos oriundos de estímulos nocivos e pelos impulsos não-nociceptivos derivados de estímulos inócuos. Além disso, esses interneurônios inibitórios seriam importantes também para impedir que fibras A β ativassem neurônios de segunda ordem nociceptivos de forma colateral, garantindo que o estímulo inócuo não provocasse dor (MCMAHON, 2013; MENDELL, 2014). Essa teoria também foi importante para facilitar o entendimento de comportamentos associados com a dor aguda, como o “massagear” de uma região que sofreu um impacto doloroso e a subsequente atenuação dessa dor, assim como esclarecer mecanismos de analgesia de algumas terapias não farmacológicas para o tratamento da dor, como a TENS.

Por fim, existe um notável sistema descendente de modulação nociceptiva partindo principalmente de áreas do tronco encefálico. Dentre essas regiões, as principais são a SCP no mesencéfalo, o bulbo rostral ventromedial (RVM), a formação reticular (FR) e *locus coeruleus* (LC) na ponte. Essas regiões enviam projeções para a medula espinal, exercendo um poderoso efeito modulatório na excitabilidade dos neurônios dessa região envolvidos com a nocicepção, incluindo os nociceptores, neurônios de segunda ordem e interneurônios excitatórios e inibitórios. Esse sistema descendente pode inibir a transmissão nociceptiva, porém ele também é capaz de facilitar esses impulsos nociceptivos, dependendo dos estímulos corticais e estímulos da periferia. Em condições normais, a inibição descendente é mantida sob controle

pela inibição dessas regiões. Entretanto, durante algumas situações, como exercício físico, estresse ou por estímulos periféricos, a inibição desse sistema é interrompida, permitindo a sua atividade. A SCP pode exercer seus efeitos diretamente sobre a medula espinal por meio da liberação de opioides endógenos, ou indiretamente pela ativação do RVM, LC e FR, que por sua vez promovem a liberação de neurotransmissores que exercem uma ação majoritariamente inibitória na medula espinal, sendo eles a serotonina, noradrenalina e GABA (Figura 1B). Assim, o resultado é a redução na liberação de neurotransmissores excitatórios associada à hiperpolarização e redução da excitabilidade de neurônios de segunda ordem ascendentes dos tratos nociceptivos, culminando na redução da percepção dolorosa (MILLAN, 2002; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). Portanto, esse sistema é imprescindível para a regulação da atividade nociceptiva, podendo ser um alvo importante no desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando a atenuação da dor.

2.1.2 Dor pós-operatória

Com o avanço da medicina, as cirurgias e técnicas anestésicas se tornaram essenciais para o tratamento de diversas condições de saúde, podendo salvar a vida de milhares de pessoas. Dessa forma, os procedimentos cirúrgicos são cada vez mais comuns como método de intervenção. A nível global, o número total de cirurgias estimado foi de aproximadamente 313 milhões de procedimentos no ano de 2012 (GAN, 2017). Apesar da importância das cirurgias no tratamento de condições de maior complexidade, normalmente esses procedimentos são acompanhados por efeitos adversos, como é o caso da dor perioperatória e pós-operatória (DPO). Apesar de ser uma consequência esperada de um procedimento cirúrgico, a DPO certamente tem um alto impacto na qualidade de vida do indivíduo. Além do mais, o tratamento inadequado ou ineficiente da DPO pode resultar em consequências graves, aumentando a morbidade e reduzindo a funcionalidade, além de possibilitar cronificação dessa dor (GAN, 2017).

A DPO pode ser caracterizada como uma resposta normal de dor induzida pelo trauma cirúrgico, acompanhada de uma resposta inflamatória e elevada ativação da via nociceptiva. A dor pós-operatória pode ser classificada como aguda, com duração de até 7 dias, ou crônica, com duração maior que 2 meses (GUPTA *et al.*, 2010).

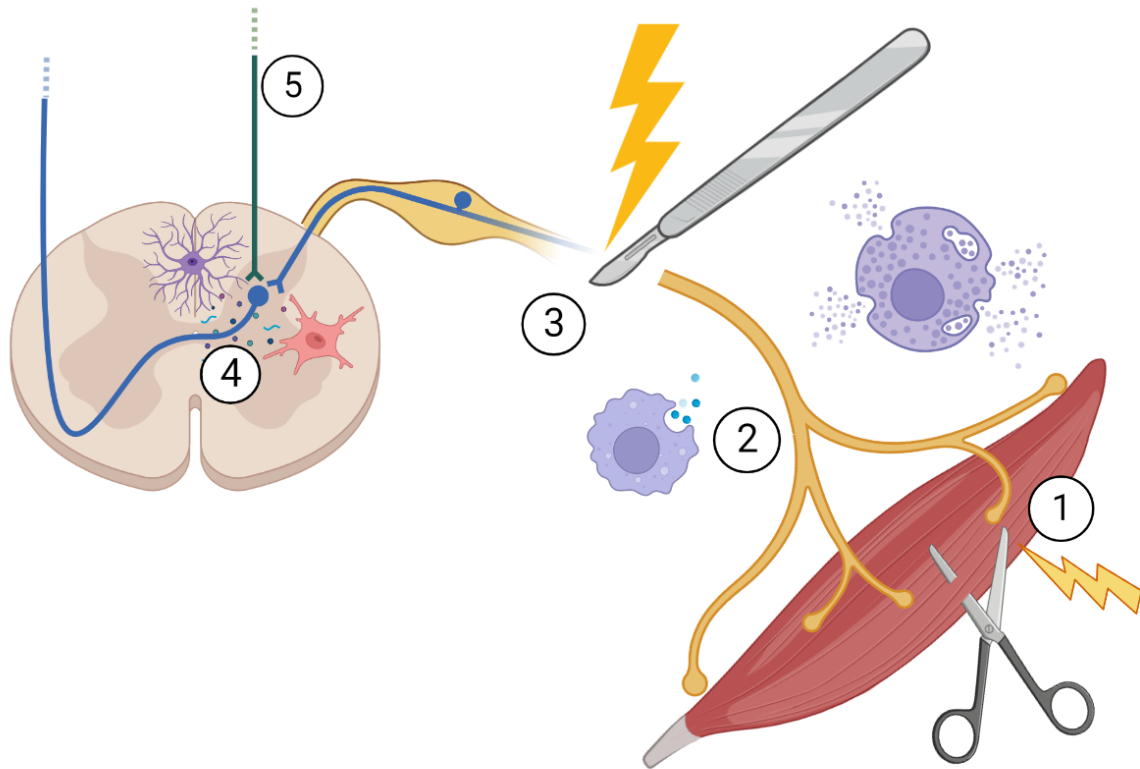
A DPO é um tipo complexo de dor, pois apresenta componentes distintos que potencializam a geração de impulsos nociceptivos e a percepção dolorosa (Figura 2). Essa dor apresenta componentes de origem nociceptiva, inflamatória e neuropática. A dor nociceptiva é oriunda da ativação direta dos nociceptores pelo estímulo nocivo, como por exemplo o bisturi que promove laceração dos tecidos ou pela abertura da incisão e sustentação dessa abertura por meio de retratores durante a cirurgia. A inflamação subsequente contribui para a dor devido à liberação de mediadores inflamatórios, que ativam receptores específicos nos nociceptores e deflagram PAs. A dor neuropática é um tipo de dor complexo causado pela lesão no sistema somatossensorial, fazendo com que a via nociceptiva passe a apresentar atividade aumentada, com disparos de PAs ectópicos e facilitação da transmissão sináptica (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; IASP, 2020). Durante a cirurgia, pequenos nervos podem ser lesionados pela incisão cirúrgica, introduzindo mais uma camada de complexidade à DPO. Devido à sua complexa fisiopatologia, a DPO é de difícil tratamento, exigindo atenção multiprofissional e estratégias eficazes para a sua resolução. A falha no controle da DPO aguda pode ser um grande fator que facilita a sua transição para a forma crônica.

O tratamento de escolha para a DPO é a terapia farmacológica. Apesar de apresentar certa eficácia no controle da DPO, essa modalidade de terapia é comumente acompanhada de efeitos adversos indesejados. Por exemplo, os opioides, considerados o padrão ouro de analgesia farmacológica, apresentam efeitos adversos como náusea, sintomas gastrointestinais, depressão respiratória, além de estar sujeita à tolerância e abuso por parte dos pacientes (BENYAMIN *et al.*, 2008).

Assim, surge a necessidade de levar em consideração terapias alternativas que consigam atenuar a DPO sem causar efeitos adversos, ou promovendo o mínimo de efeitos adversos possível. Considerando a quantidade de efeitos colaterais associados com as terapias farmacológicas, o uso de terapias não farmacológicas de forma adjuvante no manejo da DPO pode ser uma estratégia viável, pois essas terapias apresentam poucos efeitos colaterais e notável eficácia na atenuação da dor em diferentes tipos de síndromes dolorosas. Dentre essas terapias, os agentes eletrofísicos comumente utilizados na prática fisioterapêutica, como a estimulação elétrica transcutânea do nervo (TENS), fotobiomodulação, ultrassom e terapia por ondas de choque (TOC), são opções que devem ser consideradas, devido ao seu relativo baixo custo, fácil aplicabilidade, baixa ocorrência de efeitos adversos e

capacidade de atenuar a dor (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; MALTA *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2021).

Figura 2 — Representação esquemática dos mecanismos que contribuem para a dor pós-operatória (DPO) e possivelmente para a sua cronificação.



Fonte: Adaptado de KEHLET; JENSEN; WOOLF, 2006

Legenda: Inicialmente, os estímulos nocivos da cirurgia, exemplificados pela incisão e corte nos tecidos, causam a dor nociceptiva (1). Na sequência, o processo inflamatório na tentativa de reparo tecidual contribui para a dor por meio da liberação de mediadores inflamatórios que intensificam a ativação dos nociceptores. Além disso, esses mediadores podem induzir a sensibilização periférica, isto é, o aumento da excitabilidade dessas fibras nociceptivas, potencializando a geração de potenciais de ação (2). Durante a cirurgia, há a possibilidade de lesão de fibras nociceptivas, adicionando um componente neuropático de elevada complexidade à DPO (3). A persistência no aumento de impulsos nociceptivos vindos da periferia provoca alterações plásticas temporárias, porém duradouras, a nível da medula espinhal, aumentando a eficácia da sinapse entre os nociceptores e neurônios de segunda ordem. Adicionalmente, há também a ativação células da glia, que por sua vez contribuem para a formação de um microambiente que favorece o aumento da liberação de neurotransmissores excitatórios pelo nociceptor, assim como para o aumento da excitabilidade do neurônio de segunda ordem, dando início à sensibilização central (4). Por fim, a alteração dos circuitos inibitórios, incluindo a modulação descendente, pode alterar o balanço entre excitação e inibição em favor do aumento da geração e transmissão de impulsos nociceptivos, contribuindo para a percepção aumentada da dor.

2.1.2.1 DPO crônica

De acordo com a classificação proposta pela IASP, a DPO crônica pode ser definida como um tipo de dor crônica que se desenvolve ou aumenta de intensidade

após um procedimento cirúrgico e persiste além do processo de recuperação, por pelo menos 3 meses após a cirurgia (SCHUG *et al.*, 2019). Dados mostram que até 50% de indivíduos que são submetidos a cirurgias de maior complexidade e alto grau de lesão tecidual, como amputações, toracotomias, cirurgias de reparo de hérnias e até mesmo cesarianas, podem desenvolver DPO crônica. Dentre esses indivíduos, até 10% dos indivíduos podem manifestar dor crônica severa e debilitante (KEHLET; JENSEN; WOOLF, 2006). Portanto, considerando o alto número de procedimentos cirúrgicos realizados e a alta prevalência de DPO, torna-se ainda mais relevante a necessidade de investigar os mecanismos envolvidos nesse complexo tipo de dor.

Alguns fatores de risco podem estar associados ao desenvolvimento da DPO crônica. Primeiramente, a presença de dor pré-operatória próxima à região operada pode ser um grande fator preditivo para o desenvolvimento de DPO crônica. Características do indivíduo também podem ter influência, dentre elas a idade, sexo e perfil psicológico. Por exemplo, indivíduos mais jovens e do sexo feminino apresentam maiores chances de desenvolver DPO crônica. Além do mais, indivíduos com ansiedade, depressão e que tendem a “catastrofizar” a dor (pessoas que apresentam um exagero nas respostas afetivas e emocionais negativas relacionadas à dor) têm maior chance de apresentar DPO crônica. Pode haver também uma predisposição genética para a manifestação da DPO crônica em indivíduos que têm maior suscetibilidade à dor de uma forma geral (BRUCE; QUINLAN, 2011).

Adicionalmente, fatores relacionados à cirurgia parecem ser determinantes na transição da DPO aguda para crônica. A longa duração da cirurgia, presença de lesão nervosa durante o procedimento e a utilização de materiais não absorvíveis (fixação, osteossíntese) estão relacionados com a cronificação da dor crônica. O tipo de anestesia utilizado durante o procedimento cirúrgico e os métodos de analgesia empregados podem ter influência no desenvolvimento de DPO crônica, principalmente levando em consideração que níveis maiores de dor aguda estão mais associados com a cronificação da DPO (BRUCE; QUINLAN, 2011; GAN, 2017). Portanto, além de haver a necessidade de terapias eficazes na diminuição da dor aguda, investigar os mecanismos que podem estar envolvidos na transição para a dor crônica é essencial para uma abordagem completa e resolução definitiva da DPO.

Como mencionado, a DPO é um tipo complicado de dor pois apresenta além dos componentes nociceptivos e inflamatórios, comuns na dor aguda, componentes neuropáticos, acompanhados de alterações plásticas dos neurônios na via nociceptiva

tanto a nível periférico como central. A literatura descreve alguns mecanismos responsáveis por auxiliar na cronificação da DPO, resumidos na Figura 2. Esses mecanismos afetam a atividade dos neurônios nociceptivos a nível periférico e a nível central, influenciando a quantidade de impulsos nociceptivos que são gerados e finalmente interpretados como dor. Esses mecanismos podem ser divididos didaticamente como periféricos e centrais.

2.1.2.2 Sensibilização periférica na DPO crônica

Periféricamente, a sensibilização dos nociceptores na região da cirurgia é um importante fator que pode levar à cronificação da DPO. A inflamação decorrente da incisão cirúrgica é um processo normal, responsável pela regeneração do tecido lesionado durante o procedimento cirúrgico. Entretanto, uma inflamação exacerbada, mal controlada ou não resolvida pode dar início ao processo de sensibilização dos nociceptores. Esse evento, em que a responsividade dos neurônios é aumentada em decorrência da diminuição do limiar de ativação, é nomeado sensibilização periférica (CHAPMAN; VIERCK, 2017).

Durante o processo inflamatório, células imune deslocam-se para o local da lesão e liberam interleucina (IL)-1 β e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), dentre outros mediadores. Essas citocinas pró-inflamatórias são responsáveis por reger a resposta inflamatória, atraindo novas células imune, estimulando a liberação de fator de crescimento do nervo (NGF) por essas células e de prostaglandina E2 (PGE₂) pela ativação da enzima cicloxigenase (COX). Simultaneamente, células danificadas liberam no meio moléculas como NGF, trifosfato de adenosina (ATP), PGE₂, íons K⁺ e prótons H⁺, que são importantes para o processo de sensibilização dos nociceptores. Além disso, a degranulação de mastócitos fornece bradicinina (BC), mais um importante indutor da sensibilização periférica (CHAPMAN; VIERCK, 2017). Em conjunto, essa “sopa” inflamatória reduz o limiar de excitação dos nociceptores por influência direta e por alterações fenotípicas mais duradouras, facilitando ativação subsequente e induzindo a chamada hiperalgesia primária. Por exemplo, IL-1 β e TNF- α , além de orquestrarem a resposta inflamatória, atuam diretamente nos seus receptores expressos pelos nociceptores, receptor para IL-1 tipo 1 (IL-1R1) e receptor para fator de necrose tumoral tipo 1 (TNFR1), respectivamente. Estudos mostram que a ativação desses receptores nos nociceptores facilitam a abertura de canais para

sódio Na_v 1.8 e Na_v 1.9 por meio da ativação da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e fosforilação de p38, facilitando dessa forma a geração de PAs nesses neurônios (BINSHTOK *et al.*, 2008; JIN; GEREAU IV, 2006; JULIUS; BASBAUM, 2003).

O NGF é um importante indutor da sensibilização periférica. A ativação do seu receptor nos neurônios, receptor de tropomiosina relacionado à quinase A (TrkA), induz uma suprarregulação e sensibilização de canais iônicos na membrana plasmática dos nociceptores, promovendo assim uma alteração fenotípica do neurônio de forma a facilitar sua excitação. Ademais, na ocorrência de lesão de nervos, o aumento dos níveis de NGF promove o brotamento axonal anormal de fibras nociceptivas, aumentando a disponibilidade de terminações nervosas livres e contribuindo na manutenção da dor a nível periférico (CHAPMAN; VIERCK, 2017). Em conjunto, a BC ativa os receptores B1 e B2, induzindo a ativação de fosfolipase C (PLC) e a facilitação de abertura de canais catiônicos, contribuindo para a excitabilidade dos nociceptores. A PG_{E2} , por sua vez, por meio da ativação da PKA, promove diretamente a abertura de canais Na_v 1.8 e 1.9, adicionando ao aumento de excitabilidade neuronal. O ATP liberado no meio por células danificadas também ativa um canal dependente de ligante, o receptor purinérgico P2X_3 , que permite a entrada de Na^+ e Ca^{2+} , facilitando a geração de PAs.

Assim, todos esses mecanismos, em conjunto com vários outros componentes, contribuem para a redução do limiar de excitação do nociceptor, favorecendo o aumento da sua excitabilidade e a geração de impulsos nociceptivos no sistema nervoso periférico (SNP). Esse aumento substancial de impulsos nociceptivos serão direcionados para o SNC, onde haverá também alterações na modulação nociceptiva, favorecendo a amplificação da geração de PAs no neurônio de segunda ordem.

2.1.2.3 Sensibilização central na DPO crônica

A sensibilização central (SC) tem sido descrita como um mecanismo chave que contribui para o aumento da percepção dolorosa em diferentes patologias. Esse evento é descrito como um aumento na atividade de neurônios e circuitos excitatórios na via nociceptiva pelo aumento da excitabilidade de membrana e da eficácia sináptica, assim como pela redução na atividade de circuitos inibitórios (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Apesar de ser associada constantemente com

síndromes dolorosas crônicas, a sensibilização central serve como um mecanismo de reforço na ativação da via nociceptiva em condições que houve dano tecidual severo ou exposição a um estímulo nocivo de grande intensidade. Esse evento tem como intuito facilitar a geração de impulsos nociceptivos adicionais e manter a via nociceptiva em um estado de “alerta aumentado”, o que implica na amplificação da sensação dolorosa. Esse estado é temporário, no entanto, de maneira que a excitabilidade da via nociceptiva retorna a níveis basais, assim como a sensibilidade dolorosa, após a retirada do estímulo inicial que induziu a sensibilização central.

Entretanto, em casos de dor crônica, como na DPO persistente, a SC se torna uma parte crucial da dor, e é um dos mecanismos responsáveis pela cronificação da dor, mesmo na ausência de insultos periféricos que possam justificá-la. Inicialmente, um aspecto importante da SC é o fortalecimento das sinapses entre neurônios que são frequentemente estimulados em conjunto, um efeito denominado potenciação de longo prazo. Nesses casos, é necessário um estímulo intenso o bastante, com duração prolongada e que estimule diversas fibras nociceptivas em conjunto para induzir essas modificações plásticas (WOOLF, 2012). No caso da DPO, em que os impulsos nociceptivos são oriundos de um trauma tecidual extenso, acompanhado de inflamação, possivelmente lesão de fibras nervosas, e a possibilidade de sensibilização periférica acontecendo concomitantemente, o aumento na geração de PAs normalmente é suficiente para dar início à SC e promover a manutenção desse evento.

Um mecanismo rápido de aumento na eficácia sináptica, no caso da sinapse entre os nociceptores e os neurônios de segunda ordem nociceptivos no CDME, é o desbloqueio de poros bloqueados de canais NMDA pós-sinápticos. Esse receptor ionotrópico para glutamato normalmente fica bloqueado de forma dependente de voltagem pela presença de um íon magnésio. Com a excitação crescente do neurônio de segunda ordem, essa célula pode atingir um nível de despolarização suficiente para expelir o magnésio e liberar os canais NMDA, que se tornam disponíveis e contribuem mais ainda para a geração de PAs no neurônio de segunda ordem a centros supraespinais.(LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). A estimulação frequente por Sub P e CGRP liberados pelos nociceptores também promove sensibilização de subunidades dos receptores para glutamato, facilitando a sua abertura

Todavia, fatores não neuronais também têm um papel importante na gênese e manutenção da SC. A participação de células gliais tem sido foco de diversas

investigações acerca de sua participação na dor crônica. Os principais tipos de células que contribuem para a SC são a micróglia e os astrócitos. A micróglia é o conjunto de células imunocompetentes que residem do SNC, cujo papel é de monitorar o SNC em busca de riscos potenciais, como patógenos ou indicadores dano celular, assumindo um perfil fagocítico e de liberação de mediadores inflamatórios quando ativada por algum insulto. Os astrócitos são células cruciais para a manutenção das sinapses, do equilíbrio iônico do meio extracelular, da barreira hematoencefálica e do aporte metabólico dos neurônios (HANISCH, 2002; KIMELBERG; NEDERGAARD, 2010).

Apesar da importância da glia em suas funções basais, essas células expressam receptores e respondem a uma vasta gama de neurotransmissores e neuromoduladores oriundos de neurônios, outras células imune, outras células da glia ou até de estímulos próprios (WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001). A literatura mostra que essas células se tornam ativadas no CDME após um curto período após um insulto periférico intenso, seja pela presença de lesão tecidual acentuada, inflamação, lesão no SNC, neuropatia periférica, dentre outros (GRACE *et al.*, 2014; MATSUO *et al.*, 2014; MILLIGAN; WATKINS, 2009). Inicialmente, a micróglia ativa-se rapidamente, modificando o seu fenótipo e iniciando a liberação de mediadores pró-nociceptivos, que levam então à ativação de astrócitos (SAGAR *et al.*, 2011). Com a ativação de astrócitos, eles também passam a contribuir para a liberação de mais mediadores pró-nociceptivos. Esses mediadores liberados pela glia, que incluem citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6), quimiocinas, ATP, glutamato, prostaglandinas e óxido nítrico (NO), geram um estado de “neuroinflamação” (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Essa neuroinflamação, além de manter o estado ativo das células gliais de forma parácrina e autócrina, reforça similarmente a liberação de neurotransmissores excitatórios pelos nociceptores e potencializam a excitabilidade do neurônio de segunda ordem, perpetuando o estado de sensibilização da via nociceptiva. O desfecho desse evento é aumento drástico na geração de impulsos nociceptivos no neurônio de segunda ordem, amplificando a percepção dolorosa (MCMAHON; CAFFERTY; MARCHAND, 2005).

Levando em consideração os mecanismos envolvidos na transição da DPO aguda para crônica e para a sua perpetuação abordados acima, percebe-se o quão complexa essa síndrome dolorosa pode ser. Portanto é imprescindível continuar investigando mecanismos adicionais ainda não desvendados, e, principalmente, novas terapias que possam contribuir para o controle desse tipo de dor.

2.2 TERAPIA POR ONDAS DE CHOQUE

A terapia por ondas de choque (TOC) é uma terapia não farmacológica que tem sido muito estudada nos últimos anos devido à sua aplicabilidade no tratamento de diversos distúrbios de saúde. As ondas de choque (OC) podem ser definidas como ondas acústicas caracterizadas pela oscilação rápida entre uma fase de alta pressão e uma fase de baixa pressão, de forma que a oscilação brusca de pressão gera ondas fortes que se propagam pelo meio e atravessam os tecidos, promovendo efeitos biológicos (PROATO, 2006). Historicamente, o estudo das OC e o interesse nos seus efeitos sobre o corpo humano tiveram início durante a Segunda Guerra Mundial. Nesse período, observou-se que indivíduos que eram expostos às ondas de choque geradas após explosões de bombas aquáticas apresentavam graves lesões pulmonares. A partir dessa constatação, os estudos da aplicação das OC nos tecidos biológicos avançaram, até que em 1980 as OC focalizadas foram utilizadas com sucesso, pela primeira vez, para o tratamento de cálculos renais (litotripsia). Com o avanço desses estudos, na década de 1990 aparelhos comerciais foram desenvolvidos e distúrbios musculoesqueléticos começaram a ser tratados de forma bem-sucedida com o que hoje chamamos de terapia por ondas de choque (PROATO, 2006).

2.2.1 Princípios físicos da TOC

As OC, apesar de serem ondas sonoras, apresentam algumas características peculiares que lhe conferem efeitos específicos. Primeiramente, ao contrário de uma onda sonora ou de uma onda ultrassônica, que apresentam uma característica sinusoidal no que diz respeito à oscilação de pressão em relação ao tempo, a OC é um pulso que apresenta um aumento muito rápido da pressão positiva, na ordem de nanossegundos, caindo de forma gradativa até atingir uma fase mais longa de pressão negativa. A fase de pressão positiva promove compressão do meio de propagação, enquanto a fase de pressão negativa promove tensão, ou rarefação, do meio (efeito que também ocorre nos tecidos biológicos) (OGDEN; TÓTH-KISCHKAT; SCHULTHEISS, 2001). Com isso, a OC apresenta uma amplitude pressórica muito maior se comparada a outros tipos de ondas sonoras, permitindo que a OC carregue

também mais energia. Por exemplo, as OC podem alcançar picos de pressão positiva de 100 MPa, enquanto a onda ultrassônica chega a no máximo 0,05 MPa. Devido à grande quantidade de energia para gerar uma OC, entretanto, a frequência máxima de geração desse tipo de onda é muito mais baixa, sendo de aproximadamente 20 Hz (embora um único pulso apresente um amplo espectro de frequência), enquanto o ultrassom pode atingir frequências de 3 MHz e superiores (PROATO, 2006).

É importante frisar que, assim como outros tipos de onda, as OC estão sujeitas aos princípios físicos de atenuação na medida em que se propaga, ou seja, a onda pode sofrer influência dos processos de reflexão e refração antes de ser absorvida. Ao encontrar uma barreira com impedância acústica (resistência à passagem da onda) diferente do meio em que a onda está se propagando, a onda pode ser refletida na direção oposta. Por outro lado, a onda pode transpor essa barreira e ser absorvida, ou pode desviar a sua direção ao atravessá-la, o que é chamado de refração (PROATO, 2006; ROMEO *et al.*, 2014). Por isso é importante que a OC seja gerada em meio aquoso, pois é o que mais se assemelha à composição dos tecidos humanos, nos quais a presença de água é predominante. É importante também que um meio acoplador à base de água, como o gel, seja usado entre a superfície do aplicador e a superfície da pele, para favorecer a propagação e absorção das OC. Os diferentes tecidos, como músculo esquelético, ossos e gordura, apresentam impedâncias acústicas distintas entre si, fazendo com que uns absorvam mais energia que outros. Interessantemente, as interfaces entre tecidos de características diferentes acumulam o efeito das OC refletidas e das absorvidas até este ponto, sendo as regiões em que o efeito das OC são mais pronunciados (PROATO, 2006).

2.2.1.1 Tipos de OC

As OC podem ser de dois tipos, de acordo com o mecanismo de geração da onda e com as características da onda gerada. Elas podem ser: a) ondas de choque focalizadas ou b) ondas de choque radiais.

As ondas de choque focalizadas, como o nome sugere, são OC que são geradas em um meio e se propagam em todas as direções, porém são direcionadas para um único ponto focal por lentes acústicas convergentes. Para a geração desse tipo de OC, é necessária uma microexplosão controlada, que pode ser gerada utilizando distintos mecanismos. Um deles é a aplicação de uma corrente elétrica

potente em um meio aquoso entre dois eletrodos. Isso promove um aquecimento brusco e a vaporização violenta das moléculas de água, formando uma bolha que se expande de forma supersônica, gerando as ondas de choque. Esse mecanismo é denominado de eletro-hidráulico. Outra forma de geração das OC focalizadas é por meio do mecanismo piezoelétrico, em que cristais de quartzo excitáveis são bombardeados por correntes elétricas, expandindo rápida e bruscamente, gerando assim OC que são focalizadas em um ponto devido à organização convergente dos cristais. Por fim, existe um mecanismo eletromagnético de geração de OC, em que bobinas ativadas por uma corrente elétrica geram um campo magnético potente, capaz de movimentar uma membrana metálica de forma abrupta, gerando OC que são direcionadas para um ponto focal por lentes convergentes (OGDEN; TÓTH-KISCHKAT; SCHULTHEISS, 2001).

Já as ondas de choque radiais, também conhecidas como ondas de pressão, apresentam características distintas. Essas ondas não são focalizadas em apenas um ponto, pelo contrário. Elas se propagam de forma divergente a partir do ponto inicial de geração e por isso atingem uma maior área de tratamento. Todavia, pelo fato de não serem focalizadas, elas não exercem tanta pressão ou carregam a mesma quantidade de energia das OC focalizadas. Por exemplo, enquanto as OC focalizadas chegam a 100 MPa de pressão, as ondas de choque radiais alcançam apenas 10 MPa (Figuras 3A e 3B). Para geração das OC radiais, um projétil metálico é disparado em alta velocidade pelo aumento de pressão por ar comprimido (mecanismo pneumático) ou por meio da geração de um campo magnético potente que o propule (mecanismo eletromagnético). Esse projétil colide em alta velocidade com uma extremidade metálica do aplicador, gerando as ondas de pressão que se propagam a partir desse ponto. Uma pequena distinção em relação aos mecanismos de geração das OC focalizadas é que a extremidade do aplicador se desloca cerca de 1 mm quando sofre o impacto do projétil e, em contato com o tecido que receberá essa aplicação, transfere também um estímulo tátil além das OC radiais (PROATO, 2006; ROMEO *et al.*, 2014).

2.2.1.2 Parâmetros importantes da TOC

Como todos os agentes eletrofísicos utilizados de forma terapêutica, a TOC também é administrada obedecendo parâmetros específicos de aplicação, levando

em consideração as características da OC e o objetivo de tratamento. As modalidades de tratamento da TOC são divididas, como descritas anteriormente, em OC focalizada e OC radial. A escolha dentre os dois tipos depende principalmente de um fator importante: a profundidade do tecido a ser tratado e a precisão do tratamento. Enquanto a OC focalizada consegue alcançar de forma eficaz zonas focais de tratamento com maior profundidade e concentrar a energia em um ponto, a OC radial alcança zonas superficiais e trata uma região mais ampla. Nesse aspecto, as OC focalizadas são bastante utilizadas para litotripsia, reconsolidação de ossos longos e destruição de cálculos em tecidos moles (em tendões, por exemplo), na medida em que as OC radiais são aplicadas no tratamento da maioria dos demais distúrbios musculoesqueléticos (PROATO, 2006).

De uma forma geral, a TOC pode ser classificada de acordo com a quantidade de energia que o tecido recebe durante o tratamento. Assim, a TOC pode ser de baixa energia ($< 0,08 \text{ mJ/mm}^2$), média energia (de $0,08$ a $0,28 \text{ mJ/mm}^2$) ou alta energia ($> 0,28 \text{ mJ/mm}^2$), apesar de ainda não existir ainda um consenso sobre o limite entre essas categorias devido à heterogeneidade dos parâmetros reportados na literatura. Para se enquadrar em uma dessas categorias, o parâmetro principal a ser observado é a densidade de fluxo de energia (DFE), que representa a quantidade de energia aplicada pela área de 1 mm^2 (SIMPLICIO *et al.*, 2020; VERSTRAELEN *et al.*, 2014). Entretanto, para obter a DFE, a quantidade de energia em mJ deve ser definida por pulso, assim como a área de superfície em mm do cabeçote aplicador. Outros parâmetros que devem ser considerados é a frequência em Hz de aplicação dos pulsos, ou seja, quantos pulsos são administrados em um ciclo de 1 segundo, e a quantidade total de pulsos a serem administrados. Seguindo essa lógica, quanto maior for o valor absoluto de cada parâmetro, maior a quantidade de energia a ser administrada. Efeitos físicos diretos são mais observados com a TOC de alta energia, enquanto efeitos neurofisiológicos são mais comuns na TOC de baixa energia (VERSTRAELEN *et al.*, 2014).

2.2.2 Efeitos das OC nos tecidos biológicos

Ao penetrar nos tecidos, as OC promovem diversos efeitos físicos e biológicos. Os efeitos físicos diretos das OC ocorrem durante a sua propagação pelos tecidos. Como anteriormente mencionado, durante fase de alta pressão positiva, as OC

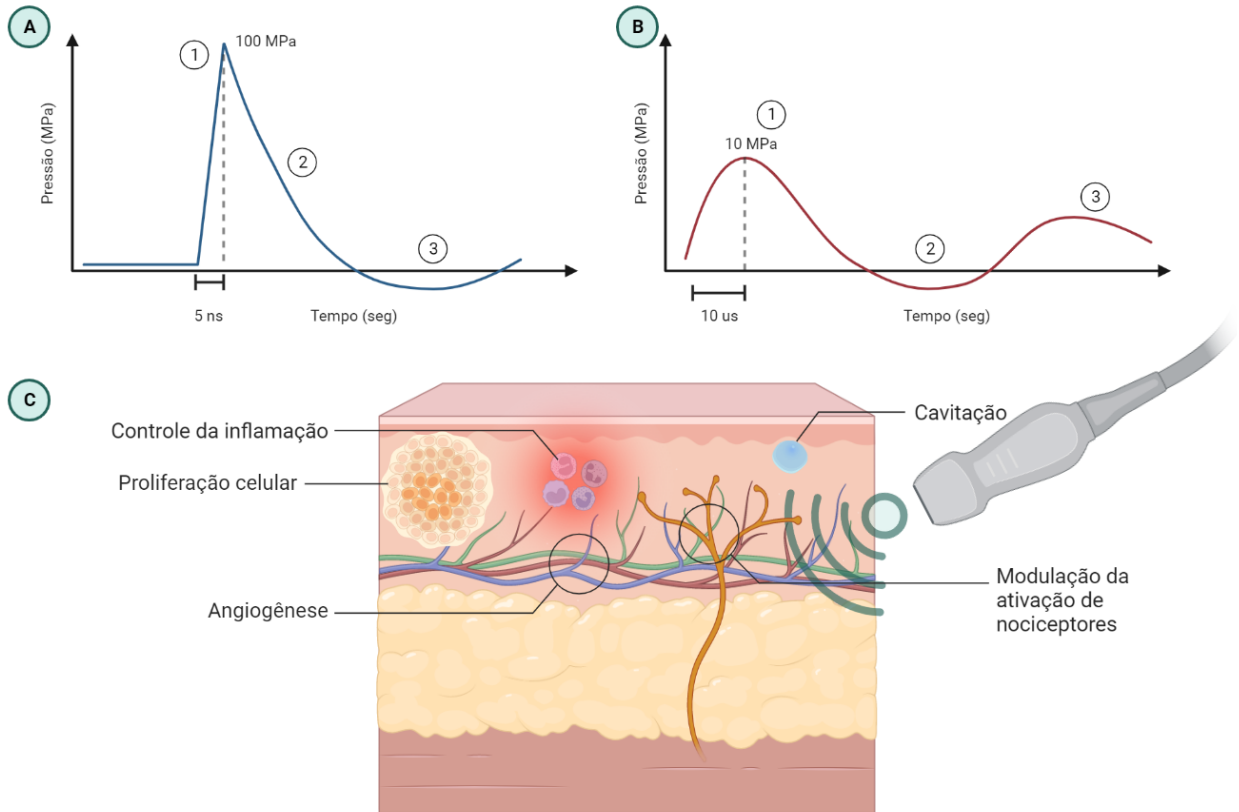
comprimem o tecido. Na fase de pressão negativa, o tecido é tensionado. Nessa fase, os gases difundidos nos líquidos se expandem, formando pequenas bolhas gasosas que, com a transição para a fase de pressão positiva, colapsam de forma relativamente intensa, direcionando jatos potentes de líquido em todas as direções. Esse efeito é denominado cavitação (OGDEN; TÓTH-KISCHKAT; SCHULTHEISS, 2001). A compressão e tensão intermitentes submete o tecido a forças de cisalhamento, e esse efeito pode alterar a permeabilidade da membrana plasmática ao fluxo de íons e ionizar moléculas a nível celular. Além disso, as OC podem alterar o funcionamento de canais iônicos, influenciando principalmente a movimentação de correntes de Ca^{2+} (SIMPLICIO *et al.*, 2020). Acredita-se que células que possuem mecanismos de mecanotransdução (como fibroblastos) possam detectar o estímulo mecânico das OC e promover a liberação de moléculas como o ATP, NO e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), os quais por sua vez promovem os efeitos secundários da aplicação da TOC (FRAIRIA; BERTA, 2011).

Levando em consideração os efeitos biológicos da TOC, os mais comumente estudados e que fundamentam a utilização da TOC de forma terapêutica são os efeitos de angiogênese e estímulo da regeneração tecidual. Por exemplo, estudos mostram que a aplicação de TOC induz a liberação de fator de crescimento transformador beta ($\text{TGF-}\beta$), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e aumenta a expressão do antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA) que, associados aos fatores mencionados anteriormente, são essenciais para o processo de formação de novos vasos e regeneração tecidual comumente observados no tratamento com a TOC (CHEN *et al.*, 2004; NOTARNICOLA; MORETTI, 2012).

A aplicação da TOC também está associada à atenuação da resposta inflamatória. Além de reduzir a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP), enzimas muito ativas responsáveis pela degradação da matriz extracelular em processos degenerativos, as OC modulam o estado de ativação de macrófagos durante o processo inflamatório, alternando essa célula de um estado pró-inflamatório (fenótipo M1) para um estado anti-inflamatório ou pró-resolutivo (fenótipo M2). Nesse contexto, a liberação de mediadores pró-inflamatórios é reduzida, enquanto mediadores anti-inflamatórios como as interleucinas 4, 10 e fatores de crescimento importantes para a angiogênese e reparo tecidual têm sua liberação aumentada (ROMEO *et al.*, 2014; SIMPLICIO *et al.*, 2020). A Figura 3C resume os principais efeitos físicos e biológicos da TOC no organismo.

Assim, as OC apresentam diversos efeitos biológicos que podem ser benéficos do ponto de vista terapêutico, principalmente no que diz respeito ao tratamento de distúrbios musculoesqueléticos.

Figura 3 — Características físicas e efeitos biológicos da terapia por ondas de choque (TOC).



Fonte: Autor.

Legenda: A) Variação pressórica ao longo do tempo de um pulso de onda de choque focalizada. Ela apresenta um brusco e elevado aumento na pressão, na ordem de nanossegundos (1), um declínio gradativo da pressão (2) até alcançar uma fase pressão negativa longa (3) que precede o próximo pulso. B) Variação pressórica de uma onda de choque radial (ou onda de pressão) ao longo do tempo. Ela apresenta um aumento mais lento e não tão acentuado da pressão positiva, na ordem de milissegundos, posteriormente oscilando entre pressões negativas (2) e positivas (3). C) Efeitos físicos e biológicos da TOC nos tecidos.

2.2.3 A TOC no tratamento da dor

Diversos estudos já demonstraram o ótimo efeito analgésico da TOC, principalmente no tratamento de distúrbios musculoesqueléticos. De acordo com estudos clínicos, a TOC reduz a dor na fascite plantar, epicondilite lateral, osteoartrite e tendinopatias de uma forma geral, sem apresentar efeitos adversos (AVENDAÑO-COY *et al.*, 2020; MELESE *et al.*, 2021; PROATO, 2006; WANG, 2012). Entretanto, os mecanismos que justificam o efeito antinociceptivo da TOC ainda carecem de esclarecimentos.

Algumas teorias tentam explicar como a TOC promove seus efeitos antinociceptivos. Indiretamente, a TOC atenua a inflamação pela diminuição da liberação de mediadores pró-inflamatórios, aumento de mediadores anti-inflamatórios, modulação da atividade de células imune e de enzimas proteolíticas (SIMPLICIO *et al.*, 2020). Levando em conta que um dos sinais cardiais da inflamação é a dor e que a própria inflamação induz a sensibilização dos nociceptores no tecido periférico, o efeito anti-inflamatório da TOC certamente contribui para a atenuação da dor.

De forma mais direta, alguns autores observaram um efeito interessante da TOC sobre a via nociceptiva: as OC reduzem a quantidade de fibras nociceptivas do tipo C que expressam Sub P e CGRP nos tecidos periféricos e de neurônios positivos para CGRP nos GRDs, reduzindo a liberação dessas substâncias durante a injúria tecidual e conseqüentemente a sua contribuição para a geração de PAs (RYSKALIN *et al.*, 2022). Apesar dessa observação nos tecidos periféricos, outro estudo já havia demonstrado não haver alterações desses peptídeos no CDME após a TOC (HAAKE; THON; BETTE, 2002). Além disso, as OC conseguem perturbar partes da membrana plasmática dos nociceptores, afetando assim a abertura de canais iônicos e dificultando a geração de PAs nessas fibras (WESS, 2008).

Outros autores hipotetizam ainda que as OC, associadas ao efeito mecânico de aplicação das OC radiais, podem hiperestimular fibras sensoriais não-nociceptivas, causando a inibição colateral no CDME de acordo com a teoria dos portões da dor (RYSKALIN *et al.*, 2022; WESS, 2008). Essa hiperestimulação, no entanto, também pode ocorrer em fibras nociceptivas; porém, nesse caso, a geração exagerada de PAs na via nociceptiva ativa regiões supraespinhais envolvidas com a analgesia endógena, como a SCP, que por conseguinte modula os nociceptores e neurônios de segunda ordem no CDME (RYSKALIN *et al.*, 2022).

Embora estudos tenham começado a desvendar os mecanismos e desenvolver teorias que justifiquem a antinocicepção induzida pela TOC, a grande maioria aborda mecanismos periféricos, enquanto as teorias envolvendo os efeitos da TOC a nível espinal são inconclusivas ou insatisfatórias. Portanto, investigar os mecanismos ainda não desvendados é imprescindível para o melhor conhecimento dessa terapia. Possíveis mecanismos que poderiam mediar o efeito antinociceptivo da TOC na medula espinal são os sistemas endocanabinoide e opioide, os quais são importantes sistemas endógenos clássicos envolvidos com a modulação nociceptiva, inclusive na antinocicepção de diferentes terapias não farmacológicas.

2.3 SISTEMA ENDOCANABINOIDE

O sistema endocanabinoide (SEC) tem ganhado cada vez mais relevância nas pesquisas biológicas. Esse sistema é composto pelos endocanabinoides (ECs), as moléculas responsáveis pela sua síntese/metabolismo e seus receptores. Apesar de o estudo direcionado a esse sistema ter ganhado força em meados da década de 1990, relatos prévios da antiguidade (200 d.C.) já despertavam o interesse pelas características medicinais da *Cannabis sativa* no organismo. Em um primeiro momento, entre 1838 até aproximadamente 1940, os pesquisadores se dedicaram a identificar os princípios ativos da *Cannabis*, identificando de forma metódica os efeitos medicinais do uso dessa planta e isolando pela primeira vez o canabidiol (CBD). Anos depois, em 1964, Gaone e Mechoulam identificaram e elucidaram a estrutura do Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (THC), um dos princípios ativos mais abundantes da planta, responsável pelos seus efeitos psicoativos (GAONI; MECHOULAM, 1964). Na sequência, em 1990 e 1993, os receptores canabinoides do tipo 1 (CB₁) e 2 (CB₂) foram clonados e identificados. Mais ou menos na mesma época, em 1992 e 1995, os primeiros ligantes endógenos desses receptores - depois denominados de endocanabinoides - anandamida (ou N-araquidonoiletanolamina; AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) foram identificados (DI MARZO, 2006). A partir desses eventos, os estudos com o SEC foram aprimorados, com o desenvolvimento de agonistas e antagonistas para contribuir no esclarecimento do papel desse sistema no organismo, identificação de enzimas que participam no metabolismo de ECs e a interação dos ECs com outros receptores.

2.3.1 Estrutura e funcionamento do SEC

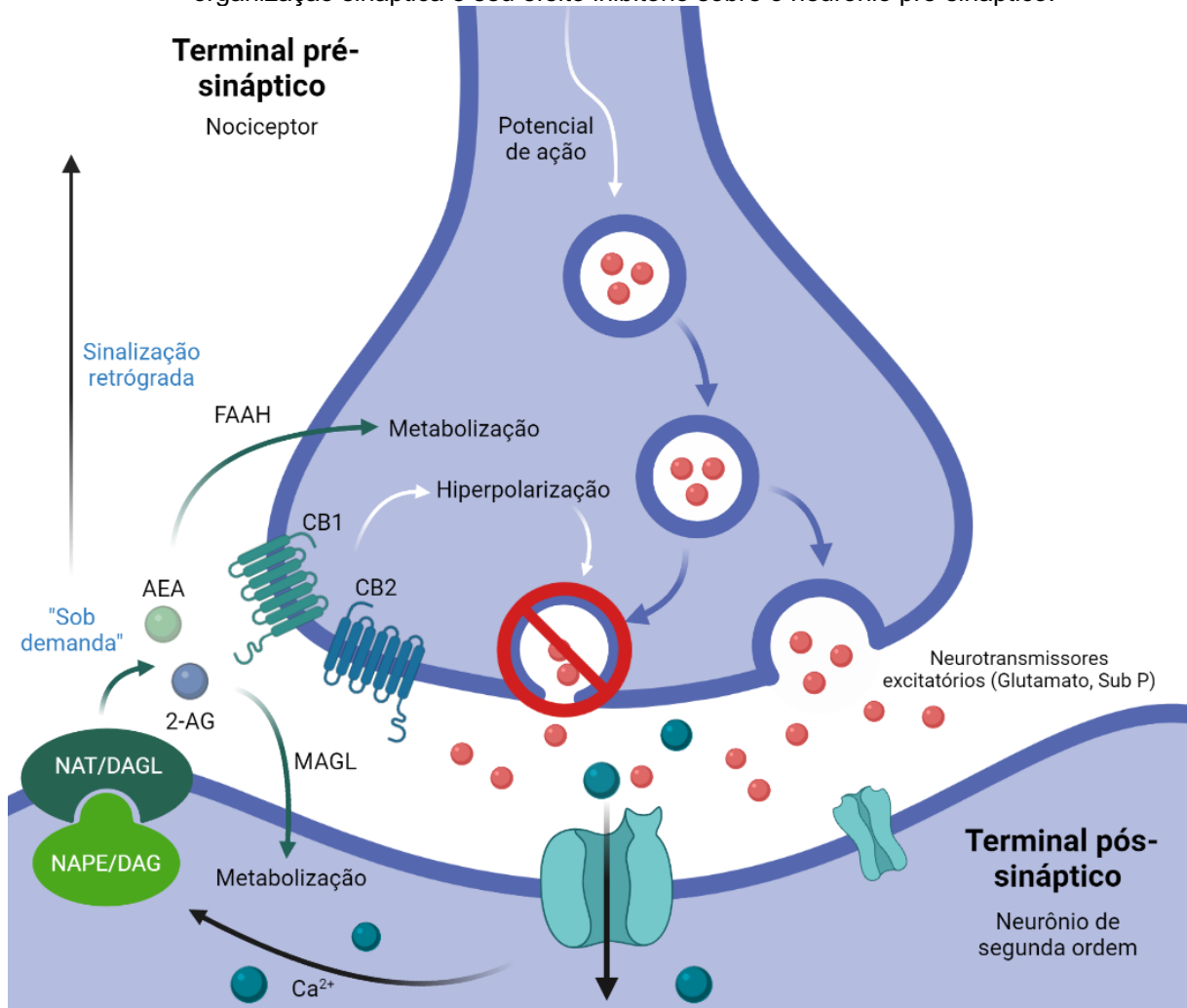
2.3.1.1 Os endocanabinoides: síntese e metabolismo

Como mencionado, os primeiros ECs a serem descobertos foram a AEA e o 2-AG, e até hoje ainda são as substâncias mais estudadas do SEC. Essas moléculas são lipofílicas, derivadas do metabolismo de fosfolípidios de membrana, apesar de não compartilharem a mesma via de síntese entre si. A AEA, em primeiro lugar, é sintetizada a partir da clivagem de seu precursor N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE) pela fosfolipase D (PLD). Este precursor, por sua vez, é derivado da adição do ácido araquidônico à fosfatidiletanolamina, catalisada pela enzima N-acetiltransferase (NAT), de forma dependente da fosforilação por PKA e da presença de Ca^{2+} (DE FONSECA *et al.*, 2005). Já o 2-AG é sintetizado a partir do metabolismo do fosfatidilinositol mediante ativação de PLC, gerando diacilglicerol (DAG). Em seguida, o DAG é convertido em 2-AG pela ação da enzima diacilglicerol lipase (DAGL) nas células que a expressam (HILLARD, 2018). A metabolização de AEA e 2-AG é mediada pelas enzimas hidrolase de amidas de ácidos graxos (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MAGL), respectivamente. Primeiramente, esses ECs são recaptados para os neurônios em um processo de transporte facilitado através da membrana, sendo hidrolisados pelas enzimas acima na sequência (DE FONSECA *et al.*, 2005). A Figura 4 oferece um panorama geral sobre a síntese e metabolismo dos ECs.

Os ECs, como parte do SEC, apresentam uma peculiaridade comparados a outros neurotransmissores. Na maioria das sinapses convencionais, os neurotransmissores são sintetizados e armazenados em vesículas sinápticas, aguardando o PA que induz o aumento nas concentrações de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico, ativando a maquinaria de transporte e fusão da vesícula de neurotransmissores com a membrana plasmática do neurônio (PURVES, 2018b). Em contrapartida, os ECs são sintetizados sob demanda, isto é, eles não ficam armazenados em vesículas. Eles são sintetizados e liberados rapidamente na chegada do estímulo liberador, e rapidamente recaptados e metabolizados, sendo rigidamente regulados (Figura 4). A ativação das enzimas para a síntese de AEA e 2-AG ocorre principalmente pela elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} . Entretanto, a ativação de receptores metabotrópicos para glutamato (mGluR) e dos

receptores muscarínicos M1 e M3 também podem levar à síntese dos ECs (ALGER; KIM, 2011).

Figura 4 — Diagrama esquemático ilustrando a estrutura e funcionamento do sistema endocanabinoide, com enfoque nas características marcantes desse sistema no que diz respeito à produção sob demanda dos endocanabinoides, aspecto retrógrado da organização sináptica e seu efeito inibitório sobre o neurônio pré-sináptico.



Fonte: Autor.

Legenda: FAAH: hidrolase de amidas de ácidos graxos; MAGL: monoacilglicerol lipase; CB₁/CB₂: receptores canabinoides dos tipos 1 e 2; AEA: anandamida; 2-AG: 2-araquidonoilglicerol; NAT: N-acetiltransferase; DAGL: diacilglicerol lipase; NAPE: N-araquidonoilfosfatidiletanolamina; DAG: diacilglicerol; Sub P: substância P.

2.3.1.2 Os receptores canabinoides

Para exercer seus efeitos, os ECs se ligam principalmente aos receptores CB₁ e CB₂, apesar de a literatura já ter demonstrado os efeitos desses ligantes em outros receptores, como o canal TRPV1, o receptor órfão GRP55 e o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR), por exemplo (DE PETROCELLIS; DI MARZO,

2009; DI MARZO, 2006; HILLARD, 2018). Os receptores CB₁ e CB₂ são GPCRs com mecanismos iguais de transdução de sinal. Eles são acoplados à proteína G_i, e por isso inibem a fosforilação de PKA dependente de AMPc pela inibição da adenilato ciclase. Entretanto, esse não é o único mecanismo de atuação desses receptores. Já foi demonstrada a interação direta desses receptores inibindo a abertura de canais para Ca²⁺ e a abertura de canais de retificação para K⁺, reforçando a hiperpolarização neuronal. Além disso, o acoplamento da ativação desses receptores com as cascatas de sinalização das MAPK e do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) também foi relatado (DE FONSECA *et al.*, 2005). Apesar do mecanismo de transdução de sinal similar, esses receptores distinguem-se pela localização de maior expressão.

Os receptores CB₁ foram inicialmente atribuídos ao cérebro, onde é expresso em maior densidade em regiões como o hipocampo, núcleos da base e cerebelo, sendo considerado um dos GPCR mais expressos no SNC. Todavia, hoje sabe-se da sua expressão, embora em menor quantidade, nos tecidos periféricos (MECHOULAM; PARKER, 2013; REGGIO, 2010). O CB₂, apesar de também ser expresso no SNC, tem a maior parte da sua expressão nas células do sistema imunológico, como linfócitos B e T, monócitos, neutrófilos e micróglia (DE FONSECA *et al.*, 2005). Interessantemente, embora tanto a AEA como o 2-AG consigam se ligar ao CB₁ e CB₂, a AEA funciona como um agonista desses receptores, enquanto o 2-AG é um agonista pleno de ambos, significando que o 2-AG é muito mais eficiente. Entretanto, a AEA aparenta ter uma afinidade muito maior pelo CB₁ em comparação com o CB₂, ao passo que o 2-AG tem uma afinidade similar pelos dois receptores (embora alguns relatos apontem uma maior afinidade pelo CB₂), mas menor que a da AEA por eles (DE FONSECA *et al.*, 2005; REGGIO, 2010).

A exemplo da síntese sob demanda dos ECs, outra característica marcante do SEC é a organização das sinapses. Em uma sinapse clássica, o neurotransmissor é liberado do terminal pré-sináptico e atua no seu receptor expresso no terminal pós-sináptico. Os ECs, negando essa tendência, são sintetizados sob demanda no terminal do neurônio pós-sináptico e liberado na fenda sináptica, normalmente exercendo seu efeito na ativação dos receptores canabinoides expressos no terminal pré-sináptico (Figura 4). Considerando a natureza dos receptores CB₁ e CB₂, essa neurotransmissão retrógrada tende a hiperpolarizar a célula pré-sináptica, diminuindo a excitabilidade da mesma e reduzindo a liberação de neurotransmissores (MECHOULAM; PARKER, 2013). Esse papel exercido pelo SEC é crucial do ponto de

vista da modulação sináptica, influenciando na plasticidade neuronal e participando de forma intensa na regulação de diversas funções do nosso organismo.

2.3.2 A influência do SEC na nocicepção

Vários neurotransmissores modulam a nocicepção, seja a nível periférico ou a nível central. O SEC participa dessa modulação de uma forma bastante marcante. Como abordado anteriormente, do ponto de vista da modulação sináptica, o SEC exerce uma considerável influência inibitória nas sinapses em que está envolvido. Avaliando mais especificamente a via nociceptiva, a expressão de ECs e receptores canabinoides em regiões determinantes da modulação nociceptiva assegura a influência desse sistema na dor. Prova disso é o fato de que a administração de agonistas dos receptores canabinoides em áreas supraespinhais envolvidas com o processamento nociceptivo (SCP dorsolateral e rafe dorsal), no CDME e nos tecidos periféricos promove atenuação da dor em diversos modelos experimentais (MARTIN *et al.*, 1995; NACKLEY; SUPLITA; HOHMANN, 2003; SAGAR *et al.*, 2005).

Relatos da literatura dão conta de que o SEC modula a atividade de regiões supraespinhais envolvidas com a modulação descendente da via nociceptiva. Por exemplo, a injeção de ECs em regiões como SCP, o núcleo dorsal da rafe, RVM e tálamo induz antinocicepção (ZOGOPOULOS *et al.*, 2013). A atividade principalmente da AEA na SCP e no bulbo RVM, por meio da ativação de CB₁, tem sido reportada. Especificamente na SCP, o CB₁, mediante ativação pela AEA, promove antinocicepção pela desinibição de projeções descendentes partindo dessa região para o CDME, modulando a excitabilidade tanto dos terminais dos nociceptores com os neurônios de segunda ordem (PALAZZO *et al.*, 2010). No mais, O CB₁ também é expresso nas células ON e OFF localizadas no bulbo RVM, importantes para a facilitação ou inibição descendente da nocicepção, respectivamente. Foi visto que a ativação de CB₁ pela AEA nas células ON inibe a atividade dessas células, reduzindo a facilitação que elas exercem, enquanto nas células OFF a ativação de CB₁ promove desinibição, liberando o seu efeito descendente inibitório sobre a via nociceptiva (PALAZZO *et al.*, 2010). Curiosamente, o 2-AG e o CB₂ não têm sido associados a essas respostas. Assim, o SEC apresenta uma função ímpar na modulação nociceptiva supraespinhal, principalmente do ponto de vista da antinocicepção.

Na medula espinal, por sua vez, a expressão de ECs no terminal pós-sináptico do neurônio de segunda ordem e a ativação retrógrada principalmente do CB₁, como detalhado acima, é essencial na atenuação da liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios pelo terminal pré-sináptico dos nociceptores, um processo adaptativo responsável por suprimir a excitabilidade excessiva da via nociceptiva (Figura 4). Por exemplo, observa-se um aumento da expressão de CB₁ e CB₂ na medula espinal após a lesão de nervos periféricos e lesões pós-operatórias, assim como elevações nos níveis de AEA e 2-AG, demonstrando o papel do SEC em atenuar a excitabilidade da via nociceptiva (ALKAITIS *et al.*, 2010; GUINDON; HOHMANN, 2009). Inclusive, é postulado que a falha desse mecanismo endógeno de modulação pode ser um fator decisivo na gênese da dor crônica (ALKAITIS *et al.*, 2010). De uma forma geral, a literatura mostra que a administração de agonistas dos receptores canabinoides promovem antinocicepção. O receptor CB₂, expresso principalmente em células microgliais na medula espinal, pode representar também um mecanismo importante de inibição dessas células, cuja importância na sensibilização central e na potencialização da nocicepção é notória (KOMOROWSKA-MÜLLER; SCHMÖLE, 2021).

A nível periférico, o SEC também contribui para a antinocicepção. De forma geral, as terminações nervosas livres dos nociceptores expressam CB₁, enquanto o CB₂ é expresso nas células, de forma que ambos são determinantes para o efeito antinociceptivo do SEC. Um elegante estudo por Agarwal *et al.* (2007) demonstrou a importância do CB₁ expresso pelos nociceptores utilizando uma linhagem geneticamente modificada de animais com *knockdown* dos receptores CB₁ expressos apenas nos nociceptores. Dessa forma, eles observaram que a ausência de CB₁ nas fibras nociceptivas periféricas promoveu hipersensibilidade mecânica e térmica, e a administração sistêmica de um agonista canabinoide não seletivo, o WIN55,212-2 não promoveu efeito antinociceptivo. Todavia, a administração intratecal desse agonista promoveu antinocicepção. Por isso eles sugeriram que o SEC, por meio do CB₁ expresso nos nociceptores, exerce um tônus inibitório sobre a resposta nociceptiva, modulando a excitabilidade dessas fibras periféricamente. Enquanto o efeito do CB₁ na excitabilidade dos nociceptores é direto, o papel do CB₂ nas células imune é mais determinante para controlar a inflamação, limitando assim o *input* de impulsos nociceptivos na via nociceptiva (ZOGOPOULOS *et al.*, 2013). Por exemplo, um estudo simples mostrou que a administração periférica de um agonista seletivo do CB₂, o

AM1241, reverteu a dor inflamatória induzida pela carragenina, além de reduzir significativamente o edema nesses animais. A administração de AM630, um agonista inverso desse receptor, aboliu o efeito anti-inflamatório da ativação do CB₂ (QUARTILHO *et al.*, 2003). Assim, o SEC a nível periférico tem um papel crucial na modulação nociceptiva.

A analgesia induzida pelo exercício físico também tem sido bastante explorada nas últimas décadas. Aumentos nos níveis de ECs, em especial de AEA, são observados durante e após a prática de exercício físico, sendo a intensidade um fator importante nesse efeito (DA SILVA SANTOS; GALDINO, 2018). O receptor CB₂ na medula espinal também é necessário para a analgesia induzida pelo exercício, uma vez que a administração i.t. do seu antagonista AM630 impede a antinocicepção induzida por um protocolo de natação em camundongos (DOS SANTOS *et al.*, 2019). Nesse aspecto, estudos já mostraram a relação entre o recrutamento do SEC durante o exercício físico e analgesia nessa situação, demonstrando a relevância do SEC na modulação nociceptiva em diferentes situações. (DIETRICH; MCDANIEL, 2004; GALDINO *et al.*, 2014).

Considerando as evidências acima apresentadas, percebe-se que a importância do SEC na modulação nociceptiva é clara. Por isso, estratégias visando o recrutamento desse sistema endógeno podem ser essenciais como uma alternativa de controle da dor em diversas situações patológicas. Pensando nisso, um estudo investigou a participação do SEC no efeito antinociceptivo de um recurso não farmacológico para o tratamento da dor, a corrente TENS. Interessantemente, os autores observaram que a aplicação da TENS atenuou a dor inflamatória induzida por tumor, e esse efeito foi mediado pelo aumento nos níveis de AEA associado ao aumento da expressão de CB₁ na pata, medula espinal e na SCP (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Dessa forma, é possível que outros agentes eletrofísicos possam induzir um efeito similar. Portanto, o presente estudo testou a hipótese de que o efeito antinociceptivo da TOC possa ser mediado pela ativação do SEC, por meio da liberação de ECs e ativação dos receptores canabinoides a nível espinal.

2.4 SISTEMA OPIOIDE

Relatos do uso ópio, um líquido extraído das sementes e flor de uma espécie de papoula, podem ser encontrados em textos gregos antigos de aproximadamente

300 a.C. Acredita-se que o seu uso pelos sumérios seja ainda mais antigo, há aproximadamente 2000 anos a.C. Apesar de o ópio ter sido utilizado para diversas finalidades em milênios, incluindo o uso recreativo e o uso medicinal, os princípios ativos dessa substância foram isolados apenas por volta do início do século XIX por Sertürner (BROWNSTEIN, 1993). O primeiro componente isolado foi a morfina, um potente alcaloide, seguido pela codeína algumas semanas depois. O efeito heterogêneo dessas substâncias no corpo levantou a hipótese da presença de distintos receptores no organismo. Assim, em meados da década de 1970, os receptores opioides foram descobertos principalmente no SNC, com uma distribuição não uniforme em diversos locais. Essa descoberta levou pesquisadores a teorizarem sobre a existência de neurotransmissores endógenos para esses receptores. Por fim, em 1975, pesquisadores isolaram de extratos de cérebros peptídeos que apresentavam uma sequência específica de aminoácidos na sua porção N-terminal (leucina-encefalina e metionina-encefalina). Depois, a partir de 1981, foram identificadas sequências de aminoácidos similares em outros peptídeos (β -endorfina e dinorfina), os quais apresentavam alta afinidade pelos receptores opioides (BROWNSTEIN, 1993).

Inicialmente, a hipótese de que esse recém-descoberto sistema de opioides endógenos e seus respectivos receptores estavam envolvidos com respostas ao estresse veio da observação de que a aplicação de choques nos pés induzia analgesia (BROWNSTEIN, 1993). Entretanto, sabe-se atualmente que esse sistema opioide (SOP) constitui uma peça-chave da modulação de diversas respostas, incluindo recompensa, emoções e a dor. Este sistema participa em grande parte da atenuação da dor principalmente por meio de vias descendentes, que suprimem principalmente a nível espinal a ascensão de impulsos nociceptivos para as áreas supraespinais de processamento doloroso (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005).

2.4.1 Estrutura e funcionamento do SOP

2.4.1.1 Os peptídeos opioides

Os peptídeos opioides que fazem parte deste sistema funcionam como neurotransmissores e neuromoduladores, e são produzidos em diversas populações de neurônios no SNC, como por exemplo na SCP, bulbo RVM e nas lâminas

superficiais da medula espinal, além de também serem expressos por células imunes na periferia (MILLAN, 2002). Dentre os vários peptídeos que constituem esse sistema, destacam-se as encefalinas, dinorfinas e a β -endorfina, as quais apresentam estrutura similar e compartilham uma sequência de aminoácidos na porção N-terminal específica. Entretanto, apesar da similaridade entre essas moléculas, elas apresentam origens distintas com base nos seus precursores. As encefalinas são originadas do precursor preproencefalina (PENK), as dinorfinas são produzidas a partir da clivagem da preprodinorfina (PDYN) e a β -endorfina liberada a partir da clivagem da pro-opiomelanocortina (POMC) (BENARROCH, 2012).

2.4.1.2 Os receptores opioides

A ativação dos receptores opioides pelos peptídeos opioides endógenos acima descritos promove os efeitos do SOP. Os receptores opioides dos tipos μ , κ e δ são receptores do tipo acoplados à proteína $G\alpha_i$, expressos em regiões importantes para a modulação da nocicepção. Por exemplo, os receptores do tipo μ e κ são amplamente expressos nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinal (CDME), enquanto o tipo δ é expresso tanto nas lâminas do corno dorsal como no corno anterior. Além disso, esses receptores também são expressos no sistema nervoso periférico, nos corpos celulares dos neurônios aferentes primários localizados nos GRDs, constituindo mais um mecanismo pelo qual esse sistema está envolvido com a modulação nociceptiva (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005). O receptor μ é também expresso em sítios supraespinais como amígdala, hipotálamo, SCP e RVM, destacando a sua importância em mecanismos supraespinais de analgesia. O efeito analgésico advindo da ativação dos receptores opioides está associado com o mecanismo de transdução desses receptores. Em síntese, a ativação desses receptores induz a abertura de canais de escoamento de K^+ e de canais para Ca^{2+} pela ação direta das subunidades $G\alpha$ e $G\beta$. Além disso, há uma redução dos níveis de AMPc devido à inibição da adenilato ciclase, impedindo a abertura de canais para Ca^{2+} dependentes da atividade da PKA, o que culmina com a hiperpolarização de neurônios (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011; MILLAN, 2002).

2.4.2 O papel do SOP na nocicepção

Considerando as características do SOP, torna-se clara a sua importância na modulação da nocicepção. Esse sistema é considerado um dos principais, senão o principal mecanismo endógeno modulatório da via nociceptiva (MILLAN, 2002). Por exemplo, a ativação dos receptores opioides nos neurônios nociceptivos de segunda ordem ou no terminal pré-sináptico de neurônios nociceptivos de primeira ordem a nível espinal dificulta a transmissão de impulsos nociceptivos através da via nociceptiva (PATHAN; WILLIAMS, 2012).

Além disso, a nível supraespinal, os receptores opioides são expressos na SCP e no RVM, regiões que controlam a inibição descendente da via nociceptiva. Em especial na SCP e bulbo RVM, os receptores opioides são expressos em neurônios GABAérgicos, os quais exercem uma influência tônica inibitória em projeções monoaminérgicas descendentes para a medula espinal, associadas com a modulação da nocicepção; dessa forma, a ativação desses receptores promove um efeito de “desinibição” dessas vias, possibilitando a modulação da excitabilidade de neurônios de projeção na medula espinal (BENARROCH, 2012; MILLAN, 1999). Por exemplo, a administração de opioides diretamente nessas regiões promove um aumento na atividade de células OFF, simultaneamente a uma diminuição da atividade de células ON, promovendo um efeito final de inibição da dor (STAUD, 2013).

Adicionalmente, a expressão de β -endorfina e encefalinas em células imunes na periferia, por exemplo, contribui para analgesia endógena a nível periférico, uma vez que neurônios de primeira ordem nociceptivos também expressam os receptores μ , κ e δ opioides (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005; MILLAN, 2002). Portanto, o SOP é essencial para a modulação nociceptiva na periferia, medula espinal e também em sítios supramedulares.

Apesar imensa importância do SOP no que diz respeito ao controle da dor por terapias farmacológicas, cresce na literatura o número de relatos da importância desse sistema na analgesia induzida por terapias não-farmacológicas. Por exemplo, o exercício físico é capaz de induzir analgesia, e o SOP é parcialmente responsável por esse efeito, seja em exercícios de força ou em exercícios aeróbicos (GALDINO; DUARTE; PEREZ, 2010; HUGHES; GRANT; PATTERSON, 2021). Além disso, outras terapias não farmacológicas como a TENS, uma corrente terapêutica normalmente aplicada com a finalidade de alívio da dor, promove analgesia mediante à ativação do

SOP a nível espinal e supraespinal (DESANTANA *et al.*, 2008; KALRA; URBAN; SLUKA, 2001; SLUKA *et al.*, 1999). A fotobiomodulação, terapia não farmacológica utilizada no controle da dor e inflamação, também promove efeito antinociceptivo mediado pelo SOP. Hagiwara e colaboradores (2007) demonstraram um aumento da POMC, precursora da β -endorfina, e participação dos receptores opioides na antinocicepção induzida pela fotobiomodulação a nível periférico. Dessa forma, levando em consideração a importância que o SOP apresenta no mecanismo analgésico de outras terapias não farmacológicas para o tratamento da dor, hipotetiza-se que esse sistema também possa estar envolvido no efeito antinociceptivo da TOC. Portanto, a investigação da participação desse mecanismo no efeito antinociceptivo da TOC pode abrir portas para o avanço de investigações clínicas futuras com base nessa terapia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento do sistema endocanabinoide (SEC) e do sistema opioide (SOP) na antinocicepção induzida pela terapia por ondas de choque (TOC) em camundongos com dor pós-operatória (DPO).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram objetivos específicos do presente estudo os listados a seguir:

- a) Verificar a eficácia antinociceptiva da TOC em um modelo de dor pós-operatória induzida pela cirurgia de incisão e retração de pele e músculo em camundongos;
- b) avaliar a participação dos receptores canabinoides CB₁, CB₂, e dos receptores opioides μ , κ , e δ a nível espinal na antinocicepção induzida pela TOC;
- c) quantificar os níveis de proteínas dos receptores canabinoides CB₁, CB₂, e dos receptores opioides μ , κ , e δ na medula espinal durante a DPO e em resposta à aplicação da TOC;
- d) quantificar os níveis de proteína das enzimas associadas com o metabolismo de endocanabinoides FAAH e MAGL na medula espinal durante a DPO e em resposta à aplicação da TOC;
- e) investigar a influência da TOC sobre a concentração de AEA e 2-AG na medula espinal;
- f) avaliar a influência da TOC sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , assim como da citocina anti-inflamatória IL-10 na medula espinal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

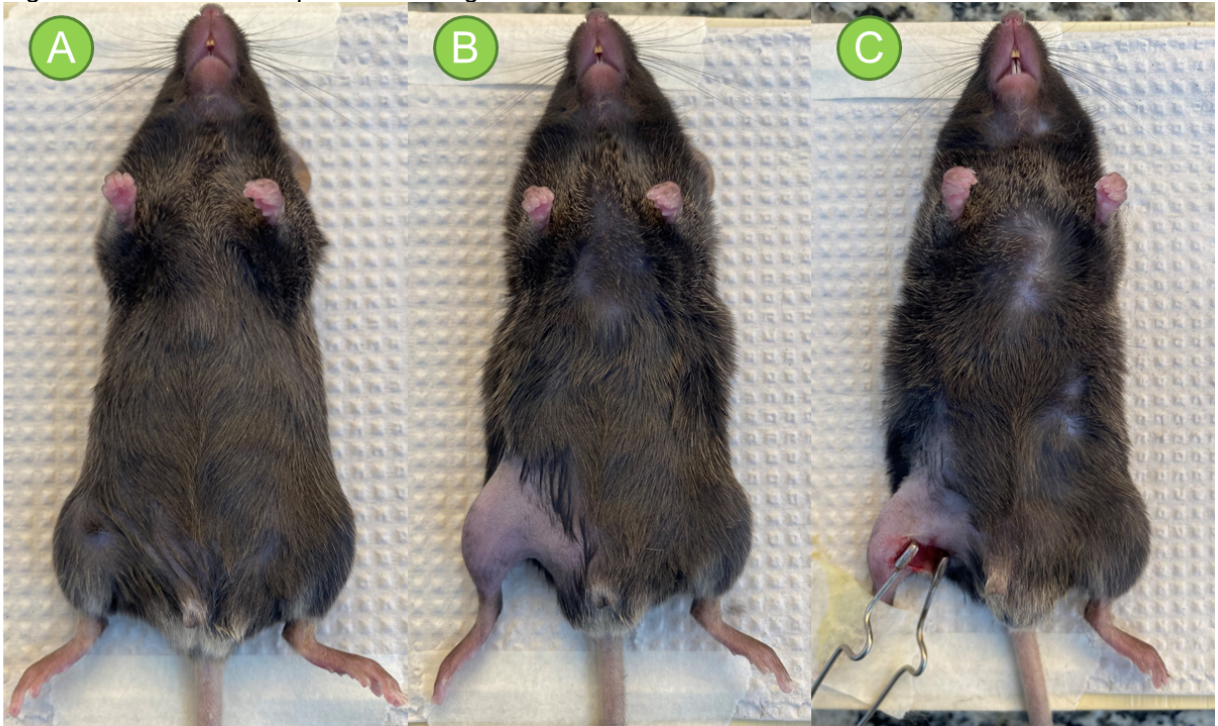
Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 7 semanas, pesando entre 25 e 30 g na chegada, obtidos do biotério central da Universidade Federal de Alfenas. Todos os animais foram mantidos em no máximo 6 animais por caixa microisoladora de polipropileno pertencente a uma estante ventilada (INSIGHT, BRASIL), em um ambiente controlado com temperatura de 23 °C, com um ciclo claro escuro de 12 h cada e com livre acesso à água e ração. Todos os experimentos comportamentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes internacionais da IASP (ZIMMERMANN, 1983), com prévia aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG, protocolo 18/2019).

4.2 MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA (DPO)

Para induzir dor crônica pós-operatória, foi utilizado um modelo baseado numa cirurgia de incisão e retração de músculo e pele (IRPM), padronizado para camundongos inicialmente por Elisei *et al.* (2020). Inicialmente os animais foram anestesiados com injeção intramuscular (i.m.) de uma solução composta por quetamina e xilazina, nas doses de 60 mg/Kg e 8 mg/Kg, respectivamente. O volume utilizado foi de 0,01 mL a cada 10 gramas de peso do animal (Figura 5A). Confirmada a anestesia, foi feita a tricotomia utilizando uma máquina de aparar pelos e assepsia com polivinilpirrolidona-iodo da região onde seria feita a incisão (Figura 5B). Então, uma incisão longitudinal de aproximadamente 8 mm de comprimento foi feita na região da coxa direita do animal, 3 mm medial à veia safena. Além disso, uma outra incisão com aproximadamente 7 mm de comprimento foi feita no músculo grácil superficialmente, aproximadamente 3 mm medial ao nervo safeno. A região superficial do músculo foi afastada, permitindo a inserção de um microrretrator esterilizado (Figura 6), com extremidades espaçadas em uma distância de 2 a 3 mm, com 4 mm de profundidade cada dente. A pele e o músculo superficial da coxa foram então retraídos de 8 a 10 mm, revelando a fáscia dos músculos adutores subjacentes (Figura 5C). Essa retração foi mantida por um período de 1 hora. Durante esse período, os animais foram monitorados e, quando necessário, foi fornecida anestesia adicional

utilizando uma subdose anestésica com quetamina e xilazina (1/3 da dose inicial). Adicionalmente, os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida (INSIGHT, BRASIL) durante o período de retração, minimizando a perda de temperatura corporal. Para o bem-estar do animal, salina estéril (0,9%) foi gotejada no local cirúrgico para evitar a desidratação tecidual e nos olhos dos animais para evitar ressecamento da córnea. Após o período de retração, os tecidos foram suturados com fios de sutura de seda 4,0. Na ocorrência de perda acentuada de sangue durante a cirurgia, a reposição de 0,5 a 1 mL de salina estéril (0,9%) por via intraperitoneal (i.p.) foi realizada, de acordo com as normas da CEUA local. Animais *naive*, que não foram submetidos a qualquer procedimento, foram utilizados como controle para conduzir o estudo.

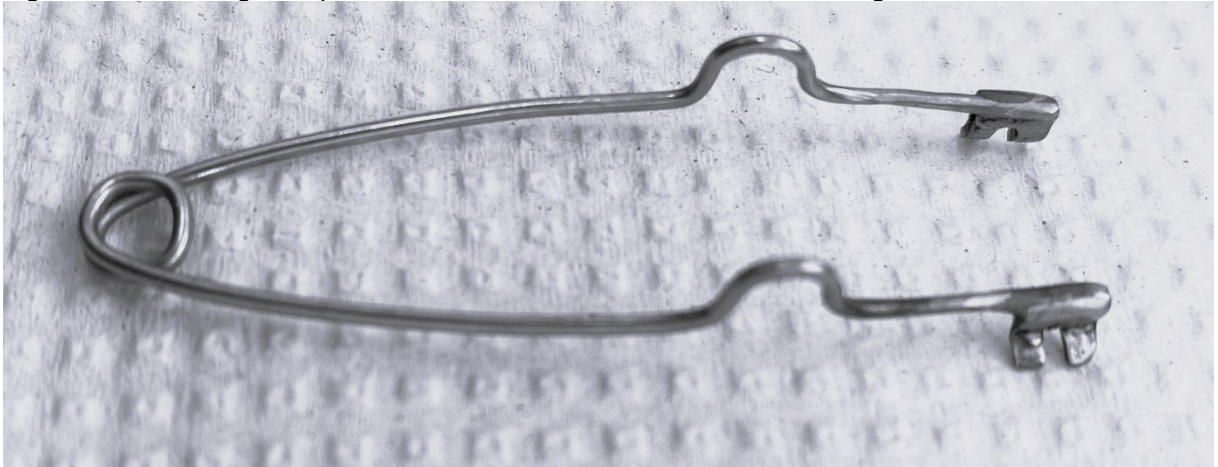
Figura 5 — Passo a passo da cirurgia de IRPM.



Fonte: Autor.

Legenda: A) Animal anestesiado; B) Tricotomia e assepsia da região medial da pata direita; C) Incisão e retração da pele e músculo (IRPM) medial à veia e nervo safeno.

Figura 6 — Imagem representativa do microrretrator utilizado na cirurgia de IRPM.



Fonte: Autor.

4.3 SUBSTÂNCIAS

Para a investigação da participação dos endocanabinoides e dos receptores canabinoides na antinocicepção induzida pela TOC, foram utilizadas as seguintes substâncias:

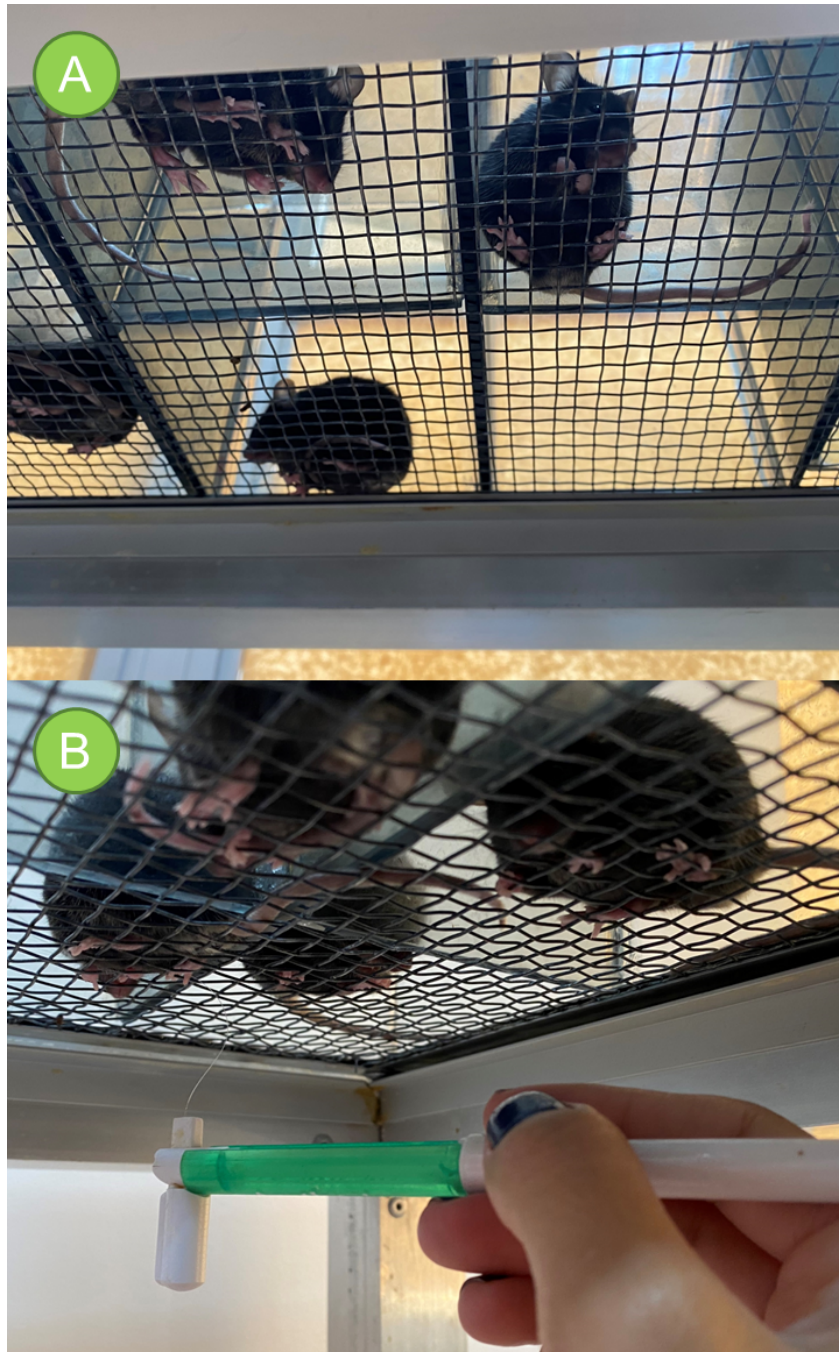
- a) AM251 (TOCRIS®, USA): agonista inverso do receptor CB_1 nas doses de 0,1, 1 e 10 μg , diluído em solução salina (0,9%) com DMSO (20%). A dose inicial de 1 μg foi baseada no estudo de Bilir *et al.* (2018);
- b) AM630 (TOCRIS®, USA): agonista inverso do receptor CB_2 nas doses de 3, 6 e 12 μg , diluído em solução salina (0,9%) com DMSO (20%). A dose inicial de 3 μg foi baseada no estudo de Fu e Taylor (2015);
- c) VDM11 (SIGMA, USA): inibidor da recaptção de anandamida nas doses de 1, 2 e 4 μg , diluído em salina (0,9%) com DMSO (20%). A dose inicial de 4 μg foi baseada no estudo de Pacheco *et al.* (2019);
- d) JZL184 (SIGMA, USA): inibidor da enzima MAGL nas doses de 0,5, 1 e 2 μg , diluído em salina (0,9%) com DMSO (20%). A dose inicial de 1 μg foi baseada no estudo de Yesilyurt *et al.* (2016);
- e) naloxona (SIGMA, USA): antagonista não seletivo de receptores opioides nas doses de 1, 2 e 4 μg , diluído em salina (0,9%). A dose inicial de 2 μg foi baseada no estudo de Zhang *et al.* (2018);
- f) cloccinamox (TOCRIS®, USA): antagonista seletivo do receptor opioide μ nas doses 1, 2 e 4 μg , diluído em salina (0,9%). A dose inicial de 2 μg foi baseada no estudo de Zhang *et al.* (2018);

- g) nor-binaltorfimina (TOCRIS®, USA): antagonista seletivo do receptor opioide κ nas doses 1,25, 2,5 e 5 μg , diluído em salina (0,9%). A dose inicial de 5 μg foi baseada no estudo de Obara *et al.* (2003);
- h) naltrindole (TOCRIS®, USA): antagonista seletivo do receptor opioide δ nas doses de 2,5, 5 e 10 μg , diluído em salina (0,9%). A dose inicial de 10 μg foi baseada no estudo de Ochi, Ohkubo e Mutoh (2002).

4.4 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO

Com o intuito de investigar a DPO, a influência da TOC na dor e a participação do SEC de forma comportamental, os animais foram submetidos à avaliação do limiar nociceptivo mecânico utilizando os filamentos de *von Frey* (AESTHESIA®, EUA) com base no método padronizado em nosso laboratório previamente (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Para isso, os camundongos foram colocados inicialmente em caixas com compartimentos individuais de vidro, sobre uma grade de metal que permite a exposição da pata dos animais, de 30 a 60 minutos, com a finalidade de permitir ambientação dos animais ao aparato. Após o período de ambientação, os filamentos foram aplicados de forma perpendicular sobre superfície plantar da pata traseira direita de cada animal com pressão crescente (0,02, 0,04, 0,07, 0,16, 0,4, 0,6, 1,0, 1,4 e 2,0 g) até que uma resposta de nocicepção positiva fosse identificada. Considerou-se uma resposta positiva a retirada da pata, seguida de lambida ou a agitação. Foram realizadas três medições por animal, espaçadas entre si por no mínimo três minutos. A média das 3 medições em gramas foi considerada como o limiar nociceptivo mecânico dos animais. A avaliação do limiar nociceptivo é exemplificada pelas Figuras 7A e 7B.

Figura 7 — Avaliação da DPO e do efeito antinocepsivo da TOC por meio do teste de von Frey.



Fonte: Autor.

Legenda: A) Ambientação dos animais no aparato antes da avaliação.
B) Aplicação do monofilamento na superfície plantar da pata direita do animal.

4.5 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

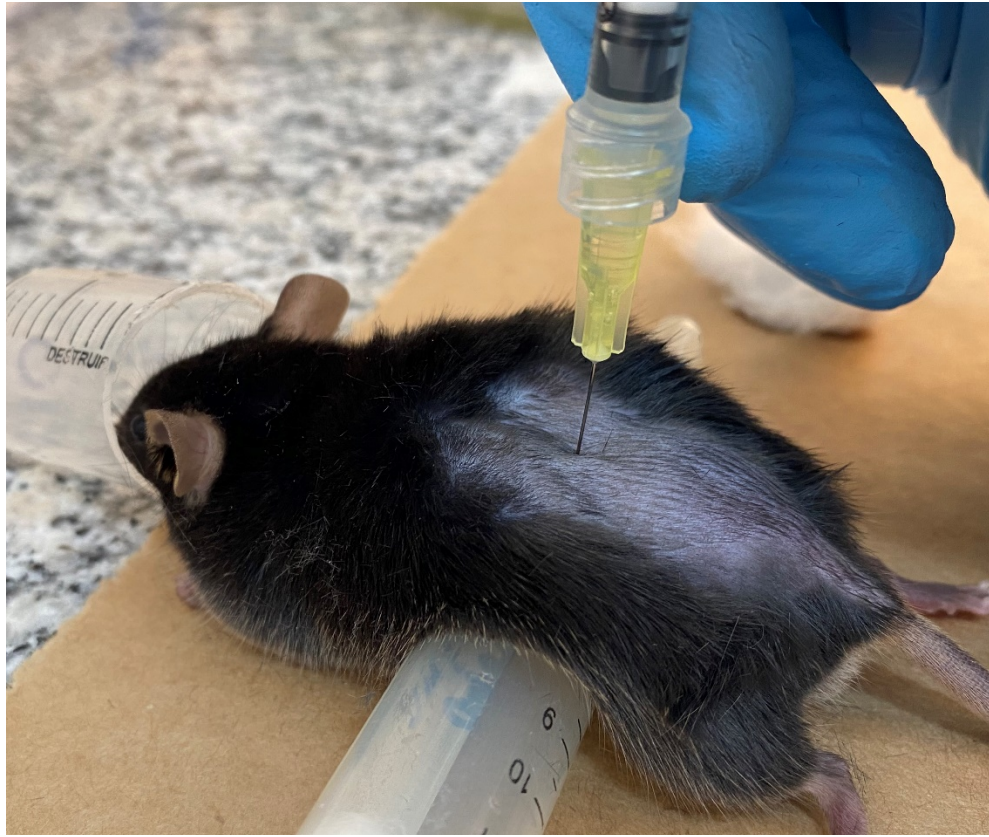
4.5.1 Intramuscular

Esta via foi utilizada para anestésiar os camundongos antes da cirurgia de IRPM. Brevemente, os animais foram imobilizados gentilmente de forma manual, envoltos por um pano, permitindo a exposição apenas do membro posterior direito. Depois, uma solução contendo quetamina e xilazina nas doses de 60 mg/Kg e 8 mg/Kg foi injetada no músculo gastrocnêmio da pata direita utilizando uma seringa com uma agulha 26,5 G, inserida perpendicularmente na região em um volume de 0,01 mL a cada 10 g de peso do animal.

4.5.2 Intratecal

A administração das substâncias descritas anteriormente foi feita por via intratecal. Para realização das injeções intratecais, os animais foram previamente sedados por meio de um sistema de vaporização de isoflurano previamente calibrado, com um fluxo de oxigênio de 2 L/min, dispensando via cone nasal 3% de isoflurano para indução da sedação e 2% para manutenção. Em seguida, foi realizada a tricotomia e limpeza com álcool 70% da região lombar dos animais. O espaço entre os processos espinhosos da quinta e sexta vertebrae lombares foi identificado por palpação. Como mostra a Figura 8, uma agulha 30 G foi introduzida no espaço sub-araquinoide e, após identificação do reflexo de *flinch* da calda, as substâncias ou veículos correspondentes foram injetados em um volume de 5 μ L., como descrito previamente (HYLDEN; WILCOX, 1980).

Figura 8 — Imagem representativa da administração de substâncias por via intratecal.



Fonte: Autor.

4.6 APLICAÇÃO DA TOC

Para a avaliação do efeito antinociceptivo da TOC e a possível participação do SEC, foi utilizado um aparelho de ondas de choque KLD HygiaPulse (KLD BIOSISTEMAS, BRASIL) que conta com uma unidade geradora acoplada a um aplicador. O aplicador gera as OC radiais por meio de um mecanismo eletromagnético em que uma bobina gera um campo magnético, impulsionando uma esfera metálica contra um receptáculo metálico, gerando choques que emitem a onda sonora terapêutica.

Para efetuar o tratamento, os animais foram previamente sedados em posição supina por meio de um sistema de vaporização de isoflurano previamente calibrado, com um fluxo de oxigênio de 2 L/min, dispensando via cone nasal 3% de isoflurano para indução da sedação e 2% para manutenção. A tricotomia e limpeza com álcool da região medial da coxa direita foi efetuada antes do tratamento. Em seguida, o aplicador do aparelho de OC foi posicionado sobre a superfície da coxa do animal e mantido em contato até o fim do tratamento (Figura 9). Os seguintes parâmetros de

tratamento foram utilizados: frequência dos pulsos de 10 Hz, ponteira do aplicador com área de contato de 5 mm, 0,40 mJ por pulso e densidade de fluxo energia de 0,11 mJ/mm². Quantidades de pulso distintas foram utilizadas para estabelecer a relação dose-resposta dos efeitos da TOC (100, 200 e 400 pulsos). Até o momento, nenhum estudo reportou parâmetros de tratamento para atenuação da DPO, portanto a dose foi estabelecida como baixa-média energia de acordo com os efeitos biológicos esperados. Os animais receberam dois tratamentos com TOC, sendo o primeiro aplicado no 14º dia após a cirurgia (dois dias antes do dia de avaliação), e o segundo no 16º dia, respeitando um intervalo de 48 horas entre as aplicações.

Figura 9 — Imagem representativa da aplicação da TOC na região medial da coxa direita dos animais.



Fonte: Autor.

Adicionalmente, parte dos animais foram submetidos ao tratamento sham como controle (aparelho de OC desligado). Nessa condição, os animais foram anestesiados com isoflurano (2%) e oxigênio (2 L/min) e posicionados como descrito anteriormente. A ponteira do cabeçote de ondas de choque foi posicionada sobre coxa dos animais, mas o aparelho permaneceu desligado durante o período equivalente ao de tratamento.

4.6.1 Avaliação por radiografia da integridade femoral após o tratamento

Devido ao fato de o aplicador do aparelho de OC emitir moderado impacto mecânico sobre a superfície tratada, ao final do tratamento, os animais tratados com

as diferentes doses (100, 200 e 400 pulsos) passaram por uma avaliação radiográfica do fêmur, com o intuito de avaliar a integridade óssea. Dessa forma, foram obtidas as radiografias da coxa direita dos animais, no 17º dia após a cirurgia, que foi o dia seguinte ao 2º tratamento com a TOC e após o término da avaliação do limiar nociceptivo. Para a obtenção das radiografias, os animais foram previamente sedados em posição supina por meio de um sistema de vaporização de isoflurano previamente calibrado, com um fluxo de oxigênio de 2 L/min, dispensando via cone nasal 3% de isoflurano para indução da sedação e 2% para manutenção. Na sequência, os animais foram posicionados com a coxa direita sobre um sensor de captura radiográfica digital CareStream RVG 5200 (KODAK, JAPÃO) conectado a um computador, que registrou as radiografias. As imagens foram avaliadas qualitativamente visando a identificação de quaisquer alterações ósseas do fêmur decorrente do tratamento que pudessem indicar fraturas, com o intuito de garantir a segurança da terapia em questão aplicada aos camundongos.

4.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS ESPINAIS DE ENDOCANABINOIDES

Para a dosagem dos níveis de ECs foi realizada por meio da técnica de cromatografia líquida associada à espectrometria de massas. Para essa finalidade, após a eutanásia dos animais, os segmentos L4 a L6 da medula espinal foram coletados, e rapidamente congelados a -196 °C em nitrogênio líquido, e posteriormente armazenados em microtubos em biofreezer a -80 °C. Para a semana da análise, as amostras foram transportadas em caixas de isopor, contendo nitrogênio líquido, para a Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Excelência em Quantificação de Lipídeos, local onde as dosagens foram realizadas. No processo de extração, cada amostra foi previamente enriquecida com 10 pmol do padrão de anandamida (AEA-d8) ou de 2-araquidonoilglicerol (2-AG-d8), homogeneizada em H₂O/MeOH e purificada como descrito anteriormente por Bligh e Dyer (1959).

Após a reação, as amostras foram liofilizadas, ressuspendidas em 100 µL de MeOH e injetadas no LC-MS/MS. As fases móveis utilizadas foram água (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. A condição de gradiente foi: 0 a 1 min, 5% de B; 5 min, 70% de B; 9,5 a 11 min, 98% de B. Uma vazão de 0,5 mL/min e a coluna Ascentis Express C8 (150 x 2,1 mm; 2,7 µm) foram empregadas.

A espectrometria de massa foi operada em modo positivo para análise de MRMHR monitoramento de reação múltipla de alta resolução (MRMHR). Os resultados foram expressos como ng/mL.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CANABINOIDES, OPIOIDES E DAS ENZIMAS FAAH E MAGL NA MEDULA ESPINAL

A técnica de Western Blot foi utilizada para avaliar e quantificar a expressão de proteínas dos receptores CB₁ e CB₂, além das enzimas FAAH e MAGL. Para isso, os animais receberam uma overdose de ketamina e xilazina e então foram sacrificados por decapitação. Em seguida, os segmentos L4 a L6 da medula espinal foram extraídos, congelados instantaneamente a -196 °C em nitrogênio e mantidos em -80 °C até o dia do processamento. As medulas foram homogeneizadas em 150 µL de uma solução tampão de ensaio radioimunoprecipitador (RIPA – R0278, SIGMA®, EUA), contendo 10% de um coquetel inibidor de proteases (P2714, SIGMA®, EUA) e 1% de um coquetel inibidor de fosfatases (P0044, SIGMA®, EUA), utilizando um homogeneizador de tecidos tipo Turrax (MARCONI®). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi aliquoteado em microtubos de polipropileno e armazenados a -80 °C para posterior utilização.

Posteriormente, as amostras foram então diluídas em tampão de amostra Laemmli 4x (BIO-RAD, EUA) com 10% de β-mercaptoetanol, e aquecidas em banho maria a seco por 5 minutos a 95 °C. Em seguida, 30 µg de proteína total em 25 µL foram pipetados no gel de poliacrilamida na concentração de 12%. As amostras então foram submetidas à eletroforese no gel de poliacrilamida utilizando um aparato Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BIO-RAD®, EUA) com corrente inicial de 80 V no gel de entrada e de 120 V no gel de corrida. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Amersham (SIGMA®, USA) com poro de 0,45 µm de diâmetro, por meio do sistema Trans-Blot Turbo (BIO-RAD®, EUA). A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. Constatadas as bandas após a transferência, a membrana foi então lavada com o tampão de lavagem TBS-Tween (TBST) 1x até a remoção completa do Ponceau e em seguida colocada em solução de bloqueio contendo 5% de leite (BIO-RAD®, EUA) por 2 horas.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T 1x e incubada *overnight* com o anticorpo primário específico: anti-CB₁ (10006590, CAYMAN CHEMICALS®, EUA) na concentração de 1:1000; anti-CB₂ (101550, CAYMAN CHEMICALS®, EUA) na concentração de 1:250; anti- μ (ab10275, ABCAM, EUA) na concentração de 1:1000; anti- κ (sc9112, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, EUA) na concentração de 1:1000; anti- δ (ab66317, ABCAM, EUA) na concentração de 1:1000; anti-FAAH (ab128917, ABCAM, USA) na concentração de 1:1000; anti-MAGL (ab24701, ABCAM, EUA) na concentração de 1:1500; e anti-DAGL α (sc-390409, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, EUA) na concentração de 1:500. No dia seguinte, a membrana foi novamente lavada com TBS-T e incubada por duas horas com o anticorpo secundário correspondente *goat anti-rabbit IgG*-HRP (a16096, INVITROGEN, EUA) na concentração de 1:3000 ou *goat anti-mouse IgG*-HRP (ab6789, ABCAM, EUA) na concentração de 1:5000. A β -actina (A2228, SIGMA®, EUA; ou A3854, SIGMA®, EUA) na concentração de 1:2000 ou 1:25000, respectivamente, foi utilizada como controle interno.

Após o período de incubação, a membrana foi novamente lavada uma última vez com TBS-T 1x e, por fim, a reação de quimioluminescência das bandas de interesse (CB₁ 52 kD, CB₂ 40 kD, μ 45 kD, κ 43 kD, δ 40 kD, FAAH 60 kD, MAGL 35 kD, DAGL α 120 kD e β -actina 42 kD) foi detectada utilizando um kit ECL Clarity™ (BIO-RAD®, EUA) por um sistema de captação ChemiDoc XRS+ (BIO-RAD®, EUA). Posteriormente, essas bandas foram analisadas de acordo com a intensidade da densidade óptica de imunorreatividade pelo *software* ImageLab (BIO-RAD®, EUA).

4.9 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS ESPINAIS DE CITOCINAS

Com o objetivo de avaliar os níveis espinais das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 durante a DPO, assim como a influência da TOC nesses níveis, foi utilizado o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Para isso, os animais receberam uma *overdose* de quetamina e xilazina e então sacrificados por decapitação. Em seguida, os segmentos L4 a L6 da medula espinal foram extraídos, congelados instantaneamente a -196 °C em nitrogênio e mantidos em -80°C até o dia do processamento. Posteriormente, as amostras de medula espinal foram homogeneizadas em 300 μ L de tampão fosfato-salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4 utilizando um homogeneizador de tecidos tipo Turrax (MARCONI®). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a

5000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para microtubos de polipropileno, que foram armazenados a -80 °C para posterior utilização.

A técnica de ELISA foi realizada por meio de kits específicos para detecção das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 em camundongos (PEPROTECH®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, o anticorpo de captura foi incubado *overnight* em uma placa de cultura enriquecida de 96 poços. No dia seguinte, os poços aspirados e lavados manualmente com tampão de lavagem contendo PBS e 0,05% de Tween-20. Depois, a curva padrão de cada citocina e 100 μ L das amostras foram colocados nos poços pelo período de 2 horas. Após esse período, a placa foi novamente aspirada e lavada, sendo incubada na sequência por 2 horas com anticorpo de detecção. Novamente, a placa foi aspirada e lavada, e a avidina-HRP foi adicionada por um período de 30 minutos. Por fim, a placa foi aspirada e lavada mais uma vez e o substrato da HRP, 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina 6-sulfônico) (ABTS), foi adicionado na sequência. Finalmente, o desenvolvimento de cor foi monitorado utilizando um leitor de placa de ELISA BioTek ELx800 (BIOTEK, EUA).

4.10 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.10.1 Avaliação da DPO induzida pelo modelo de IRPM

Inicialmente, com o intuito de avaliar a DPO induzida pela cirurgia de IRPM, todos os animais passaram inicialmente pela medida basal do limiar nociceptivo. Então, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: controle (Co) e com dor pós-operatória (DPO). Os animais do grupo com DPO passaram pela cirurgia de IRPM para indução da modelo DPO. Além disso, o limiar nociceptivo de todos os animais foi avaliado novamente 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia. Este experimento também foi utilizado para definir o dia em que os demais experimentos envolvendo o tratamento com a TOC seriam efetuados, sendo escolhido o 14º dia para o início dos experimentos, uma vez que nesse período alterações espinais que representam um estado de sensibilização central já estão presentes (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Considerando que o tratamento com a TOC foi iniciado no 14º dia e um intervalo de 48 foi obedecido entre os tratamentos, o segundo tratamento foi realizado no 16º dia, e assim esse dia foi estabelecido para avaliação do limiar nociceptivo e coleta da medula espinal.

4.10.2 Avaliação do efeito antinociceptivo da TOC na DPO induzida pela IRPM

Após a avaliação da DPO induzida pela IRPM, foi conduzido um experimento para investigar o efeito antinociceptivo da TOC na nocicepção deste modelo. Para isso, primeiramente todos os animais passaram por uma avaliação basal do limiar nociceptivo. Em seguida, os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: a) animais controle (Co) que não passaram por qualquer procedimento; b) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória (DPO); c) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da DPO e receberam tratamento SHAM no 14º e 16º dia (DPO + SHAM); d) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória e receberam 100 pulsos da TOC no 14º e 16º (DPO + TOC 100p); e) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória e receberam 200 pulsos da TOC no 14º e 16º (DPO + TOC 200p); f) e animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória e receberam 400 pulsos da TOC no 14º e 16º (DPO + TOC 400p). No 16º dia, o limiar nociceptivo de todos os animais foi novamente avaliado 30, 60, 90, 120, 180, 300 e 420 minutos depois da segunda aplicação da TOC. Esse experimento foi utilizado para estabelecer a dose que seria utilizada nos experimentos subsequentes. A dose utilizada para os experimentos subsequentes foi a dose de 100 pulsos (TOC 100p), como detalhado nos resultados. Além disso, no 17º dia, esses mesmos animais passaram por uma avaliação radiológica com o intuito de avaliar a segurança da aplicação da TOC em camundongos. A Figura 10 resume o delineamento do experimento descrito acima.

4.10.3 Avaliação da participação dos receptores canabinoides e opioides a nível espinal e da influência dos níveis espinais de AEA e 2-AG na antinocicepção induzida pela TOC

Com o intuito de investigar a contribuição do SEC e do SOP a nível espinal na antinocicepção induzida pela TOC, foi realizada uma série de experimentos farmacológicos como descrito a seguir. Inicialmente, os camundongos passaram por uma avaliação basal do limiar nociceptivo mecânico. Na sequência, os animais foram alocados aleatoriamente nos grupos da seguinte forma: a) animais controle (Co) que não passaram por qualquer procedimento; b) animais que passaram pela cirurgia de

IRPM para indução da dor pós-operatória (DPO); c) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória, receberam a primeira aplicação da TOC no 14º dia e a pré-administração de veículo seguida pela segunda aplicação da TOC no 16º dia (DPO+VEC+TOC 100p); d) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória, receberam a primeira aplicação da TOC no 14º dia e a pré-administração de 0,1, 1 ou 10 µg de AM251 seguida pela segunda aplicação da TOC no 16º dia (DPO+AM251(0,1 µg)+TOC 100p, DPO+AM251(1 µg)+TOC 100p e DPO+AM251(10 µg)+TOC 100p, respectivamente); e) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória, receberam a primeira aplicação da TOC no 14º dia e a pré-administração de 3, 6 ou 12 µg de AM630 seguida pela segunda aplicação da TOC no 16º dia (DPO+AM630(3 µg)+TOC 100p, DPO + AM630(6 µg)+TOC 100p e DPO+AM630(12 µg)+TOC 100p, respectivamente); f) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória, receberam a primeira aplicação da TOC no 14º dia e a pré-administração de 1, 2 ou 4 µg de VDM11 seguida pela segunda aplicação da TOC no 16º dia (DPO+VDM11(1 µg)+TOC 100p, DPO+VDM11(2 µg)+TOC 100p e DPO+VDM11(4 µg)+TOC 100p, respectivamente); g) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória, receberam a primeira aplicação da TOC no 14º dia e a pré-administração de 0,5, 1 ou 2 µg de JZL184 seguida pela segunda aplicação da TOC no 16º dia (DPO+JZL184(0,5 µg)+TOC 100p, DPO+JZL184(1 µg)+TOC 100p e DPO+JZL184(2 µg)+TOC 100p, respectivamente); h) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória, receberam a primeira aplicação da TOC no 14º dia e a pré-administração de 1, 2 ou 4 µg de Naloxona seguida pela segunda aplicação da TOC no 16º dia (DPO+Nalo(1 µg)+TOC 100p, DPO+Nalo(2 µg)+TOC 100p e DPO+Nalo(4 µg)+TOC 100p, respectivamente); i) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória, receberam a primeira aplicação da TOC no 14º dia e a pré-administração de 1, 2 ou 4 µg de Cloccinamox seguida pela segunda aplicação da TOC no 16º dia (DPO+Clocci(1 µg)+TOC 100p, DPO+Clocci(2 µg)+TOC 100p e DPO+Clocci(4 µg)+TOC 100p, respectivamente); j) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória, receberam a primeira aplicação da TOC no 14º dia e a pré-administração de 1,25, 2,5 ou 5 µg de nor-binaltorfimina seguida pela segunda aplicação da TOC no 16º dia (DPO+Nor BNI(1,25 µg)+TOC 100p, DPO+Nor BNI(2,5 µg)+TOC 100p e DPO+Nor BNI(5 µg)+TOC 100p, respectivamente); k) e animais que

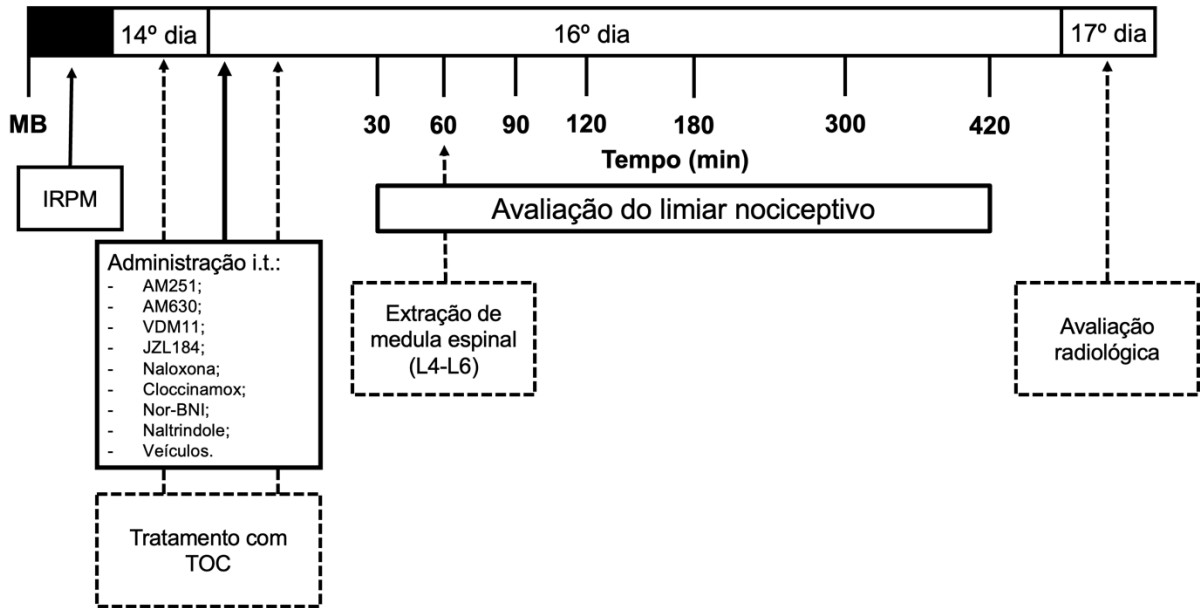
passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória, receberam a primeira aplicação da TOC no 14º dia e a pré-administração de 10, 2 ou 4 µg de Naltrindole seguida pela segunda aplicação da TOC no 16º dia (DPO+Naltrin(1 µg)+TOC 100p, DPO+Naltrin(2 µg)+TOC 100p e DPO+Naltrin(4 µg)+TOC 100p, respectivamente). No 16º dia, o limiar nociceptivo de todos os animais foi novamente avaliado 30, 60, 90, 120, 180, 300 e 420 minutos depois da segunda aplicação da TOC. A Figura 10 esquematiza a organização dos experimentos descritos acima.

Em uma série distinta de experimentos, animais controle ou com DPO receberam a pré-administração i.t. da maior dose de AM251, AM630, VDM11, JZL184, Naloxona, Cloccinamox, Nor-binaltorfimina, Naltrindole ou seus respectivos veículos, associado ao tratamento com 100 pulsos da TOC ou tratamento sham em combinações diferentes aos grupos descritos no parágrafo anterior, com o intuito de avaliar a influência dessas intervenções de forma isolada no limiar nociceptivo, servindo como um experimento controle.

4.10.4 Avaliação dos níveis de ECs, expressão de receptores canabinoides, opioides e níveis de citocina na medula espinal após aplicação da TOC

Para coleta das amostras utilizadas nos testes biomoleculares, experimentos distintos foram conduzidos. Em primeiro lugar, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos: a) animais controle (Co) que não passaram por qualquer procedimento; b) animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da dor pós-operatória (DPO); c) e animais que passaram pela cirurgia de IRPM para indução da DPO e receberam a aplicação da TOC no 14º e 16º dia (DPO+TOC 100p). No 16º dia, exatamente 1 hora após a segunda aplicação da TOC, os animais foram eutanasiados e os segmentos L4 a L6 da medula espinal foram extraídos e armazenados, como representado na Figura 10. Vale lembrar que esses animais não passaram por avaliação comportamental.

Figura 10 — Diagrama resumindo o delineamento dos experimentos.



Fonte: Autor.

Legenda: Resumidamente, os animais passaram por uma medida basal (MB) do limiar nociceptivo mecânico. Logo em seguida, parte dos animais foi submetida à cirurgia de IRPM para indução da DPO. Após 14 dias, os animais receberam o primeiro tratamento com a TOC. No 16º dia, primeiramente os animais receberam, por via i.t., a administração das substâncias ou seus respectivos veículos, e logo após foram tratados com a TOC pela segunda vez. Em seguida, o limiar nociceptivo foi novamente avaliado 30, 60, 90, 120, 180, 300 e 420 minutos após o tratamento. Em um outro experimento, parte dos animais passou pela cirurgia de IRPM para indução da DPO. No 14º dia, os animais receberam o primeiro tratamento com a TOC e no 16º dia receberam o segundo tratamento. 1 hora após o tratamento (momento do pico de antinocicepção), os animais foram eutanasiados para extração da medula espinal. A avaliação radiológica foi realizada no 17º em um único experimento, para a garantir a segurança de aplicação da TOC nos camundongos. MB: medida basal; IRPM: incisão e retração de pele e músculo.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média \pm E.P.M. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais de limiar nociceptivo ao longo do tempo, foi utilizada a Análise de Variância de duas vias (*Two-way ANOVA*). Para os dados comportamentais de área sob a curva (ASC) do limiar nociceptivo, foi utilizada a análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*). Nos gráficos de ASC, foram utilizados os dados da avaliação do limiar nociceptivo referentes à janela de tempo em que foi observado efeito antinociceptivo da TOC em cada experimento. Tanto para ANOVA de uma ou duas vias, as análises foram seguidas pelo pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni, sendo considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas e elaboração de figuras foram

realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 5 (GRAPHPAD SOFTWARE, EUA).

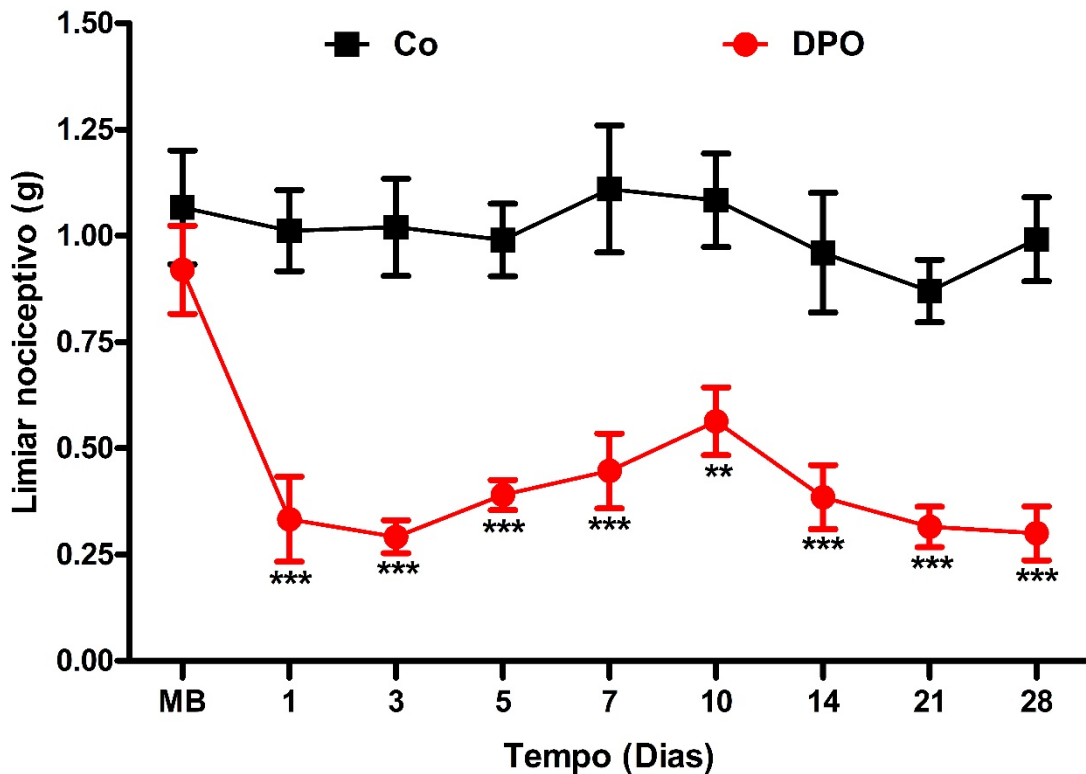
5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA DPO INDUZIDA PELA CIRURGIA DE IRPM

Inicialmente, foi realizado um experimento com objetivo de avaliar a DPO induzida pela cirurgia de IRPM. Assim, foram utilizados 12 camundongos, divididos em 2 grupos de 6 animais cada: grupo controle (Co) e grupo com dor (DPO).

Os resultados mostram uma redução significativa do limiar nociceptivo do grupo DPO em relação ao grupo Co, do 1º até o 28º dia após a cirurgia de IRPM ($p < 0,001$ do 1º ao 7º; $p < 0,01$ no 10º dia; e $p < 0,001$ do 14º ao 28º dia; $F_{1,10} = 1,707$), representando a dor pós-operatória nesses animais (Gráfico 1). Com base nesse resultado, o 14º dia pós-operatório foi o período escolhido para iniciar o tratamento com a TOC, e o 16º para as avaliações nos próximos experimentos.

Gráfico 1 — Avaliação da DPO induzida pela cirurgia de incisão e retração de pele e músculo (IRPM) durante 28 dias.



Fonte: Autor.

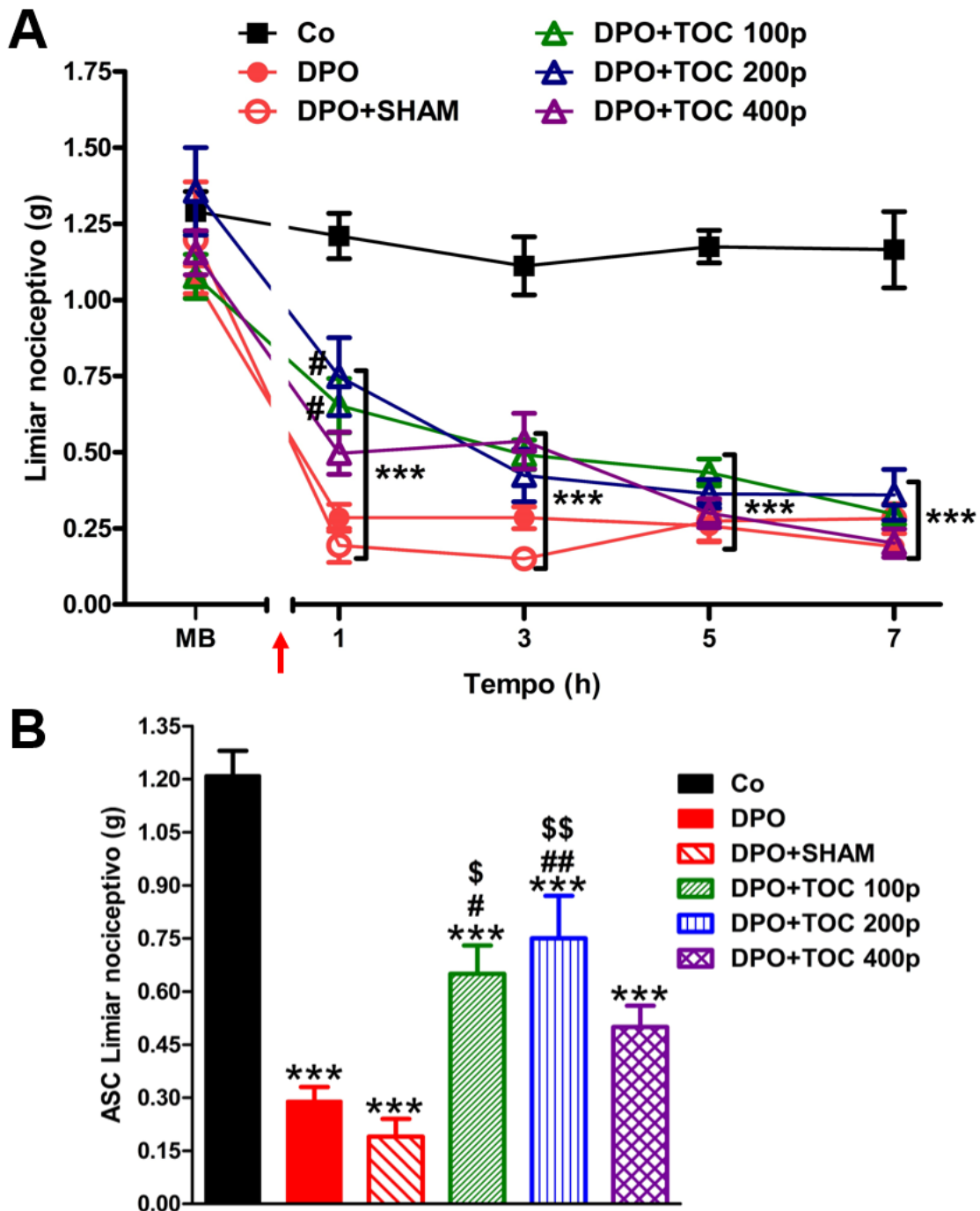
Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. ** indica significância estatística ($p < 0,01$) e *** indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo Co. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória.

5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA TOC NA DPO INDUZIDA PELA IRPM

O próximo passo do estudo foi a avaliação do efeito antinociceptivo de diferentes doses de tratamento com a TOC na DPO induzida pela IRPM. É possível verificar no Gráfico 2A que os animais do grupo com DPO apresentaram uma redução significativa do limiar nociceptivo ($p < 0,001$, $F_{5,29} = 4,479$) quando comparados com os do grupo Co. Entretanto, os animais com DPO tratados com 100 (DPO+TOC 100p) e 200 pulsos (DPO+TOC 200p) da TOC apresentaram uma atenuação da alodínia mecânica ($p < 0,05$, $F_{5,29} = 4,479$) em relação aos animais com DPO não tratados (DPO) na 1ª hora após o tratamento. Apesar de haver uma tendência antinociceptiva do tratamento com 400 pulsos da TOC (DPO+TOC 400p), não houve significância estatística ($p > 0,05$, $p < 0,05$, $F_{5,29} = 4,479$) quando comparado com o grupo DPO. Além disso, os animais operados que passaram pelo tratamento sham (DPO+SHAM)

apresentaram uma queda significativa do limiar nociceptivo semelhante ao grupo DPO, porém não foi observado efeito antinociceptivo nesse grupo. O Gráfico 2B mostra a ASC do limiar nociceptivo referente ao período em que foi identificado efeito antinociceptivo da TOC (1 hora após o tratamento). Dessa forma, esses achados mostraram que 2 tratamentos com 100 e 200 pulsos de TOC foram suficientes para atenuar a DPO induzida pela IRPM no 16º dia por 1 hora, demonstrando a eficácia antinociceptiva das doses utilizadas. Com base nesses dados, a dose de 100 pulsos foi a menor dose efetiva e, portanto, foi a dose utilizada nos experimentos seguintes para investigação dos mecanismos envolvidos com a antinocicepção dessa terapia.

Gráfico 2 — Avaliação do efeito antinociceptivo do tratamento com 3 diferentes doses da TOC (100, 200 e 400 pulsos) sobre a DPO induzida pela cirurgia de IRPM no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito antinociceptivo da TOC (B).



Fonte: Autor.

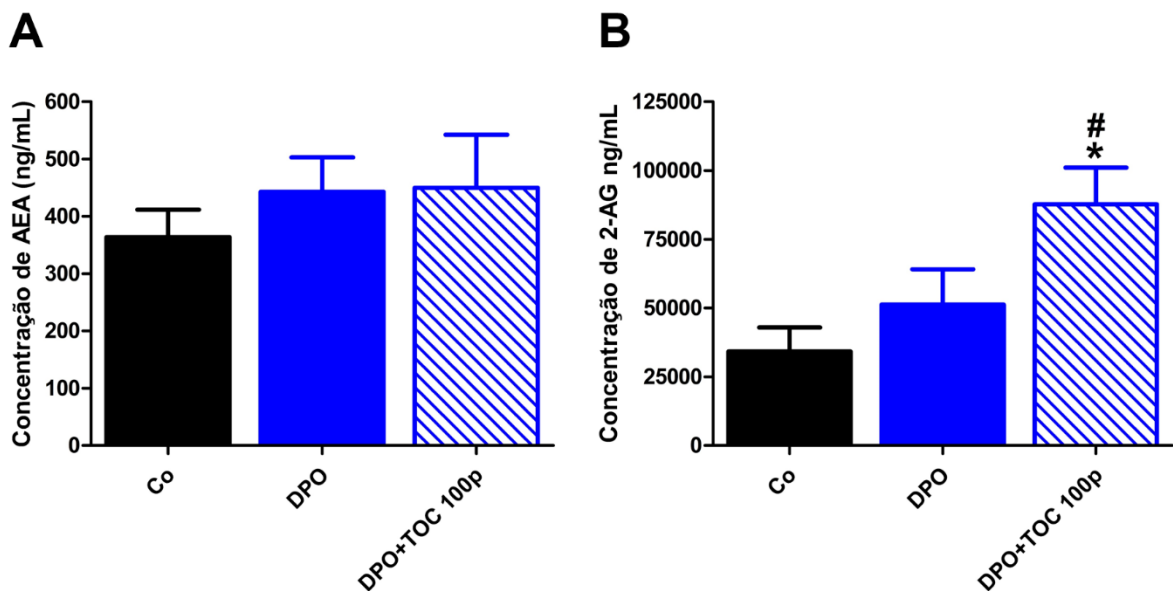
Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. *** indica significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo Co; #, ## indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$) em relação ao grupo DPO; \$, \$\$ indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$) em relação ao grupo DPO+SHAM. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. ASC: área sob a curva. TOC: terapia por ondas de choque. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia.

5.3 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SEC A NÍVEL ESPINAL NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA TOC

5.3.1 Avaliação dos níveis espinais de endocanabinoides após a TOC

Após averiguar a atenuação da DPO pela TOC, foi investigado se o efeito antinociceptivo induzido pela aplicação da TOC estava relacionado com a alteração dos níveis de ECs na medula espinal. De acordo com os dados mostrados no Gráfico 3, a dosagem de AEA (Gráfico 3A) e 2-AG (Gráfico 3B) nos segmentos L4 a L6 da medula espinal dos animais mostrou que, apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos com relação aos níveis de AEA ($p > 0,05$; $F_{2,14} = 0,4135$), houve um aumento significativo dos níveis de 2-AG nos animais com DPO tratados com a TOC (DPO+TOC 100p) quando comparados aos animais Co ($p < 0,05$; $F_{2,14} = 5,312$) e animais com DPO ($p < 0,05$; $F_{2,14} = 5,312$). Portanto, o efeito antinociceptivo da TOC pode ter sido mediado pelo aumento dos níveis de 2-AG, e possivelmente pela ativação dos receptores CB₁ e CB₂ expressos na medula espinal.

Gráfico 3 — Avaliação dos níveis de AEA (A) e 2-AG (B) nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 16º dia após a cirurgia de IRPM para indução da DPO, 1 hora após o segundo tratamento com a TOC.



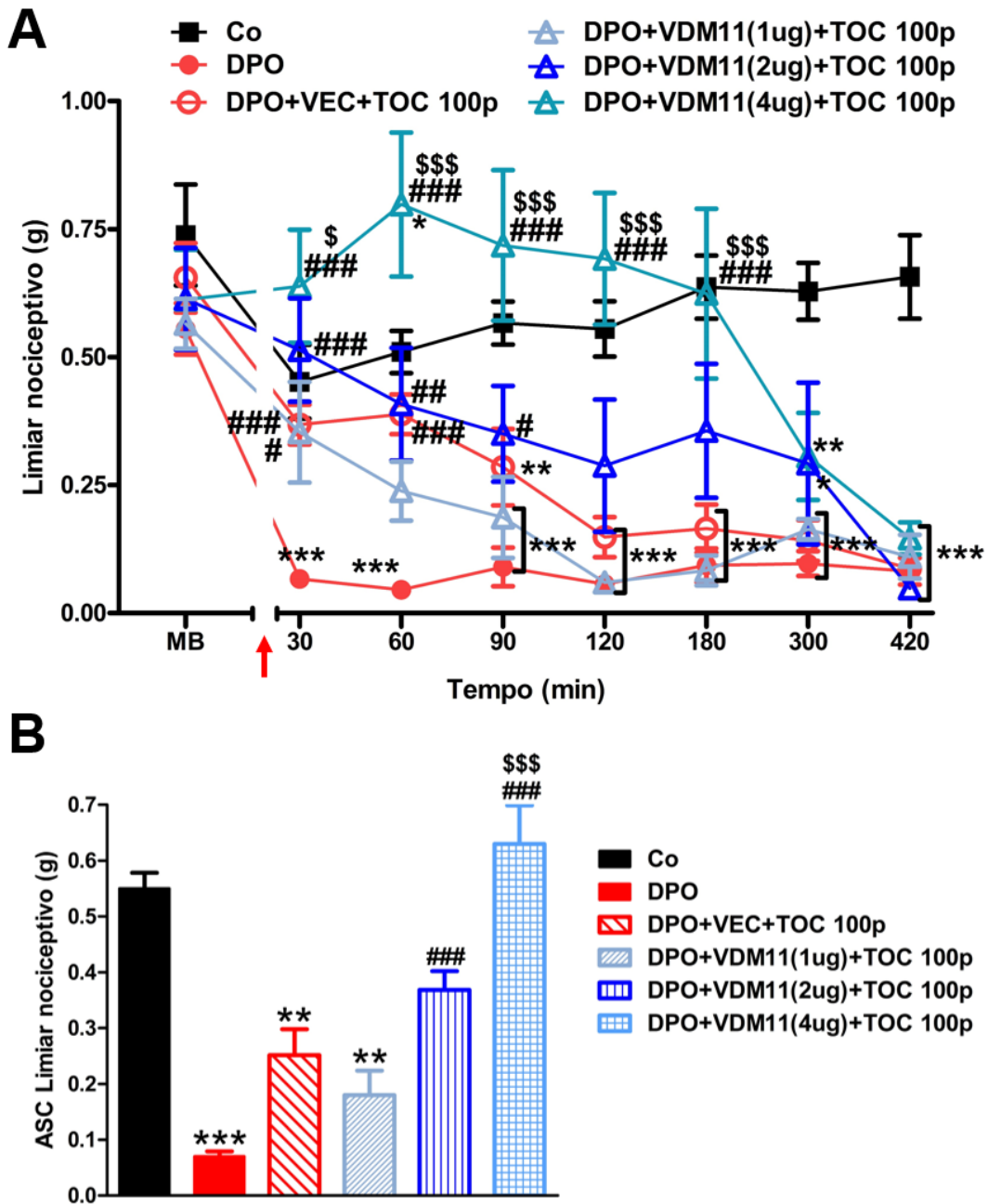
Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da concentração dos EC em nanogramas por mililitro (ng/mL) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co; # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo IRPM. Co: controle. DPO: dor pós-operatória. TOC: terapia por ondas de choque. AEA: anandamida. 2-AG: 2-araquidonoilglicerol.

5.3.2 Avaliação da influência dos níveis espinais de AEA e 2-AG na antinocicepção induzida pela TOC

Diante dos dados que sugerem o envolvimento dos receptores canabinoides no efeito antinociceptivo induzido pela TOC, foi investigado se o aumento da disponibilidade dos endocanabinoides AEA e 2-AG poderia potencializar a antinocicepção induzida pela TOC. Para isso, foi realizada a pré-administração de VDM11, um inibidor do transportador de membrana da AEA, prolongando a permanência desse neurotransmissor na fenda sináptica e diminuindo a sua metabolização. O Gráfico 4A mostra que a administração de VDM11 na dose de 4 µg (DPO+VDM11(4 µg)+TOC 100p) promoveu não somente a reversão da DPO ($p < 0,001$; $F_{5,30} = 4,894$), mas também uma potencialização do efeito antinociceptivo da TOC de 30 minutos até 180 minutos após o tratamento ($p < 0,05$ aos 30 minutos, $p < 0,001$ aos 60, 120 e 180 minutos; $F_{5,30} = 4,894$), aumentando a intensidade da antinocicepção induzida pela TOC e prolongando a sua duração. As doses de 1 e 2 µg, por outro lado, não foram suficientes para potencializar o efeito antinociceptivo da TOC ($p > 0,05$; $F_{5,30} = 4,894$). O Gráfico 4B representa a ASC do limiar nociceptivo correspondente ao período em que houve efeito antinociceptivo da TOC e do VDM11 (30, 60, 90, 120 e 180 minutos após o tratamento). Sendo assim, este achado pode sugerir que o efeito da TOC pode ser mediado pelo SEC ou por mecanismos em comum, uma vez que o aumento da disponibilidade de AEA potencializou a antinocicepção da TOC, indicando um possível efeito sinérgico.

Gráfico 4 — Avaliação da influência do aumento da disponibilidade espinal de AEA no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e gráfico de área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito do VDM11 e a antinociceção da TOC (B).

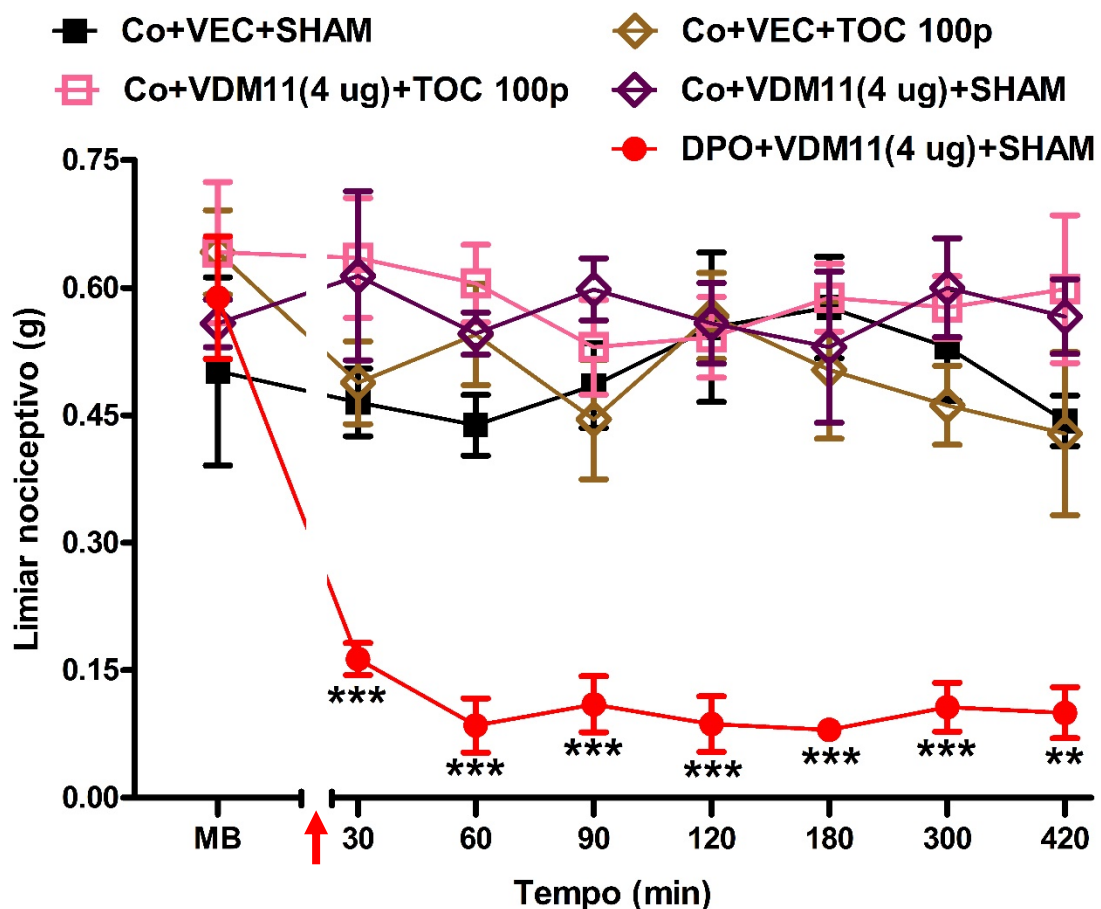


Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. *, **, *** indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co #, ##, ### indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo DPO; \$, \$\$, \$\$\$ indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo DPO+VEC+TOC 100p. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. ASC: área sob a curva. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de VDM11 seguida pelo tratamento com a TOC.

O Gráfico 5 apresenta os efeitos da administração do VDM11, TOC ou tratamento sham em animais Co e com DPO induzida por IRPM. Interessantemente, o Gráfico 5 revela que a administração apenas do VDM11 na dose de 4 µg em animais Co ou DPO não foi capaz de alterar o limiar nociceptivo por si só, e que a combinação do VDM11 e o tratamento com a TOC não alterou o limiar nociceptivo dos animais sem dor, reforçando a possibilidade de sinergismo entre a antinocicepção da TOC e o SEC.

Gráfico 5 — Efeito da injeção i.t. de VDM11 ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais



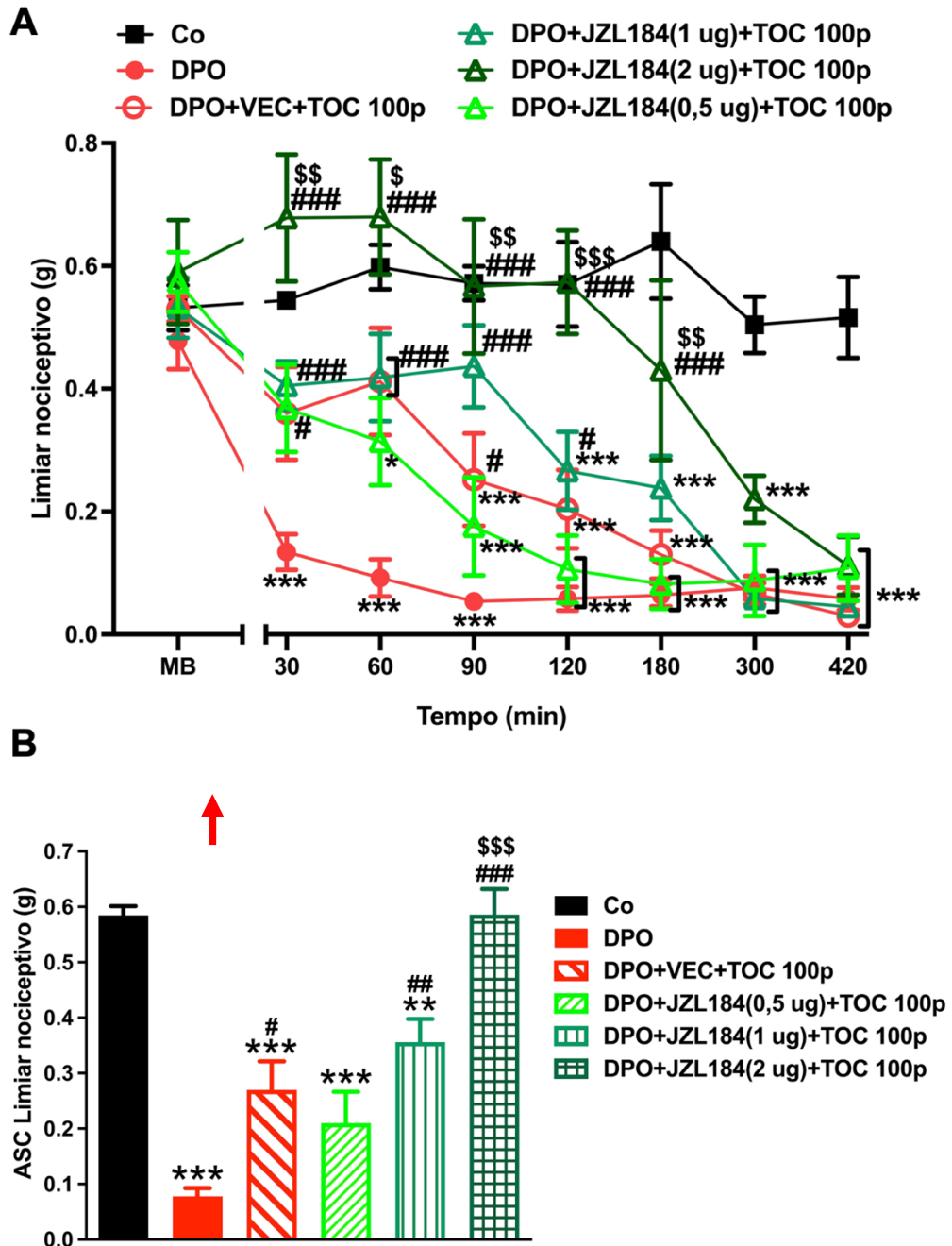
Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. **, *** indicam significância estatística ($p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co+VEC+SHAM. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de VDM11 seguida pelo tratamento com a TOC.

Para investigar se o aumento da disponibilidade do 2-AG poderia potencializar o efeito antinociceptivo da TOC, foi realizada a pré-administração de JZL184, um

inibidor da enzima MAGL, responsável pela degradação do 2-AG, aumentando assim a disponibilidade desse endocanabinoide. O Gráfico 6A demonstra que a pré-administração do JZL184 na concentração de 2 μg foi capaz de potencializar significativamente a antinocicepção da TOC 30, 60 e 90 minutos após o tratamento ($p < 0,01$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente; $F_{5,28} = 3,267$), além de prolongar o efeito antinociceptivo até 180 minutos após o tratamento ($p < 0,01$; $F_{5,28} = 3,267$), a exemplo do que houve com a pré-administração de VDM11. Além disso, a concentração de 1 μg também foi atenuou a DPO 120 minutos após o tratamento com a TOC ($p < 0,05$; $F_{5,28} = 3,267$), o que não ocorreu com o grupo tratado com TOC e que recebeu veículo (DPO+VEC+TOC 100p). O Gráfico 6B representa a ASC do limiar nociceptivo correspondente ao período em que houve efeito antinociceptivo da TOC e do JZL184 (30, 60, 90, 120 e 180 minutos após o tratamento).

Gráfico 6 — Avaliação da influência do aumento da disponibilidade espinal de 2-AG no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e gráfico de área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito do JZL184 e a antinociceção da TOC (B).

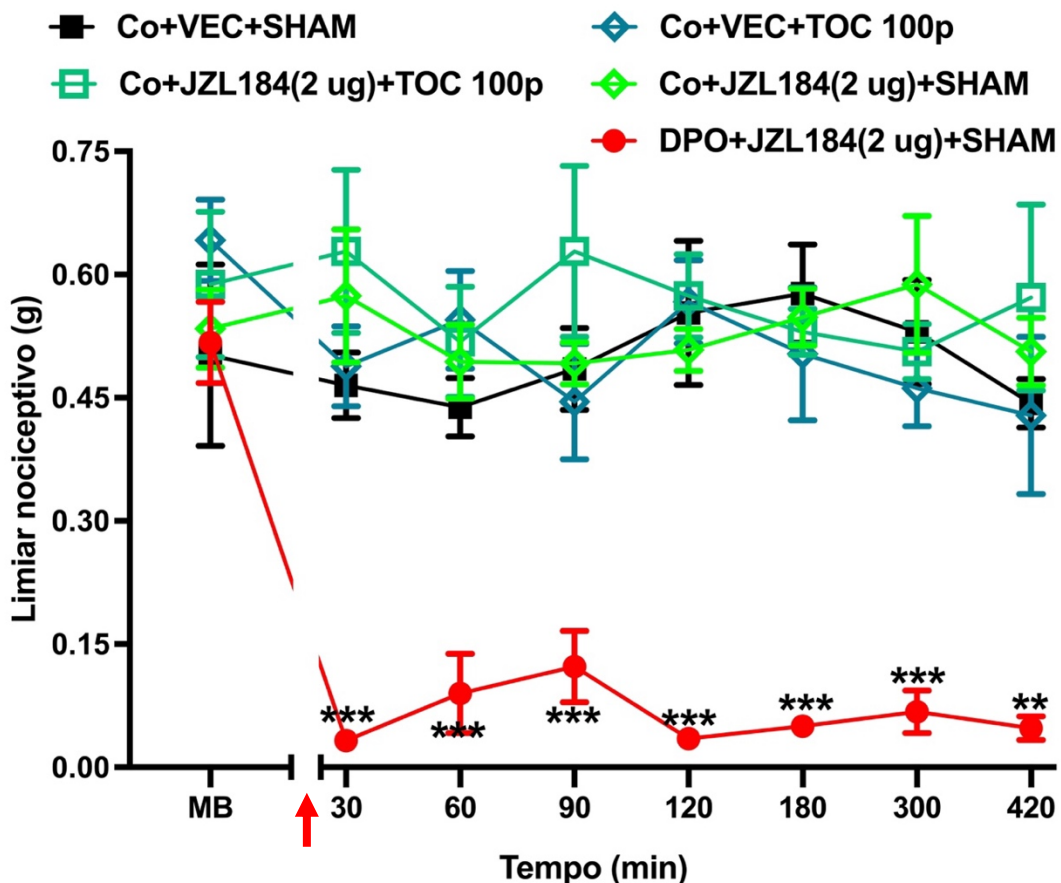


Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. *, *** indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co #, ##, ### indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo DPO; \$, \$\$, \$\$\$ indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo DPO+VEC+TOC 100p. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. ASC: área sob a curva. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de JZL184 seguida pelo tratamento com a TOC.

Assim como feito para as outras substâncias, foi realizado um experimento controle com a administração de JZL184 em grupos sem dor e com DPO, na ausência de tratamento. Não houve diferença estatística entre os grupos sem dor após receber a administração do tratamento SHAM, da TOC e a maior concentração de JZL184 (2 µg), que não foi suficiente para atenuar a DPO na ausência da TOC ($p > 0,05$; $F_{4,21} = 1,959$), sustentando a noção de que pode haver um sinergismo entre o SEC e o efeito antinociceptivo da TOC (Gráfico 7).

Gráfico 7 — Efeito da injeção i.t. de JZL184 ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais Co ou com DPO induzida pela IRPM, no 16º dia pós-operatório



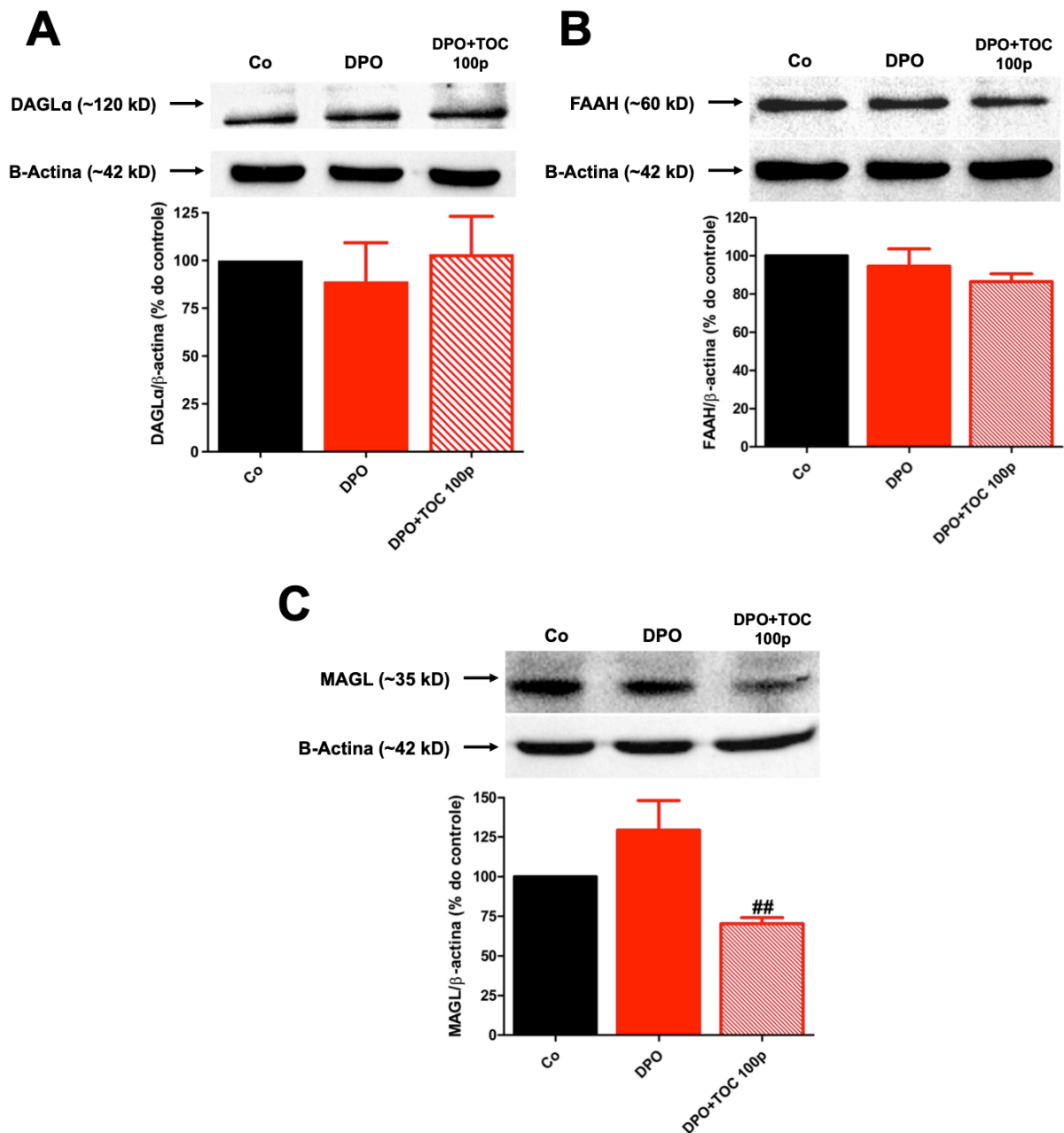
Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. **, *** indicam significância estatística ($p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co+VEC+SHAM. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de JZL184 seguida pelo tratamento com a TOC.

5.3.3 Avaliação da influência da TOC na expressão espinal de DAGL α , FAAH e MAGL

Considerando o aumento nos níveis espinais de 2-AG após o tratamento com a TOC, foi avaliada a expressão de proteínas referente à enzima DAGL α , com o intuito de elucidar uma possível origem desse aumento. Além disso, as enzimas FAAH e MAGL são importantes, pois elas são responsáveis por hidrolisar os ECs e controlar os seus níveis, encerrando a participação deles na modulação sináptica. Portanto, a expressão dessas enzimas também foi avaliada. Com relação à expressão de DAGL α , não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$; $F_{2,15} = 6,938$), sugerindo que a elevação nos níveis espinais de 2-AG induzida pela TOC pode não envolver essa via de síntese (Gráfico 8A). Ademais, a quantificação dos níveis de proteína referentes à FAAH mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$; $F_{2,15} = 1,430$) na expressão de FAAH entre os grupos avaliados (Gráfico 8B). Em contrapartida, a quantificação de MAGL revelou que os animais com DPO tratados com a TOC (DPO+TOC 100p) apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$; $F_{2,15} = 6,082$) da expressão de MAGL na medula espinal comparados aos animais não tratados (DPO) (Gráfico 8C). Esse resultado condiz com os níveis aumentados de 2-AG em decorrência do tratamento com a TOC em animais com DPO (Gráfico 3B), sugerindo que o aumento desse EC pode ter sido ocasionado não pela redução na sua metabolização pela MAGL, a qual parece ter sofrido influência do tratamento com a TOC.

Gráfico 8 — Expressão de DAGL α (A), FAAH (B) e MAGL (C) nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 16º dia após a cirurgia de IRPM para indução da DPO, 1 hora após o segundo tratamento com a TOC.



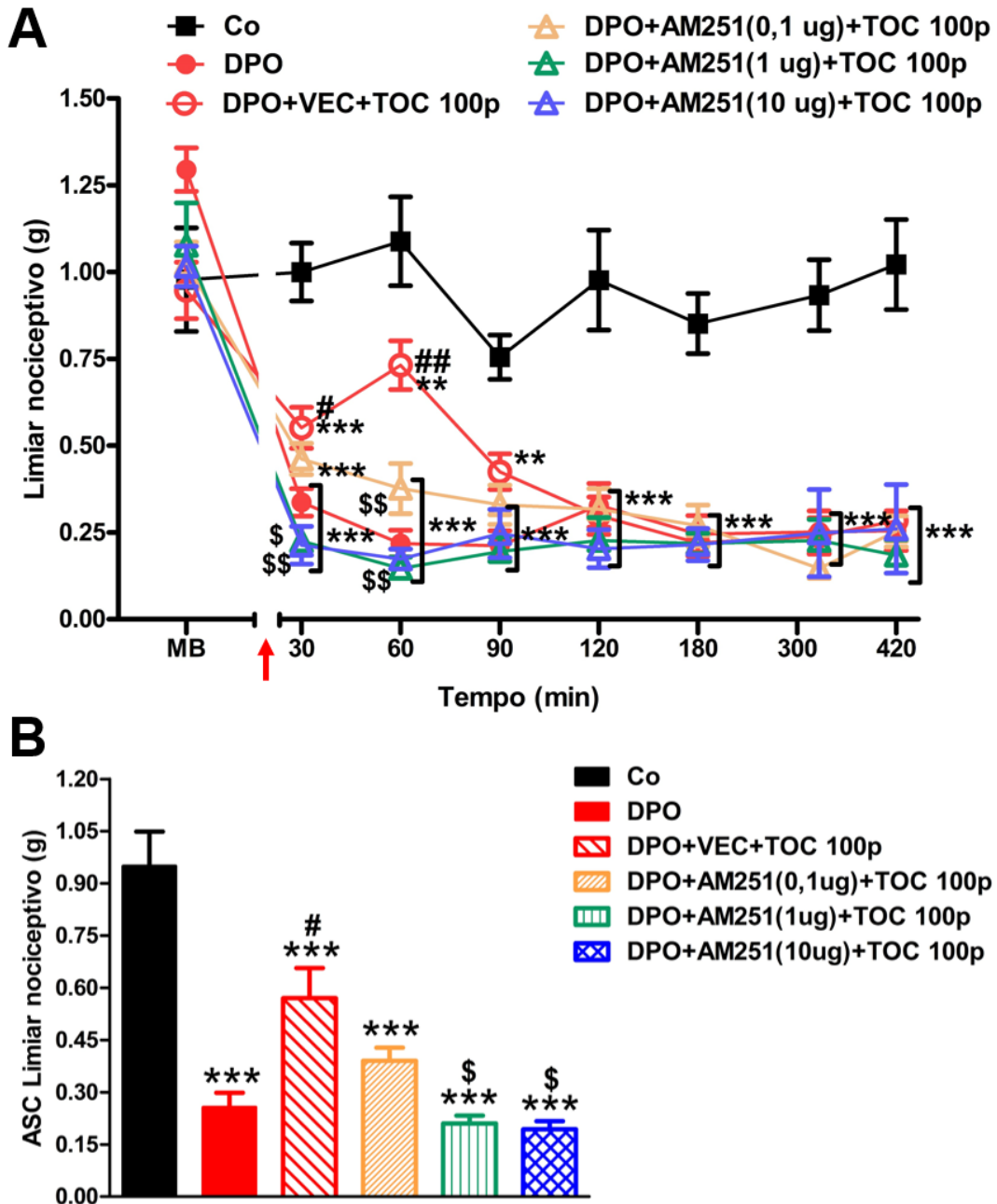
Fonte: Autor.

Legenda: A imagem representativa mostra as bandas de cada grupo referente ao peso molecular da DAGL α , FAAH, MAGL e da β -actina. Os dados foram expressos como a média \pm E.P.M. da expressão relativa de DAGL α , FAAH e MAGL pela β -actina como porcentagem da expressão do grupo controle, contendo 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. ## indica significância estatística ($p < 0,01$) em relação ao grupo DPO. Co: controle. DPO: dor pós-operatória; TOC: terapia por ondas de choque. DAGL α : diacilglicerol lipase α . FAAH: hidrolase de amidas de ácidos graxos. MAGL: monoacilglicerol lipase.

5.3.4 Avaliação da participação dos receptores CB₁ e CB₂ espinais na antinocicepção induzida pela TOC

Analisando o fato de que a TOC induziu aumento nos níveis espinais de 2-AG, sugerindo a participação desse mecanismo na antinocicepção da TOC, investigou-se também a participação dos receptores canabinoides na medula espinal nesse efeito antinociceptivo. A participação dos receptores CB₁ espinais na antinocicepção induzida pela TOC foi avaliada por meio da pré-administração i.t. do antagonista AM251. Sendo assim, o Gráfico 9A revela que a pré-administração do veículo do AM251 não impede o efeito antinociceptivo de 100 pulsos da TOC (DPO+VEC+TOC100p), que atenuou a DPO até 60 minutos após a sua aplicação (30 minutos: $p < 0,05$; $F_{5,30} = 5,031$; 60 minutos: $p < 0,01$; $F_{5,30} = 5,031$). No entanto, a pré-administração i.t. do AM251 nas doses de 1 e 10 μg impediu o efeito antinociceptivo da TOC 30 ($p < 0,05$, $p < 0,01$; $F_{5,30} = 5,031$ respectivamente) e 60 minutos ($p < 0,01$, $p < 0,001$; $F_{5,30} = 5,031$ respectivamente) após a aplicação da TOC, sugerindo a participação a nível espinal do receptor CB₁ na antinocicepção induzida pela TOC. O Gráfico 9B mostra a ASC do limiar nociceptivo correspondente ao período em que houve efeito antinociceptivo da TOC (30 e 60 minutos após o tratamento).

Gráfico 9 — Avaliação da participação dos receptores CB1 espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito do AM251 e a antinocicepção da TOC (B).

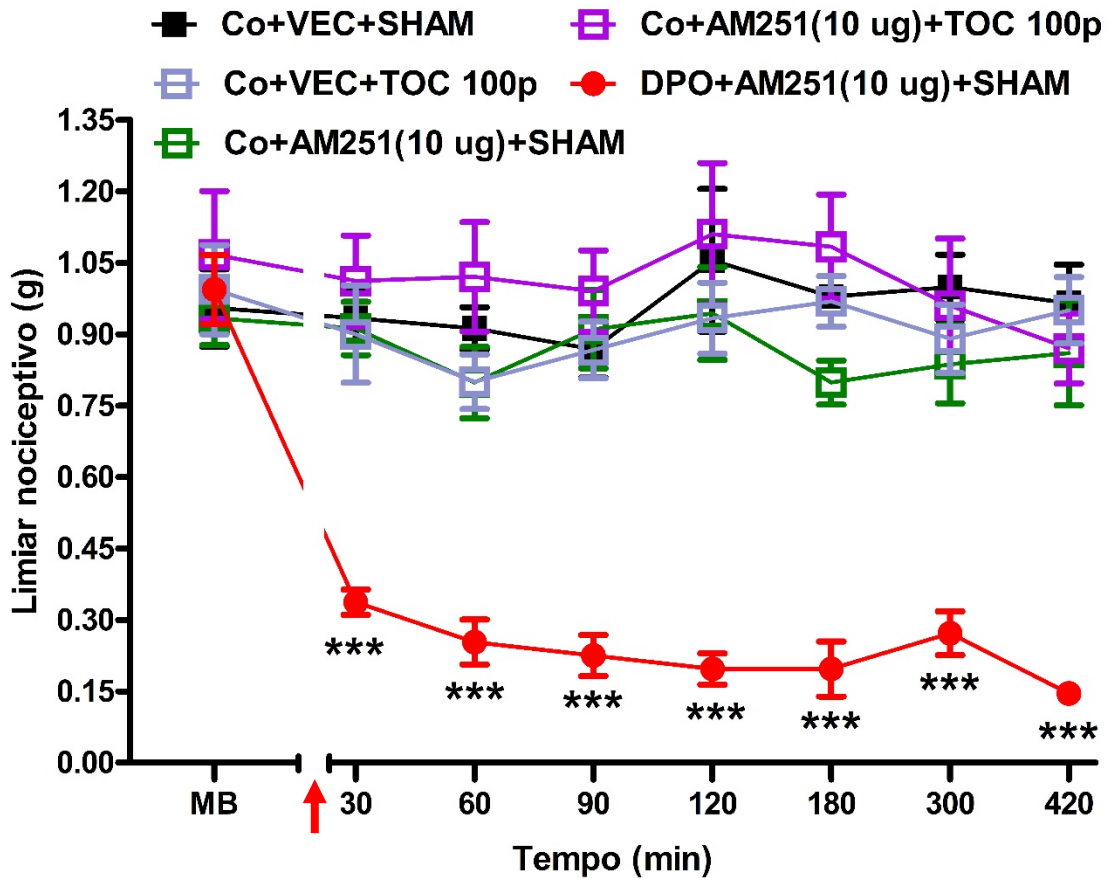


Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. **, *** indicam significância estatística ($p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co; #, ## indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$) em relação ao grupo DPO; \$, \$\$ indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$) em relação ao grupo DPO+VEC+ TOC 100p. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. ASC: área sob a curva. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de AM251 seguida pelo tratamento com a TOC.

Adicionalmente, a administração i.t. da maior dose do AM251 (10 µg) ou de seu veículo, a aplicação de TOC, ou a aplicação do tratamento SHAM nos animais Co não provocaram alterações do limiar nociceptivo, de forma que não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais que receberam veículo e tratamento SHAM (Co+VEC+SHAM), os animais que receberam veículo e 100 pulsos de TOC (Co+VEC+TOC100p) e os animais que receberam 10 µg de AM251 e tratamento SHAM (Co+AM251(10 µg)+TOC 100p) ($p > 0,05$, $F_{4,25} = 2,628$). A injeção i.t. de AM251 (10 µg) ou o tratamento SHAM não foram capazes de atenuar a DPO induzida pela IRPM (DPO+AM251 (10 µg)+SHAM) (Gráfico 10).

Gráfico 10 — Efeito da injeção i.t. de AM251 ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais controle ou com DPO induzida pela IRPM, no 16º dia pós-operatório.



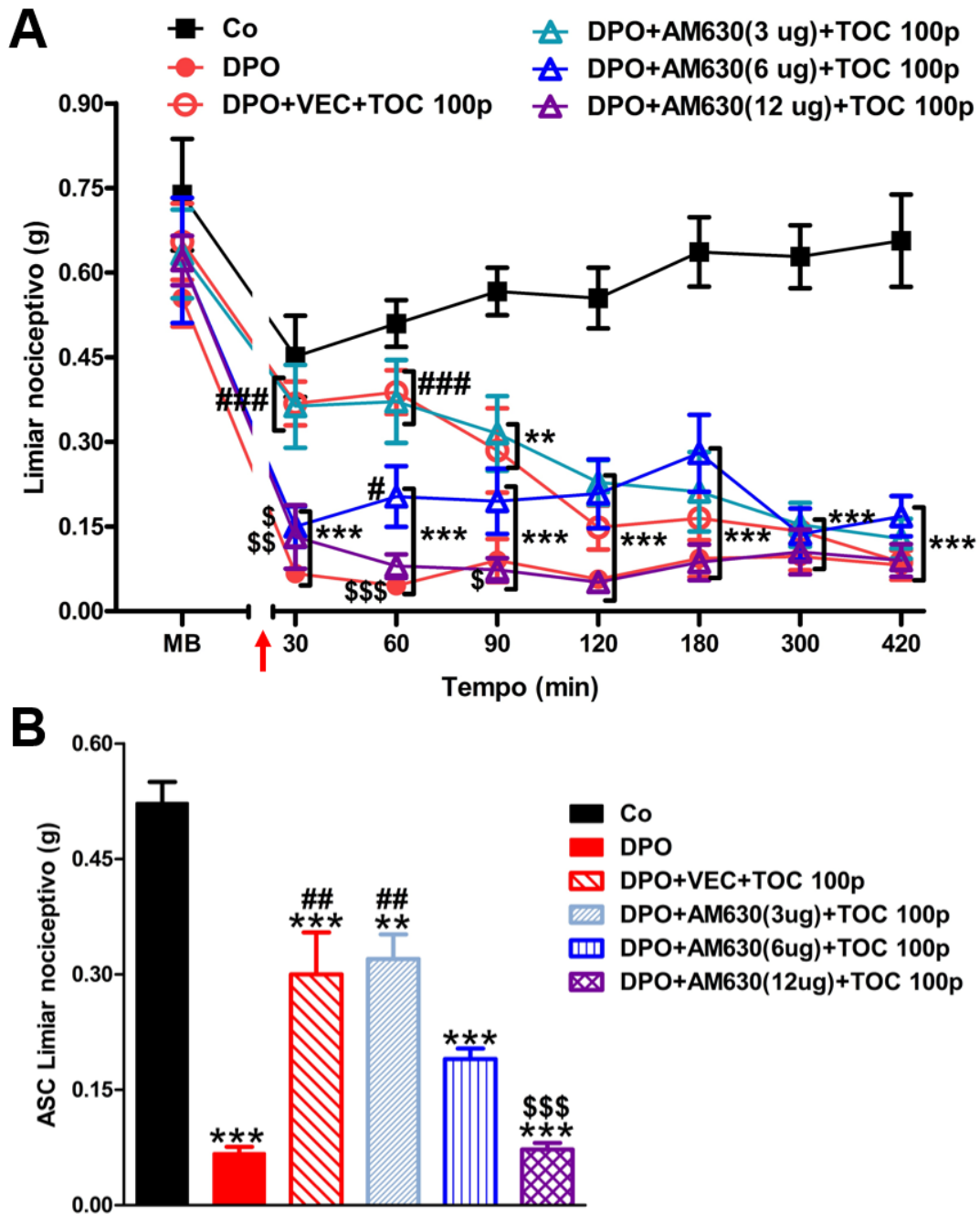
Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. **, *** indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$) em relação ao grupo Co+VEC+SHAM. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de AM251 seguida pelo tratamento com a TOC.

De forma similar, foi investigado se os receptores CB₂ na medula espinal estavam envolvidos na antinocicepção induzida pela TOC por meio da pré-administração i.t. do antagonista AM630. Os resultados apresentados no Gráfico 11A mostram que a pré-administração do veículo não impedem o efeito antinociceptivo do tratamento com 100 pulsos da TOC, uma vez que foi observada uma atenuação da DPO induzida pela IRPM 30 ($p < 0,001$; $F_{5,30} = 2,832$), 60 ($p < 0,001$; $F_{5,30} = 2,832$) e 90 ($p < 0,05$; $F_{5,30} = 2,832$) minutos após a aplicação de TOC. Entretanto, a pré-administração i.t. de AM630 afetou de forma dose-dependente o efeito antinociceptivo da TOC. Na dose mais elevada (12 μ g) reverteu completamente a antinocicepção induzida pela TOC 30 ($p < 0,01$; $F_{5,30} = 2,832$), 60 ($p < 0,001$; $F_{5,30} = 2,832$) e 90 ($p <$

0,05; $F_{5,30} = 2,832$) minutos após o tratamento, enquanto a dose intermediária (6 μg) reduziu a antinociceção induzida pela TOC apenas aos 30 minutos ($p < 0,05$; $F_{5,30} = 2,832$). A menor dose (3 μg) não impediu a antinociceção da TOC. O Gráfico 11B representa a ASC do limiar nociceptivo correspondente ao período em que houve efeito antinociceptivo da TOC (30, 60 e 90 minutos após o tratamento). Esses achados sugerem a participação do CB_2 espinal no efeito antinociceptivo da TOC.

Gráfico 11 — Avaliação da participação dos receptores CB2 espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito do AM630 e a antinocicepção da TOC (B).

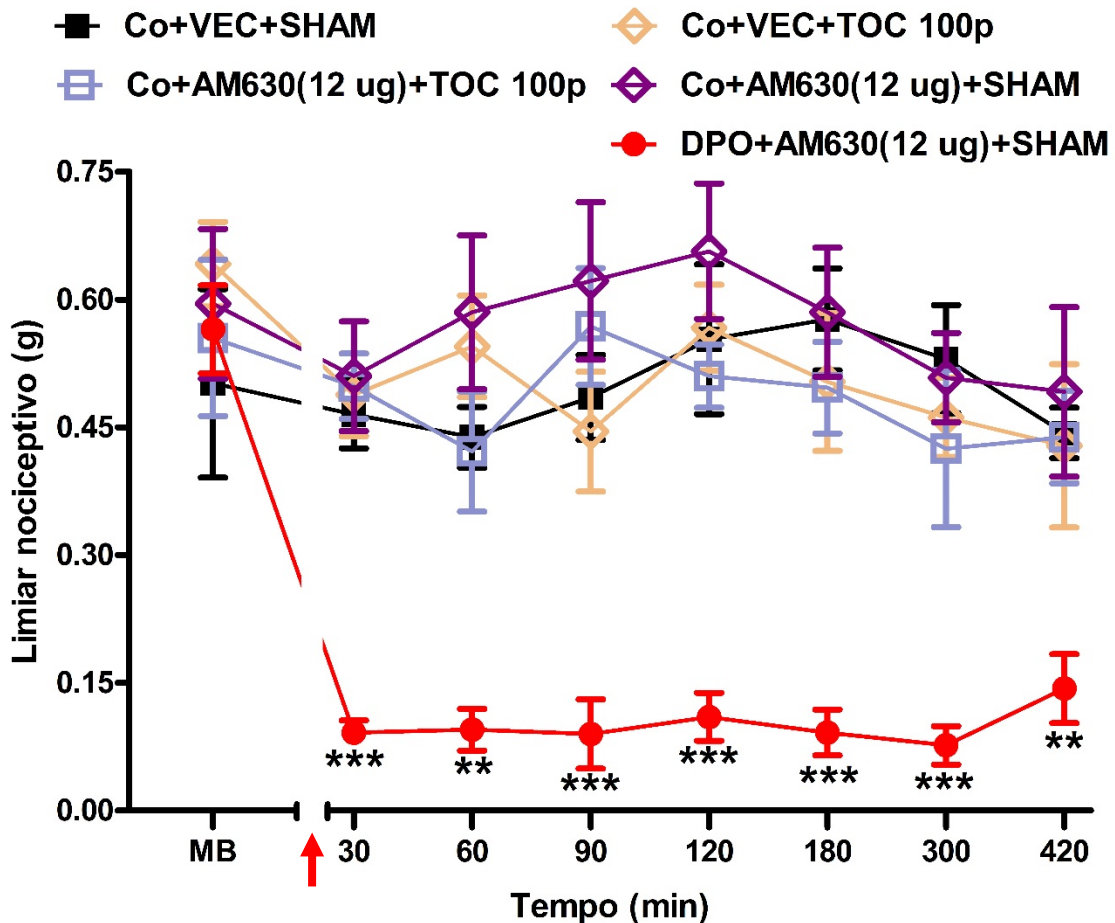


Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. **, *** indicam significância estatística ($p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co; #, ##, ### indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo DPO; \$, \$\$, \$\$\$ indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo DPO+VEC+TOC 100p. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. ASC: área sob a curva. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de AM630 seguida pelo tratamento com a TOC.

A exemplo dos experimentos envolvendo o AM251, a administração i.t. de AM630 não alterou significativamente o limiar nociceptivo dos animais Co, assim como não influenciou a DPO induzida pela IRPM (Gráfico 12).

Gráfico 12 — Efeito da injeção i.t. de AM630 ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais Co ou com DPO induzida pela IRPM, no 16º dia pós-operatório.



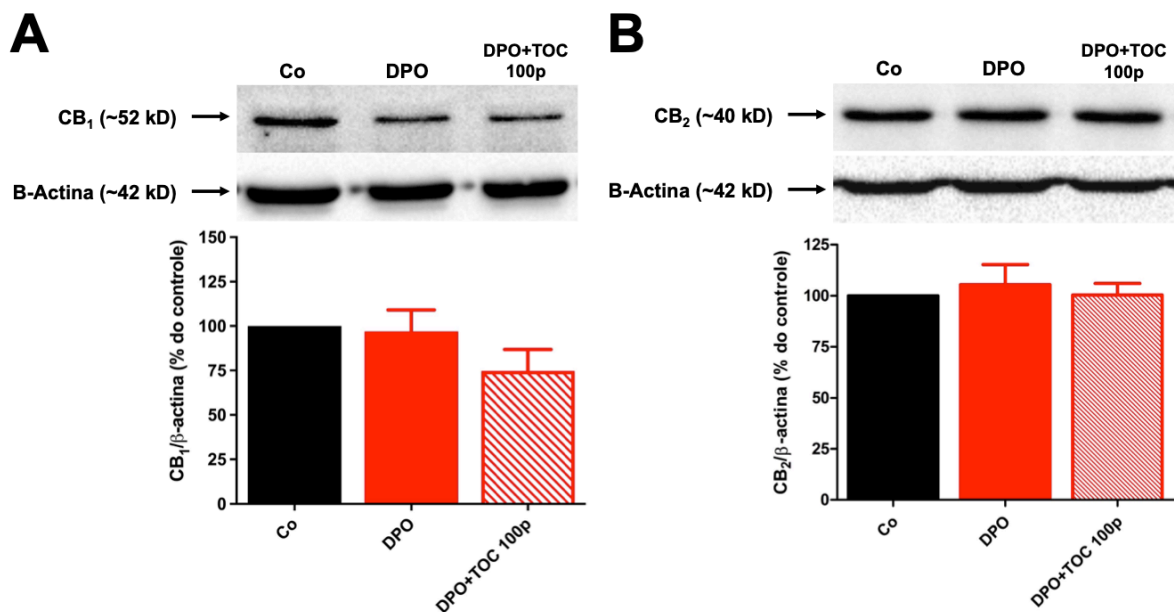
Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. **, *** indicam significância estatística ($p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co+VEC+SHAM. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de AM630 seguida pelo tratamento com a TOC.

5.3.5 Avaliação da influência da TOC na expressão espinal dos receptores CB₁ e CB₂

Farmacologicamente, a participação dos receptores canabinoides na antinocicepção induzida pela TOC foi avaliada previamente, sugerindo a participação desses receptores no efeito acima descrito. Porém, foi investigado também se a TOC poderia influenciar a expressão dos receptores CB₁ e CB₂ na medula espinal. Os Gráficos 13A e 13B mostram que a expressão tanto de CB₁ ($p > 0,05$; $F_{2,15} = 1,960$) como de CB₂ ($p > 0,05$; $F_{2,15} = 0,2109$), respectivamente, não apresentou diferença significativa entre os grupos, permitindo sugerir que o efeito antinociceptivo da TOC pode não ter ocorrido devido a alterações na expressão dos receptores canabinoides.

Gráfico 13 — Expressão dos receptores canabinoides CB₁ (A) e CB₂ (B) nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 16º dia após a cirurgia de IRPM para indução da DPO, 1 hora após o segundo tratamento com a TOC



Fonte: Autor.

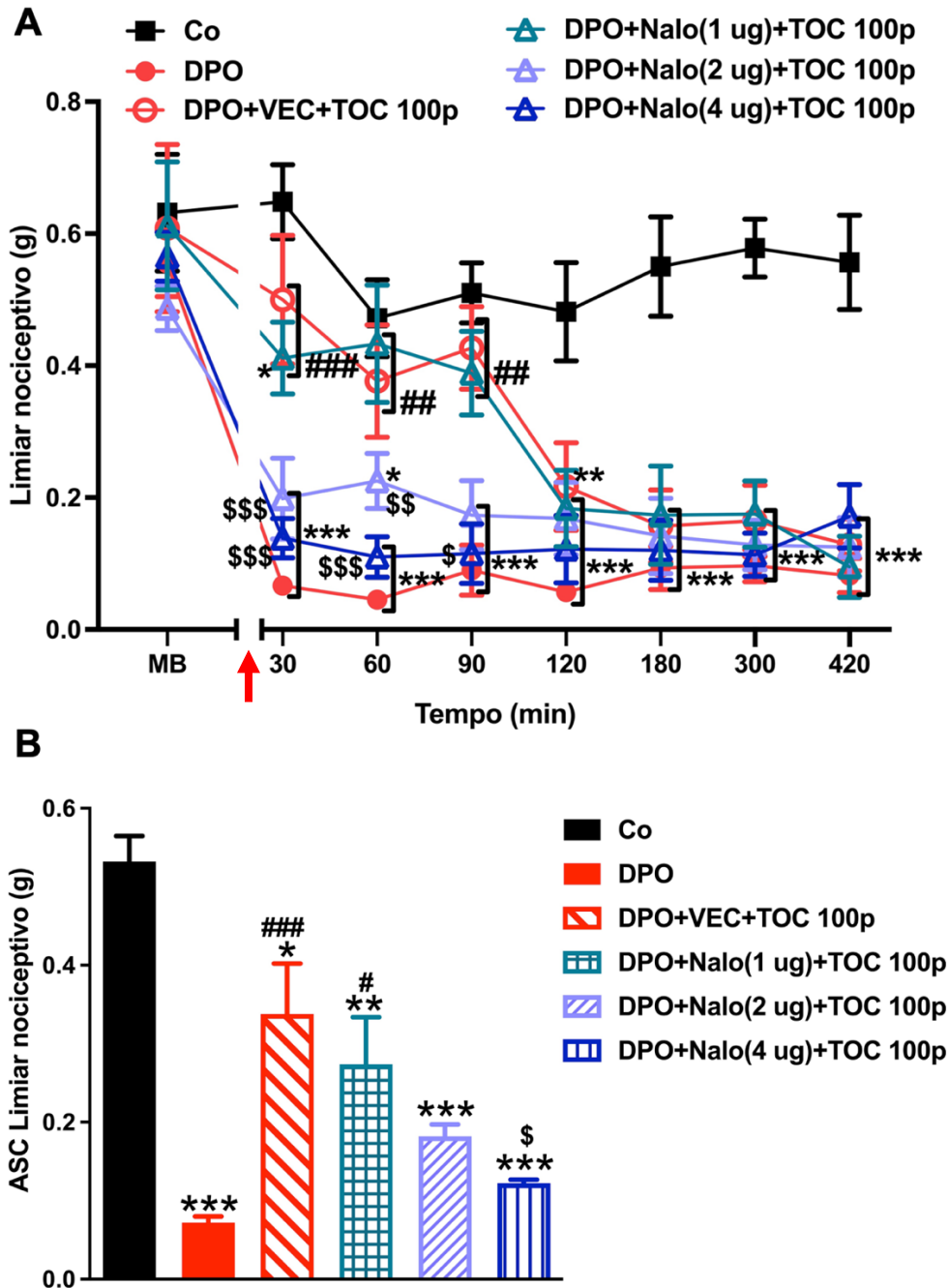
Legenda: A imagem representativa mostra as bandas de cada grupo referente ao peso molecular de CB₁, CB₂ e da β-actina. Os dados foram expressos como a média ± E.P.M. da expressão relativa de CB₁ e CB₂ pela β-actina como porcentagem da expressão do grupo controle, contendo 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. Co: controle. DPO: dor pós-operatória; TOC: terapia por ondas de choque.

5.4 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SOP A NÍVEL ESPINAL NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA TOC

5.4.1 Avaliação da participação dos receptores opioides espinais na antinocicepção induzida pela TOC

Levando em conta a importância do SOP na antinocicepção endógena e de outras terapias não farmacológicas, foi investigado se esse sistema poderia também estar envolvido com a antinocicepção induzida pela TOC. Para isso, inicialmente foi avaliada a participação dos receptores opioides de forma não seletiva, a nível espinal, no efeito antinociceptivo da TOC por meio da administração da Naloxona, um antagonista opioide não-seletivo. O Gráfico 14A mostra que a pré-administração de Naloxona, de forma dose-dependente, reduziu o efeito antinociceptivo da TOC, em especial a maior concentração, que impediu completamente o efeito do tratamento 30, 60 e 90 minutos após sua aplicação ($p < 0,001$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente; $F_{5,30} = 3,746$). A concentração intermediária da Naloxona (2 μg) impediu a antinocicepção da TOC 30 ($p < 0,001$; $F_{5,30} = 3,746$) e 60 minutos ($p < 0,01$; $F_{5,30} = 3,746$) apenas, enquanto a menor concentração (1 μg) não afetou o efeito antinociceptivo dessa terapia. Similarmente, o Gráfico 14B representa a ASC do limiar nociceptivo correspondente ao período em que houve efeito antinociceptivo da TOC e da Naloxona (30, 60 e 90 minutos após o tratamento). Esses achados sugerem que os receptores opioides na medula espinal podem coletivamente ter algum envolvimento no efeito antinociceptivo da TOC.

Gráfico 14 — Avaliação não seletiva da participação dos receptores opioides espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito da Naloxona e a antinociceção da TOC (B).

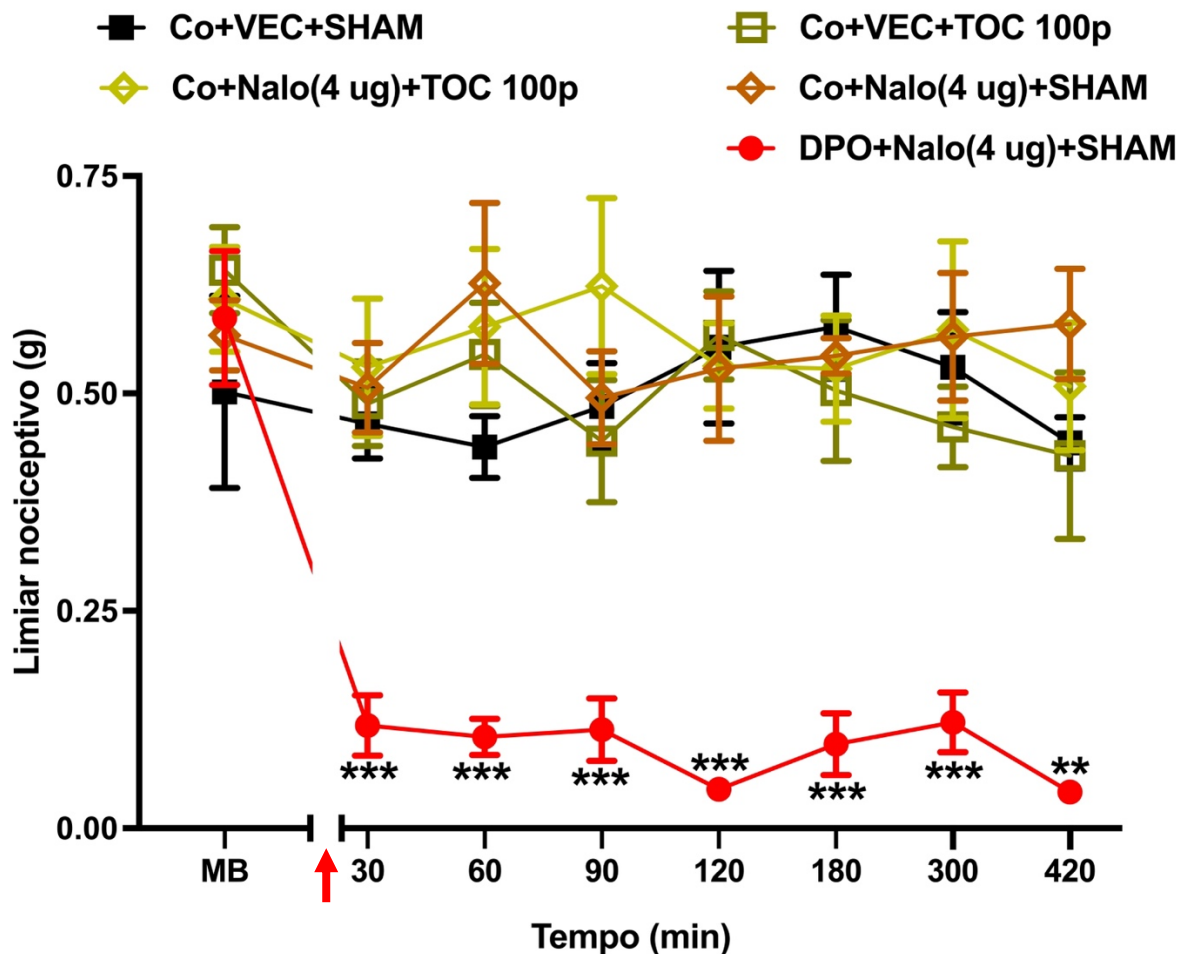


Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. **, *** indicam significância estatística ($p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co; #, ##, ### indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo DPO; \$, \$\$, \$\$\$ indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo DPO+VEC+TOC 100p. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. ASC: área sob a curva. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. Nalo: Naloxona. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de Naloxona seguida pelo tratamento com a TOC.

O experimento controle exibido no Gráfico 15 mostra que a administração i.t. de Naloxona por si só não provocou alterações do limiar nociceptivo dos animais controle, assim como não interferiu no limiar nociceptivo dos animais com DPO induzida por IRPM.

Gráfico 15 — Efeito da injeção i.t. de Naloxona ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais Co ou com DPO induzida pela IRPM, no 16º dia pós-operatório



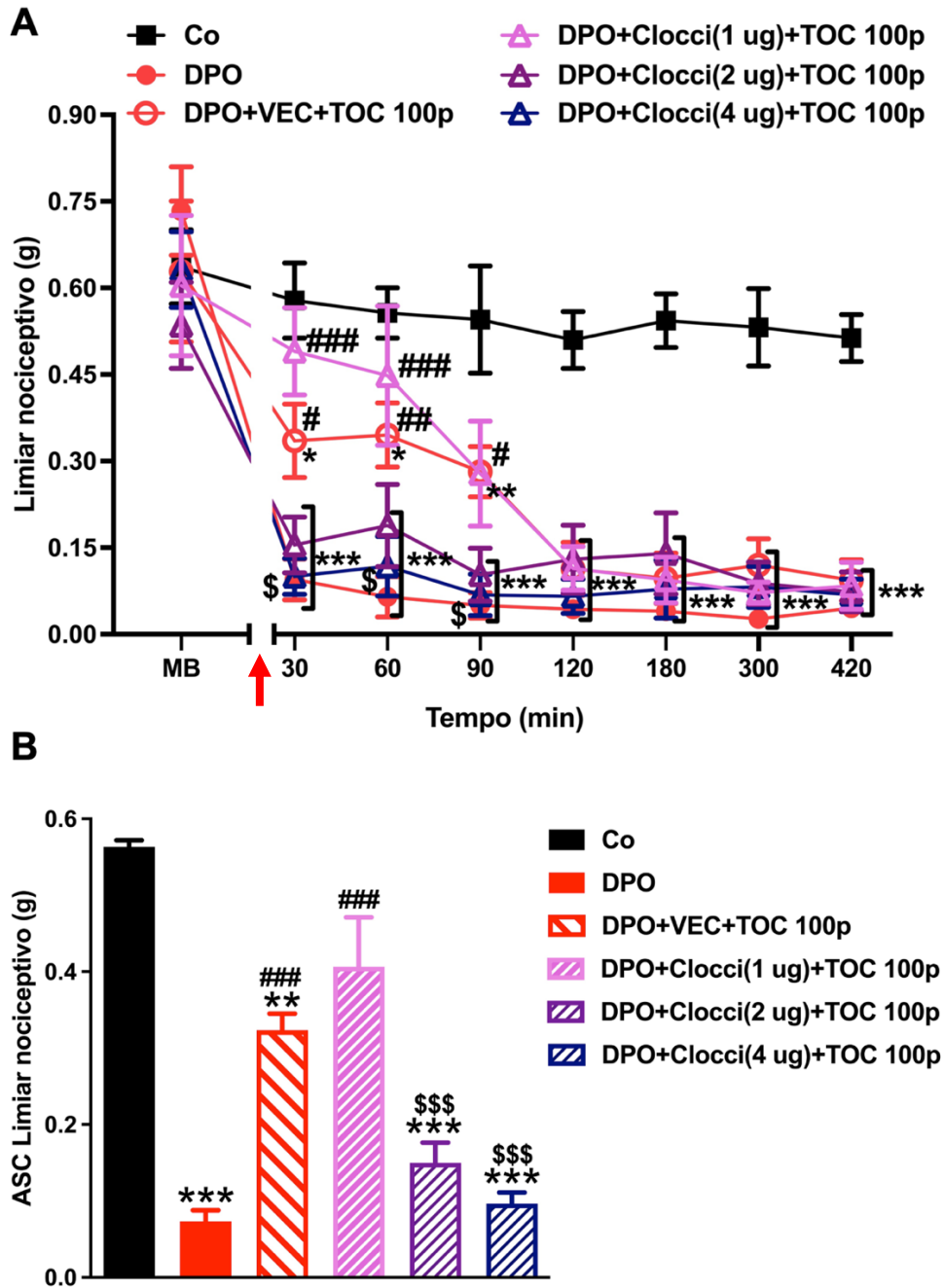
Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. **, *** indicam significância estatística ($p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co+VEC+SHAM. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. Nalo: Naloxona. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de Naloxona seguida pelo tratamento com a TOC.

Considerando que a administração i.t. Naloxona interferiu no efeito antinociceptivo da TOC, sugerindo a participação dos receptores opioides espinais nesse efeito, questionou-se a participação individual de cada receptor opioide nessa

antinociceção. Por isso, em seguida foi realizada a pré-administração de Cloccinamox, um antagonista seletivo irreversível dos receptores opioides μ . O Gráfico 16A revela que a pré-administração i.t. de Cloccinamox também uma reversão dose-dependente da antinociceção induzida pela TOC, de forma que a maior concentração utilizada (4 μg) foi suficiente para impedir o efeito antinociceptivo nos minutos 30, 60 e 90 ($p < 0,05$; $F_{5,28} = 4,148$). A concentração intermediária (2 μg) demonstrou uma redução, porém não significativa ($p > 0,05$; $F_{5,28} = 4,148$) no mesmo período de tempo, enquanto a menor concentração (1 μg) não afetou o efeito antinociceptivo da TOC. O Gráfico 16B representa a ASC do limiar nociceptivo correspondente ao período em que houve efeito antinociceptivo da TOC e do Cloccinamox (30, 60 e 90 minutos após o tratamento). Esses resultados indicam que os receptores opioides μ na medula espinal podem estar relacionados com a antinociceção promovida por essa terapia.

Gráfico 16 — Avaliação da participação dos receptores opioides μ espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito do Cloccinamox e a antinocicepção da TOC (B).

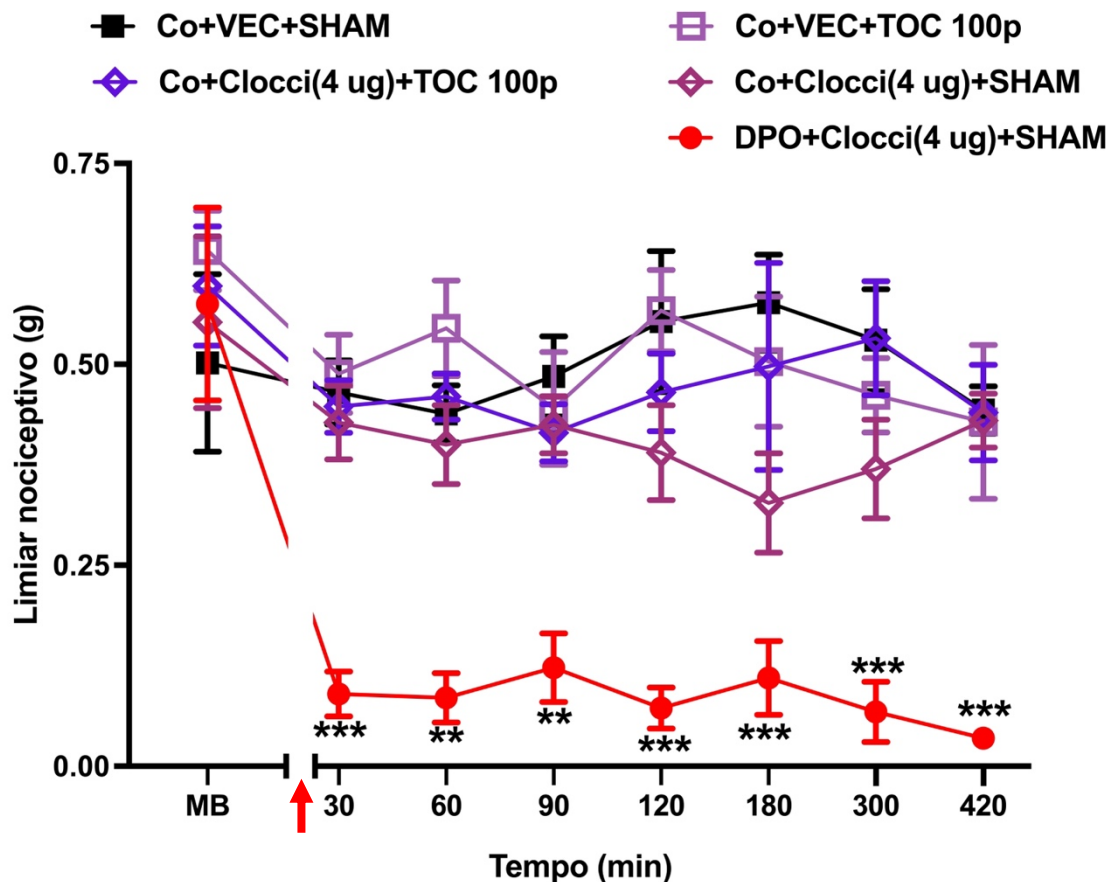


Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. *, **, *** indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co; #, ##, ### indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo DPO; \$, \$\$\$ indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,001$) em relação ao grupo DPO+VEC+TOC 100p. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. ASC: área sob a curva. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. Clocci: Cloccinamox. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de Cloccinamox seguida pelo tratamento com a TOC.

Em mais um experimento controle, foi demonstrado que a administração i.t. de Cloccinamox em animais sem dor não alterou o limiar nociceptivo desses animais, e também não provocou variações do limiar nociceptivo nos animais com DPO (Gráfico 17).

Gráfico 17 — Efeito da injeção i.t. de Cloccinamox ou veículo, e do tratamento com 100 pulsos de TOC ou tratamento SHAM no limiar nociceptivo de animais Co ou com DPO induzida pela IRPM, no 16º dia pós-operatório



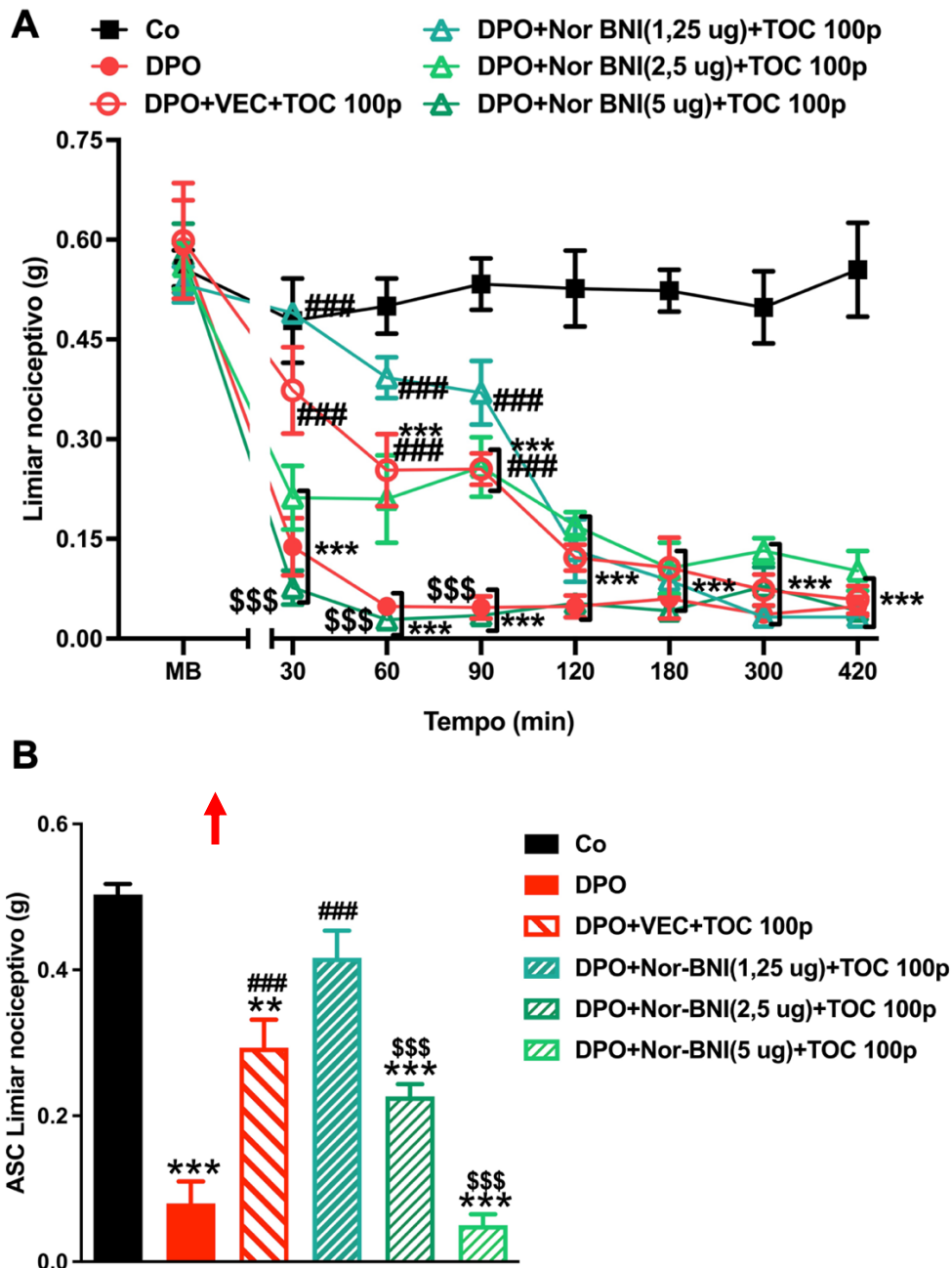
Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. **, *** indicam significância estatística ($p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co+VEC+SHAM. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. Clocci: Cloccinamox. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de Naloxona seguida pelo tratamento com a TOC.

Após a investigação da participação dos receptores μ , investigou-se também se os receptores κ na medula espinal poderiam estar envolvidos na antinocicepção induzida pela TOC. Para isso, foi efetuada a administração do antagonista seletivo de

receptores opioides κ , a Nor-binaltorfimina (Nor-BNI). Similarmente, de acordo com o Gráfico 18A, foi observado um efeito dose-dependente na redução do efeito antinociceptivo da TOC, de forma que a maior concentração de Nor-BNI pré-administrada por via i.t. (5 μg) reverteu completamente a antinocicepção da TOC 30, 60 e 90 ($p < 0,001$; $F_{5,27} = 6,951$) minutos após a sua aplicação. As demais concentrações (2,5 e 1,25 μg) entretanto não demonstraram diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo tratado que recebeu veículo (DPO+VEC+TOC 100p) no mesmo período de tempo ($p > 0,05$; $F_{5,27} = 6,951$). O Gráfico 18B representa a ASC do limiar nociceptivo correspondente ao período em que houve efeito antinociceptivo da TOC e da Nor-BNI (30, 60 e 90 minutos após o tratamento). Esse resultado sugere que, a exemplo da participação dos receptores μ , os receptores κ também podem estar associados com a antinocicepção induzida pela TOC.

Gráfico 18 — Avaliação da participação dos receptores opioides κ espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito da Nor-binaltorfimina e a antinocicepção da TOC (B).

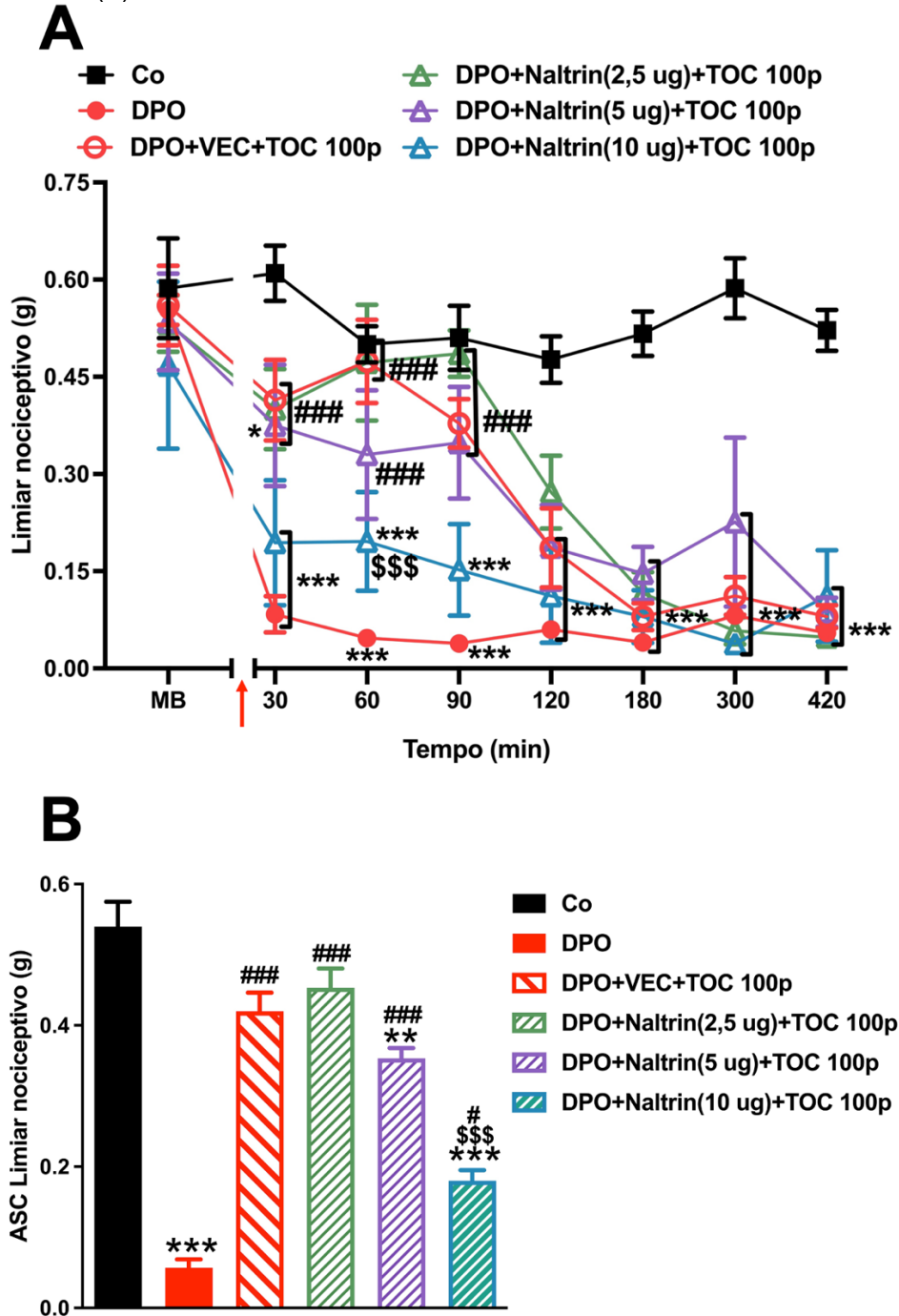


Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. **, *** indicam significância estatística ($p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co; ### indicam significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo DPO; \$\$\$ indicam significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo DPO+VEC+TOC 100p. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. ASC: área sob a curva. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. Nor-BNI: Nor-binaltorfimina. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de Nor-binaltorfimina seguida pelo tratamento com a TOC.

Assim como os demais receptores opioides, a participação espinal dos receptores δ na antinocicepção induzida pela TOC também foi avaliada. O Gráfico 19^a mostra que a pré-administração de Naltrindole, um antagonista seletivo dos receptores opioides δ , foi capaz de diminuir o efeito antinociceptivo da TOC com a administração da maior dose (DPO+Naltrin (10 μ g)+TOC 100p) 60 minutos após o tratamento, em comparação com o grupo que recebeu veículo (DPO+VEC+TOC 100p) ($p < 0,001$; $F_{5,27} = 3,859$). As outras doses (2,5 e 5 μ g) não reduziram significativamente a antinocicepção induzida pela TOC ($p > 0,05$; $F_{5,27} = 3,859$). O Gráfico 19B, por sua vez, representa a ASC do limiar nociceptivo correspondente ao período em que houve efeito antinociceptivo da TOC e efeito do Naltrindole (30, 60 e 90 minutos após o tratamento). Com base nesses achados, é possível que os receptores opioides δ na medula espinal estejam associados com a antinocicepção induzida pela TOC, embora essa relação precise ser explorada melhor.

Gráfico 19 — Avaliação da participação dos receptores opioides μ espinais no efeito antinociceptivo da TOC sobre DPO induzida pela cirurgia de IRPM, no 16º dia pós-operatório (A) e área sob a curva do limiar nociceptivo durante o efeito do Naltrindole e a antinociceção da TOC (B).



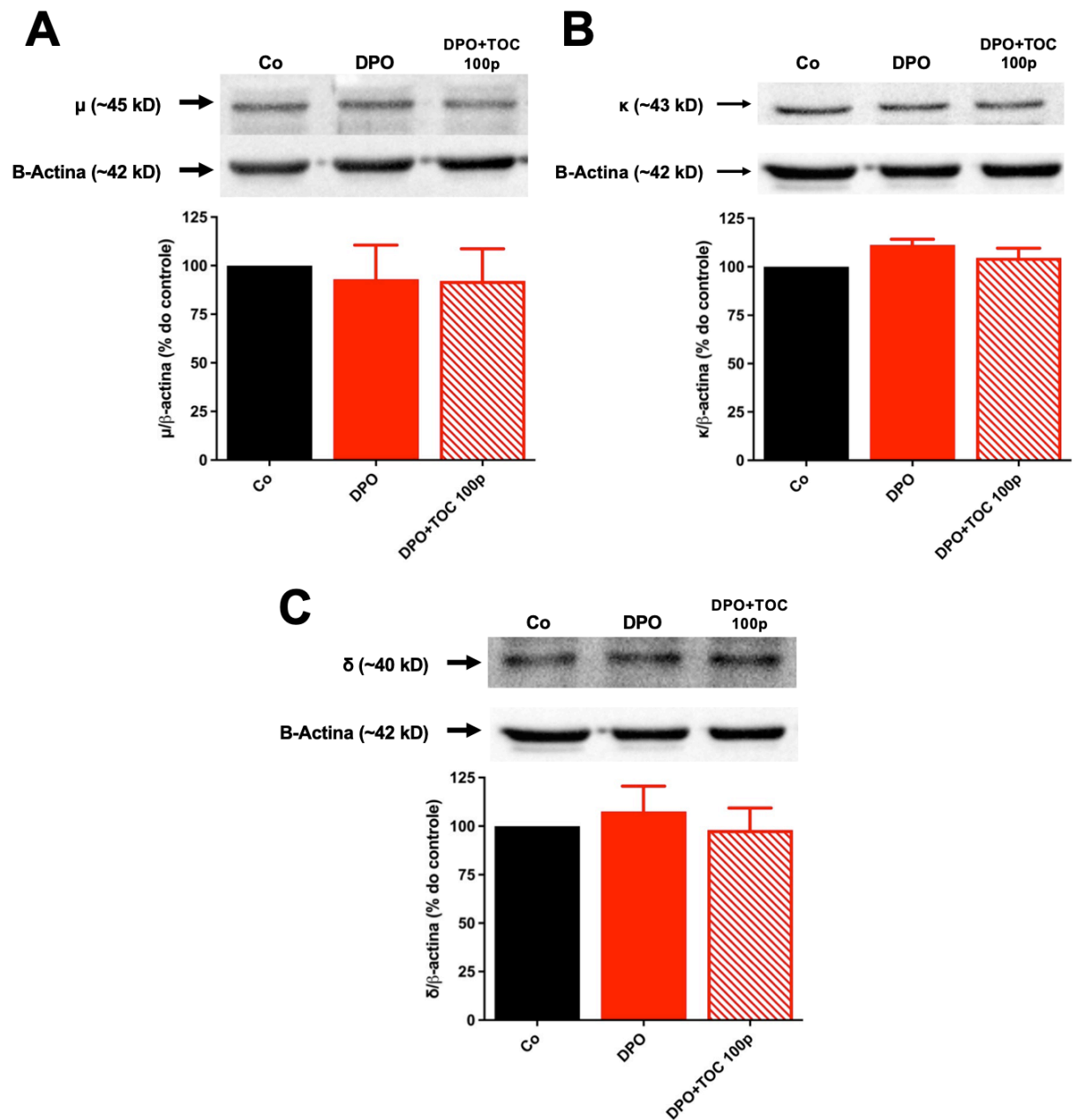
Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) de 5-6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste Bonferroni. *, **, *** indicam significância estatística ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) em relação ao grupo Co; #, ### indicam significância estatística ($p < 0,51$, $p < 0,001$) em relação ao grupo DPO; \$\$\$ indicam significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo DPO+VEC+TOC 100p. MB: medida basal. DPO: dor pós-operatória. ASC: área sob a curva. VEC: veículo. TOC: terapia por ondas de choque. Naltrin: Naltrindole. A flecha vermelha indica a quebra no eixo X, representando a transição para o 16º dia, quando foi feita a administração i.t. de Naltrindole seguida pelo tratamento com a TOC.

5.4.2 Avaliação da influência da TOC na expressão espinal dos receptores opioides

Uma vez identificada farmacologicamente a participação dos receptores opioides de forma seletiva e não seletiva, investigou-se também se a TOC seria capaz de alterar a expressão dos receptores opioides nos segmentos L4 a L6 da medula espinal, e assim influenciar o funcionamento do SOP durante a DPO. Primeiramente, foi avaliada a expressão dos receptores opioides μ (Gráfico 20A), porém não houve diferença significativa entre os grupos em relação a expressão desse receptor ($p > 0,05$; $F_{2,15} = 5,580$). Similarmente, a avaliação da expressão dos receptores opioides κ nos segmentos L4 a L6 da medula espinal não revelou diferenças significativas ($p > 0,05$; $F_{2,15} = 2,857$) entre os grupos, como é possível observar no Gráfico 20B. Por fim, a avaliação da expressão dos receptores opioides δ nos mesmos segmentos lombares da medula espinal não indicou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$; $F_{2,15} = 4,506$) entre os grupos (Gráfico 20C). Esses achados sugerem que a participação do SOP no efeito antinociceptivo da TOC não está necessariamente atrelada a modificações na expressão dos receptores opioides.

Gráfico 20 — Expressão dos receptores μ (A), κ (B) e δ opioides nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 16º dia após a cirurgia de IRPM para indução da DPO, 1 hora após o segundo tratamento com a TOC.



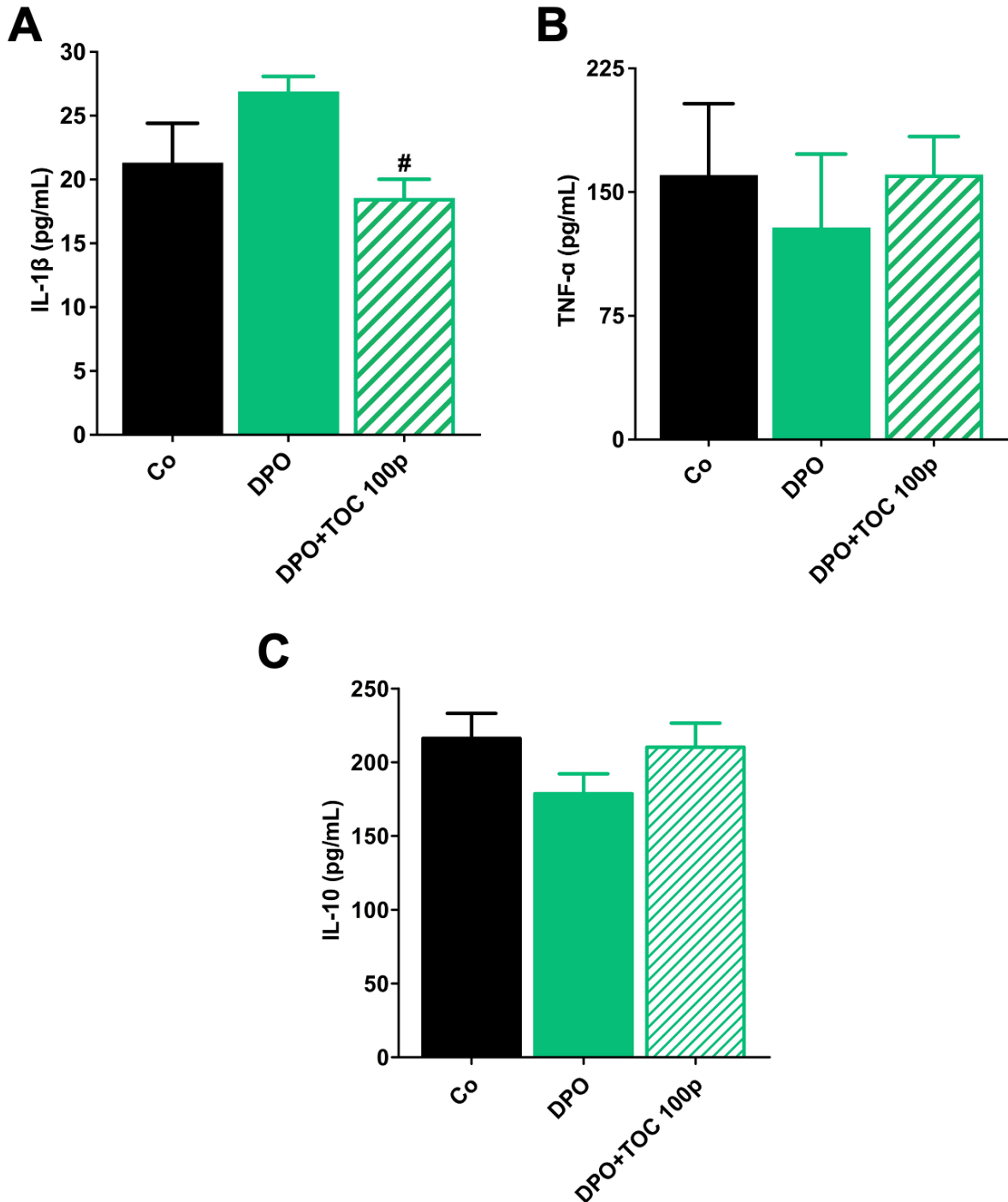
Fonte: Autor.

Legenda: A imagem representativa mostra as bandas de cada grupo referente ao peso molecular dos receptores μ , κ , δ e da β -actina. Os dados foram expressos como a média \pm E.P.M. da expressão relativa de μ , κ e δ pela β -actina como porcentagem da expressão do grupo controle, contendo 6 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Co. Co: controle. DPO: dor pós-operatória. TOC: terapia por ondas de choque.

5.5 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TOC NOS NÍVEIS ESPINAIS DE CITOCINAS

As citocinas possuem um papel essencial na modulação nociceptiva. Por esse motivo, a influência da TOC nos níveis espinais de citocinas chave, como IL-1 β , TNF- α e IL-10, foi avaliada. O Gráfico 21A mostra que, apesar de não ter havido um aumento significativo dos níveis de IL-1 β do grupo com DPO em comparação com o grupo controle, o tratamento com a TOC reduziu significativamente os níveis dessa citocina em relação o grupo não tratado ($p < 0,05$; $F_{2,12} = 4,167$). A respeito dos níveis espinais de TNF- α (Gráfico 21B), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$; $F_{2,8} = 0,2089$), assim como não houve diferença entre os grupos quanto aos níveis de IL-10 ($p > 0,05$; $F_{2,15} = 1,657$) (Gráfico 21C). Sendo assim, esses resultados podem indicar que há também uma contribuição da diminuição dos níveis espinais de IL-1 β , uma importante citocina pró-nociceptiva, para o efeito antinociceptivo da TOC.

Gráfico 21 — Avaliação dos níveis das citocinas IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) nos segmentos L4 a L6 da medula espinal no 16º dia após a cirurgia de IRPM para indução da DPO, 1 hora após o segundo tratamento com a TOC.



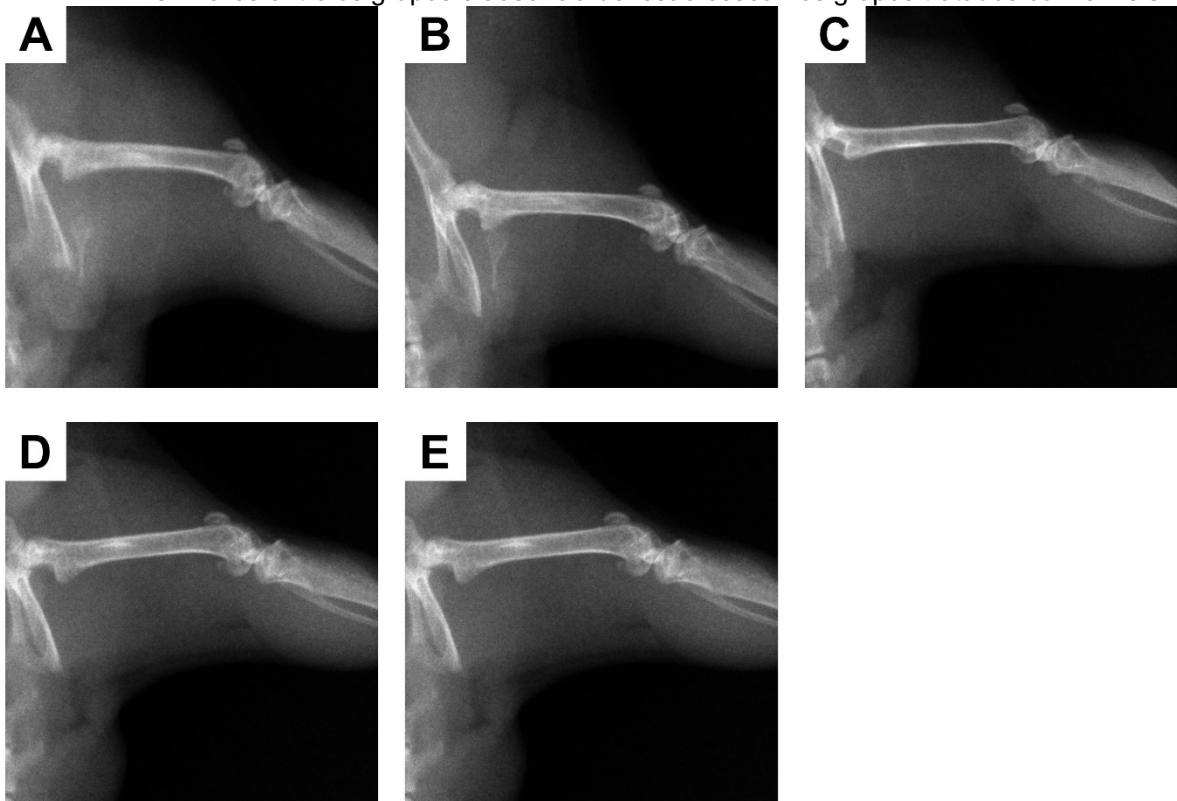
Fonte: Autor.

Legenda: Os dados representam a média \pm E.P.M. da concentração de IL-1 β , TNF- α e IL-10 em picogramas por mililitro (pg/mL) de 3-5 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni, porém não foi encontrada diferença entre os grupos. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo DPO. Co: controle. DPO: dor pós-operatória; TOC: terapia por ondas de choque.

5.6 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DA INTEGRIDADE FEMORAL APÓS O TRATAMENTO COM A TOC

Para avaliar se o tratamento com ondas de choque foi seguro ou teve a capacidade de afetar a integridade do fêmur na região tratada, os mesmos animais tratamento com as 3 doses da TOC (100, 200 e 400 pulsos) foram submetidos no 17º dia à avaliação radiográfica da coxa direita. A observação das radiografias revela que o fêmur apresenta característica normal, sem presença de fraturas, tanto nos animais dos grupos Co (Figura 11A) e com DPO (Figura 11B), como nos animais que receberam 100 (Figura 11C), 200 (Figura 11D) ou 400 (Figura 11E) pulsos da TOC. Dessa forma, apesar do impacto mecânico durante o tratamento, a TOC apresenta ser segura para aplicação nos camundongos, promovendo antinocicepção sem causar efeitos adversos, principalmente no osso. Nenhum outro efeito adverso do tratamento, como hematomas, equimose e petéquias, foram observados no decorrer do estudo.

Figura 11 — Imagens radiográficas representativas de cada grupo, demonstrando características similares entre os grupos e ausência de lesão óssea nos grupos tratados com a TOC.



Fonte: Autor.

Legenda: A) Grupo Co; B) Grupo DPO; C) Grupo DPO+TOC 100p; D) Grupo DPO+TOC 200p; E) Grupo DPO+TOC 400p.

6 DISCUSSÃO

Até o presente momento, os resultados deste estudo destacam a capacidade da TOC em atenuar a DPO induzida pela cirurgia de IRPM em camundongos, um modelo análogo a cirurgias de grande porte em humanos. Nesse contexto, os achados do presente estudo sugerem que o SEC, principalmente, possa ter um papel importante na antinocicepção induzida pela TOC, já que o tratamento com a TOC induziu um aumento espinal nos níveis de 2-AG, mas não de AEA, que pode ter ocorrido devido à redução da sua degradação, atrelada à diminuição da expressão da enzima MAGL. Além disso, a administração por via i.t. de antagonistas seletivos dos receptores canabinoides atenuou o efeito antinociceptivo da TOC, e o aumento da disponibilidade de ECs induzido farmacologicamente potencializou o efeito dessa terapia. Associado a isso, o SOP também parece participar do efeito antinociceptivo da TOC, uma vez que a administração de antagonistas seletivos e não seletivo dos receptores opioides, interferem no antinocicepção dessa terapia, embora a TOC não tenha influenciado a expressão de receptores opioides na medula espinal.

Como esperado, o presente estudo encontrou uma redução significativa do limiar nociceptivo mecânico dos animais que passaram pela cirurgia de IRPM comparados com animais controle, iniciando no 1º dia pós-operatório e perdurando até o 28º dia. Levando em consideração o bem-estar animal, não foi feita avaliação do limiar nociceptivo além desse período. Esse resultado está em concordância com o estudo de Flatters (2008), em que ratos submetidos à IRPM apresentaram hipersensibilidade tátil no von Frey até o 29º dia em comparação com os animais controle ou o limiar da pata contralateral à lesão. No estudo de Flatters, a cirurgia também foi capaz de induzir hiperalgesia térmica e hipersensibilidade ao frio, embora isso não tenha sido o foco de investigação do presente estudo. Os nossos achados também corroboram os dados de Elisei *et al.* (ELISEI *et al.*, 2020), que encontraram nocicepção no mesmo período, do 1º ao 28º dia de avaliação por von Frey, porém em camundongos da linhagem Swiss. Desta forma, o presente estudo foi o primeiro a padronizar a cirurgia de IRPM na linhagem C57BL/6, induzindo efetivamente a DPO nesses animais.

A TOC de baixa e média energia tem ganhado atenção nas últimas décadas, principalmente para o tratamento de lesões musculoesqueléticas, como epicondilite lateral, fascite plantar e até reconsolidação óssea (WANG, 2012).

Atualmente, no entanto, dados suportam a noção de que os pulsos acústicos das ondas de choque podem também promover regeneração tecidual em casos de lesão tecidual, por meio do aumento na proliferação e diferenciação celular, efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos e de supressão da nocicepção (MITTERMAYR *et al.*, 2012). Poucos estudos clínicos avaliaram a eficácia da TOC na dor e funcionalidade do paciente em um contexto pós-operatório. Em estudos parecidos, Haghghat *et al.* (2019) e Turgut, Saglam e Toy (2021), administraram 2800 e 2000 pulsos de OC, respectivamente, com DFE de 0,03 mJ/mm², por um período mínimo de 1 mês em indivíduos pós cirurgia de liberação do túnel do carpo, observando melhora mais rápida na dor e funcionalidade da mão quando comparados a indivíduos não tratados. Kamel *et al.* (2020), por sua vez, observaram redução de dor e maior amplitude de movimento do pescoço e cabeça ao tratar pontos de dor miofascial em pacientes recuperando de cirurgia para dissecação de tumor na região cervical, aplicando 1000 pulsos de OC com DFE de 0,25 mJ/mm². Apesar da capacidade de atenuar a DPO demonstrada nesses estudos, os mecanismos pelos quais a TOC induz o efeito antinociceptivo não foram contemplados.

Por esse motivo, o presente estudo direcionou o uso dessa terapia para o tratamento da DPO em um modelo animal induzido pela cirurgia de IRPM, com o intuito de confirmar a sua eficácia e investigar os mecanismos centrais de antinocicepção dessa terapia. Como resultado, foi observado um efeito antinociceptivo com duração de aproximadamente 1 hora nos animais com DPO, utilizando duas aplicações (no 14º e 16º dia após a IRPM) com 100 ou 200 pulsos de TOC. Apesar de ter apresentado uma tendência ao efeito, 400 pulsos de TOC não promoveram antinocicepção. Vale lembrar que, em estudos clínicos, a quantidade de pulsos utilizada tende a ser maior que 1000 pulsos por administração, levando em consideração que a área de tratamento é várias vezes maior em um humano do que nos camundongos utilizados no presente estudo, motivo pelo qual foi preconizado o uso de uma quantidade de pulsos mais baixas. Por exemplo, os parâmetros de tratamento do presente estudo estão em sintonia com os do estudo de Chai *et al.* (2017), que submetem camundongos C57BL/6 ao tratamento com TOC, utilizando 100 pulsos e uma DFE de 0,12 mJ/mm², e observaram formidáveis efeitos neuroprotetores no cérebro em um modelo de isquemia crônica, embora a localização da aplicação da TOC no corpo dos animais não tenha sido revelada pelos autores.

Apesar da escassez na literatura de relatos dos efeitos antinociceptivos da TOC em modelos animais incisionais ou pós-cirúrgicos, os achados do presente estudo suportam parcialmente os efeitos da TOC em outros modelos nociceptivos. Por exemplo, um estudo mostrou que três aplicações da TOC na 3ª hora, 3 e 7 dias após a cirurgia, utilizando 200 pulsos na dose de 0,12 mJ/mm² reduziu a hiperalgesia térmica e alodinia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático (CCI) em curto prazo, até 8 dias da cirurgia de CCI (CHEN *et al.*, 2017). Por outro lado, um estudo semelhante, utilizando a mesma metodologia, observou um efeito antinociceptivo em longo prazo, com duração de até 29 dias após a CCI (YANG *et al.*, 2019). Adicionalmente, uma única aplicação de 1000 pulsos da TOC na dose de 0,08 mJ/mm² foi capaz de aumentar a duração de caminhada de ratos com osteoartrite comparados com ratos controle, sendo esse desfecho um indicativo do efeito antinociceptivo da TOC, além de reduzir a expressão nos GRDs de CGRP (OCHIAI *et al.*, 2007). Dessa forma, a TOC nos parâmetros escolhidos se mostrou eficaz ao atenuar a DPO induzida pela cirurgia de IRPM em camundongos, mesmo que de forma temporária.

Como já destacado acima, o efeito antinociceptivo da TOC já foi documentado tanto em estudos experimentais como em ensaios clínicos, porém os mecanismos centrais envolvidos com a antinocicepção da TOC ainda não foram totalmente esclarecidos. Os resultados do presente estudo, no entanto, permitem sugerir que o SEC a nível espinal tem um papel importante na antinocicepção da TOC, já que a avaliação dos níveis de ECs na medula espinal revelou um resultado interessante: houve uma elevação nos níveis de 2-AG, mas não de AEA, na medula espinal após tratamento com a TOC. Interessantemente, esses níveis corresponderam aos resultados do presente estudo relacionados à expressão das enzimas que metabolizam esses ECs, com diminuição da expressão de MAGL, mas não de FAAH, nos animais com DPO tratados com a TOC. Por outro lado, não houve aumento da expressão de DAGL α , sinalizando que o aumento nos níveis de 2-AG pode não ter sido causado pelo aumento na sua taxa de síntese, pelo menos não por essa via. A racionalização desses resultados sugere que a TOC possa ter diminuído a expressão da enzima MAGL nos segmentos L4 a L6 da medula espinal, consequentemente diminuindo a degradação de 2-AG e aumentando a sua disponibilidade nessa região. Com base nesses achados, é possível sugerir que o aumento nos níveis de 2-AG tenha favorecido a ativação dos receptores canabinoídes, corroborando com estudos

prévios da literatura em que o aumento da disponibilidade de 2-AG causado pela inibição farmacológica da MAGL atenuou tanto a dor inflamatória como a dor neuropática em animais (GHOSH *et al.*, 2013; KINSEY *et al.*, 2009). Considerando que o 2-AG é um agonista tanto do CB₁ como do CB₂, seus efeitos podem ter ocorrido pela ativação direta do CB₁ principalmente expressos nos neurônios, promovendo hiperpolarização dos mesmos, ou do CB₂ majoritariamente expressos na glia, reduzindo a influência dessas células sobre a excitabilidade neuronal (GUINDON; HOHMANN, 2009). Não obstante, até onde pudemos apurar, o presente estudo foi o primeiro a demonstrar a alteração dos níveis espinais de ECs associada à atenuação da dor em decorrência da aplicação periférica da TOC.

Embora o 2-AG apresente níveis elevados nos tecidos, nem toda sua produção é destinada ao seu funcionamento como neurotransmissor, dado que ele é um intermediário no metabolismo de lipídeos. A principal via de síntese desse EC é dependente da PLC β e subsequentemente de DAGL α , e esta via está envolvida principalmente com a modulação sináptica no SNC (FEZZA *et al.*, 2014). Entretanto há vias alternativas que podem contribuir para a síntese dessa molécula. Por exemplo, o 2-AG pode ser sintetizado a partir do fosfatidilinositol com a participação fosfolipase A1 (PLA1) e então liso PLC e pela hidrólise do ácido lisofosfatídico (LPA) pela LPA fosfatase. Entretanto, apesar de essas vias terem uma menor influência na participação do 2-AG na modulação sináptica, sabe-se menos sobre os seus mecanismos de regulação (MURATAEVA; STRAIKER; MACKIE, 2014). Assim, mesmo não tendo havido influência da TOC sobre a expressão de DAGL α , o aumento dos níveis de 2-AG pelas vias alternativas não deve ser negligenciado e mais estudos poderiam desvendar a sua contribuição nos níveis de 2-AG após o tratamento com a TOC.

Interessantemente, ao contrário do 2-AG, não houve influência da TOC sobre os níveis de AEA na medula espinal. Embora esses ECs compartilhem precursores semelhantes, as vias de biossíntese são distintas. Como já descrito, a partir da fosfatidiletanolamina, a enzima NAT forma o precursor NAPE, que é transformado em AEA por meio da fosfolipase D seletiva a NAPE, ou NAPE-PLD. Por outro lado, o fosfatidilinositol sofre a influência da enzima PLC gerando o precursor DAG, que é então transformado em 2-AG pela ação da enzima DAGL (MUCCIOLI, 2010). Como a TOC pode ter afetado diferencialmente essas vias ainda é obscuro, uma vez que as enzimas responsáveis pela biossíntese dessas substâncias, ou mesmo as

concentrações dos precursores, ainda não foram avaliadas no presente estudo. Nesse contexto, um estudo relatou que os níveis de AEA aumentaram de 1 a 3 dias após a cirurgia de indução de dor pós-incisional, enquanto os níveis de 2-AG foram aumentados mais tardiamente, de 3 a 9 dias (ALKAITIS *et al.*, 2010). Nossos resultados diferem deste estudo, pois não foi observada alteração nos níveis de ECs em animais com DPO induzida pela IRPM que não foram tratados com a TOC. Todavia, o resultado de Alkaitis *et al.* (2010) pode justificar a ausência de efeito da TOC sobre a AEA em termos temporais. Talvez a avaliação e a aplicação da TOC em um período mais curto após a indução da DPO poderiam ter permitido a identificação de alterações nos níveis de AEA. A literatura mostra também que a aplicação da TOC está relacionada com o aumento na liberação do fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF) *in vitro*. A ativação do receptor de tropomiosina relacionado à quinase B (TrKB) pelo BDNF permite a modulação da PLC, a qual está relacionada com a síntese de 2-AG, mas não de AEA, podendo justificar a influência diferencial da TOC nos níveis desses ECs (LIU *et al.*, 2019). Além disso, outro fato a se considerar é que, naturalmente, a expressão basal de 2-AG é muito maior que a expressão basal de AEA, e acredita-se ainda que exista um reservatório distinto de 2-AG desacoplado da síntese e liberação sob demanda desse EC, fatores que podem ter facilitado a influência da TOC sobre os níveis de 2-AG, mas não de AEA (ALGER; KIM, 2011).

Embora os níveis de AEA não terem sido influenciados na medula espinal, sabe-se que ela tem um papel importante na modulação da via nociceptiva não só na medula espinal, como também na SCP e no bulbo RVM. Na SCP, a atividade da AEA e a sua ligação ao receptor CB₁ está relacionada com a desinibição do tônus inibitório sobre as projeções descendentes dessa região partindo para a medula espinal, permitindo a atenuação da excitabilidade da via nociceptiva por esse mecanismo. Igualmente importante, no bulbo RVM, a participação da AEA por meio do CB₁ desinibe células OFF e inibe células ON, resultando em um balanço majoritariamente inibitório na modulação descendente partindo dessa região (PALAZZO *et al.*, 2010). Nesse contexto, teoriza-se que a TOC seja capaz de ativar regiões supraespinais relacionadas com a modulação descendente (SIMPLICIO *et al.*, 2020). Portanto, apesar de a TOC não ter afetado diretamente os níveis e a participação espinal da AEA, a influência dessa terapia na participação da AEA em outros níveis de modulação não pode ser descartada e exige mais estudos para seu esclarecimento.

A antagonização dos receptores CB₁ e CB₂ impediu parcial ou completamente a antinocicepção dessa terapia. Apesar de ser o primeiro estudo a demonstrar a participação dos receptores canabinoides no efeito antinociceptivo da TOC, os resultados do presente estudo confirmam dados da literatura relatando a importância desses receptores na antinocicepção a nível espinal em outras intervenções. Por exemplo, um estudo prévio do nosso laboratório já havia demonstrado que a administração i.t. do antagonista de CB₁ AM251, na dose de 1 µg, impediu o efeito antinociceptivo da TENS em camundongos Swiss com dor inflamatória induzida por tumor (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Similarmente, outro estudo do nosso grupo averiguou que a administração i.t. do antagonista de CB₂ AM630, na dose de 4 µg, impediu a analgesia induzida pelo exercício físico em camundongos C57BL6 com dor inflamatória induzida por carragenina (DOS SANTOS *et al.*, 2019). Portanto, a participação dos receptores canabinoides na antinocicepção da TOC é extremamente relevante, uma vez que o SEC, por meio desses receptores, está envolvido com a atenuação da dor em humanos e pode ser um alvo crucial para uma terapia combinada envolvendo a TOC (DIETRICH; MCDANIEL, 2004).

Não foi observada alteração na expressão de CB₁ na medula espinal dos animais com DPO ou tratados com a TOC. Relatos na literatura descrevem um aumento na expressão dos receptores CB₁ na medula espinal a partir de 4 até aproximadamente 14 dias da indução de dor neuropática em ratos (SAGAR *et al.*, 2012). Além disso, um estudo avaliando a dor cervical pós-operatória em ratos encontrou um aumento na expressão espinal do receptor CB₁ dois dias após a indução da dor, porém o mesmo não foi observado para o receptor CB₂ (WANG *et al.*, 2021). O presente estudo diverge dos estudos acima, já que não foi encontrada alteração na expressão dos receptores CB₁ na medula espinal, o que pode ser atribuído ao período de avaliação mais tardio, por volta do 16º dia. Assim como o CB₁, não houve variação na expressão espinal de CB₂. Esse achado conflita parcialmente com relatos da literatura, demonstrando que há um aumento da expressão de CB₂ na medula espinal de ratos com dor neuropática, mas não com dor crônica de origem inflamatória (ZHANG *et al.*, 2003). O aumento da expressão dos receptores canabinoides após a injúria periférica é descrito como um aumento funcional na tentativa de modular a excitabilidade da via nociceptiva e gerar uma resposta adaptativa de redução da dor. (ALKAITIS *et al.*, 2010; SAGAR *et al.*, 2012). Embora a expressão dos receptores CB₁ e CB₂ não tenha sido alterada no presente estudo, seja pelo modelo de DPO utilizado

ou pela TOC, os níveis de um dos seus principais ligantes, o 2-AG, foram aumentados com o tratamento, tendo sido provavelmente o fator responsável pela resposta comportamental de atenuação da DPO observada com a aplicação da TOC.

Mesmo levando em conta que a TOC não foi capaz de influenciar os níveis de AEA na medula espinal, a elevação nos níveis de AEA induzida farmacologicamente por meio da pré-administração de VDM11 potencializou o efeito da TOC, intensificando a antinocicepção e prolongando esse efeito. Há vários anos, os ECs têm sido considerados na literatura como um importante alvo terapêutico para o tratamento da dor, e formas de elevar os níveis dessas substâncias em áreas importantes da modulação nociceptiva têm sido investigadas. Por exemplo, foi observado em um estudo que a elevação dos níveis de AEA pela administração sistêmica de VDM11 em ratos potencializou a analgesia induzida por estresse por meio do receptor CB₁ (HOHMANN *et al.*, 2005). Adicionalmente, o aumento da disponibilidade de AEA pela administração de outros inibidores de sua recaptção, como AM404 e UCM707, reduziu a dor neuropática induzida pela CCI e a dor inflamatória induzida pela administração periférica de adjuvante completo de Freund (CFA) (LA RANA *et al.*, 2006). Interessantemente, o aumento da disponibilidade espinal de AEA pela injeção i.t. de MAFP, um potente inibidor da enzima FAAH, potencializou o efeito antinociceptivo da TENS em camundongos com dor inflamatória induzida por tumor (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Assim como descrito acima, a atenuação da nocicepção associada com a administração de inibidores da enzima MAGL é descrito na literatura. Por exemplo, a administração periférica do JZL184 tem efeito antialodínico e de diminuição do edema em camundongos com inflamação induzida por carragenina (GHOSH *et al.*, 2013). Adicionalmente, a administração espinal de JZL184 é responsável por reduzir a dor inflamatória induzida por carragenina em ratos, assim como a taxa de disparo e o campo receptivo de neurônios de ampla faixa dinâmica na medula espinal (WOODHAMS *et al.*, 2012). O SEC exerce uma espécie de tônus inibitório da via nociceptiva, na tentativa de regular a excitabilidade dos neurônios e modular a dor. Durante modelos crônicos de dor, esse tônus é especialmente importante, dado que a sua perda pode dar lugar à sensibilização da via nociceptiva, potencializando a dor (ALKAITIS *et al.*, 2010; SAGAR *et al.*, 2012). Apesar desses relatos da literatura, a administração intratecal de uma única dose de VDM11 e JZL184 não foi suficiente para reduzir a nocicepção nesse modelo de DPO no presente estudo, talvez por não

promover um aumento tão substancial nos níveis dos ECs capaz de subverter a sensibilização central decorrente do modelo. Entretanto, múltiplas administrações dessas substâncias poderiam aumentar suficientemente os níveis de ECs, ou por um período maior, favorecendo a reversão do quadro de sensibilização e a atenuação da DPO. De qualquer forma, a administração dessas substâncias em conjunto com a TOC foi capaz não somente de potencializar a antinocicepção, mas também de prolongá-la. Isso pode indicar um possível sinergismo entre a TOC e o SEC, ou pelo menos a atuação por mecanismos em comum, visto que o aumento dos níveis de AEA e 2-AG potencializou o efeito da TOC.

O SOP é imprescindível para a regulação da homeostase e manutenção de diversos processos no nosso organismo, dentre os quais a modulação da nocicepção é um dos mais discutidos, não só pelo seu papel endógeno, mas também pela participação em mecanismos relacionados a terapias exógenas. Então, muito se discute sobre a participação desse sistema no efeito de fármacos, porém outras formas de terapia, como as não farmacológicas, também podem atuar de forma dependente deste sistema (SLUKA *et al.*, 1999).

Embora a participação do SOP esteja mais clara em outras terapias não farmacológicas para o tratamento da dor, apenas um grupo avaliou a influência da TOC em mecanismos envolvidos com a analgesia a nível espinal, incluindo os opioides endógenos. Nesse estudo, Haake, Thon e Bette (2001) demonstraram que a aplicação de TOC periféricamente (na pata traseira direita) em ratos, sem qualquer modelo de dor, não alterou a expressão relativa dos peptídeos opioides met-enkefalina e dinorfina nas lâminas I e II do CDME nos segmentos L4 e L5 desses animais, em um intervalo de 4 a 72 horas após a aplicação. Embora os dados do estudo acima descartem a possibilidade de influência da TOC no funcionamento do SOP a nível espinal, os dados do presente estudo apontam que os receptores opioides medeiam, pelo menos em partes, a antinocicepção dessa terapia, já que a antagonização não seletiva dos receptores opioides (Naloxona) e a antagonização seletiva dos receptores μ , κ e δ (Cloccinamox, Nor-binaltorfimina e Naltrindole, respectivamente) sugerem que o efeito antinociceptivo da TOC é mediado pelos receptores opioides. Reforçando esse dado, a administração das maiores concentrações desses antagonistas em animais sem dor não induziu uma redução do limiar nociceptivo, indicando que a atenuação do tônus opioide atuante sobre a medula espinal *per se* não deve ter sido responsável pela diminuição do efeito

antinociceptivo da TOC. No presente estudo não foi avaliado diretamente o efeito da TOC na expressão dos peptídeos opioides a nível espinal, porém a presença de injúria periférica no nosso estudo, diferentemente do estudo de Haake, Thon e Bette, pode influenciar o próprio funcionamento do SOP, como indicam dados da literatura, e a também a forma como a TOC interage com esse sistema (TAYLOR; CORDER, 2014). Em casos de injúria tecidual severa, os níveis de opioides tendem a aumentar em regiões associadas com a modulação nociceptiva na tentativa de orquestrar uma resposta adaptativa de atenuação da dor (TAYLOR; CORDER, 2014). Assim, a TOC poderia impulsionar essa resposta, possivelmente favorecendo a liberação de mais opioides, e a inibição do SOP poderia então interferir com o efeito antinociceptivo dessa terapia. Entretanto, a mensuração da expressão dos peptídeos opioides em resposta ao tratamento com a TOC seria importante para comprovar essa hipótese.

A avaliação da expressão dos receptores opioides na medula espinal apontou que não houve alterações entre os grupos com relação à expressão dos receptores μ , κ e δ . Relatos na literatura demonstram um aumento da expressão dos receptores μ a nível espinal em modelos de dor inflamatória, podendo permanecer aumentada até 3 meses após a injúria inicial (MOUSA *et al.*, 2002; TAYLOR; CORDER, 2014). Embora em um contexto de injúria periférica o aumento da expressão desses receptores seja esperado do ponto de vista compensatório, com o intuito de limitar a excitabilidade excessiva da via nociceptiva, a introdução de uma terapia que reduz o *input* de estímulos nociceptivos pode atenuar essa resposta, prevenindo o aumento na expressão desses receptores, já que outros mecanismos (por exemplo a estimulação do SEC) atuando simultaneamente possam contribuir para limitar o aumento da excitabilidade dos neurônios a nível espinal.

Por outro lado, a literatura aponta que os receptores opioides δ na medula espinal são regulados não somente por estímulos periféricos como a inflamação, mas também pela exposição prolongada à morfina, por exemplo. Interessantemente, esses receptores nem sempre são expressos em grande quantidade na membrana plasmática das terminações dos neurônios aferentes primários na medula espinal. Em algumas instâncias, esses receptores podem estar localizados em compartimentos intracelulares, e sua translocação para a superfície da membrana plasmática é necessária para a sua participação na antinocicepção (QUIRION *et al.*, 2020). Dessa forma, uma possibilidade seria a estimulação da translocação desses receptores para a superfície da membrana após a TOC, favorecendo a antinocicepção por parte do

receptor δ , mesmo na ausência de aumento de sua expressão. Além disso, a análise da expressão de proteínas por Western Blot no presente estudo não avaliou separadamente extratos dos compartimentos celulares, portanto qualquer alteração no local de expressão dos receptores não detectaria o processo de translocação e, por isso, mais estudos seriam necessários para apurar essa hipótese.

Os receptores opioides κ também estão associados com a analgesia a nível espinal, ressaltando o potencial terapêutico desse receptor no tratamento da dor (MILLAN, 1990). Entretanto, no cérebro, esse receptor pode estar associado aos efeitos negativos do aspecto afetivo-emocional da dor e sintomas do tipo depressivo, limitando o seu uso efetivo. Esses receptores são expressos nos terminais pré-sinápticos espinais de fibras aferentes primárias peptidérgicas e estão relacionados com diminuição da neurotransmissão excitatória (SNYDER *et al.*, 2018). Entretanto, há relatos também de que esse receptor pode estar associado com a tolerância a fármacos como a morfina e até apresentar efeitos pró-nociceptivos associados com a suprarregulação de dinorfina a nível espinal durante modelos de dor crônica (XU *et al.*, 2004). Resumidamente, a estimulação dos receptores κ induz antinocicepção, porém a sua ativação contínua pode causar tolerância. Considerando que a aplicação de TOC foi realizada apenas duas vezes, e não por um período prolongado, é plausível que essa terapia tenha estimulado momentaneamente esse sistema, causando antinocicepção sem promover efeitos negativos. Além disso, a expressão dos receptores κ não foi influenciada pela TOC, indicando que o efeito antinociceptivo observado pode estar associado a mecanismos independentes da regulação da expressão deles. Talvez a quantificação futura de peptídeos opioides possa esclarecer essa relação.

Em um contexto geral no estudo da dor, as citocinas são imprescindíveis para a modulação da nocicepção a nível espinal. Até o presente momento, estudos revelaram que a aplicação periférica de TOC pode reduzir a expressão de NF- κ B e consequentemente a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , além de diminuir o estresse oxidativo no nervo ciático e nos GRD de ratos com dor neuropática (CHEN *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2019). Porém, a nível espinal, a influência da aplicação da TOC sobre os níveis de citocinas, especificamente em modelos de dor, ainda não foi investigada. Os achados do presente estudo confirmam parcialmente esses dados, uma vez que a avaliação dos níveis espinais de citocinas no presente estudo apontou uma diminuição dos níveis de IL-1 β , mas não de TNF- α ,

na medula espinal dos animais tratados com DPO tratados com TOC comparados com os animais não tratados. No entanto, não houve elevação dos níveis dessas citocinas pró-inflamatórias induzido pelo modelo de DPO no 16º dia de avaliação. Essas citocinas são consideradas pró-nociceptivas pois elas são responsáveis por amplificar a transmissão sináptica excitatória devido ao aumento da condutividade de canais como AMPA e NMDA, além de aumentar também a sua expressão nos neurônios, resultando em uma elevação da excitabilidade neuronal (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Paralelamente a isso, o CB₂ tem sido descrito como um importante modulador da nocicepção a nível espinal, em especial pela sua capacidade de atenuar a ativação microglial e astrocítica durante a dor crônica (RACZ *et al.*, 2008). Nessa condição, as células da glia ativadas na medula espinal promovem a liberação de mediadores pró-nociceptivos, principalmente pela ativação da via de sinalização intracelular das MAPK com subsequente ativação de NF-κB (WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001). Já foi demonstrado que a aplicação da TOC tem um efeito supressor na ação dessa via *in vitro* e no cérebro em um modelo de isquemia crônica, diminuindo tanto a expressão de NF-κB e de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) como a liberação de TNF-α (CHAI *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2015). Assim, mesmo que a participação glial não tenha sido diretamente avaliada por métodos farmacológicos ou biomoleculares, sugere-se que o aumento dos níveis de 2-AG induzidos pela TOC evidenciados no presente estudo possa ter reduzido a ativação excessiva da glia por meio da ativação do CB₂ expressos nessas células, conseqüentemente diminuindo a liberação de mediadores responsáveis pela amplificação da excitabilidade neuronal, tais como a IL-1β.

Por outro lado, ao avaliar a influência da TOC nos níveis da IL-10, não houve diferença entre os grupos. A IL-10 é uma citocina importante com atividade anti-inflamatória e pró-resolutiva, e na medula espinal está relacionada com a atenuação da nocicepção em modelos de dor crônica (MILLIGAN; WATKINS, 2009). No entanto, é possível que este mecanismo não esteja envolvido com a antinocicepção induzida pela TOC, e que esse efeito esteja mais relacionado com a atuação direta dos ECs sobre os neurônios e com a diminuição espinal nos níveis de IL-1β, possivelmente pela modulação da atividade glial.

Finalmente, devido à escassez de relatos na literatura, há controvérsias a respeito dos mecanismos centrais responsáveis pela analgesia da TOC, que impressionantemente foram pouco abordados até o presente momento. Nesse

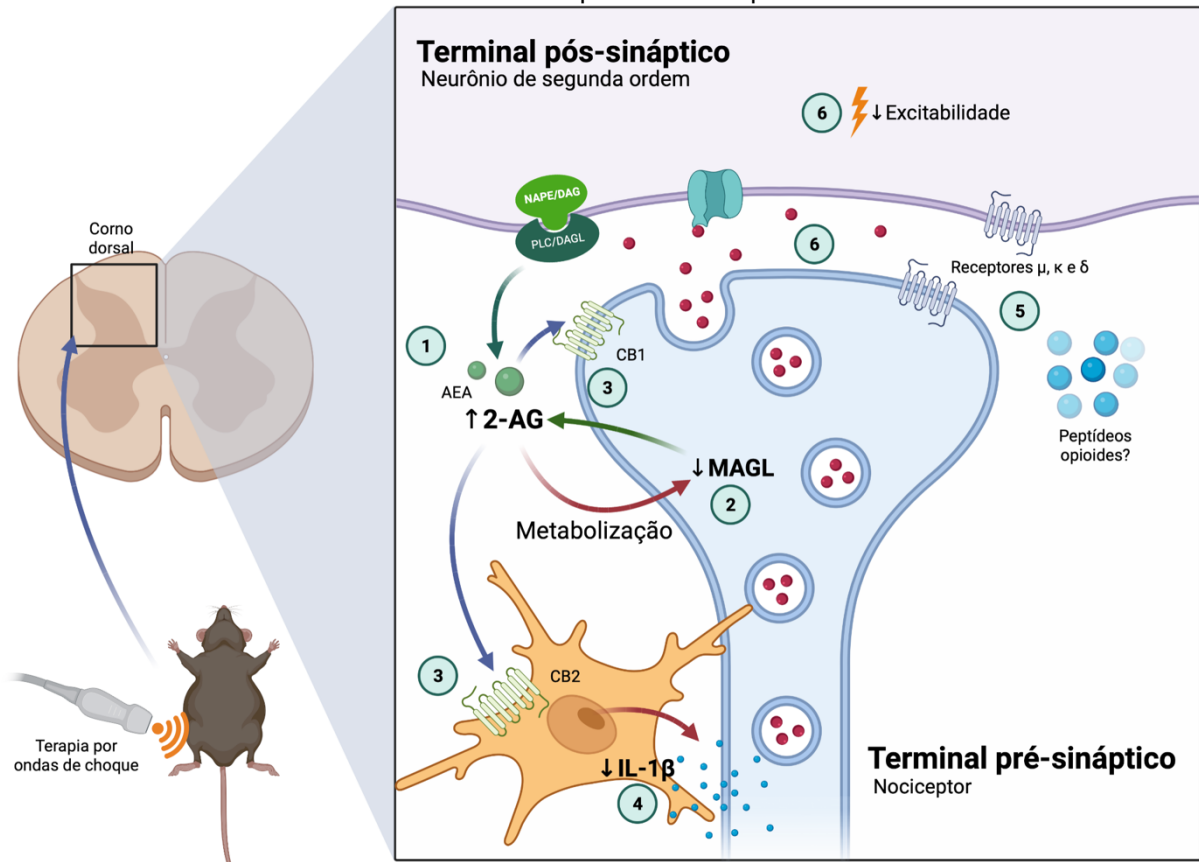
sentido, os resultados do presente estudo, pela primeira vez, apresentam a promissora participação do SEC, e possivelmente do SOP, na antinocicepção induzida pela TOC, ainda que experimentos adicionais sejam necessários para esclarecer outros aspectos da contribuição do SOP para a modulação nociceptiva exercida por essa terapia.

Embora os resultados apresentados sejam expressivos, o estudo também apresenta limitações. Em primeiro lugar, para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na antinocicepção da TOC, a avaliação da participação do SEC e SOP a nível periférico e supraespinal teriam sido importantes. Além disso, a avaliação do SOP mesmo a nível espinal não foi tão completa como deveria ter sido. Outra possível limitação seria a extrapolação dos achados do presente estudo, observados em um modelo animal, para o ser humano, principalmente levando em consideração as dimensões físicas que diferem amplamente, no que diz respeito aos parâmetros da TOC, à área de tratamento e, principalmente, aos efeitos observados.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, conclui-se que a TOC é um recurso seguro e eficaz, capaz de atenuar a DPO induzida pela IRPM em camundongos. Esse efeito parece ter sido mediado pelo aumento dos níveis espinais de 2-AG, possibilitado pela redução na expressão da enzima MAGL. Esse endocanabinoide provavelmente participou da antinocicepção por meio da ativação dos receptores CB₁ e CB₂ na medula espinal. Além disso, os resultados apontaram a possível participação dos receptores opiodes μ , κ e δ na medula espinal na antinocicepção da TOC, apesar de que essa terapia não promoveu alterações na expressão espinal dos receptores citados. A TOC também foi capaz de reduzir os níveis espinais da citocina IL-1 β , mais um mecanismo que pode estar envolvido com o alívio da DPO por parte da TOC (Figura 12). Mesmo assim, experimentos futuros serão necessários para aprofundar a investigação dos mecanismos envolvidos com a participação do SOP na antinocicepção dessa terapia, fornecendo ainda mais fundamentos para a proposição de terapias mais eficientes para tratar a DPO.

Figura 12 — Diagrama esquemático sintetizando os principais resultados a respeito da participação do SEC e SOP no efeito antinociceptivo induzido pela TOC.



Fonte: Autor.

Legenda: 1) A aplicação periférica da TOC induz um aumento nos níveis espinais 2-AG, mas não de AEA; 2) Esse aumento pode ter sido mediado pela redução da expressão espinal da enzima MAGL, responsável por uma das vias de inativação do 2-AG, após o tratamento com a TOC; 3) Os endocanabinoides, em especial o 2-AG, podem ter interagido com receptores CB₁ de forma retrógrada nos terminais pré-sinápticos dos neurônios de primeira ordem, causando a sua hiperpolarização e redução na liberação de neurotransmissores excitatórios. Além disso, o 2-AG pode ter ativado os receptores CB₂ expressos nas células gliais, como a micróglia; 4) nas células gliais, a ativação do receptor CB₂ pode ter reduzido a liberação de IL-1β, uma vez que essas células contribuem para a sensibilização central em modelos de dor pela liberação de mediadores pró-nociceptivos, evitando assim a hiperexcitabilidade neuronal; 5) Os receptores opioides μ, κ, e δ, expressos, tanto no neurônio de segunda ordem como no neurônio de primeira ordem, parecem mediar a antinocicepção induzida pela TOC. Entretanto, o efeito da TOC sobre a expressão dos peptídeos opioides na medula espinhal ainda deve ser explorado de forma; 6) O conjunto dos fatores descritos acima, influenciados pela TOC, resulta na menor excitabilidade do neurônio de segunda ordem, justificando a diminuição da DPO devido ao tratamento. MAGL: monoacilglicerol lipase; CB₁/CB₂: receptores canabinoides dos tipos 1 e 2; AEA: anandamida; 2-AG: 2-araquidonoilglicerol; DAGL: diacilglicerol lipase; NAPE: N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina; PLC: fosfolipase C; DAG: diacilglicerol; IL-1β: interleucina-1β.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, N. *et al.* Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. **Nature Neuroscience**, New York, v. 10, n. 7, p. 870, 2007.
- ALGER, B. E.; KIM, J. Supply and demand for endocannabinoids. **Trends in Neurosciences**, New York, v. 34, n. 6, p. 304–315, 2011.
- AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent signaling and behavior. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 115, n. 6, p. 1363, 2011.
- ALKAITIS, M. S. *et al.* Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 5, p. e10891, 2010.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1000, p. 40–56, 2004.
- AVENDAÑO-COY, J. *et al.* Extracorporeal shockwave therapy improves pain and function in subjects with knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **International Journal of Surgery**, London, v. 82, p. 64–75, 2020.
- BENARROCH, E. E. Endogenous opioid systems. **Neurology**, Minneapolis, v. 79, n. 8, p. 807–814, 2012.
- BENNETT, D. L. *et al.* The role of voltage-gated sodium channels in pain signaling. **Physiological Reviews**, Washington, v. 99, n. 2, p. 1079–1151, 2019.
- BENYAMIN, R. *et al.* Opioid complications and Side Effects. **Pain Physician**, Paducah, v. 11, p. 105–120, 2008.
- BILIR, K. A. *et al.* Involvement of spinal cannabinoid receptors in the antipruritic effects of WIN 55,212-2, a cannabinoid receptor agonist. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 43, n. 5, p. 553–558, 2018.
- BINSHTOK, A. M. *et al.* Nociceptors are interleukin-1 β sensors. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 28, n. 52, p. 14062–14073, 2008.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BROWNSTEIN, M. J. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 12, p. 5391, 1993.

BRUCE, J.; QUINLAN, J. Chronic Post Surgical Pain. **Reviews in Pain**, Londres, v. 5, n. 3, p. 23–9, 2011.

CHAI, H. T. *et al.* Extracorporeal shock wave therapy effectively protects brain against chronic cerebral hypo-perfusion-induced neuropathological changes. **American Journal of Translational Research**, Madison, v. 9, n. 11, p. 5074, 2017.

CHAPMAN, C. R.; VIERCK, C. J. The transition of acute postoperative pain to chronic pain: An integrative overview of research on mechanisms. **The Journal of Pain**, Philadelphia, v. 18, n. 4, p. 359.e1-359.e38, 2017.

CHEN, K. H. *et al.* Combination therapy with extracorporeal shock wave and melatonin markedly attenuated neuropathic pain in rat. **American Journal of Translational Research**, Madison, v. 9, n. 10, p. 4593–4606, 2017.

CHEN, Y. J. *et al.* Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF- β 1 and IGF-I expression. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 22, n. 4, p. 854–861, 2004.

CHEN, Y. L. *et al.* Extracorporeal shock wave therapy effectively prevented diabetic neuropathy. **American Journal of Translational Research**, Madison, v. 7, n. 12, p. 2543, 2015.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 32, p. 1, 2009.

DA SILVA SANTOS, R.; GALDINO, G. Endogenous systems involved in exercise-induced analgesia. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Warszawa, v. 69, n. 1, 2018.

DE FONSECA, F. R. *et al.* The endocannabinoid system: Physiology and pharmacology. **Alcohol and Alcoholism**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 2–14, 2005.

DE OLIVEIRA, H. U. *et al.* Investigation of the involvement of the endocannabinoid system in tens-induced antinociception. **The Journal of Pain**, Philadelphia, v. 21, n. 7–8, p. 820–835, 2019.

DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: Focus on g-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, New York, v. 5, n. 1, p. 103–121, 2009.

DESANTANA, J. M. *et al.* Effectiveness of transcutaneous electrical nerve stimulation for treatment of hyperalgesia and pain. **Current Rheumatology**, [S.I.] v. 10, n. 6, p.492-499, 2008.

DI MARZO, V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 134–140, 2006.

DIETRICH, A.; MCDANIEL, W. F. Endocannabinoids and exercise. **British Journal of Sports Medicine**, Loughborough, v. 38, n. 5, p. 536–541, 2004.

DOS SANTOS, R. S. *et al.* Involvement of spinal cannabinoid CB2 receptors in exercise-induced antinociception. **Neuroscience**, Oxford, v. 418, p. 177–188, 2019.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 120, p. 3760–3772, 2010.

ELISEI, L. M. S. *et al.* Antinociception induced by artemisinin nanocapsule in a model of postoperative pain via spinal TLR4 inhibition. **Inflammopharmacology**, Dordrecht, v. 28, n. 6, p. 1537–1551, 2020.

FEZZA, F. *et al.* Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 11, p. 17078–17106, 2014.

FLATTERS, S. J. L. Characterization of a model of persistent postoperative pain evoked by skin/muscle incision and retraction (SMIR). **Pain**, Amsterdam, v. 135, n. 1–2, p. 119–30, 2008.

FRAIRIA, R.; BERTA, L. Biological effects of extracorporeal shock waves on fibroblasts: A review. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, Roma, v. 1, n. 4, p. 138, 2011.

FU, W.; TAYLOR, B. K. Activation of cannabinoid CB2 receptors reduces hyperalgesia in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 595, p. 1–6, 2015.

GALDINO, G. *et al.* The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 77, p. 313–324, 2014.

GALDINO, G. S.; DUARTE, I. D. G.; PEREZ, A. C. Participation of endogenous opioids in the antinociception induced by resistance exercise in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 43, n. 9, p. 906–909, 2010.

GAN, T. J. Poorly controlled postoperative pain: prevalence, consequences, and prevention. **Journal of Pain Research**, Auckland, v. 10, p. 2287, 2017.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 86, n. 8, p. 1646–1647, 1964.

GHOSH, S. *et al.* The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 suppresses inflammatory pain in the mouse carrageenan model. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 92, n. 0, p. 498, 2013.

GRACE, P. M. *et al.* Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 14, n. 4, p. 217–231, 2014.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. The endocannabinoid system and pain. **Central Nervous System & Neurological Disorders - Drug Targets**, [S.l.] v. 8, p. 403–421, 2009.

GUPTA, A. *et al.* Clinical aspects of acute post-operative pain management & its assessment. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, Mumbai, v. 1, n. 2, p. 97, 2010.

HAAKE, M.; THON, A.; BETTE, M. Absence of spinal response to extracorporeal shock waves on the endogenous opioid systems in the rat. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 279–284, 2001.

HAAKE, M.; THON, A.; BETTE, M. No influence of low-energy extracorporeal shock wave therapy (ESWT) on spinal nociceptive systems. **Journal of Orthopaedic Science**, Gettysburg, v. 7, n. 1, p. 97–101, 2002.

HAGHIGHAT, S. *et al.* Extracorporeal shockwave therapy in pillar pain after carpal tunnel release: A prospective randomized controlled trial. **Advanced Biomedical Research**, Mumbai, v. 8, n. 1, p. 31, 2019.

HAGIWARA, S. *et al.* GaAIIAs (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 39, n. 10, p. 797–802, 2007.

HANISCH, U. K. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**, New York, v. 40, n. 2, p. 140–155, 2002.

HERKENHAM, M. *et al.* Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: A quantitative in vitro autoradiographic study. **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 11, n. 2, p. 563–583, 1991.

HILLARD, C. J. Circulating Endocannabinoids: From Whence Do They Come and Where are They Going? **Neuropsychopharmacology**, New York, v. 43, n. 1, p. 155–172, 2018.

HOHMANN, A. G. *et al.* An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, London, v. 435, n. 7045, p. 1108–1112, 2005.

HOLDEN, J. E.; JEONG, Y.; FORREST, J. M. The endogenous opioid system and clinical pain management. **AACN Clinical Issues**, Philadelphia v. 16, n. 3, p. 291–301, 2005.

HUGHES, L.; GRANT, I.; PATTERSON, S. D. Aerobic exercise with blood flow restriction causes local and systemic hypoalgesia and increases circulating opioid and endocannabinoid levels. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 131, n. 5, p. 1460–1468, 2021.

HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 67, p. 313–316, 1980.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. **IASP Terminology**. [S.l., 2020]. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>>. Acesso em: 27 jul. 2022.

JIN, X.; GEREAU IV, R. W. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . **Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 26, n. 1, p. 246–255, 2006.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, London, v. 413, p. 203–210, 2003.

KALRA, A.; URBAN, M. O.; SLUKA, K. A. Blockade of opioid receptors in rostral ventral medulla prevents antihyperalgesia produced by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 298, n. 1, p. 257–263, 2001.

KAMEL, F. A. H. *et al.* Efficacy of extracorporeal shockwave therapy on cervical myofascial pain following neck dissection surgery: A randomized controlled trial. **Annals of Rehabilitation Medicine**, [S.l.], v. 44, n. 5, p. 393–401, 2020.

KEHLET, H.; JENSEN, T. S.; WOOLF, C. J. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. **The Lancet**, New York, v. 367, n. 9522, p. 1618–1625, 2006.

KIMELBERG, H. K.; NEDERGAARD, M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. **Neurotherapeutics**, Orlando, v. 7, n. 4, p. 338–353, 2010.

KINSEY, S. G. *et al.* Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 330, n. 3, p. 902, 2009.

KOMOROWSKA-MÜLLER, J. A.; SCHMÖLE, A. C. CB2 receptor in microglia: The guardian of self-control. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 1, p. 1–27, 2021.

LA RANA, G. *et al.* Modulation of neuropathic and inflammatory pain by the endocannabinoid transport inhibitor AM404 [N-(4-hydroxyphenyl)-eicosa-5,8,11,14-tetraenamide]. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 317, n. 3, p. 1365–1371, 2006.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **Journal of Pain**, Philadelphia, v. 10, n. 9, p. 895–926, 2009.

LISCHKA, A. *et al.* Genetic pain loss disorders. **Nature Reviews. Disease Primers**, London, v. 8, n. 1, 2022.

LIU, T. *et al.* Cellular signaling pathways modulated by low-intensity extracorporeal shock wave therapy. **International Journal of Impotence Research**, London, v. 31, n. 3, p. 170, 2019.

MALTA, I. *et al.* Investigation of the effects of therapeutic ultrasound or photobiomodulation and the role of spinal glial cells in osteoarthritis-induced nociception in mice. **Lasers in Medical Science**, London, n. 0123456789, 2021.

MARTIN, W. J. *et al.* An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 56, n. 23–24, p. 2103–2109, 1995.

MATSUO, H. *et al.* Early transcutaneous electrical nerve stimulation reduces hyperalgesia and decreases activation of spinal glial cells in mice with neuropathic pain. **Pain**, Amsterdam, v. 155, n. 9, p. 1888–1901, 2014.

MCENTIRE, D. M. *et al.* Pain transduction: A pharmacologic perspective. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, London, v. 9, n. 8, p. 1069, 2016.

MCCMAHON, S. B. **Wall and Melzack's textbook of pain**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013.

MCCMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B. J.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Experimental Neurology**, Orlando, v. 192, n. 2, p. 444–462, 2005.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The endocannabinoid system and the brain. **Annual Review of Psychology**, Palo Alto, v. 64, p. 21–47, 2013.

MELESE, H. *et al.* Extracorporeal shock wave therapy on pain and foot functions in subjects with chronic plantar fasciitis: Systematic review of randomized controlled trials. **Disability and Rehabilitation**, London, p. 5007–5014, 2021.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: A new theory. **Science**, Washington, v. 150, n. 3699, p. 971–979, 1965.

MENDELL, L. M. Constructing and deconstructing the gate theory of pain. **Pain**, Amsterdam, v. 155, n. 2, p. 210, 2014.

MILLAN, M. J. κ -Opioid receptors and analgesia. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 70–76, 1990.

MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1–164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 66, p. 355–474, 2002.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 10, n. 1, p. 23–36, 2009.

MITTERMAYR, R. *et al.* Extracorporeal shock wave therapy (ESWT) for wound healing: Technology, mechanisms, and clinical efficacy. **Wound Repair and Regeneration**, St. Louis, v. 20, n. 4, p. 456–465, 2012.

MOUSA, S. *et al.* Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 126, n. 1–2, 2002.

MUCCIOLI, G. G. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 15, n. 11–12, p. 474–483, 2010.

MURATAEVA, N.; STRAIKER, A.; MACKIE, K. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 171, n. 6, p. 1379, 2014.

NACKLEY, A. G.; SUPLITA, R. L.; HOHMANN, A. G. A peripheral cannabinoid mechanism suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. **Neuroscience**, Oxford, v. 117, n. 3, p. 659–670, 2003.

NOTARNICOLA, A.; MORETTI, B. The biological effects of extracorporeal shock wave therapy (ESWT) on tendon tissue. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, Roma, v. 2, n. 1, p. 33, 2012.

OBARA, I. *et al.* Antagonists of the κ -opioid receptor enhance allodynia in rats and mice after sciatic nerve ligation. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 140, n. 3, p. 538, 2003.

OCHI, T.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S. Blockade of the antinociceptive effect of spinally administered kyotorphin by naltrindole in mice. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 322, n. 2, p. 95–98, 2002.

OCHIAI, N. *et al.* Extracorporeal shock wave therapy improves motor dysfunction and pain originating from knee osteoarthritis in rats. **Osteoarthritis and Cartilage**, London, v. 15, n. 9, p. 1093–1096, 2007.

OGDEN, J. A.; TÓTH-KISCHKAT, A.; SCHULTHEISS, R. Principles of shock wave therapy. **Clinical Orthopaedics And Related Research**, Philadelphia, v. 387, p. 8–17, 2001.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, Emigsville, v. 8, n. 2, p. 143–51, 2014.

PACHECO, D. DA F.; ROMERO, T. R. L.; DUARTE, I. D. G. Ketamine induces central antinociception mediated by endogenous cannabinoids and activation of CB1 receptors. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 699, p. 140–144, 2019.

PAK, S. C. *et al.* Nonpharmacological interventions for pain management in paramedicine and the emergency setting: A review of the literature. **Evidence-based**

Complementary and Alternative Medicine, [S.l.] v. ID 873039, n. 873039, p. 1–8, 2015.

PALAZZO, E. *et al.* The role of cannabinoid receptors in the descending modulation of pain. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 3, n. 8, p. 2661, 2010.

PATHAN, H.; WILLIAMS, J. Basic opioid pharmacology: an update. **British Journal of Pain**, London, v. 6, n. 1, p. 11, 2012.

PROGRAMA DE ATUALIZAÇÃO EM TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA (PROATO). **Terapia por Ondas de Choque**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

PURVES, D. Pain. *In*: PURVES, D. *et al.* (Ed.). **Neuroscience**. 6th ed. Massachusetts: Oxford University, 2018. p. 213–230.

PURVES, D. Synaptic transmission. *In*: PURVES, D. *et al.* (Ed.). **Neuroscience**. 6th ed. Massachusetts: Oxford University, 2018. p. 85–113.

QUARTILHO, A. *et al.* Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 99, n. 4, p. 955–960, 2003.

QUIRION, B. *et al.* The delta-opioid receptor: A target for the treatment of pain. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, Lausanne, v. 13, 2020.

RACZ, I. *et al.* Crucial role of CB2 cannabinoid receptor in the regulation of central immune responses during neuropathic pain. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 28, n. 46, p. 12125, 2008.

RAJA, S. N. *et al.* The Revised IASP definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. **Pain**, Amsterdam, v. 161, n. 9, p. 1976, 2020.

REGGIO, P. Endocannabinoid binding to the cannabinoid receptors: What is known and what remains unknown. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 17, n. 14, p. 1468–1486, 2010.

ROMEO, P. *et al.* Extracorporeal shock wave therapy in musculoskeletal disorders: a review. **Medical Principles and Practice**, [S.l.] v. 23, n. 1, p. 7–13, 2014.

RUSSELL, F. A. *et al.* Calcitonin gene-related peptide: Physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, Washington, v. 94, n. 4, p. 1099, 2014.

RYSKALIN, L. *et al.* Molecular mechanisms underlying the pain-relieving effects of extracorporeal shock wave therapy: A focus on fascia nociceptors. **Life**, v. 12, n. 5, p. 743, 2022.

SAGAR, D. R. *et al.* Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. **The European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 371–379, 2005.

SAGAR, D. R. *et al.* The contribution of spinal glial cells to chronic pain behaviour in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritic pain. **Molecular Pain**, London, v. 7, n. 1, p. 88, 2011.

SAGAR, D. R. *et al.* Dynamic changes to the endocannabinoid system in models of chronic pain. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 367, n. 1607, p. 3300–3311, 2012.

SANTOS, G. X. *et al.* Central involvement of 5-HT_{1A} receptors in antinociception induced by photobiomodulation in animal model of neuropathic pain. **Lasers in Medical Science**, London, p. 1–9, 2021.

SCHUG, S. A. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic postsurgical or posttraumatic pain. **Pain**, Amsterdam, v. 160, n. 1, p. 45–52, 2019.

SIMPLICIO, C. L. *et al.* Extracorporeal shock wave therapy mechanisms in musculoskeletal regenerative medicine. **Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma**, Delhi, v. 11, p. S309–S318, 2020.

SLUKA, K. A. *et al.* Spinal blockade of opioid receptors prevents the analgesia produced by TENS in arthritic rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 289, n. 2, p. 840–846, 1999.

SNYDER, L. M. *et al.* Kappa opioid receptor distribution and function in primary afferents. **Neuron**, Cambridge, v. 99, n. 6, p. 1274–1288.e6, 2018.

STAUD, R. The important role of CNS facilitation and inhibition for chronic pain. **International Journal of Clinical Rheumatology**, London, v. 8, n. 6, p. 639, 2013.

TAYLOR, B. K.; CORDER, G. Endogenous analgesia, dependence, and latent pain sensitization. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, Heidelberg, v. 20, p. 283, 2014.

THIEL, M. Application of shock waves in medicine. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 387, p. 18–21, 2001.

TURGUT, M. C.; SAGLAM, G.; TOY, S. Efficacy of extracorporeal shock wave therapy for pillar pain after open carpal tunnel release: A double-blind, randomized, sham-controlled study. **The Korean Journal of Pain**, Seoul, v. 34, n. 3, p. 315, 2021.

VERSTRAELEN, F. U. *et al.* High-energy versus low-energy extracorporeal shock wave therapy for calcifying tendinitis of the shoulder: Which is superior? A meta-analysis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 472, n. 9, p. 2816, 2014.

WANG, C. J. Extracorporeal shockwave therapy in musculoskeletal disorders. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, London, v. 7, n. 1, p. 11, 2012.

WANG, J. *et al.* Electroacupuncture alleviates hyperalgesia by regulating cb1 receptor of spinal cord in incisional neck pain rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [S.I.] 2021.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: A driving force for pathological pain. **Trends in Neurosciences**, New York, v. 24, n. 8, p. 450–455, 2001.

WESS, O. J. A neural model for chronic pain and pain relief by extracorporeal shock wave treatment. **Urological Research**, Berlin, v. 36, n. 6, p. 327–334, 2008.

WOODHAMS, S. G. *et al.* Spinal administration of the monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 produces robust inhibitory effects on nociceptive processing and the development of central sensitization in the rat. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 167, n. 8, p. 1609, 2012.

WOOLF, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, Amsterdam, v. 152, n. 3 Supplemental, p. 1–31, 2012.

XU, M. *et al.* Neuropathic pain activates the endogenous κ opioid system in mouse spinal cord and induces opioid receptor tolerance. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 24, n. 19, p. 4576, 2004.

YANG, C. H. *et al.* Long-term therapeutic effects of extracorporeal shock wave-assisted melatonin therapy on mononeuropathic pain in rats. **Neurochemical Research**, New York, v. 44, n. 4, p. 796–810, 2019.

YESILYURT, O. *et al.* Systemic and spinal administration of FAAH, MAGL inhibitors and dual FAAH/MAGL inhibitors produce antipruritic effect in mice. **Archives of Dermatological Research**, Berlin, v. 308, n. 5, p. 335–345, 2016.

ZHANG, J. *et al.* Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. **The European Journal of Neuroscience**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 2750–2754, 2003.

ZHANG, T. *et al.* Preemptive intrathecal administration of endomorphins relieves inflammatory pain in male mice via inhibition of p38 MAPK signaling and regulation of inflammatory cytokines. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2018.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 109–110, 1983.

ZOGOPOULOS, P. *et al.* The role of endocannabinoids in pain modulation. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Paris, v. 27, n. 1, p. 64–80, 2013.