

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**ETIANE MICHELI MEYER CALLAI**

**IMPACTO DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA  
(ETCC) NA RESPOSTA COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE RATOS  
SUBMETIDOS A UM MODELO DE NEURALGIA TRIGEMINAL**

**Porto Alegre**

**2016**

**ETIANE MICHELI MEYER CALLAI**

**IMPACTO DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA  
(ETCC) NA RESPOSTA COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE RATOS  
SUBMETIDOS A UM MODELO DE NEURALGIA TRIGEMINAL**

Dissertação de Mestrado para  
obtenção do Título de Mestre junto à  
Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Iraci Lucena da Silva Torres

Porto Alegre

2016

|

*“Quando os ventos de mudança sopram, umas pessoas levantam barreiras,  
outras constroem moinhos de vento.”*

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por me proporcionar todas as oportunidades de ser feliz.
- A minha orientadora, Professora Doutora. Iraci Lucena da Silva Torres, por sua generosidade em apostar em mim mesmo sem ter nenhuma garantia, me aceitando em seu grupo de pesquisa e me orientando ao longo do mestrado com muita dedicação.
- A todos os colegas do laboratório que são excepcionais em termos de coleguismo. Em especial, Alexandre Quevedo, Liciane Medeiros, Vanessa Scarabelot e Isabel de Macedo que me ajudaram em muitos sentidos e me ensinaram a trilhar o caminho da pesquisa a cada passo com muita paciência e desprendimento.
- Aos meus familiares, minha mãe, Beatriz, por não ter medido esforços para investir na minha educação. Meu irmão Paulo André e minha cunhada, Rúbia que me apoiaram e cuidaram da minha filha nos momentos em que precisei estudar, me acolheram em sua casa quando moravam em Porto Alegre e fizeram o necessário para que eu pudesse atingir meu objetivo. E ao meu pai, Paulo Roberto, que mesmo não estando mais aqui, despertou em mim o gosto pelo conhecimento em minha infância.
- Ao meu marido, Herton, por ser um companheiro para todas as horas, enfrentando as minhas batalhas como se fossem suas. Por me apoiar, financiar, tolerar, torcer por mim e por mudar o curso de sua vida para seguir a minha. Sem palavras....
- A minha querida e iluminada filhinha, Rafaela, por ser a luz que me guia, a motivação para eu crescer profissionalmente, essa criança querida e compreensiva que me acompanha nos estudos sempre muito comportada para que eu consiga me concentrar!
- Aos professores do Programa de Pós-Graduação (PPG) Fisiologia pela qualidade do ensino.
- Aos funcionários do PPG Fisiologia pelo trabalho realizado.
- À Professora Doutora Deise Ponzoni pela disponibilidade em ajudar sanando dúvidas quanto à cirurgia.
- Ao Professor Doutor Guilherme Baldo pela orientação de estágio.
- Aos Professores Doutores, Maria Flávia Marques e Alex Sander da Rosa Araújo que colaboraram em minha qualificação de mestrado.
- Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal (UEA), chefiados pela Enfermeira Marta Cioato, pela qualidade e credibilidade no serviço prestado o que garante a qualidade da pesquisa.

- Aos funcionários da Unidade de Análise Molecular e de Proteínas (UAMP), especialmente ao Jéferson B. da Silva, pelo espaço que oferecem e pela ajuda na realização das dosagens bioquímicas e armazenamento das amostras.
- À Flávia Rejane Giusti, da Unidade de Patologia Experimental (UPE) pela importante ajuda na obtenção das imagens histológicas.
- Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto. E ao HCPA pela excelente qualidade de sua Unidade de Experimentação Animal, onde o trabalho pôde ser desenvolvido com qualidade e segurança.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado.
- A Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) - CNPq/UFRGS pelas bolsas dos alunos de iniciação científica que participaram deste trabalho.  
À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) E a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo financiamento da pesquisa.
- E a todos que de alguma maneira direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A neuralgia trigeminal é o tipo de neuropatia orofacial mais prevalente, acometendo principalmente indivíduos idosos. O sintoma mais característico é alodínia mecânica relacionada à sensibilização central. Atualmente, os tratamentos disponíveis para o tratamento da neuralgia trigeminal são o farmacológico, como uso de anticonvulsivantes e antidepressivos, e o cirúrgico, em casos eletivos. Entretanto, nem todos os pacientes obtêm remissão sintomática, toleram os fármacos ou podem ser submetidos a procedimento cirúrgico. Mesmo nos casos em que é realizada cirurgia, os sintomas tendem a retornar em alguns anos. Assim, torna-se necessário buscar novas terapias para neuralgia trigeminal. A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) parece ser uma alternativa promissora no alívio das dores neuropáticas por promover neuroplasticidade de sistemas envolvidos na modulação dos processos nociceptivos. Além disso, é uma técnica segura, não invasiva, indolor e bem tolerada. Devido a sua relevância, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ETCC em um modelo animal de dor neuropática orofacial (neuralgia trigeminal) na resposta nociceptiva mecânica usando-se o teste de Von Frey de filamentos e em parâmetros bioquímicos (dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) em soro e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), fator de crescimento neural (NGF) e interleucina 10 (IL-10) em tronco encefálico). Todos os procedimentos experimentais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (UEA), Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) e Unidade de Patologia Experimental (UPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O modelo de dor neuropática utilizado foi o de injúria por constrição crônica do nervo infraorbitário (CCI-ION) proposto por Imamura em 1997 adaptado. O trabalho foi dividido em dois desenhos experimentais. Inicialmente foi realizado o protocolo 1 que com 21 animais divididos em 2 grupos: dor (CCI-ION) e sham dor (acesso cirúrgico sem constrição). Foi realizado o teste de Von Frey nos tempos: basal, 3, 7, 10 e 14 dias pós-cirurgia para determinar a partir de que dia se estabelece dor neuropática. No protocolo 2, os animais foram divididos em 7 grupos: controle, sham dor, sham dor + sham ETCC (tratamento falso), sham dor + ETCC (tratamento ativo), dor, dor + sham ETCC e dor + ETCC. Esta etapa foi realizada em 2 fases. Na primeira fase, os animais foram eutanasiados 24 horas após a última sessão de tratamento, na segunda fase, 7 dias após a última sessão de tratamento. Foi realizado o teste de Von Frey de filamentos nos tempos: basal, 14 dias após a cirurgia, imediatamente a última sessão de tratamento, 24 horas após a última sessão de tratamento. Na segunda fase, foram realizadas avaliações neuroquímicas 7 dias após a última sessão de tratamento. O tratamento consistiu de 8 sessões

diárias consecutivas de ETCC anodal com duração de 20 minutos para os grupos ETCC e o mesmo tempo como os eletrodos desligados para os grupos sham ETCC. Observamos que são necessários, pelo menos 14 dias após a cirurgia para o estabelecimento da dor neuropática, ETCC foi capaz de promover o retorno do limiar nociceptivo mecânico ao valor basal 24 horas após o final do tratamento no grupo dor com tratamento ativo. Não foi encontrada diferença entre os grupos imediatamente e 24h após o tratamento provavelmente porque o limiar nociceptivo dos animais foi re-estabelecido. Nas dosagens bioquímicas realizadas observou-se diminuição dos níveis de lactato desidrogenase (LDH) em soro no grupo dor e tratamento ativo, sugerindo segurança na técnica empregada. Os níveis de NGF (fator de crescimento neural) em tronco encefálico mostraram-se menores nos animais submetidos ao modelo de dor tratados com ETCC em relação aos submetidos ao modelo de dor, sem tratamento em 24 horas e, mais acentuadamente, após 7 dias do final do tratamento com ETCC. Os níveis de TNF- $\alpha$  e de IL-10 em tronco encefálico aumentaram nos grupos submetidos ao modelo de dor 7 dias após o final do tratamento, e a ETCC não foi capaz de reverter estes efeitos. A conclusão deste trabalho é de que o modelo de dor neuropática orofacial utilizado pode ser usado em estudos de curta duração (menor que 22 dias), não sendo útil para estudos longos. A ETCC mostrou-se eficaz no aumento do limiar nociceptivo em animais submetidos ao modelo de dor, reduzindo, NGF, TNF- $\alpha$  e IL-10 em tronco encefálico e demonstrando segurança.

## ABSTRACT

Trigeminal neuralgia is the most prevalent type of orofacial neuropathy, it affects mainly elderly individuals. The most characteristic symptom is mechanical allodynia related to central sensitization. Currently, the therapies available for the treatment of trigeminal neuralgia are pharmacological, as anticonvulsants and antidepressants, and surgery in some cases. However, not all patients get remission of symptoms, tolerate the drugs side effects or may undergo surgery. Even in cases where surgery is performed, the symptoms tend to return in a few years. Thus, it becomes necessary to search for new therapies for trigeminal neuralgia. Transcranial direct current stimulation (tDCS) appears to be a promising alternative for the relief of neuropathic pain by promoting neuroplasticity of the systems involved in the modulation of nociceptive processes. Moreover, it is a safe, non-invasive, painless and well tolerated technique. Because its relevance, the aim of this study was to evaluate the efficacy of tDCS in a neuropathic orofacial pain (trigeminal pain) animal model on nociceptive response using the Von Frey filament testing and biochemical parameters. All experimental procedures were performed in the Unidade de Experimentação Animal (UEA), Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) and Unidade de Patologia Experimental (UPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Therefore, were evaluated the mechanical nociceptive response and some neurochemical parameters. Neuropathic pain model used was the chronic constriction injury to the infraorbital nerve (CCI-ION) adapted from Imamura in 1997. Behavioral evaluation was performed by the facial Von Frey filaments test. Biochemical parameters analyzed were: lactate dehydrogenase (LDH) in serum and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), nerve growth factor (NGF), and interleukin 10 (IL-10) in brainstem. The study was divided into two experimental designs. Initially a pilot project was conducted with 21 animals divided into 2 groups: pain (CCI-ION) and sham pain (surgical access without nerve constriction). Von Frey test was performed at times: baseline, 3, 7, 10 and 14 days after surgery to determine the time when neuropathic pain was present. In the second experimental design, animals were divided into 7 groups: control, sham pain, sham pain + sham tDCS (fake treatment), sham pain + tDCS (active treatment), pain, + sham tDCS and pain + ETCC. This step was performed in 2 stages. In the first phase, the animals were euthanized 24 hours after the last treatment session, in the second phase, seven days after the last treatment session. In the second phase, neurochemical evaluations were performed 7 days after the last treatment session. Treatment consisted of 8 consecutive sessions of anodal tDCS with 20 minutes duration to tDCS groups

and the same time as the electrodes disconnected for sham tDCS groups. It was observed that, at least 14 days after surgery are needed for establishing of neuropathic pain, tDCS was able to promote the return of the mechanical nociceptive threshold to baseline immediately and 24 hours after the end of treatment inside pain with active treatment group. No difference was found between groups immediately and 24 hours after treatment probably because the nociceptive threshold of the animals were re- established. In biochemical assays it was observed decrease in serum lactate dehydrogenase levels (LDH) in group pain and active treatment , suggesting technique's security. The brainstem levels of NGF (nerve growth factor) were smaller in pain group treated with tDCS animals in comparison to pain model without treatment animals in 24 hours and most markedly after 7 days of tDCS end of treatment . The brainstem levels of TNF-  $\alpha$  and IL - 10 were increased in pain groups in 7 days after the end of treatment , and tDCS was not able to reverse these effects . The conclusion is that the neuropathic orofacial pain model adopted can be used in short-term studies (less than 22 days) , not being useful for long studies. The ETCC was effective in reducing the nociceptive threshold in animals subjected to pain model , reducing NGF , TNF-  $\alpha$  and IL- 10 in the brainstem with security.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Teste de von Frey facial de filamentos.....	36
<b>Figura 2.</b> Cirurgia de constrição do nervo infraorbitário em rato.....	37
<b>Figura 3.</b> Posição dos eletrodos para ETCC em rato.....	38
<b>Figura 4.</b> Efeito da cirurgia CCI-ION sobre o limiar nociceptivo mecânico.....	42
<b>Figura 5.</b> Níveis de NGF em tronco encefálico 24 horas após tratamento.....	44
<b>Figura 6.</b> Níveis de NGF em tronco encefálico 7 dias após tratamento.....	44
<b>Figura 7.</b> Níveis de TNF- $\alpha$ em tronco encefálico 24 horas após tratamento.....	45
<b>Figura 8.</b> Níveis de TNF- $\alpha$ em tronco encefálico 7 dias após tratamento.....	45
<b>Figura 9.</b> Níveis de IL – 10 em tronco encefálico 24 horas após tratamento.....	46
<b>Figura 10.</b> Níveis de IL – 10 em tronco encefálico 7 dias após tratamento.....	46
<b>Figura 11.</b> Níveis de LDH em soro 24 horas após tratamento.....	47
<b>Figura 12.</b> Níveis de LDH em soro 7 dias após tratamento.....	47
<b>Figura 13.</b> Imagem histológica de gânglio trigeminal esquerdo de rato.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Efeito da ETCC sobre o limiar nociceptivo mecânico.....	43
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT = serotonina

Ach = acetilcolina

ACTH = hormônio adrenocorticotrópico

AMPA = ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

AMPC = adenosina monofosfato cíclico

ATM = articulação temporomandibular

ATP = trifosfato de adenosina

AVE = acidente vascular encefálico

BDNF = fator neurotrófico derivado do encéfalo

Ca<sup>2+</sup> = íon cálcio

CCI-ION = injúria por constrição crônica do nervo infraorbitário

CGRP = peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CEUA = Comitê de Ética no Uso de Animais

CNPq = Comitê Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNSVT = complexo nuclear sensitivo do trigêmeo

CT = grupo controle total

D = grupo dor

DE = grupo dor + ETCC

DS = grupo dor + sham ETCC

ELISA = de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPM = erro padrão da média

EROs = espécies reativas de oxigênio

ETCC = estimulação transcraniana por corrente contínua

EUA = Estados Unidos da América

FIPE = Fundo de Incentivo à Pesquisa

GABA = ácido gama-aminobutírico

HCPA = Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HHA = hipotálamo-hipófise-adrenal

IASP = *International Association for the Study of Pain*

IL-10 = interleucina 10

IL-1 $\beta$  = interleucina-1 $\beta$

IL-6 = interleucina 6

K<sup>+</sup> = íon potássio

LDH = enzima lactato desidrogenase

LTP = *long-term potentiation*

MAPK = proteínas cinases ativadas por mitógenos

Na<sup>+</sup> = íon sódio

NFkB = fator nuclear kappa B

NGF = fator de crescimento neural

NK1 = receptor de neurocinina para substância P

NMDA = *N*-metil-D-aspartato

NOS = óxido nítrico sintase

NR1 = subunidade de receptor NMDA

NT = neuralgia trigeminal

p75NTR = receptor de neurotrofina p75

PAG = substância cinzenta periaquedutal

PGE<sub>2</sub> = prostaglandina E<sub>2</sub>

pH = potencial de hidrogênio

PIBIC = Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

POMC = pró-opiomelanocortina

PPG = programa de pós-graduação

REZ = *root entry zone*

rTMS = *repetitive transcranial magnetic stimulation*

RVM = bulbo rostral ventromedial

S = grupo sham dor

S1 = córtex sensitivo primário

S2 = córtex sensitivo secundário

SE = grupo sham dor + ETCC

SNC = sistema nervoso central

SNK = Student Newman Keuls

SNP = sistema nervoso periférico

SP = substância P

SS = grupo sham dor + sham ETCC

TDAH = transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TNFR1 = TNF receptor 1

TNFR2 = TNF receptor 2

TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa

TrkA = *tyrosine kinase A receptor*

TRKB = *tropomyosin receptor kinase B*

TRP = canal de potencial transiente

TRPA1 = receptor de potencial transiente A1

TRPM8 = receptor de potencial transiente M8

TRPV1 = receptor de potencial transiente V1

UAMP = Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas

UEA = Unidade de Experimentação Animal

UPE = Unidade de Patologia Experimental

V1 = ramo trigeminal oftálmico

V2 = ramo trigeminal maxilar

V3 = ramo trigeminal mandibular

VC = subnúcleo caudal

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1. – DOR.....	16
1.1.1 – DEFINIÇÃO DE DOR.....	16
1.1.2 – TRANSMISSÃO DO ESTÍMULO NOCICEPTIVO.....	16
1.1.3 – MODULAÇÃO ENDÓGENA DA DOR.....	19
1.2 – DOR CRÔNICA.....	20
1.2.1 – MECANISMOS DE CRONIFICAÇÃO DA DOR.....	20
1.2.2. – DOR NEUROPÁTICA.....	23
1.3 – NEURALGIA TRIGEMINAL.....	25
1.3.1 – VIA TRIGEMINAL.....	25
1.3.2 – CLASSIFICAÇÃO E FISIOPATOLOGIA DA NEURALGIA TRIGEMINAL.....	25
1.3.3 – TRATAMENTOS ATUAIS.....	27
1.4 – ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC).....	29
2 – JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	32
3 – HIPÓTESE.....	33
4 – OBJETIVOS.....	34
4.1 – OBJETIVO GERAL.....	34
4.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
5 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1 – ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	35
5.2 – DESENHO EXPERIMENTAL.....	35
5.2.1 – PROTOCOLO 1.....	35
5.2.1.1 – VON FREY.....	36
5.2.1.2 – CIRURGIA.....	36
5.2.1.3 – GRUPOS PROTOCOLO 1.....	37
5.2.2 – PROTOCOLO 2.....	38
5.2.2.1 – TRATAMENTO.....	38
5.2.2.2 – GRUPOS PROTOCOLO 2.....	39
5.3 – EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	39

5.4 – TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.....	40
5.4.1 – TNF- $\alpha$ , INTERLEUCINA 10, LACTATO DESIDROGENASE e NGF.....	40
5.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5.5.1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA PROTOCOLO 1.....	40
5.5.2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA PROTOCOLO 2.....	40
5.6 – ASPECTOS ÉTICOS.....	40
6 – RESULTADOS.....	42
6.1 – PROTOCOLO 1.....	42
6.1.1 – VON FREY PROTOCOLO 1 .....	42
6.2 – PROTOCOLO 2.....	43
6.2.1 – VON FREY PROTOCOLO 2.....	43
6.2.3 – NGF 24 HORAS APÓS TRATAMENTO.....	43
6.2.4 – NGF 7 DIAS APÓS TRATAMENTO.....	44
6.2.5 – TNF- $\alpha$ 24 HORAS APÓS TRATAMENTO.....	44
6.2.6 – TNF- $\alpha$ 7 DIAS APÓS TRATAMENTO.....	45
6.2.7 – IL 10 24 HORAS APÓS TRATAMENTO.....	45
6.2.8 – IL 7 DIAS APÓS TRATAMENTO.....	46
6.2.9 – LDH 24 HORAS APÓS TRATAMENTO.....	46
6.2.10 – LDH 7 DIAS APÓS TRATAMENTO.....	47
7 – DISCUSSÃO.....	48
7.1 – DISCUSSÃO PROTOCOLO 1.....	48
7.2 – DISCUSSÃO PROTOCOLO 2.....	52
8 – CONCLUSÕES.....	57
8.1 – CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	57
8.2 – CONCLUSÃO GERAL.....	57
9 – PERSPECTIVAS.....	59
10 – REFERÊNCIAS.....	60
11 – ANEXOS.....	73
11.1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	73
11.2 – DIVULGAÇÕES.....	75



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOR

### 1.1.1 DEFINIÇÃO DE DOR

A dor foi descrita em 1994 pela *International Association for the Study of Pain (IASP)* como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial dos tecidos ou descrita em termos de tais lesões” (Merskey e Bogduk, 1994). É uma experiência subjetiva devido aos aspectos emocionais e afetivos fornecidos pelo seu caráter urgente e primitivo.

De acordo com a duração, a dor pode ser classificada em aguda, que tem função protetiva importante para a sobrevivência, alertando o indivíduo sobre iminente dano tecidual; e crônica, quando persiste por três meses ou mais. A dor crônica não possui finalidade protetiva, é considerada uma doença *per se* trazendo sérias consequências ao indivíduo, comprometendo profundamente a qualidade de vida do paciente (Russo e Brose, 1998).

As síndromes de dor crônica são importantes problemas de saúde pública devido a alta prevalência e elevados custos financeiros para os sistemas de saúde. Recente pesquisa realizada nos Estados Unidos da América (EUA) sugere que 1,5 bilhões de pessoas sofram com dor crônica (*Global Industry Analysts*, 2015) no mundo. E, somente nos EUA são 100 milhões de pessoas adultas (*Institute of Medicine Report*, 2011), gerando um custo de 560 a 635 bilhões de dólares diretamente ou indiretamente, por ausências ao trabalho (Aronoff, 2016).

### 1.1.2 TRANSMISSÃO DO ESTÍMULO NOCICEPTIVO

Os neurônios aferentes responsáveis pela transmissão dos estímulos nocivos possuem especializações na extremidade periférica de seus axônios do tipo terminações nervosas livres denominados receptores nociceptivos ou nociceptores. Estes receptores encontram-se amplamente distribuídos no organismo em locais como a pele, tecido subcutâneo,

articulações, músculos, polpa dental, entre outros; com excessão do sistema nervoso central (SNC). Receptores nociceptivos classificam-se em térmicos, mecânicos e polimodais de acordo com o tipo de estímulo que transduzem. Uma quarta classe de receptores denomina-se receptores silentes. Nociceptores térmicos são ativados por temperaturas superiores a 45°C ou inferiores a 5°C. Os mecânicos respondem à pressão intensa e nociceptores polimodais são sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos ou químicos de grande intensidade (Kandel et al, 2000; Loeser et al, 2001).

As fibras nervosas que transmitem os sinais dos nociceptores são do tipo A $\delta$  e C. As fibras A $\delta$  são mielinizadas, com velocidade de transmissão de 5 a 30m/s. A sensação provocada pela estimulação dessas fibras é do tipo picada, “dolorimento” e conduzem estímulos térmicos e mecânicos. Fibras C são amielínicas e sua velocidade de transmissão é de 1 m/s provocando sensação de queimação. Essas fibras conduzem sinais de receptores polimodais. Devido a velocidade de condução ser diferente em relação as fibras A $\delta$  e C, o indivíduo sente uma dupla sensação quando ocorre uma lesão tecidual. Inicialmente, a primeira fase da dor é mais aguda em pontada, resultante da transmissão pelas fibras A $\delta$  e, posteriormente, a segunda dor ou dor difusa, queimação persistente, decorrente da transmissão pelas fibras C (Lent, 2010).

Neurônios que recebem informação sensorial são neurônios primários ou de primeira ordem. Seus corpos estão localizados nos gânglios das raízes dorsais da medula espinhal ou no gânglio trigeminal (gânglio de Gasser), quando se localizam na região orofacial. Esses neurônios são pseudounipolares, ou seja, um axônio único deixa o corpo celular e se bifurca. Um dos prolongamentos axonais vai para a periferia, onde recebe os estímulos nociceptivos e o outro faz sinapse com neurônios da medula espinhal ou tronco encefálico. Na medula espinhal, entram pelo corno dorsal da medula espinhal e fazem sinapses com os neurônios de segunda ordem nas lâminas I e II. Em estímulos orofaciais, as fibras nociceptivas incorporam-se ao nervo trigêmeo e entram nas lâminas I, II, V e VI do subnúcleo caudal (VC) do complexo nuclear sensitivo do trigêmeo (CNSVT) no tronco encefálico. Na medula espinhal, os neurônios de segunda ordem emitem axônios que cruzam para o lado oposto no mesmo segmento em que entraram e ascendem pelo trato espinotalâmico na coluna anterolateral (Lent, 2010; Sessle, 2010).

O trato espinotalâmico é subdividido em neoespinotalâmico ou espinotalâmico lateral, onde encontram-se fibras A $\delta$ , da dor rápida, e paleoespinotalâmico ou espinotalâmico medial,

contendo fibras C, da dor lenta. Trato espinotalâmico ascende até o tronco encefálico onde encontra neurônios de segunda ordem do CNSVT. Estas fibras passam a formar o lemnisco espinhal que se dirige à formação reticular e ao tálamo. Impulsos de dor rápida vão diretamente ao tálamo, núcleos posterior e ventral posterior, onde conectam-se a neurônios de terceira ordem que vão até o córtex sensitivo primário (S1) e secundário (S2) onde ocorre a integração e interpretação dos estímulos. Entretanto, estímulos de dor lenta passam primeiro pela formação reticular, antes de chegar ao tálamo e, de lá para S1 e S2. Algumas dessas fibras terminam no tronco encefálico (formação reticular, núcleo parabraquial e grisea periaquedutal) promovendo reações comportamentais e fisiológicas aos estímulos dolorosos. (Lent, 2010; De Marco & Pascoe, 2008; Sessle, 2010). Os neurotransmissores da sinapse entre o neurônio primário e o secundário são glutamato, o mais importante, substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Glutamato é um neurotransmissor excitatório peptídico que atua nos seguintes receptores de membrana: ionotrópicos ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), NMDA, kainato e metabotrópicos. Receptores AMPA são ativados pelos primeiros potenciais de ação. Já os do tipo NMDA precisam de estímulos persistentes para serem ativados, uma vez que são inibidos por 1 íon magnésio em condições normais. Para que este íon seja deslocado, e o receptor seja liberado, é necessário atingir um certo limiar de voltagem, o que ocorre após intensa estimulação. Por outro lado, substância P é um neuropeptídeo da classe das taquicinininas liberado pelas fibras amielínicas peptidérgicas em resposta a estímulos nocivos. Seu receptor é o de neurocinina NK1, que é ligado à proteína G, metabotrópico. Adicionalmente, CGRP, um peptídeo liberado por pequenas fibras amielínicas, se liga ao seu receptor e potencializa a ação da substância P. Além disso, nos nociceptores trigeminais, CGRP aumenta a liberação do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), uma neurotrofina relacionada a neuroplasticidade e sensibilização central que se liga ao receptor TRKB (*tropomyosin receptor kinase B*) (Khan e Smith, 2015).

### 1.1.3 MODULAÇÃO ENDÓGENA DA DOR

Em 1965, com a apresentação da Teoria de Comporta por Melzack e Wall (Melzack e Wall, 1982) iniciou-se a pesquisa sobre modulação de dor. Apesar de ter sofrido alterações, esta teoria ainda é aceita. Fala que neurônios da lâmina V da medula espinhal recebem informações de fibras do tipo A $\delta$ , C (nociceptivas) e A $\beta$  (não nociceptivas). As fibras A $\beta$  excitam interneurônios inibitórios da lâmina II, inibindo o disparo de neurônios da lâmina V. Já as fibras A $\delta$  e C excitam neurônios da lâmina V e inibem os interneurônios da lâmina II. Logo, a estimulação das fibras A $\beta$  “fecha as comportas” e a estimulação das fibras A $\delta$  e C “abre as comportas” da dor que permitem a entrada dos estímulos nociceptivos no SNC.

Além da modulação nociceptiva que ocorre na medula, influências inibitórias e excitatórias em centros superiores formam o sistema modulador descendente. Por exemplo, a estimulação da substância cinzenta periaquedutal (PAG) promove analgesia. Estimulação proveniente da PAG excita neurônios serotoninérgicos na linha média do núcleo magno da rafe e projetam-se para o corno dorsal da medula fazendo conexões inibitórias com os neurônios das lâminas I, II e V (Kandel et al, 2000, Sessle, 2010).

Algumas substâncias endógenas neuromoduladoras são envolvidas na atenuação da dor, tanto periférica quanto centralmente como ácido gama-aminobutírico (GABA), neurotransmissor inibitório e peptídeos opioides endógenos. Opioides endógenos são identificados em três classes: encefalinas,  $\beta$ -endorfinas e dinorfinas, com os precursores, respectivamente, pró-encefalina, pró-opiomelanocortina (POMC) e pró-dinorfina. A POMC é sintetizada principalmente na hipófise e dá origem ao hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Em situações de estresse, a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) induz síntese e liberação na corrente sanguínea de ACTH e  $\beta$ -endorfina pela adenohipófise. Os receptores ativados pelos opioides endógenos são  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ , todos ligados à proteína G. Receptores  $\mu$  são encontrados em grande concentração na PAG, bulbo rostral ventromedial (RVM) e corno dorsal da medula espinhal, principalmente nas lâminas I e II, e terminação central de fibras C no CNSVT, regiões ligadas ao controle endógeno da dor.

## 1.2 DOR CRÔNICA

### 1.2.1 MECANISMOS DE CRONIFICAÇÃO DA DOR

Dor é uma experiência biopsicossocial complexa que pode perdurar por muito tempo após lesão tecidual, mesmo após resolução do processo patológico que a desencadeou, levando a síndromes dolorosas crônicas (Aronoff, 2016). A dor crônica não tem caráter protetivo e resultada de alterações no sistema somatossensorial nociceptivo devido à neuroplasticidade nestes circuitos neurais pela persistência de estimulação nociceptiva (Staud, 2006; Staud e Rodriguez, 2006). Síndromes dolorosas crônicas ativam eixos Hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e Simpato adrenal e são associados à depressão de sistema imunológico e a alterações no sistema nervoso periférico (SNP) e SNC (Sessle et al, 2010).

A partir de lesão tecidual, inicia-se um processo chamado de sensibilização periférica, que consiste na diminuição no limiar e aumento e prolongamento de resposta a estímulos dolorosos em neurônios primários da região afetada. Respostas a estímulos térmicos de calor são as mais afetadas pela sensibilização periférica. Células lesadas (epiteliais, conjuntivas e células nervosas) e imunes liberam substâncias pró-inflamatórias, com efeito sinérgico, formam a chamada “sopa inflamatória”. Entre os componentes deste processo estão as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Leung e Cahill, 2010), eicosanóides como prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), histamina, íons  $K^+$ , bradicinina, peptídeos SP e CGRP, neurotrofinas como fator de crescimento neural (NGF) e BDNF, trifosfato de adenosina (ATP), serotonina (5-HT), acetilcolina (ACh), várias citocinas como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) interleucina 6 (IL-6) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Piotrowski e Foreman, 1986; Campbell et al., 1989). TNF- $\alpha$ , uma citocina relacionada a dor (Leung e Cahill, 2010), ativa receptores TNF receptor 1 (TNFR1) e TNF receptor 2 (TNFR2) e tem um papel fundamental na ativação de outras citocinas (Choi et al, 2015). Liberação de íons hidrogênios e radicais livres como precursor de radicais hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), levam a acidificação na área ao redor do nociceptor. Prostaglandinas e bradicinina atuam modulando receptores de potencial transitório vanilóide do tipo I (TRPV1) acoplados a canais iônicos dependente de ligante, via ativação de adenosina monofosfato cíclico (AMPC),

reduzindo tempo de hiperpolarização da membrana neural pós sináptica e diminuindo limiar de disparo da fibra nervosa.

As neurotrofinas desempenham um importante papel no processo nociceptivo. O NGF liberado no local da lesão, após ligar-se ao receptor tyrosine kinase A (TrkA) com maior afinidade ou ao receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) com menor afinidade, é internalizado e viaja pelo axônio até o corpo celular axonal onde altera a expressão de neuropeptídeos, canais de Na<sup>+</sup> e receptores como TRPV1, aumentando sua sensibilidade (Mizumura e Murase, 2015). As neurotrofinas aumentam a síntese de SP e de CGRP nas fibras C, reduzem atividade do GABA e acionam proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) que fosforilam AMPc e iniciam transcrição gênica responsável por alterações fenotípicas. Estas alterações no fenótipo contribuem para amplificação da eficácia sináptica e juntas estas substâncias potencializam sua ação, causando vasodilatação e extravasamento de líquido dos vasos para o interstício, formando um círculo vicioso de inflamação. A partir disso, ocorre diminuição do limiar dos receptores primários e ativação de receptores silentes, subclasse de fibras C amielínicas que disparam em presença de inflamação. Estes eventos levam à hiperalgesia primária, que ocorre no local da lesão e também, à hiperalgesia secundária, que ocorre na área adjacente à lesão pela difusão dos mediadores inflamatórios pelos tecidos (Fletcher et al., 1996; Aida et al., 1999) ampliando área de dor além da lesão inicial.

Em contrapartida, existem mecanismos endógenos de controle da inflamação excessiva evitando dano tecidual e mantendo a homeostase. Por exemplo, leucócitos liberam interleucina-10 (IL-10), uma citocina com ampla e potente ação anti-inflamatória, inibindo fator nuclear kappa B (NFkB) e síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL1-β e TNF-α minimizando dano tecidual. IL-10 inibe resposta imune inata e adquirida na fase de resolução do processo inflamatório (Khan et al, 2015, Ouyang et al, 2011). Entretanto, nem sempre, esses mecanismos são suficientes para prevenir alterações neuroplásticas decorrentes de processos de dor prolongada.

No caso de persistência de alterações no SNP decorrentes da demora ou incapacidade de resolução da lesão ou doença inicial, o processo inflamatório ou lesão neural induzem a alterações plásticas funcionais, químicas e estruturais no SNC desencadeando fenômeno de sensibilização central. Este fenômeno consiste em estado de hiperexcitação neuronal decorrente de diminuição da inibição e/ou aumento da eficácia sináptica, processos relacionados a sinais dolorosos dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal ou do subnúcleo caudal do CNSVT. Sensibilização central é um tipo de plasticidade sináptica consequente de atividade decorrente de intensa, repetida e sustentada estimulação nociceptiva

(Costigan et al, 2009; Latremoliere e Woolf, 2009). Alterações plásticas são decorrentes da ativação de cinases intracelulares, aumento da fosforilação de canais iônicos e de receptores e indução da transcrição gênica (Jensen, 2008). Em virtude da sensibilização central, os neurônios do corno dorsal da medula espinhal passam a apresentar atividade espontânea, diminuição no limiar de ativação, aumento da resposta a estímulos supralimiais e aumento do tamanho de seus campos receptivos. Somando-se ainda alteração ao processamento sensorial, déficit funcional em mecanismos antinociceptivos descendentes, ativação da via facilitatória da dor e aumento da percepção da dor secundária (somação temporal) (Nijs et al., 2010). Além de alterações em neurônios de segunda ordem, são sugeridas alterações no processamento central da dor em neurônios de terceira ordem. Apesar da sensibilização central ter semelhanças com sensibilização periférica, seus mecanismos moleculares diferem substancialmente, assim como o tipo de estímulo que tem sua resposta alterada. No caso da sensibilização central, a resposta a estímulos mecânicos é especialmente alterada, enquanto na sensibilização periférica, a resposta a estímulos térmicos para altas temperaturas sofre maior alteração. Como ocorrem alterações em propriedades de neurônios centrais, o processamento está alterado e a sensação dolorosa passa a ser distorcida e aumentada, ocorrendo mesmo na ausência de estímulos nocivos e inflamação. Com consequente alodínia e hiperalgesia como características de sensibilização central. Alodínia é a interpretação dolorosa de estímulos não nocivos, enquanto que hiperalgesia consiste na resposta aumentada a estímulos dolorosos (Latremoliere e Woolf, 2009).

Além disso, outros processos estão envolvidos na sensibilização central como o fenômeno *wind-up* e potenciação de longa duração (do inglês, *long-term potentiation* - LTP) que são desencadeados pela permanência do estímulo nociceptivo. *Wind-up* consiste na amplificação do sinal decorrente de maior sensibilidade dos neurônios de segunda ordem ao glutamato resultante da somação temporal de estímulos repetidos transmitidos por fibras C. Se os estímulos tiverem frequência entre 0,5 a 5 Hz, ocorre progressiva potencialização em neurônios do corno dorsal da medula espinhal (Aronoff, 2016). Fibras C liberam substância P, CGRP e glutamato, que atuam respectivamente em receptores NK1, CGRPr e NMDA (Aronoff, 2016; Garcia-Recio e Gascón, 2015). Ativação do receptor NMDA, passo central no início e manutenção da sensibilização central, ocorre tardiamente, pois é necessário remover o íon magnésio que bloqueia o receptor de maneira voltagem-dependente para que ela ocorra. A ligação de glutamato ao receptor AMPA promove despolarização de membrana, abertura do canal iônico e consequente influxo de sódio e efluxo de potássio. Efeitos estes somados a despolarização gerada pela ativação dos receptores NK1 e CGRPr deslocam o

magnésio e ativam receptor NMD, canal de cátions que permite influxo de sódio, de potássio e de cálcio. Além disso, ao atingir determinada voltagem, canais de cálcio dependentes de voltagem, são abertos, ampliando o efeito despolarizante (Schaible, 2007; Latremoliere e Woolf, 2009). O cálcio intracelular ao atingir nível ideal, ativa cascatas de sinalização responsáveis pelo início e manutenção do processo de sensibilização central. Os neurônios mais profundos do corno dorsal da medula espinhal estão mais envolvidos no fenômeno de *wind-up* do que neurônios de camadas superficiais (Aronoff, 2016). O *wind-up* tem duração limitada, desaparece em alguns segundos após a interrupção do estímulo, é uma espécie de potenciação homossináptica, uma vez que ocorre somente nas sinapses ativadas de curto prazo (Klauman et al, 2008; Latremoliere e Woolf, 2009).

LTP é um mecanismo de memória que também ocorre no processamento de estímulos dolorosos relacionados ao fenômeno de sensibilização central (Latremoliere e Woolf, 2009). Possui três fases: inicial, com duração de minutos; precoce, com duração de algumas horas; e tardia, que pode durar de muitas horas a vida toda. Quando são gerados estímulos repetidos nos receptores, ocorre somação destes e os potenciais de ação sinápticos gerados por fibras A $\delta$  e C são lentos, podendo durar mais de 20 segundos. A soma destes potenciais lentos em neurônios primários geram potenciais longos nos neurônios do núcleo trigeminal. Poucos segundos de despolarização de fibras primárias podem levar a despolarizações de vários minutos no neurônio secundário. Quando receptor NMDA é ativado, ocorre um aumento do cálcio intracelular, ativando enzimas cinases dependentes de cálcio que ativam a enzima óxido nítrico sintase (NOS) responsável pela síntese de neuromediador óxido nítrico (NO). O NO atravessa membranas e se difunde em todas direções, agindo, também em neurônio pré-sináptico, aumentando liberação de glutamato por horas. No entanto, o mecanismo de longa duração do fenômeno de LTP, é ligado à ativação da expressão gênica de proteínas para novos receptores glutamatérgicos, moléculas de adesão e componentes de novos sítios pós-sinápticos nas espinhas dendríticas (Lent, 2010).

## 1.2.2 DOR NEUROPÁTICA

Dor crônica pode ser subdividida em nociceptiva e neuropática. A dor nociceptiva ocorre pela ativação prolongada dos nociceptores. Um exemplo de dor crônica nociceptiva é a dor causada por doenças inflamatórias crônicas. Dor neuropática, por sua vez, consiste na “dor que surge como consequência direta de uma lesão ou doença do sistema somatossensorial” (Jensen et al., 2011). Ela pode ter como etiologia traumas em tecido

nervoso, patologias inflamatórias, infecciosas, metabólicas, autoimunes, degenerativas, neoplásicas, medicamentos quimioterápicos utilizados para o tratamento oncológico, iatrogenias, entre outras. As alterações em neurônios produzidas devido à dor neuropática são maiores do que as causadas por dor inflamatória (Latremoliere e Woolf, 2009). Alguns fatores de risco para o estabelecimento da dor neuropática são idade, gênero e polimorfismos genéticos (Chen et al, 2015).

A neuropatia leva a alterações funcionais no local do nervo lesado e na área adjacente gerando erros na transmissão dos sinais elétricos. Estas alterações podem levar à plasticidade maladaptativa e desencadear geração ectópica de potenciais de ação, desinibição da transmissão sináptica (por redução na síntese, atividade e liberação de neurotransmissores por interneurônios gabaérgicos e glicinérgicos) e/ou perda da conectividade sináptica. Com a perda da conexão sináptica, há possibilidade de novos circuitos e de interações neuroimunes. Então, uma lesão em estrutura nervosa pode causar dor neuropática e/ou déficit sensorial (Costigan et al, 2009). Os neurônios aumentam sua taxa de disparo em presença de lesão, aumentando número de canais de  $\text{Na}^+$ , fenômeno correlacionado à dor espontânea e à dor associada ao movimento, levando à sensibilização central. Fibras de grosso calibre ( $\text{A}\beta$ ) que não transmitem sinais de dor, passam a expressar novas substâncias como BDNF e substância P e enzimas como a tetraidopterina, um cofator para óxido nítrico sintase (NOS) e passam a conduzir sinais nociceptivos e contribuir para a sensibilização central. Fibras C que sofreram injúria degeneram nos seus terminais na lâmina II da medula. A perda de aferências em conjunto com aumento da capacidade de crescimento neuronal como tentativa de regeneração das fibras afetadas, leva fibras  $\text{A}\beta$  a se espalharem das lâminas III e IV para lâminas I e II e ativarem neurônios especificamente nociceptivos (Latremoliere e Woolf, 2009).

Uma lesão nervosa causa ativação e alterações em células gliais e também ativação de células imunes, especialmente macrófagos e células T. Ativação destas populações de células é mais extensa na neuropatia do que na inflamação. Glia ativada produz e libera fatores tróficos, neurotransmissores, citocinas e espécies reativas de oxigênio, importantes mediadores na sensibilização central (Latremoliere e Woolf, 2009). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  por astrócitos e micróglia, induz aumento da transmissão glutamatérgica e diminuição na inibição pelos interneurônios do corno dorsal da medula espinhal gerando a sensibilização por dor neuropática (Silva et al, 2015). São características da dor neuropática, dor espontânea, alodínia (sensação dolorosa frente a estímulos táteis não nocivos), hiperalgesia mecânica ou térmica (resposta aumentada a estímulos nocivos), anestesia, disestesia e hipoestesia (Sessle et. al., 2010).

## **1.3 NEURALGIA TRIGEMINAL**

### **1.3.1 VIA TRIGEMINAL**

O nervo trigêmeo é um nervo misto, predominantemente sensitivo com uma pequena porção motora, responsável pela inervação da face e cavidade oral. A raiz sensitiva subdivide-se em três ramos a partir do gânglio trigeminal: oftálmico (V1), maxilar (V2) e mandibular (V3) inervando três dermatômos faciais. A raiz motora inerva a musculatura mastigatória e segue mesmo percurso do ramo mandibular, não podendo ser distinguido deste por ressonância magnética (Leclerq et al, 2013).

O nervo trigêmeo corresponde ao 5º par craniano, é bilateral e cada um dos elementos inerva uma hemiface. Sai na base do crânio pelos forames oval (V3) e redondo (V2). V1 entra na órbita ocular pela fissura orbital superior. A raiz trigeminal emerge da ponte e segue para o interior da fossa de Meckel, uma dobra da dura máter, onde se encontra gânglio trigeminal ou gânglio de Gasser que contém corpos celulares de neurônios sensitivos. O núcleo trigeminal é amplamente distribuído no tronco encefálico do mesencéfalo à medula espinhal cervical superior (Leclerq et al, 2013).

### **1.3.2 CLASSIFICAÇÃO E FISIOPATOLOGIA DA NEURALGIA TRIGEMINAL**

A neuralgia trigeminal (NT) é um exemplo de neuropatia, no entanto acomete o nervo trigêmeo (V par craniano). Esta condição patológica é especialmente debilitante para o paciente por ser a região orofacial ricamente inervada e ter grande representação no córtex somatossensorial. Aspectos psicológicos e emocionais também são relevantes quando relacionados a essa região do corpo (Kryzanowska e Avedaño, 2012). Pacientes convivem com medo da dor apresentando alto índice de ansiedade e depressão (Macianskyte, 2011). Adicionalmente, qualidade de vida e desempenho das atividades são comprometidos (Zakrzewska, 2006). A inexistência de testes e exames específicos muitas vezes atrapalham e retardam o diagnóstico (Ibrahim, 2014), comprometem eficácia do tratamento e dificultam pesquisas científicas. Apesar da escassez de dados, estima-se que sua incidência seja de 28,9 casos a cada 100.000 habitantes (Dieleman et al, 2008). Neuralgia do nervo trigêmeo pode afetar pessoas de todas idades, (Childs, 2000), mas o maior número de casos ocorre a partir dos 50 anos, e principalmente entre 60 e 70 (Cruccu et al, 2006). Esta condição acomete mais o gênero feminino, sem diferença entre as raças (Ritter e Friedman, 2009). Tradicionalmente

classifica-se a NT em clássica ou essencial e secundária ou sintomática, e ambas diferenciam-se de acordo com sua etiologia e sintomatologia.

A neuralgia trigeminal essencial é a mais comum (Zakrzewska e McMillan, 2011). Seu diagnóstico é clínico e baseia-se nas queixas e no histórico do paciente. Caracteriza-se por uma dor intensa que pode atingir intensidade 10 na escala visual analógica de dor que varia entre 0 e 10 (Edlich, 2006). Apresenta as seguintes características: penetrante, cortante, do tipo choque. Esta dor pode ser espontânea ou surgir a partir de toque em pontos ou zonas de gatilho que, quando estimulados, deflagram crise dolorosa ipsilateral. Estas zonas de gatilho podem se localizar intra ou extra-oralmente e, às vezes, distantes do local onde a dor é percebida. Muitas vezes, o estímulo desencadeador é inócuo, caracterizando fenômeno de alodínia. A sensibilização de pontos de gatilho ocorre durante atividades cotidianas como mastigação, escovação dental, lavagem do rosto, maquiagem, barbear, toque de lençol ou do vento em uma caminhada. Isso pode ocorrer várias vezes dentro de poucas horas (Edlich, 2006), demonstrando o declínio na qualidade de vida de seus portadores devido à dor.

A NT clássica tem um comportamento paroxístico e, muitas vezes, o paciente lembra claramente do primeiro episódio. Os ataques podem durar de segundos até 2 minutos. Imediatamente após a crise, aparece o período refratário, quando um novo episódio não pode ser deflagrado. O paciente permanece sem dor entre os episódios, ela geralmente é afetado apenas um dos ramos do nervo trigêmeo, mais comumente maxilar ou mandibular, e é unilateral (Gronseth et al, 2008; Edlich, 2006 Jannetta 1967; Rappaport e Devor 1994). Exame clínico neurológico apresenta-se normal (Leclerq, 2013).

A fisiopatologia da neuralgia trigeminal essencial é controversa e não está totalmente esclarecida (Sabalys et al, 2012). O mecanismo mais aceito sugere que a neuralgia trigeminal clássica se desenvolva a partir de processo de desmielinização que pode ser decorrente de esclerose múltipla, malformação de Chiari, presença de massa dentro das cisternas em contato com a raiz do trigêmeo e compressão neurovascular (Leclerq, 2013). A compressão neurovascular é causa mais comum, sendo responsável por 80 a 90% dos casos (McLaughlin et al, 1999), reconhecida como fator etiológico por Janetta em 1967 (Janetta, 1967) sendo Hilton e colaboradores, em 1994, que descreveram em detalhes a ultraestrutura das anormalidades na região de compressão neurovascular (Hilton et al, 1994). Essa teoria encontrou suporte em exames de imagem e cirurgias subsequentes (Benes et al, 2005; Cha et al, 2011 e Chen et al, 2012) e em análises ultraestruturais de tecido neuronal, mostrando alterações histológicas no tecido. Sugere-se que o contato de um vaso tortuoso ou aberrante, frequentemente artéria cerebelar superior ou um de seus ramos (Love e Coakham, 2001),

perpendicularmente à raiz nervosa do trigêmeo, cause microtraumas, por sua pulsação, levando, com o tempo, à desmielinização. Isso acontece em uma região específica, a *root entry zone* (REZ). A REZ localiza-se de 2 a 6 mm da emergência no tronco. É um local de transição entre a mielina central (oligodendróglia) e periférica (células de Schwann). Uma erosão na bainha de mielina e, posterior remielinização bizarra ou parcial fazem com que esses neurônios se tornem hiperexcitáveis e apresentem um fenômeno conhecido como “*after discharge*”. Trata-se de uma explosão de impulsos que podem ter origem externa e duram além do tempo do estímulo, recrutamento de neurônios vizinhos por transmissão efática gerando rápida amplificação do sinal, resultando em uma explosão de dor paroxística (Zakrzewska e McMillan, 2011), impulsos ectópicos causam dor espontânea (Nurmikko e Eldridge, 2001). O mecanismo que cessa a dor e leva ao período refratário após um ataque se deve à hiperpolarização da membrana pelo influxo de íons de potássio por canais iônicos (Devor e Rappaport, 2002).

A neuralgia trigeminal sintomática é subsequente a uma patologia ou lesão traumática e a dor assemelha-se àquela sentida em decorrência de lesão em nervo espinhal. Qualquer doença ou lesão da via trigeminal pode ser responsável pela NT secundária. O conhecimento da anatomia e dos dermatômos envolvidos pode ajudar na identificação do local de origem da dor. Episódios dolorosos são longos, com duração de até 4 horas, uma dor de fundo, contínua, pode persistir entre os episódios. A dor intensifica-se no período da noite, sendo descrita como em queimação, superficial, em agulhadas, provocada por estímulos (nocivos ou não) na região afetada. Podem ser afetados os três dermatômos não havendo existência de pontos gatilho e período refratário (Merskey e Bogduk, 1994). Exemplos de lesões da via trigeminal que podem levar a NT sintomática são: lesão do núcleo trigeminal, lesão da raiz nervosa dentro das cisternas ou da fossa de Meckel, lesão do seio cavernoso e lesão de ramo distal. Estas lesões são, muitas vezes, identificáveis com exames de imagem como ressonância magnética (Leclerq, 2013).

### **1.3.3 TRATAMENTOS ATUAIS**

Atualmente, não existe cura para NT (Allsop et al, 2015). Em alguns casos, pode haver remissão espontânea dos sintomas, mas a maioria dos pacientes experimenta episódios de dor recorrentes e necessita de tratamento (Kraft, 2008). O tratamento farmacológico é de primeira escolha (Cruccu et al, 2008; Gronseth et al, 2008; Zakrzewska e Linskey, 2009). O fármaco de primeira linha é a carbamazepina, anticonvulsivante que bloqueia canais de sódio

de membrana, diminuindo sua excitabilidade e atenuando seletivamente as descargas ectópicas associadas à dor na NT. Ele é capaz de promover alívio completo da dor em poucos dias, principalmente em pacientes com diagnóstico recente. Entretanto, apesar dos bons resultados, a carbamazepina apresenta efeitos colaterais importantes como hepatossupressão, disfunção hepática, leucopenia, náusea, cansaço, sonolência e, raramente, aplasia de medula, além da possibilidade de interação medicamentosa. Seu uso deve ser iniciado com doses baixas aumentando gradativamente para minimizar esses efeitos. Doses usuais variam de 100 a 2.400 mg por dia. A maioria dos pacientes responde com doses entre 200 a 800 mg diários, divididos em duas ou três administrações (Kraft, 2008).

Substituto da carbamazepina, a oxcarbazepina, é um pró-fármaco da carbamazepina com eficácia semelhante e menos efeitos colaterais (Cruccu et al, 2008 e Gronseth et al, 2008). Por não usar sistema citocromo hepático, tem menos interações e é mais tolerável que carbamazepina. Os medicamentos de segunda linha de tratamento são baclofeno e lamotriguina, que também apresentam efeitos colaterais como fraqueza, ataxia e diplopia em altas doses (Zakrzewska e McMillan, 2011).

É importante salientar que 30% dos pacientes não respondem ao tratamento medicamentoso ou não toleram seus efeitos colaterais. (Finnerup et al, 2005; Edlich, 2006 e Attal et al, 2006). Nesses casos, pode se fazer necessária uma abordagem cirúrgica, com maior índice de sucesso quando realizada precocemente. Entretanto, NT afeta pacientes idosos, dificultando intervenção cirúrgica devido às condições de saúde geral. Técnicas cirúrgicas mais utilizadas são termocoagulação do gânglio de Gasser e descompressão neurovascular. Na termocoagulação do gânglio de Gasser, o gânglio é lesionado por calor, injeção de glicerol ou compressão mecânica por balão, sendo realizada sob intensa sedação ou anestesia geral. Pode promover alívio sintomático por até doze anos podendo ser repetida duas ou três vezes ao longo da vida.. Entretanto, tem como aspecto negativo o risco de dor por desaferentação, tão debilitante quanto NT (Leclerq, 2013; Zakrzewska e McMillan, 2011).

A descompressão neurovascular, por sua vez, preserva função trigeminal, mas é um procedimento neurocirúrgico maior com risco de mortalidade variando de 0,2 a 0,5%. Craniotomia na região pós-auricular é necessária para que a compressão do nervo seja eliminada. Complicações pós-operatórias incluem vazamentos de líquido, hematomas, meningites assépticas, diplopia e fraqueza facial. A principal complicação a longo prazo é perda auditiva ipsilateral, que pode ser maior que 10% (Zakrzewska e McMillan, 2011).

#### 1.4 ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC)

Com as limitações das terapias atuais no tratamento da neuralgia trigeminal, se faz necessária busca de novas alternativas mais toleráveis e com menos efeitos adversos. A Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) surge como possível terapia para NT por ser indolor, bem tolerada e não invasiva (Nitsche e Stagg, 2011). Apresentando resultados positivos no tratamento de outras doenças, modulando função cortical e induzindo neuroplasticidade (Nitsche et al, 2008). Estudos têm mostrado eficácia da ETCC no tratamento de sequelas relacionadas a acidente vascular encefálico (AVE) (Fregni et al 2005; Hummel et al, 2005); epilepsia (Fregni, Thome-Souza et al, 2006); depressão (Boggio, Rigonatti et al, 2007); drogadição (Fregni et al, 2008); fibromialgia (Fregni, Boggio et al, 2006) e lesões traumáticas da medula espinhal (Fregni, Boggio et al, 2006). Sua aplicação no tratamento de dor inflamatória (Laste et al, 2012), dor induzida por estresse (Adachi et al, 2012) e no transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Leffa et al, 2016) tem sido avaliada em estudos em animais.

A eletroestimulação começou a ser usada há 2.000 anos em pacientes com epilepsia e cefaleia. Scribonius Largus, Pliny the Elder e Galen usavam peixes elétricos para causar repentino torpor nos pacientes (Kellaway 1946). Cientistas modernos como Galvani e Volta passaram a estudar estimulação elétrica usando métodos científicos modernos (Priori 2003). O pioneiro na eletroterapia no tratamento de transtornos psiquiátricos foi Aldini, sobrinho de Galvani, em 1804 (Parent, 2004). Porém, após a descoberta da terapia eletroconvulsiva nos anos 30, o foco das pesquisas deixou de ser a terapia com baixa corrente. O interesse por eletroterapia com baixa corrente ressurgiu há pouco tempo, no caso da ETCC, em 2001 (Nitsche e Stagg, 2011).

Os mecanismos da ETCC não estão totalmente elucidados. Sabe-se que durante a estimulação ocorrem alterações na excitabilidade cortical, dependentes da intensidade da corrente aplicada, da duração da aplicação e da posição dos eletrodos (polaridade). A estimulação anodal aumenta a excitabilidade da membrana dos neurônios corticais durante e após a estimulação (despolarização), enquanto a catodal, diminui (hiperpolarização). Estas modificações no potencial de repouso da membrana não deflagram potenciais de ação (Nitsche et al, 2008; Reis et al, 2009; Nitsche e Stagg, 2011).

Os efeitos da ETCC têm curta duração, sendo observados por alguns minutos após o final da aplicação. Entretanto, sessões repetidas e espaçadas são capazes de prolongá-los por várias semanas. Tais efeitos decorrem de fenômenos elétricos na membrana neuronal durante

a aplicação e subsequente síntese proteica e modulação sináptica em sinapses GABAérgicas e glutamatérgicas de interneurônios corticais . A corrente anodal aumenta a concentração de cálcio intracelular e leva à expressão gênica. Sugere-se a participação de moléculas moduladoras nesse processo como catecolaminas, acetilcolina e serotonina. Na ETCC catodal, é difícil avaliar o quanto os efeitos posteriores ao tratamento dependem de mudanças na polarização da membrana, embora derivem de modulação sináptica glutamatérgica. Os neuromoduladores envolvidos são dopamina, acetilcolina e serotonina (Islam, Aftabuddin et al 1995; Liebetanz et al, 2002; Nitsche, Fricke et al, 2003; Nitsche, Grundey et al, 2004; Kuo et al, 2007; Nitsche, Kuo, Karrasch et al, 2009; Nitsche e Stagg, 2011 ).

Evidências de ETCC no tratamento de dor crônica têm sido obtidas por meio de protocolos nos quais o eletrodo de estimulação é posicionado sobre o córtex motor primário (M1), região adjacente à área de processamento da dor; e o eletrodo de referência, sobre a região supraorbital contralateral (Nitsche e Paulus, 2000, 2001) com corrente de 1 a 2 mA por 10 a 20 minutos em humanos (Nitsche et al, 2007). Estudos recentes com ratos têm utilizado corrente de 0,5 mA por 20 minutos e devido à desproporção entre o tamanho do eletrodo e do cérebro do animal, estimulação do córtex ocorre de forma generalizada (Adachi et al, 2012). Esta disposição dos eletrodos é adotada por sugerir-se que os efeitos da ETCC no alívio da dor dependam da projeção das fibras do córtex motor para outras estruturas envolvidas no processamento da dor, como o tálamo e núcleos do tronco cerebral. Assim, este efeito pode ser consequência do estímulo propagado para vias neurais rostrocaudal inibitórias da dor, resultando em uma redução da percepção da dor (Lefaucheur, 2006; Drouot et al., 2002; Lima e Fregni, 2008).

Uma forma de se avaliar a segurança da técnica de ETCC é a dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH). Esta enzima catalisa uma reação redox reduzindo, de forma reversível, convertendo piruvato em lactato. Para tanto é necessário consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) e formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD<sup>+</sup>). O contrário ocorre durante a oxidação do lactato em piruvato. LDH localiza-se no citoplasma, mas em alguns tipos celulares como astrócitos, células prostáticas e mamárias, na mitocôndrias O piruvato formado pela LDH no citoplasma, na matriz mitocondrial ou membrana mitocondrial participa da cadeia respiratória no interior da mitocôndria. Esta enzima apresenta-se em cinco isoformas diferentes de acordo com o tecido em que se encontra. Todas elas estão geralmente presentes no plasma em níveis fisiológicos. A dosagem da enzima LDH em soro pode indicar danos celulares que podem acompanhar

certas condições patológicas (Adeva et al, 2013) e pode servir de ferramenta para avaliação da segurança de novas terapias.

A ETCC tem se mostrado segura em mais de 100 artigos com indivíduos saudáveis e pacientes, não havendo relatos de efeitos colaterais importantes. Alguns pacientes relatam discreto formigamento na área abaixo do eletrodo, cefaleia, fadiga e/ou náusea. Portanto, a ETCC parece ser uma promissora alternativa terapêutica no tratamento das dores crônicas devido ao bom desempenho demonstrado até agora em pesquisas com diferentes condições patológicas e também por sua segurança e tolerabilidade (Nitsche et al, 2008; Poreisz et al, 2007).

## 2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A dor crônica é uma doença debilitante com consequências nefastas para condições física, psicológica e comportamental. Além do desconforto causado pela dor, transtornos como depressão, ansiedade e deficiências psicomotoras relacionados a quadros de dor crônica levam ao prejuízo social e econômico do paciente. Neuralgia trigeminal é a mais agonizante entre as dores orofaciais. Tratamento de primeira escolha é o farmacológico, sendo anticonvulsivantes os fármacos mais usados. Entretanto, nem todos pacientes sentem alívio significativo dos sintomas e cerca de 30% não toleram os efeitos colaterais. Em casos em que não há sucesso do tratamento farmacológico há indicação de cirurgia, no entanto seus resultados não são permanentes. Salientando que nem todos os pacientes podem ser submetidos a procedimentos cirúrgicos. Com base nessas informações, faz-se necessária a busca por novas terapias.

Neste contexto, a ETCC aparece como possível alternativa já que tem se mostrado uma terapia promissora no tratamento da dor crônica neuropática. É uma técnica é indolor, bem tolerada e não invasiva. E além disso, seus mecanismos não estão completamente elucidados, tornando válida a pesquisa pré-clínica que possibilita uma investigação mais aprofundada de seus mecanismos de ação.

### **3 HIPÓTESE**

ETCC reverte alodínia e hiperalgesia e altera parâmetros neuroquímicos induzidos por modelo de dor trigeminal em ratos.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Esta dissertação teve como objetivo avaliar o efeito da ETCC em um modelo animal de dor neuropática orofacial (neuralgia trigeminal) na resposta nociceptiva e em parâmetros bioquímicos.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1-** Avaliar o efeito do tratamento com sessões repetidas de ETCC em animais submetidos a um modelo cirúrgico de dor neuropática orofacial na alodínia mecânica utilizando o teste de Von Frey facial por filamentos;
- .2 -** Avaliar os níveis de fator de crescimento neuronal (NFG) em tronco encefálico;
- 3 -** Avaliar os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  em tronco encefálico;
- 4 -** Avaliar os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 em tronco encefálico;
- 5 –** Quantificar os níveis de Lactato Desidrogenase em soro.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas (HCPA) sob o número 14.0329 e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob o número 29.370. Foram utilizados ratos Wistar machos com 60 a 70 dias de idade, pesando entre 270 a 340g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas-moradia, confeccionadas em polipropileno, medindo 49 x 34 x 16 cm, com assoalho recoberto de serragem e com número máximo de cinco animais por caixa. Ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$ ) e livre acesso à água e ração Nuvilab (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil). Foram realizados todos os procedimentos necessários para minimizar dor e desconforto. A manutenção dos animais seguiu a Lei 11.794, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

### **5.2 DESENHO EXPERIMENTAL**

#### **5.2.1 PROTOCOLO 1**

O trabalho foi dividido em dois desenhos experimentais. Inicialmente foi realizado um projeto piloto com 21 animais para se determinar o tempo necessário entre a cirurgia e o estabelecimento da dor neuropática sem que houvesse a influência da dor pós-operatória. O parâmetro utilizado foi o teste de Von Frey facial por filamentos (seção V.5) realizado no anteriormente à cirurgia (basal), 3, 7, 10 e 14 dias após a cirurgia. Os animais foram eutanasiados após o teste comportamental, 14 dias após a cirurgia.

### 5.2.1.1 VON FREY

O teste comportamental utilizado foi Von Frey facial de filamentos. Este teste mede a sensibilidade (alodínia/hiperalgesia) mecânica e consiste na aplicação de pressão de um filamento plástico sobre a área a ser testada, no caso, vibrissas. Cada filamento apresenta uma gradação que consiste na força em gramas necessária para que ele seja flexionado.

Durante a realização do teste, um filamento é posicionado perpendicularmente à região do teste e pressionado até que seja flexionado, como visto na figura 1. Alteram-se os filamentos até que o animal apresente comportamento aversivo como retirada da face, vocalização ou ataque. O valor em gramas do filamento que desencadeia o comportamento aversivo corresponde ao limiar de sensibilidade mecânica do animal.

O teste comportamental foi realizado em diferentes tempos ao longo do estudo, possibilitando uma avaliação temporal dos efeitos da dor neuropática e do tratamento com a ETCC. Anteriormente à indução da dor neuropática, foram realizadas as medidas basais e os testes foram repetidos no décimo quarto dia pós-operatório e 24 horas após a última sessão de ETCC.

**Figura 1 - Teste de von Frey facial de filamentos.**



Fonte: autor. O filamento é pressionado na região de vibrissas perpendicularmente à face.

### 5.2.1.2 CIRURGIA

O modelo de dor utilizado para mimetizar a neuralgia trigeminal foi constrição crônica do nervo infraorbitário (CCI-ION) adaptado do modelo proposto por Imamura em 1997. As adaptações realizadas consistiram da utilização de fio de sutura de Vicryl 4.0 no lugar de

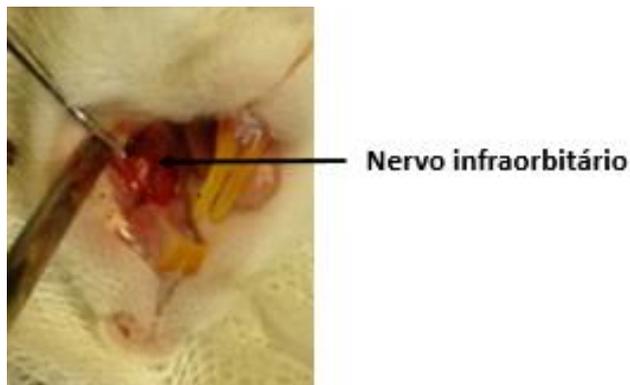
*chromic-gut 4.0* para a constrição do nervo, anestesia com cetamina (50mg/kgi.p.) + xilasina (10mg/kgi.p.) para indução e isoflurano (2% inalatório) para manutenção no lugar de sódio pentobarbital (50 mg/Kg i.p.) e sutura da incisão com fio de Vicryl 5.0 no lugar de fio de seda 4.0.

Inicialmente, os ratos foram anestesiados e o acesso cirúrgico se deu por uma incisão intraoral em maxila no lado esquerdo distante 0,5 mm da inserção do primeiro molar superior que se estendeu ao longo do fundo de sulco vestibular por cerca de 1cm no sentido anterior. Os tecidos foram divulsionados e o nervo infraorbitário, exposto e isolado com mostra a figura 2. Foram então realizadas duas ligaduras com finalidade de constrição, com 2mm de distância entre elas, com fio de Vicryl 4-0,. Após a realização das ligaduras, a incisão foi suturada com fio de Vicryl 5.0. Os animais foram mantidos em incubadora aquecida até a recuperação da anestesia.

Os animais do grupo sham foram submetidos ao mesmo procedimento de anestesia, acesso cirúrgico e sutura, porém sem a constrição do feixe nervoso. O acesso intrabucal foi realizado para que vibrissas do animal permanecessem intactas.

Após a cirurgia, foi administrado cloridrato de tramadol (5mg/kg i.p.) em intervalos de 12 horas nas primeiras 24 horas para alívio da dor, minimizando o desconforto dos animais.

**Figura 2 - Cirurgia de constrição do nervo infraorbitário em rato.**



Fonte: autor. Nervo infraorbitário isolado do tecido que o cerca com instrumento odontológico.

### **5.2.1.3 GRUPOS PROTOCOLO 1**

1. Sham dor (S) – acesso cirúrgico sem constrição do nervo
2. Dor (D) – cirurgia de constrição do nervo infraorbitário (CCI-ION)

## 5.2.2 PROTOCOLO 2

No segundo desenho experimental, foram utilizados 130 animais para avaliar o efeito da ETCC na neuralgia trigeminal no comportamento nociceptivo. O teste de von Frey por filamentos, descrito no ítem 5.2.1.1, foi realizado nos tempos basal, 14 dias após a cirurgia, decrita no ítem 5.2.1.2, imediatamente após o tratamento e 24 horas após o tratamento. Os animais foram eutanasiados 24 horas após a última sessão de ETCC. As dosagens bioquímicas foram realizadas 24 horas e 7 dias após a última sessão de tratamento.

### 5.2.2.1 TRATAMENTO

O tratamento foi realizado no segundo desenho experimental e teve início após o estabelecimento da dor neuropática, 14 dias após a cirurgia. Foram realizadas sessões de ETCC por 8 dias com duração diária de 20 minutos. A corrente aplicada foi de 0,5 mA.

Considerando que se faz necessária imobilização dos animais para evitar o deslocamento do aparato durante a aplicação de ETCC e que esta imobilização pode ser um fator gerador de estresse, foi realizada habituação prévia a esta situação. Para tanto, os ratos foram imobilizados em toalhas, da mesma maneira que durante a sessão de aplicação de ETCC, nos 5 dias que antecederam o início do tratamento.

Os eletrodos foram fixados no crânio com com fita adesiva (Micropore®) em local previamente tricotomizado para facilitar a passagem da corrente elétrica. O eletrodo de estimulação, anodal, foi posicionado na linha média interauricular e o eletrodo de referência, cátodo, na região supra-orbital (figura 3).

**Figura 3 - Posição dos eletrodos para ETCC em rato.**



Fonte: Adachi et al., 2012, com autorização. Posição do eletrodo catodal na linha média entre os olhos. O eletrodo anodal, na linha média, entre as orelhas.

### **5.2.2.2 GRUPOS PROTOCOLO 2**

1. Controle (CT) – sem procedimento cirúrgico ou tratamento
2. Sham dor (S) - acesso cirúrgico sem constrição do nervo
3. Sham dor + sham ETCC (SS) - acesso cirúrgico sem constrição do nervo + colocação dos eletrodos desligados por 20 minutos (tratamento falso)
4. Sham dor + ETCC (SE) - acesso cirúrgico sem constrição do nervo + colocação dos eletrodos ligados por 20 minutos (tratamento ativo)
5. Dor (D) - CCI ION
6. Dor + sham ETCC (DS) – CCI ION + tratamento falso  
Dor + ETCC (DE) - CCI ION + tratamento ativo

### **5.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS**

Os animais foram eutanasiados por decapitação e, posteriormente, foram coletadas amostras de tecidos (tronco encefálico, gânglio trigeminal, córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo e sangue) para futuras análises. O sangue foi retirado para centrifugação em tubos plásticos por 5 minutos em 3000 X g a temperatura ambiente. As amostras foram congelados a -80°C para posterior análise.

É importante salientar que o modelo prevê a verificação dos efeitos neuroquímicos (em estruturas do SNC) e dosagens bioquímicas que podem ser alteradas pela utilização de anestesia na eutanásia desses animais, sendo o método por decapitação utilizado para preservação morfológica das estruturas a serem analisadas. Qualquer que seja o fármaco utilizado para a eutanásia este afetará a fisiologia do animal de alguma maneira. Os anestésicos barbitúricos, mais utilizados, são potentes hipnóticos que produzem depressão dose dependente no SNC. Devido ao objetivo do trabalho, que é a preservação da fisiologia do cérebro para posterior análise, precisamos utilizar a eutanásia por guilhotinamento. A rápida eutanásia por decapitação é necessária para que se preserve ao máximo a composição molecular do tecido cerebral. Os pesquisadores têm experiência nesta forma de eutanásia não tendo tido problemas em outros trabalhos já realizados na Unidade de Experimentação Animal do HCPA e aprovado por este Comitê de Ética.

## **5.4 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS**

### **5.4.1 TNF- $\alpha$ , INTERLEUCINA 10, LACTATO DESIDROGENASE e NGF**

Os níveis de NGF, TNF- $\alpha$  e INTERLEUCINA 10 foram analisados em tronco encefálico e LDH em soro por Kit comercial ELISA (ensaio imuno enzimático) para ratos (R&D Systems, Minneapolis, United States). O tecido do tronco encefálico foi homogeneizado em solução comercial com antiproteínases (Sigma® #P8340) no volume de 1:10 e centrifugado por cinco minutos a 10.000rpm. A proteína total foi mensurada pelo método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos em pg/mg de proteína para tronco encefálico e U/L para soro.

## **5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

### **5.5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA PROTOCOLO 1**

Os dados comportamentais foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, seguido de Bonferroni e considerado significativo  $P < 0,05$ . Foi utilizado o programa SPSS versão 20 para Windows.

### **5.5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA PROTOCOLO 2**

Os cálculos estatísticos para a análise comportamental foram realizados pelo teste de Friedman, seguido de Wilcoxon. As análises bioquímicas foram feitas com ANOVA de 2 vias seguida de Student Newman Keuls (SNK),  $P < 0,05$  SPSS 20 para Windows foi utilizado no protocolo 2.

## **5.6 ASPECTOS ÉTICOS**

Os procedimentos propostos por esse projeto obedecem aos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Envolvendo Animais (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: 8th Edition Published 2011*), assim como a Lei 11794/08 de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei AROUCA), a diretriz 13 do CONCEA de 2013 e a Normativa 30 de fevereiro de 2015. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê

de Ética no Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA) sob o número 14.0329 e pelo CEUA/UFRGS sob o número 29.370.

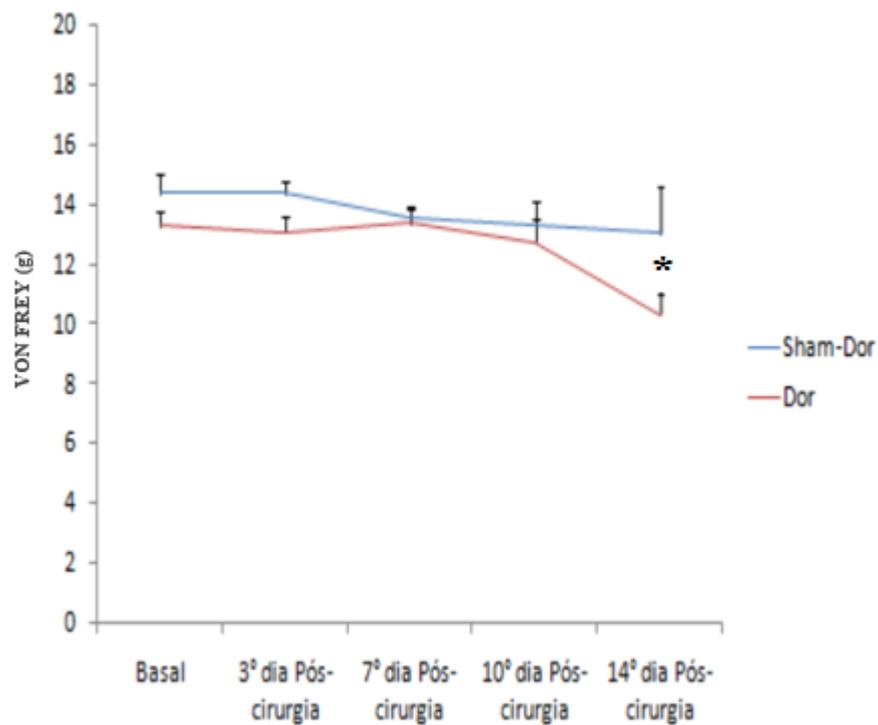
## 6 RESULTADOS

### 6.1 PROTOCOLO 1

#### 6.1.1 VON FREY PROTOCOLO 1

A hipersensibilidade mecânica foi confirmada nos animais do grupo dor (D) no 14º dia após cirurgia pela redução significativa no limiar nociceptivo. Diferindo significativamente do grupo sham do modelo cirúrgico (S), ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni ( $F_{(4,19)}=3,54$ ,  $P<0,05$ ).

Figura 4 - Efeito da cirurgia CCI-ION sobre o limiar nociceptivo mecânico.



Fonte: autor. Teste de von Frey facial por filamentos. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM (N=21). Grupos dor e sham dor. \* diferença significativa do grupo dor em relação ao grupo sham dor no 14º dia (ANOVA de medidas repetidas/ Bonferroni,  $F_{(4,19)}=3,54$ ,  $P<0,05$ ).

## 6.2 PROTOCOLO 2.

### 6.2.1 VON FREY PROTOCOLO2

Foi verificado aumento significativo no limiar nociceptivo imediatamente e 24h após a última sessão de tratamento dentro do grupo dor tratamento ativo (DE) em relação à medida de 14 dias pós-cirurgia. Não houve diferença quanto ao limiar nociceptivo entre os grupos nas medidas imediatamente e 24h após a última sessão de tratamento, Friedman/Wilcoxon:  $\chi^2=12,51$ ,  $P<0,006$ .

**Tabela 1 - Efeito da ETCC sobre o limiar nociceptivo mecânico.**

	<b>Basal</b>	<b>14 dias após CCI -ION</b>	<b>Imediatamente após ETCC</b>	<b>24h após ETCC</b>
<b>Controle</b>	100 (60-300)g	100 (100-300)g	180 (26-300)g	100 (60-300)g
<b>Sham Dor</b>	100 (60-210)g	100 (51,5-300)g	100 (51,5-300)g	60 (60-120)g
<b>Sham Dor + Sham ETCC</b>	100 (60-180)g	100 (8-100) g	100 (60-300)g	300 (100-300)g
<b>Sham Dor +ETCC</b>	100 (80-300)g	100 (80-180)g	100 (43-240)g	60 (26-200)g
<b>Dor</b>	100 (90-300)g <sup>a</sup>	26 (8-60)g <sup>b</sup>	20,5 (15-60)g <sup>b</sup>	60 (51,5-100)g <sup>c</sup>
<b>Dor +Sham ETCC</b>	100 (60-180)g <sup>d</sup>	10 (4-60)g <sup>e</sup>	26 (8-100)g <sup>d</sup>	60 (8-100)g <sup>d</sup>
<b>Dor + ETCC</b>	60 (60-90)g <sup>f</sup>	9 (6,5-23,25)g <sup>g</sup>	43 (8-60)g <sup>g</sup>	60 (26-160)g <sup>fh</sup>

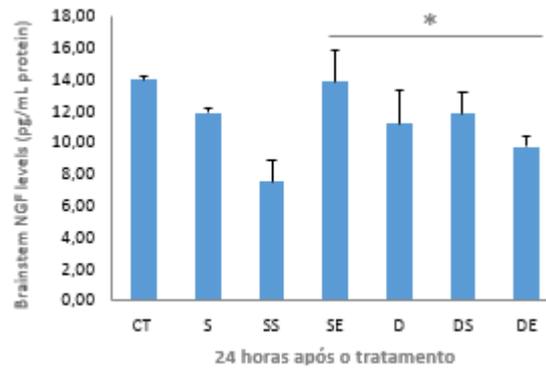
Mediana (IQ25-75)

Fonte: autor. Teste de von Frey facial de filamentos. Dados expressos em mediana, interquartil 25 e interquartil 75 (N=47). Grupos controle total (CT), sham dor (S), sham dor + sham ETCC (SS), sham dor + ETCC (SE), dor (D), dor + sham ETCC (DS), dor + ETCC (DE). Letras iguais  $p > 0,05$  intragrupo; letras diferentes  $p \leq 0,05$  intragrupo (Friedman/Wilcoxon:  $\chi^2=12,51$ ,  $P<0,006$ ).

### 6.2.2 NGF 24 HORAS APÓS TRATAMENTO

Níveis centrais de NGF foram avaliados em tronco encefálico 24 horas após a última sessão de ETCC, neste período foi observada interação entre as variáveis independentes dor e tratamento (ANOVA 2 vias/SNK  $F_{(2,38)} = 5.48$ ,  $P<0,05$ ).

**Figura 5 - Níveis de NGF em tronco encefálico 24 horas após tratamento.**

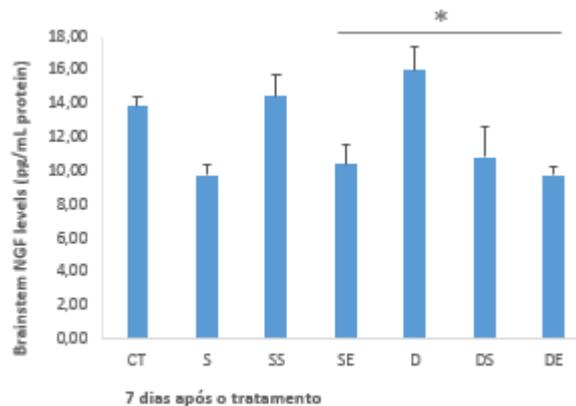


Dados apresentados em Média  $\pm$  EPM (N=44). Grupos controle total (CT), sham dor (S), sham dor + sham ETCC (SS), sham dor + ETCC (SE), dor (D), dor + sham ETCC (DS), dor + ETCC (DE). Houve interação em 24 horas após o final do tratamento entre as variáveis independentes dor X ETCC (ANOVA 2 vias/SNK  $F_{(2,38)} = 5.48$ ,  $P < 0,05$ ).

### 6.2.4 NGF 7 DIAS APÓS TRATAMENTO

A interação permaneceu sete dias após o final do tratamento, quando se observou redução dos níveis de NGF nos animais submetidos ao modelo de dor e ao tratamento com ETCC (ANOVA 2 vias/SNK  $F_{(2,44)} = 9.9$ ,  $P < 0,05$ ).

**Figura 6 - Níveis de NGF em tronco encefálico 7 dias após tratamento.**

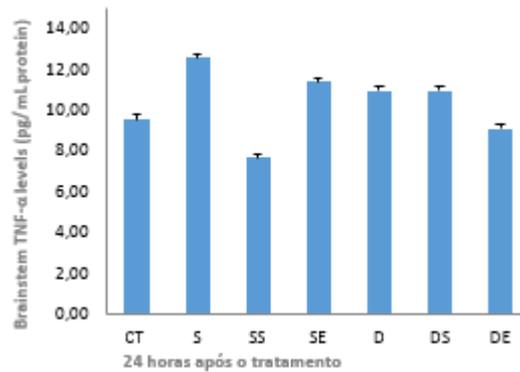


Fonte autor. Dados apresentados em Média  $\pm$  EPM (N=44). Grupos controle total (CT), sham dor (S), sham dor + sham ETCC (SS), sham dor + ETCC (SE), dor (D), dor + sham ETCC (DS), dor + ETCC (DE). Houve interação em 7 dias após o final do tratamento entre as variáveis independentes dor X ETCC (ANOVA 2 vias/SNK  $F_{(2,44)} = 9.9$ ,  $P < 0,05$ ).

### 6.2.5 TNF- $\alpha$ 24 HORAS APÓS TRATAMENTO

Vinte e quatro horas após o final do tratamento, não foi observada diferença nos níveis de TNF- $\alpha$  em tronco encefálico nos diferentes grupos experimentais, ANOVA 2 vias,  $P > 0,05$ .

**Figura 7 - Níveis de TNF- $\alpha$  em tronco encefálico 24 horas após tratamento.**

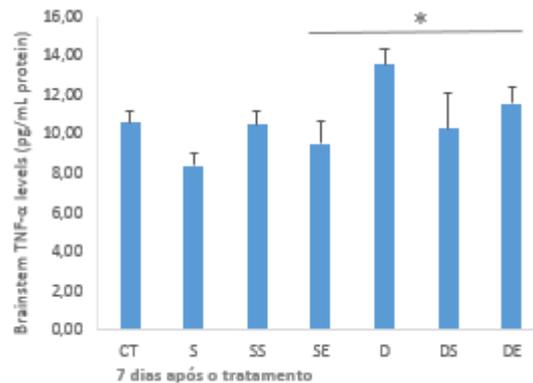


Fonte: autor. Dados apresentados em Média  $\pm$  EPM (N=44). Grupos controle total (CT), sham dor (S), sham dor + sham ETCC (SS), sham dor + ETCC (SE), dor (D), dor + sham ETCC (DS), dor + ETCC (DE). Não houve diferença significativa entre os grupos em 24 horas após o final do tratamento (ANOVA 2 vias,  $P > 0,05$ ).

### 6.2.6 TNF- $\alpha$ 7 DIAS APÓS TRATAMENTO

Sete dias após o final do tratamento, foi observada interação entre as variáveis independentes dor e tratamento, ANOVA de 2 vias/SNK,  $F_{(2,45)} = 3.3$ ,  $P < 0,05$ .

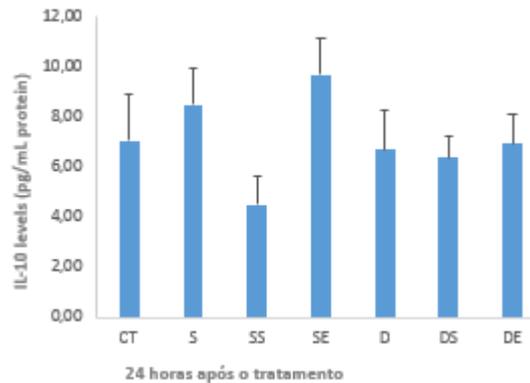
**Figura 8 - Níveis de TNF- $\alpha$  em tronco encefálico 7 dias após tratamento.**



Fonte: autor. Dados apresentados em Média  $\pm$  EPM (N=44). Grupos controle total (CT), sham dor (S), sham dor + sham ETCC (SS), sham dor + ETCC (SE), dor (D), dor + sham ETCC (DS), dor + ETCC (DE). Houve interação em 7 dias após o final do tratamento entre as variáveis independentes dor X ETCC (ANOVA 2 vias/SNK  $F_{(2,45)} = 3.3$ ,  $P < 0,05$ ).

### 6.2.7 IL-10 24 HORAS APÓS TRATAMENTO

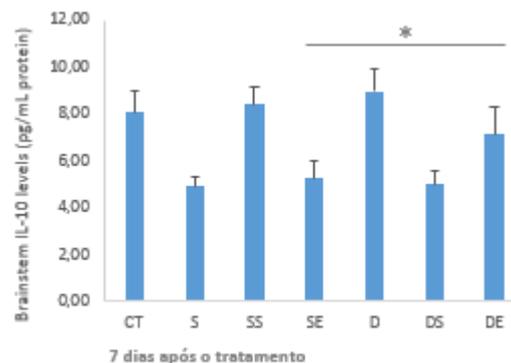
Na avaliação de 24h após a última aplicação de ETCC, não foi observado efeito do modelo ou do tratamento aplicado, ANOVA 2 vias,  $P > 0,05$ .

**Figura 9 - Níveis de IL – 10 em tronco encefálico.**

Fonte: autor. Dados apresentados em Média  $\pm$  EPM (N=44). Grupos controle total (CT), sham dor (S), sham dor + sham ETCC (SS), sham dor + ETCC (SE), dor (D), dor + sham ETCC (DS), dor + ETCC (DE). Não houve diferença significativa entre os grupos em 24 horas após o final do tratamento (ANOVA 2 vias,  $P>0,05$ ).

### 6.2.8 IL-10 7 DIAS APÓS TRATAMENTO

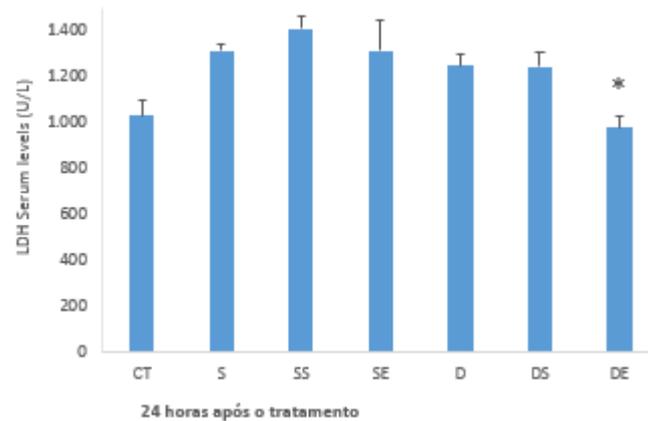
Sete dias após a última sessão de ETCC, houve interação entre as variáveis independentes dor e tratamento. ANOVA 2 vias/SNK,  $F_{(2,45)} = 10,56$ ,  $P<0,05$ .

**Figura 10 - Níveis de IL – 10 em tronco encefálico 7 dias após tratamento.**

Fonte: autor. Dados apresentados em Média  $\pm$  EPM (N=44). Grupos controle total (CT), sham dor (S), sham dor + sham ETCC (SS), sham dor + ETCC (SE), dor (D), dor + sham ETCC (DS), dor + ETCC (DE). Interação em 7 dias após o tratamento entre as variáveis independentes dor X ETCC (ANOVA 2 vias/SNK  $F_{(2,45)} = 10,56$ ,  $P<0,05$ ).

### 6.2.9 LDH 24 HORAS APÓS TRATAMENTO

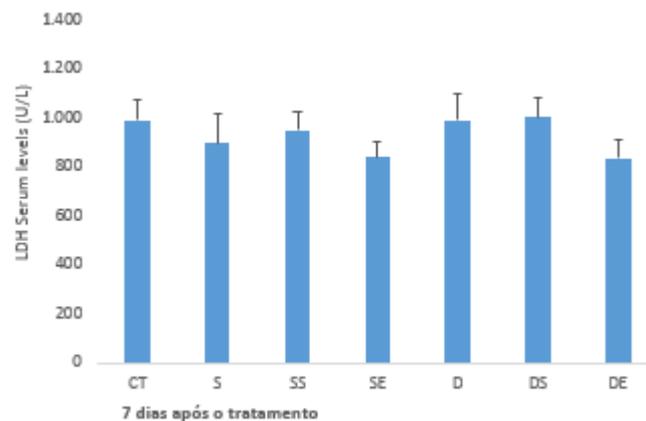
ANOVA de duas vias mostrou redução significativa nos níveis de LDH em soro em 24 horas após o tratamento no grupo dor e tratamento (DE) ( $F_{(2,46)}=13,64$ ;  $F_{(2,46)} = 3,79$ , respectivamente,  $P<0,05$ ). O tratamento com ETCC reverteu o aumento nos níveis de LDH induzido pelo procedimento cirúrgico.

**Figura 11 - Níveis de LDH em soro 24h após tratamento.**

Fonte: autor. Dados apresentados em Média  $\pm$  EPM (N=90). Grupos controle total (CT), sham dor (S), sham dor + sham ETCC (SS), sham dor + ETCC (SE), dor (D), dor + sham ETCC (DS), dor + ETCC (DE). \* diminuição significativa de LDH em soro (ANOVA 2 vias ( $F_{(2,46)}=13,64$ ;  $F_{(2,46)}=3,79$ , respectivamente,  $P<0,05$ ).

### 6.2.10 LDH 7 DIAS APÓS TRATAMENTO

Sete dias após a última sessão de ETCC, não foi observada diferença significativa entre os grupos, ANOVA de duas vias,  $P>0,05$ .

**Figura 12 - Níveis de LDH em soro 7 dias após tratamento.**

Fonte: autor. Dados apresentados em Média  $\pm$  EPM (N=90). Grupos controle total (CT), sham dor (S), sham dor + sham ETCC (SS), sham dor + ETCC (SE), dor (D), dor + sham ETCC (DS), dor + ETCC (DE). Não houve diferença significativa entre os grupos em 7 dias após o final do tratamento (ANOVA 2 vias,  $P>0,05$ ).

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 DISCUSSÃO PROTOCOLO 1

Este protocolo objetivou estabelecer um modelo eficaz de dor neuropática orofacial a partir de modelo adaptado do modelo proposto por Imamura e cols. (1997). A sensibilidade mecânica foi avaliada pelo limiar nociceptivo no teste de Von Frey filamentos visando estabelecer o momento a partir do qual a dor neuropática se instala, dissociando-a da interferência da dor inflamatória decorrente do procedimento cirúrgico.

A constrição do nervo infraorbitário tem sido citada amplamente na literatura para mimetizar neuralgia trigeminal secundária. Isso se deve ao fato de este nervo ser exclusivamente sensitivo, sem componentes autonômicos ou motores, ao contrário do nervo mandibular que possui fibras motoras além das sensitivas, o que facilita a interpretação das respostas comportamentais do animal testado. Além disso, o nervo infraorbitário compõe uma grande parte do ramo maxilar do nervo trigêmeo o que o torna sua neuropatia bastante parecida com neuralgia que afeta o ramo maxilar.

Existem na literatura várias técnicas cirúrgicas para a constrição do nervo infraorbitário que derivaram da técnica proposta por Bennett e Xie (1988) para neuropatia isquiática. Estas técnicas possuem limitações como a técnica de Gregg Dee (1973) e a de Jacquín e Zeigler (1983) que requer a remoção do olho do animal, sendo considerada um procedimento bastante agressivo. A técnica de Vos e cols. (1994) carece de detalhamento na literatura, não especificando um acesso direto ao nervo, o que dificulta sua execução (Kernisant et al, 2008). A técnica de Henry e cols. (Henry et al., 2007) emprega um acesso por incisão na região de vibrissas, o que pode prejudicar os testes comportamentais realizados nesta área. Kernisant, em 2008, propôs uma técnica com incisão na pele na região do osso frontal acessando o nervo infraorbitário no osso maxilar, dentro da órbita. Essa técnica traz o risco de lesão do nervo etmoidal anterior, além da necessidade de se afastar o globo ocular (Kernisant et al, 2008). Desta forma a escolha de uma adaptação do modelo cirúrgico de Imamura e cols. (1997) para este estudo deve-se ao fato de ser uma técnica de fácil execução, além disso, este modelo tem a vantagem de ter um acesso cirúrgico intrabucal, mantendo intacta a região de vibrissas, que será testada nas avaliações nociceptivas subsequentes. Tem como desvantagem o fato de o nervo ser constricto em uma região mais distal, abrangendo menos fibras em relação a modelos que acessam o nervo mais medialmente. Outra limitação é a formação de cicatriz intraoral em fundo de sulco, na mesma altura das vibrissas,

extraoralmente. Como a área de cicatriz pode estar com alteração sensorial (mais sensível) e a área de vibrissas é o local onde se posiciona os filamentos do teste de Von Frey, poderia gerar confusão na discriminação entre dor cicatricial e dor neuropática. As adaptações realizadas no modelo original ocorreram devido à experiência bem sucedida de nosso grupo de pesquisa no uso do anestésico isoflurano. A indução da anestesia por cetamina e xilasina foi necessária por ser o isoflurano um anestésico inalatório e a boca do animal deveria permanecer aberta durante a cirurgia, o que poderia diminuir a efetividade da anestesia. O uso do fio de vicryl em lugar do *chrome-gut* foi baseado em estudo anterior de nosso grupo no qual foi utilizado o fio de vicryl com sucesso em modelo de constrição isquiática (Cioato, 2015). A substituição do fio de seda pelo de vicryl para a sutura da incisão ocorreu devido ao fato do fio de seda ser um importante fator retentivo de placa bacteriana, o que poderia levar à inflamação da mucosa, além da presença do volume do nó intrabucalmente durante os testes, o que poderia trazer prejuízo ao teste comportamental.

O período necessário para o estabelecimento de dor neuropática após a cirurgia diverge bastante na literatura. Ele pode variar, por exemplo, de 3 dias para um modelo de constrição do nervo isquiático aferindo-se limiar mecânico pelo teste de Von Frey eletrônico e limiar térmico pelo teste da placa quente (Rifell et al, 2016) a um período entre 4 e 8 semanas para um modelo de constrição do infraorbitário pela técnica proposta por Kernisant (2008) medindo limiar mecânico e térmico com teste orofacial operante modificado (Cha et al, 2012). Os resultados obtidos neste protocolo demonstram que o modelo cirúrgico de dor neuropática orofacial empregado foi capaz de induzir dor neuropática a partir do 14º dia pós-cirúrgico. Resultado semelhante foi encontrado por Vos e cols. (1994) utilizando modelo de constrição do nervo infraorbitário, que demonstra aumento significativo na resposta à estimulação mecânica pelo teste de Von Frey filamentos do 12º ao 15º dias após a cirurgia. Também Henry e colaboradores (2007) relatam diminuição no limiar nociceptivo mecânico no teste de Semmes-Weinstein monofilamentos Isso já foi demonstrado por estudo prévio do nosso grupo em modelo de neuropatia por constrição do nervo isquiático (Cioato et al, 2015). Salientamos que o nervo isquiático difere do infraorbitário por ser um nervo misto com uma porção motora e outra sensitiva. Entretanto, mesmo apresentando diferenças funcionais, acreditamos que os resultados encontrados na neuropatia isquiática e trigeminal possam ser comparados, já que os estímulos provenientes dos dois nervos compartilham vias ascendentes a partir do lemnisco medial em direção a formação reticular e tálamo (Lent, 2010; De Marco & Pascoe, 2008; Sessle, 2010).

Nossos resultados complementam os resultados de hipersensibilidade térmica ao calor mostrados por Imamura (1997), que mostram aumento significativo na hipersensibilidade térmica a partir do 4º. dia, após o procedimento cirúrgico, com pico entre o 8º. e 12º. dias após a cirurgia. A diferença nos períodos de instalação de dor neuropática térmica e mecânica pode ser explicada pelo fato de que diferentes estímulos nociceptivos envolvem diferentes tipos de fibras em sua condução. Alodínia térmica depende de plasticidade de fibras de menor calibre, de condução lenta (fibras C), enquanto alodínia mecânica depende de alterações em fibras de maior calibre, de condução mais rápida (fibras A $\delta$  e A $\beta$ ) (Imamura et al, 1997). Também a via aferente para os dois tipos de estímulos difere. Fibras C ascendem pelo trato paleoespinal, enquanto fibras A $\delta$  e A $\beta$ , pelo trato neoespinal (Lent, 2010)

O mecanismo sugerido para instalação da dor neuropática trigeminal envolve a lesão mecânica nas fibras do nervo infraorbitário em consequência da constrição com fio. Inicialmente, o procedimento cirúrgico desencadeia reação inflamatória pela liberação de mediadores inflamatórios na região afetada considerando vasos, células epiteliais e conjuntivas. Fibras nervosas lesadas liberam moléculas como CGRP e substância P intensificando vasodilatação, eritema, edema e consequentemente, a inflamação. Os procedimentos empregados em nosso estudo (cirurgia com constrição de nervo infraorbitário, dor neuropática, e cirurgia sem constrição, sham cirurgia), desencadeiam um período inicial de reação inflamatória e consequentemente dor inflamatória. Até 14 dias o processo inflamatório sofre resolução, observada nos ratos dos grupos sham cirurgia, no entanto, os animais submetidos ao modelo de dor neuropática, permanecem com dor decorrente do estímulo constante pela pressão exercida pelo fio de sutura nas fibras nervosas. Essa pressão causa danos à bainha de mielina induzindo constante liberação de glutamato na sinapse entre os neurônios primário e secundário, no complexo sensitivo nuclear do trigêmeo. A liberação intensa e sustentada de glutamato leva a maior sensibilidade dos neurônios secundários a esse neurotransmissor facilitando o processo nociceptivo, pelos fenômenos de *wind up* e LTP gerando um estado de sensibilização central (Costigan et al, 2009; Latremoliere e Woolf, 2009). A partir da instalação da sensibilização central, surgem alodínia e hiperalgesia secundária que são responsáveis pela diminuição do limiar nociceptivo mecânico detectado no teste de Von Frey por filamentos.

A realização do protocolo 1 permitiu determinar o período de estabelecimento da dor neuropática discriminando-a da dor inflamatória. Desta forma subsidiando a escolha do protocolo ideal a ser usado no protocolo experimental 2, considerando a pressão em gramas e o período de tempo adequados a serem empregados. Neste primeiro protocolo experimental,

foi usado um teto de 15 gramas para o teste de Von Frey filamentos, valor alterado posteriormente no segundo protocolo uma vez que mostrou-se necessário um valor mais amplo de cobertura em gramas para avaliar a nocicepção neste modelo. O período de tempo de 14 dias permitiu de forma mais segura evitar a sobreposição de informações nociceptivas inflamatórias e neuropáticas temporais que se sucedem após a intervenção neste modelo cirúrgico.

## 7.2 DISCUSSÃO PROTOCOLO 2

A partir das inferências obtidas no protocolo experimental 1, buscou-se, no protocolo 2, avaliar a ETCC como alternativa terapêutica no modelo de neuralgia trigeminal proposto. A exposição à ETCC aumentou o limiar nociceptivo mecânico no teste de von Frey filamentos nos animais expostos ao modelo de dor imediatamente e 24 horas após o final do tratamento. As análises bioquímicas demonstraram diminuição nos níveis de LDH dos animais expostos à ETCC, interação entre exposição do modelo de dor e ETCC sob os níveis de NGF em 24 horas e 7 dias após o final do tratamento e sob os níveis de TNF- $\alpha$  e IL10 em 7 dias após o tratamento.

O aumento no limiar nociceptivo mecânico, observado nesta dissertação, corrobora estudos prévios que mostram efeito antinociceptivo do ETCC em estudos clínicos em pacientes fibromiálgicos (Fregni et al, 2006). Corrobora também estudos prévios de nosso grupo de pesquisa utilizando modelo de dor neuropática por constrição crônica isquiática, avaliada pelos testes da placa quente e Von Frey eletrônico (Cioato et al, 2015), dor inflamatória induzida por adjuvante completo de Freund (do inglês *complete Freund's adjuvant* - CFA) avaliada pelos testes de placa quente e von Frey filamentos (Laste et al, 2012). Entretanto cabe salientar que esta diferença ocorreu comparada com medida prévia ao tratamento (14º dia após a cirurgia) no grupo DE, porém não houve diferenças entre os grupos imediatamente e 24 horas após o tratamento demonstrando que a dor neuropática induzida pelo modelo proposto não se mantém até o 22º. dia após cirurgia, quando foi realizada a última medida nociceptiva.

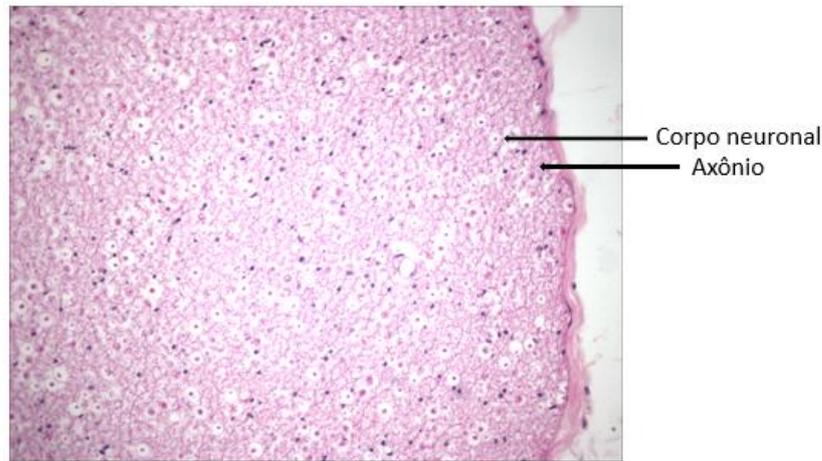
O mecanismo proposto para a ETCC envolve a passagem de corrente elétrica de baixa intensidade. Os efeitos da ETCC dependem de sua polaridade, existindo ETCC catodal, que hiperpolariza e anodal, que despolariza membrana. Com a passagem da corrente anodal, as membranas das células nervosas que se encontram abaixo do eletrodo, na área estimulada, torna-se despolarizada (Nitsche e Stagg, 2011). Esta pequena despolarização aproxima-se mas

não atinge o limiar de disparo de potencial de ação, com isso, a célula fica mais propensa a disparar (Nitsche et al, 2008). A explicação para o alívio doloroso produzido pela ETCC pode incidir sobre a atuação indireta do córtex motor, que é o alvo do tratamento com ETCC em humanos. Sugere-se que estimulação do córtex motor promova facilitação da estimulação feita por projeções corticais do córtex motor para estruturas como tálamo e córtex anterior cingulado, estas sim, envolvidas diretamente na inibição da sensação de dor ou alteração nos aspectos afetivos relacionados à dor (Drouot et al., 2002; Lima e Fregni, 2008). Estas modificações elétricas da membrana tem duração limitada a minutos após o final da aplicação. Entretanto, sessões repetidas, como foi o caso do presente estudo (8 sessões diárias consecutivas), podem prolongar seus efeitos por até várias semanas (Reis et al, 2009). Em nosso estudo observamos efeito da ETCC 24 horas após a última sessão. A permanência dos efeitos por um período maior é atribuída a alterações na expressão gênica, síntese proteica e modulação sináptica, induzida pela alteração no potencial de repouso da membrana plasmática. (Liebetanz et al, 2002; Nitsche, Fricke et al, 2003) e possível ativação glutamatérgica em interneurônios corticais (Nitsche e Stagg, 2011). É importante lembrar, que a aplicação da ETCC em ratos, devido a relação entre o tamanho do eletrodo e a pequena dimensão da cabeça do animal, não é possível sugerir que ocorra estimulação focal. Uma vez que não é possível selecionar especificamente a área de córtex motor, a estimulação provavelmente ultrapasse essa área estimulada. Mesmo assim, sugerimos que o mecanismo de ação da ETCC em ratos seja o mesmo sugerido para humanos, ou seja via córtex motor.

Quanto a ausência de diferença entre os grupos no comportamento nociceptivo no 22º. dia após a cirurgia, podemos sugerir que possa ter havido reabsorção parcial do fio de sutura, não mantendo a tensão necessária no fio durante todo o tempo de experimento. Entretanto, esta não pode ser a única explicação, uma vez que em estudo prévio de nosso grupo, empregando constrição isquiática, também utilizando um fio reabsorvível, a dor se manteve por período de até 29 dias após a cirurgia (Cioato et al, 2015). Sendo assim, outra possibilidade seria o fato de, neste modelo, a constrição do nervo ser feita depois da emergência do nervo infraorbitário na maxila, tendo pouca espessura de tecido entre ele e a mucosa de fundo de sulco superior (pode-se visualizar a sutura pela mucosa translúcida). Sendo o rato um roedor e alimentando-se de ração peletizada, que é dura, poderia haver fricção nesta área durante a alimentação ou ato de roer e modificação na tensão da constrição do nervo, o que poderia explicar a diferença temporal na manutenção da dor entre os modelos de constrição isquiática e e infraorbitária.

O gânglio trigeminal foi retirado para análises que serão realizadas futuramente. Para a confirmação da retirada correta do gânglio trigeminal, foram confeccionadas lâminas por amostragem de algumas amostras. A técnica de coloração utilizada foi hematoxilina-eosina. As lâminas foram confeccionadas na UPE. Observou-se presença de corpos celulares neuronais em meio a fibras nervosas, estrutura típica de gânglio, como mostrado na figura 13, confirmando a correta retirada do gânglio trigeminal.

**Figura 13 – Imagem histológica de gânglio trigeminal esquerdo de rato.**



Fonte: autor. Coloração hematoxilina-eosina (HE). Aumento de 40X.

Em nosso estudo avaliação de LDH em soro foi realizada na expectativa de se avaliar a segurança da técnica de ETCC empregada, já que ocorre aplicação de corrente elétrica e formação de calor na área o que poderia levar a lesão celular. Este teste permite inferir sobre possíveis danos à membrana celular, uma vez que LDH é uma enzima intracelular, níveis elevados no soro indicam morte celular por lise de membrana (Adeva-Andani et al, 2014). Como houve diminuição dos níveis de LDH no grupo submetido ao modelo de dor + tratamento (DE), podemos inferir que esta seja indicação de segurança no protocolo utilizado (corrente de 0,5 mA por 20 minutos diários por 8 dias consecutivos). É considerando que não houve alteração nos demais grupos, podemos sugerir que o efeito da ETCC foi estado dependente e protetivo em relação ao animal que apresentava a neuropatia. Esta hipótese é corroborada pela diminuição dos níveis de NGF em tronco encefálico em animais com dor neuropática e submetidos ao tratamento com ETCC, tanto 24 horas após a última sessão de tratamento quanto 7 dias, indexada pela interação entre os fatores dor e tratamento.

Sabe-se que NGF está relacionada com sobrevivência, desenvolvimento e trofismo de células nervosas centrais e periféricas (Levi-Montalcini e Angeletti, 1968) e com plasticidade

sináptica (Berry et al, 2012). A importância da diminuição de NGF pela ETCC deve-se ao fato de o NGF relacionar-se com dor, participando da formação do sistema nociceptivo, de sensibilização e alterações neuroplásticas em estados dolorosos (Misumura e Murase, 2015). Corroborando nossa hipótese, estudo prévio demonstrou que injeção de NGF em ratos produz estado de hiperalgesia (Lewin et al, 1994). No entanto, estudos que avaliam níveis teciduais de NGF e terapias de neuromodulação são conflitantes. Ao contrário dos resultados obtidos nesta dissertação, modelo de neuropatia isquiática associado ao tratamento com ETCC demonstrou aumento de NGF em córtex e medula espinal (Cioato, 2014) e aumento de NGF em núcleo rubro (Jing et al 2009). Enquanto Brunoni e cols. (2005) não observaram alterações nos níveis plasmáticos de NGF em pacientes em episódio de depressão maior submetidos a ETCC (Brunoni et al, 2015). Já em estudo com ratos a exposição à rTMS de baixa frequência, uma técnica não invasiva de neuromodulação com corrente magnética aumentou os níveis de NGF em hipocampo (Tan et al, 2013). Adicionalmente, estudo prévio de nosso grupo de pesquisa mostrou aumento de NGF em tronco encefálico em modelo de dor orofacial inflamatória induzida por CFA injetado na ATM de rato (Sacarabelot, 2015). Porém, é importante salientar as diferenças metodológicas e atividades estrutura específica de alguns fatores de crescimento, como observado pela variação de resultados envolvendo níveis NGF em diferentes estruturas cerebrais em modelos animais (Cioato, 2014, Tan et al, 2013, Sacarabelot, 2015). Entretanto modelos que desencadeiam lesão tecidual por longo período, como apresentado neste estudo, onde ocorre lesão do nervo infraorbitário, a sinalização nociceptiva constante envolve alterações plásticas em sistemas relacionados ao processamento da dor (Costigan et al, 2009; Latremoliere e Woolf, 2009). Sendo assim, podemos sugerir que o mecanismo de ação da ETCC esteja relacionado à diminuição nociceptiva causada pela resolução da dor no 22º. dia após indução do modelo de constrição infraorbitária indexado pela diminuição de NGF em tronco encefálico e que o tratamento com ETCC teve um efeito homeostático, estado dependente e resolutivo uma vez que a tendência à diminuição dos níveis de NGF somente no animal sofreu a indução do modelo de neuropatia permanece por até 7 dias após o final do tratamento com ETCC.

Na dosagem de TNF- $\alpha$  em tronco encefálico realizada 7 dias após o tratamento mostra uma tendência à diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  no grupo com dor submetido a ETCC, corroborando mais uma vez nossa hipótese de efeito estado dependente e resolutivo do ETCC. TNF- $\alpha$  é sabidamente uma citocina relacionada à patogênese da dor neuropática periférica e centralmente. Em modelo de constrição crônica isquiática em ratos foi detectado TNF- $\alpha$  no local da lesão e sofreu superestimulação com o passar do tempo (Leung e Cahill, 2010). Injeção de

TNF- $\alpha$  em gânglio da raiz dorsal de nervo que sofreu constrição crônica levou a liberação anterógrada (no local da lesão) e retrógrada (na raiz) de TNF- $\alpha$  causando alodínia no nervo constrito e nos nervos adjacentes (Schafers et al, 2003). Modelos de dor neuropática por constrição crônica de isquiático em ratos apresentam elevação dessa citocina em estruturas centrais como hipocampo (Ignatowski et al, 1999, Covey et al, 2000), locus coeruleus (Covey et al, 2000, 2002) e núcleo rubro (Li et al, 2008). Adicionalmente, Wei (Wei et al, 2008) demonstrou aumento de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em tronco encefálico de ratos submetidos a constrição do nervo infraorbitário, com aumento de fosforilação de subunidade NR1 de receptor NMDA. No entanto, este aumento de TNF- $\alpha$  não foi observado em nosso modelo, provavelmente devido avaliação de seus níveis ter ocorrido após longo tempo da exposição a injúria inicial (constrição do nervo). Pois sabidamente o TNF- $\alpha$  é uma das primeiras citocinas a ser liberada na cascata inflamatória e sua avaliação, neste estudo, foi feita em uma fase resolutive do processo neuropático. Por outro lado a tendência à diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$  observada no 22º. dia após indução do modelo, também corroboram nossa hipótese do papel resolutive e estado dependente do ETCC. Mas também não podemos deixar de sugerir um possível papel do TNF- $\alpha$  na analgesia induzida por ETCC corroborando estudo prévio do grupo em que demonstramos diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  em hipocampo de ratos submetidos aos modelos de hiperalgesia induzida por estresse crônico e tratados com ETCC (Adachi et al., 2012).

A análise dos níveis centrais de IL-10 aos 7 dias após a intervenção mostrou redução nos níveis de interleucina nos animais com dor neuropática e tratados com ETCC. Sabe-se que IL-10 é uma citocina anti-inflamatória liberada em uma fase tardia do processo inflamatório, com função protetiva, prevenindo dano tecidual excessivo causado por inflamação (Ouyang et al., 2011; Tabas e Glass, 2013) e relacionada a dor neuropática (Khan et al, 2015). Seu papel no processo doloroso não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que IL-10 reduz atividade do fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) e síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , interleucina 1 $\beta$  e interleucina 6 (Clark et al, 2013). Estudos prévios de nosso grupo mostram aumento dessa citocina no período de 7 dias após o final do tratamento com ETCC em um modelo de dor inflamatória orofacial induzida por injeção de CFA em ATM de ratos em relação ao de 24 horas. Em modelo de dor neuropática isquiática, ocorreu diminuição de IL-10 7 dias após o final do tratamento com ETCC (Scarabelot, 2015; Cioato et al, 2015).

Neste estudo, verificou-se uma tendência à diminuição de IL-10 em tronco encefálico, o que parece paradoxal, já que a ETCC provocou diminuição no limiar nociceptivo e IL-10 tem função analgésica. Entretanto, o mecanismo proposto nesta dissertação para diminuição da IL-10, TNF- $\alpha$  e NGF em tronco encefálico, onde acontece a primeira sinapse no complexo nuclear

sensitivo do trigêmeo, pode ser sugerido pela diminuição da sinalização nociceptiva que chega a regiões superiores do SNC, já que ocorre ativação de vias inibitórias descendentes da dor. Com a menor sinalização, ocorreria diminuição de liberação de mediadores relacionados a dor, mesmo a IL-10 que tem efeito analgésico (Shao et al, 2015). Ou seja, com menos dor, haveria menos citocinas pró-inflamatórias, menos neurotrofinas gerando maladaptação neuroplásticas e, conseqüentemente, também menos citocinas anti-inflamatórias, que não seriam mais necessárias.

Concluindo, nesta discussão demonstramos que o modelo animal de dor neuropática adaptado de Imamura e colaboradores, (1997), mimetiza neuralgia trigeminal secundária com relação ao comportamento nociceptivo e é adequado para experimentos de curta duração (duração inferior a 22 dias) não sendo indicado para experimentos de longa duração. Adicionalmente demosntramos que o tratamento com ETCC foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo mecânico do grupo submetido ao modelo de neuropatia para seu limiar níveis basais. Além disso, a ETCC tendeu a diminuir níveis centrais de NGF e citocinas pró-inflamatorias e anti-inflamatórias, indicando um efeito anti-inflamatório da ETCC nos animais que apresentavam dor neuropática, sugerindo um efeito resolutivo de longa duração, dependente do estado do animal. Sugerimos que esta diminuição não foi significativa devido à interação da dor com o tratamento. E estes efeitos podem ser relacionados ao efeito analgésico observado nos animais. Então podemos sugerir que a ETCC pode ser uma ferramenta não farmacológica útil no tratamentos de quadros que cursm com dor neuropática e inflamatória.

## 8 CONCLUSÕES

### 8.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir, de acordo com os objetivos que:

1. Sobre o modelo de neuralgia trigeminal adaptado de Imamura et al, 1997 empregado no protocolo 1:
  - 1.1. Necessita de 14 dias para ser instalado, sendo que, antes deste período não é possível determinar se a resposta nociceptiva é de origem inflamatória (decorrente do procedimento cirúrgico) ou neuropática (decorrente da constrição do nervo).
  - 1.2. Não perdura por 22 dias.
  - 1.3. Induz aumento de níveis de TNF- $\alpha$  em 22 dias após a cirurgia de constrição do nervo.
  - 1.4. Induz a aumento de IL-10 22 dias após a cirurgia de constrição do nervo.
2. Sobre o tratamento repetido com ETCC aplicado para tratar a dor neuropática experimental, realizado no protocolo 2:
  - 2.1. Aumenta o limiar nociceptivo mecânico em ratos submetidos ao modelo de dor imediatamente e 24 horas após o final do tratamento.
  - 2.2. Reduz os níveis de NGF em tronco encefálico em ratos submetidos ao modelo de dor 24 horas e 7 dias após o final do tratamento.
  - 2.3. Reduz os níveis de TNF- $\alpha$  em tronco encefálico em ratos submetidos ao modelo de dor 7 dias após o tratamento
  - 2.4. Induz diminuição nos níveis de IL-10 em tronco encefálico em ratos submetidos ao modelo de dor 7 dias após o tratamento
  - 2.5. Reduz os níveis de LDH em soro 24 horas após o final do tratamento.

### 8.2 CONCLUSÃO GERAL

O modelo adotado neste estudo (adaptado de Imamura et al, 1997) foi eficaz no estabelecimento de dor neuropática simulando neuralgia trigeminal secundária após 14 de cirurgia, sabendo-se, com segurança, que neste período não existe mais presença de dor inflamatória decorrente da cirurgia. Este modelo é de grande validade quando usado em estudos de menor duração, sendo contraindicado para estudos longos.

ETCC diminui a resposta nociceptiva de maneira estado dependente, ou seja, altera o comportamento nociceptivo em animais submetidos ao modelo de dor, sem alterar esta resposta em animais naive ou sham. Além disso, alterou níveis centrais de neuromoduladores (NGF) e citocinas pró e anti-inflamatórias, sugerindo efeito anti-inflamatório secundário à diminuição da sinalização nociceptiva.

A discussão proposta nesta dissertação é de grande relevância por fornecer subsídios para a pesquisa pré-clínica da neuralgia trigeminal, o que é fundamental para o avanço científico na busca por melhores terapias.

## **9 PERSPECTIVAS**

Objetivando enriquecer o conhecimento em relação ao efeito da ETCC na neuralgia trigeminal são necessários novos estudos envolvendo a quantificação de receptores NMDA e a dosagem dos níveis de BDNF em tronco encefálico. Assim como em gânglio trigeminal, uma estrutura periférica intimamente relacionada a dor orfacial. É necessária validação de modelos de dor que possibilitem um efeito mais duradouro possibilitando maior período de estudo possibilitando avaliação de tratamentos em longo prazo.

## 10 REFERÊNCIAS

Adachi LNS, Caumo W, Laste G, Medeiros LF, Rozisky JR, de Souza A, Fregni F, Torres ILS. **Reversal of chronic stress-induced pain by Transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model.** Brainresearch 1489 (2012) 17-26.

Adeva-Andany M, López-Ojén M, Funcasta-Calderón R, Ameneiros-Rodríguez E, Donapetry-García C, Vila-Altesor M, Rodríguez-Seijas J. **Comprehensive review on lactate metabolism in human health.** Mithocondrion 17(2014) 76-1000.

Aida S, Baba H, Yamakura T et al. **The effectiveness of preemptive analgesia varies according to the type of surgery: a randomized, double-blind study.** Anesth Analg 89:711-716, 1999.

Allsop M. J. Twiddy M., Grant H., Czoski-Murray C., Mon-Williams M., Mushtaq F., Phillips N., Zakrzewska J. M. Pavitt S. **Diagnosis, medication, and surgical management for patients with trigeminal neuralgia: a qualitative study.** Acta Neurochir (2015) 157:1925–1933.

Aronoff, Gerald M. **What Do We Know About the Pathophysiology of Chronic Pain? Implications for Treatment Considerations.** Med Clin N Am 100 (2016) 31–42, 2016.

Attal N, Cruccu G, Haanpaa M, et al. **EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain.** Eur J Neurol 2006; 13:1153-1169.

Benes L, Shiratori K, Gurschi M, et al. **Is preoperative high-resolution magnetic resonance imaging accurate in predicting neurovascular compression in patients with trigeminal neuralgia? A single-blind study.** Neurosurg Ver 2005; 28: 131–136.

Benett GJ., Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 1988;33:87-107

Berry A, Bindocci E, Alleva E. NGF, **Brain and Behavioral Plasticity.** Neural Plasticity Volume 2012, Article ID 784040, 9 pages.

Boggio PS, Rigonatti SP, Ribeiro RB, Myczkowski ML, Nitsche MA, Pascual-Leone A, and others. 2007. **A randomized, double-blind clinical trial on the efficacy of cortical direct current stimulation for the treatment of major depression.** *Int J Neuropsychopharmacol* 11:1–6.

Brunoni AR, Machado-Vieira R, Carlos A. Zarate Jr CA, Vieira ELM, Leandro Valiengo L, Bonseñor IM, Lotufo PA, Gattaz WF, Teixeira AL. **Assessment of non-BDNF neurotrophins and GDNF levels after depression treatment with sertraline and transcranial direct current stimulation in a factorial, randomized, sham-controlled trial (SELECT-TDCS): An exploratory analysis.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015 January 2; 0: 91–96.

Campbell JN, Raja SN, Cohen RH et al. **Peripheral Neural Mechanisms of Nociception,** em: Wall PD, Melzack R. *Textbook of Pain*. Edinburgh, Scotland, Churchill Livingstone, 1989; 22-45.

Cha J, Kim ST, Kim HJ, et al. **Trigeminal neuralgia: Assessment with T2 VISTA and FLAIR VISTA fusion imaging.** *Eur Radiol* 2011; 21: 2633–2639.

Cha M, Kohan KJ, Zuo X, Ling JX, Gu JG. **Assessment of chronic trigeminal neuropathic pain by the orofacial operant test in rats.** *Behavioural Brain Research* 234 (2012) 82–90.

Chen J, Guo ZY, Yang G, et al. **Characterization of neurovascular compression in facial neuralgia patients by 3D high-resolution MRI and image fusion technique.** *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5: 476–479.

Chen N, Zhang J, Wang P, et al. **Functional alterations of pain processing pathway in migraine patients with cutaneous allodynia.** *Pain Med* 2015;16(6): 1211–20.

Childs AM, Meaney JF, Ferrie CD, Holland PC. **Neurovascular compression of the trigeminal and glossopharyngeal nerve: three case reports.** *Arch Dis Child* 2000; 82: 311-15.

Choi BM, Lee SH, Na SM, Park DY, Lee GW, Noh G. **The time-course and RNA interference of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  expression on neuropathic pain induced by L5 spinal nerve transection in rats.** *Korean J Anesthesiol* 2015 April 68(2): 159-169.

Cioato SG, Medeiros LF, Filho PRM, Vercelino R, de Souza A, Scarabelot VL, Oliveira C, Adachi LNS, Fregni F, Caumo W, Torres ILS. **Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model.** *Brain Stimulation* (2015) 1-9.

Cioato SG. **Avaliação de Respostas Nociceptiva e Neuroquímica Induzidas por Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) em Ratos Submetidos a um Modelo de dor Neuropática.** 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

Clark AK, Old EA, Malcangio M. **Neuropathic pain and cytokines: current perspectives,** *J. Pain Res.* 6 (2013) 803–814.

Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. **Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage.** *Annu Rev Neurosci* 2009;32:1–32.

Covey WC, Ignatowski TA, Knight PR, Spengler RN. **Brain-derived TNFalpha: involvement in neuroplastic changes implicated in the conscious perception of persistent pain.** *Brain Res* 2000, 859:113-122.

Covey WC, Ignatowski TA, Renauld AE, Knight PR, Nader ND, Spengler RN: **Expression of neuron-associated tumor necrosis factor alpha in the brain is increased during persistent pain.** *Reg Anesth Pain Med* 2002, 27:357-366.

Cruccu G, Biasiotta A, Galeotti F, et al. **Diagnosis of trigeminal neuralgia: a new appraisal based on clinical and neurophysiological findings.** In: Cruccu G, Hallett M, eds. *Brainstem Function and Dysfunction.* Amsterdam, the Netherlands: Elsevier; 2006:171-186.

Cruccu G, Gronseth G, Alksne J, et al. **AAN-EFNS guidelines on trigeminal neuralgia management.** Eur J Neurol 2008; 15:1013 e 28.

De Marco, G.J.; Pascoe, P.J. **Anatomy, Physiology, and Effects of Pain.** IN: Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals.* San Diego: Elsevier, 2008, p.3-25.

Devor M, Amir R, Rappaport ZH. **Pathophysiology of trigeminal neuralgia: the ignition hypothesis.** Clin J Pain 2002; 18:4 e 13.

Dieleman JP, Kerklaan J, Huygen FJ, et al. **Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population.** Pain 2008; 137:681 e 8.

Drouot X, Nguyen JP, Pechanski M, Lefaucher JP. **The antalgic efficacy of chronic motor cortex Stimulation is related to sensory changes in the painful zone.** Brain 2002; 125: 1660-1664.

Edlich, R. F., Winters, K. L., Britt, L. D. & Long, III, W. B. **Trigeminal Neuralgia.** Journal of Long-Term Effects of Medical Implants, 200, 616 (2): 185–192. Federation of Neurological Societies. Neurology 2006; 71:1183 e 90.

Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, et al. **Algorithm for neuropathic pain treatment: A nevidence based proposal.** Pain 2005; 118:289-305

Fletcher D, Kayser V, Guilbaud G - **Influence of timing of administration on the analgesic effect of bupivacaine infiltration in carrageenin-injected rats.** Anesthesiology 84:1129-1137, 1996.

Fregni F, Boggio P, Mansur C, Wagner T, Ferreira M, Lima M, and others. 2005. **Transcranial direct current stimulation of the unaffected hemisphere in stroke patients.** Neuroreport 16(14):1551–5.

Fregni F, Boggio PS, Lima MC, Ferreira MJ, Wagner T, Rigonatti SP, and others. 2006. **A sham controlled, phase II trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of central pain in traumatic spinal cord injury.** Pain 122(1–2):197–209.

Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJ, Rocha RR, Natalle L, and others. 2006. **A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia.** Arthritis Rheum 54(12):3988–98.

Fregni F, Liguori P, Fecteau S, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Boggio PS. 2008. **Cortical stimulation of the prefrontal cortex with transcranial direct current stimulation reduces cueprovoked smoking craving: a randomized, sham-controlled study.** J Clin Psychiatry 69(1):32–40.

Fregni F, Thome-Souza S, Nitsche MA, Freedman SD, Valente KD, Pascual-Leone A. 2006. **A controlled clinical trial of cathodal DC polarization in patients with refractory epilepsy.** Epilepsia 47(2):335–42.

Garcia-Recio M. e Gascón P. **Biological e pharmacological aspects of the NK1-receptor.** BioMed Research International Volume 2015, Article ID 495704, 14 pages.

Global Industry Analysts, Inc. Report, January 10, 2011. Disponível em: <<http://www.prweb.com/pdfdownload/8052240.pdf>>. Acessado em 16 de outubro de 2015.

Gregg JM. **A surgical approach to the ophthalmic-maxillary nerve trunks in the rat.** Journal of dental research 1973;52:392.

Gronseth G, Cruccu G, Alksne J, et al. **Practice parameter: the diagnostic evaluation and treatment of trigeminal neuralgia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the European Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society (IHS).** The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). Cephalgia 2008; 33: 629-808.

Henry MA, Freking AR, Johnson LR, Levinson RS. **Sodium channel Nav1.6 accumulates at the site of infraorbital nerve Injury.** *BMC Neuroscience* 2007, 8:56.

Hilton DA, Love S, Gradidge T, Coakham HD. **Pathological findings associated with trigeminal neuralgia caused by vascular compression.** *Neurosurgery* 1994; 35: 299-3-3.

Hummel F, Celnik P, Giraux P, Floel A, Wu W, Gerloff C, and others. 2005. **Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke.** *Brain* 128(3):490–9.

Ibrahim S (2014) **Trigeminal neuralgia: diagnostic criteria, clinical aspects and treatment outcomes. A retrospective study.** *Gerodontology* 31(2):89–94

Ignatowski TA, Covey WC, Knight PR, Severin CM, Nickola TJ, Spengler RN. **Brain-derived TNFalpha mediates neuropathic pain.** *Brain Res* 1999, 841:70-77.

Imamura Y., Kawamoto H., Nakanishi O. **Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats.** *Exp Brain Res* (1997) 116:97-103

Institute of Medicine Report from the Committee on Advancing Pain Research, Care, and education: relieving pain in America, a blueprint for transforming prevention, care, education and research. Baltimore (MD): TheNationalAcademies Press; 2011.

Islam N, Aftabuddin M, Moriwaki A, Hattori Y, Hori Y. 1995. **Increase in the calcium level following anodal polarization in the rat brain.** *Brain Res* 684(2):206–8.

Janetta PJ. **Arterial compression of the trigeminal nerve at the pons in patients with trigeminal neuralgia.** *J Neurosurg* 1967; 26 Suppl: 159-62.

Jacquin MF, Zeigler HP. **Trigeminal orosensation and ingestive behavior in the rat.** *Behavioral neuroscience* 1983;97:62–97.

Jensen T S. **Pathophysiology of pain: from theory to clinical evidence.** *European Journal of Pain Supplements* 2 (2008) 13–17.

Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, Treede RD. **A new definition of neuropathic pain.** *Pain.* 2011 Oct;152(10):2204-5.

Jing YY, Wang JY, Li XL, Wang ZH, Pei L, Pan MM, Dong XP, Fan GX, Yuan YK. **Nerve growth factor of red nucleus involvement in pain induced by spared nerve injury of the rat sciatic nerve.** *Neurochem Res.* 2009; 34(9):1612-1618.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M. **Princípios da neurociência.** Ed Manole. Cp 24: 477-478, 483.2000.

Kellaway P. 1946. **The part played by electric fish in the early history of bioelectricity and electrotherapy.** *Bull Hist Med* 20:112–37.

Kernisant M, Gear R, Jasmin L, Vit J, Ohara T. **Chronic Constriction Injury of the Infraorbital Nerve in the Rat using modified syringe needle.** *J Neurosci Methods.* 2008 July 15; 172(1): 43–47.

Khan J, Ramadan K, Korczeniewska O, Anwer MM, Benoliel R, Eliav E. **Interleukin-10 levels in rat models of nerve damage and neuropathic pain.** *Neuroscience Letters* 592 (2015) 99–106.

Khan M, Smith MT. **Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology.** *Molecules* 2015, 20, 10657-10688.

Klaumann, P. R.; Wouk, A. F. P. F.; Sillas, T. **Pathophysiology of pain.** *Archives of Veterinary Science*, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

Kraft R. **Trigeminal Neuralgia.** *American Family Physician* 2008, Volume 77, Number 9: 1291-1296.

Kryzanowska A., Avedaño C. **Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain.** *Brain and Behavior* 2012; 2(5): 678-697.

Kuo M-F, Grosch J, Fregni F, Paulus W, Nitsche MA. 2007. **Focusing effect of acetylcholine on neuroplasticity in the human motor cortex.** *J Neurosci* 27(52):14442–7.

Laste G, Caumo W, Adachi LN, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PR, Partata WA, Fregni F, Torres IL. **After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation.** *Exp Brain Res.* 2012; 221(1): 75.

Latremoliere A e Woolf CJ. **Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity.** *J Pain.* 2009 September ; 10(9): 895–92.

Leclercq D., Thiebaut J.-B., Héran F. **Trigeminal neuralgia. Diagnostic and Interventional Imaging** (2013) 94, 993—1001.

Lefaucher JP. **The use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in chronic neuropathic pain.** *Neurophysiologie Clinique* 36 (2006) 117–124.

Leffa DT, de Souza A, Medeiros LF, de Oliveira C, Grevet EH, Caumo W, de Souza DO, Rohde LA, Torres IL. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2016 Feb;26(2):368-377.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Caumo%20W%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=26792443](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Caumo%20W%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=26792443)

Lent, R. **Cem Bilhões de Neurônios.** Atheneu, 2ª edição 165-173, 2010.

Leung S, Cahill CM. **TNF- $\alpha$  and neuropathic pain - a review.** *Leung and Cahill Journal of Neuroinflammation* 2010, 7:27.

Levi-Montalcini R.; Angeletti P. U. **Physiol Rev**, 1968, 48, 534-569.

Lewin GR, Rueff A, Mendell LM (1994) **Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia.** *Eur J Neurosci* 6(12):1903–1912.

Liebetanz D, Nitsche MA, Tergau F, Paulus W. 2002. **Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DCstimulation– induced after-effects of human motor cortex excitability.** *Brain* 125(Pt 10):2238–47.

Lima MC, Fregni F. **Motor cortex stimulation for chronic pain: systematic review and meta-analysis of the literature.** *Neurology*. 2008 Jun 10;70(24):2329-37

Loeser, J.D.; Butler, S.H.; Chapman, C.R.; Turk, D.C (eds). *Bonica's Management of Pain*. 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

Love S, Coakham HB. **Trigeminal neuralgia: pathology and pathogenesis** [published correction appears in *Brain*. 2002;125(pt 3):687]. *Brain*. 2001;124(pt 12):2347-2360.

Macianskyte D, Januzis G, Kubilius R, Adomaitiene V, Sciupokas A (2011) **Associations between chronic pain and depressive symptoms in patients with trigeminal neuralgia.** *Medicina (Kaunas)* 47(7):386–392.

McLaughlin MR, Janetta PJ, Clyde BL, Subach BR, Comey CH, Resnick DK. **Microvascular decompression of cranial nerves: lessons learned after 4400.** *Neurosurg* 1999; 90: 1-8.

Melzack R, Wall PD, TY TC. **Acute pain in an emergency clinic: latent of onset and descriptor patterns related to different injuries.** *Pain* 14:33-43, 1982.

Merskey H, Bogduk N (1994) **Task Force on Taxonomy of the International Association for the Study of Pain: Detailed descriptions of pain syndromes, classification of chronic pain, descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms**, 2nd ed. IASP Press, Seattle, pp 39, 59–61.

Mizumura K, Murase S. **Role of Nerve Growth Factor in Pain.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015. H.-G. Schaible (ed.), Pain Control, Handbook of Experimental Pharmacology 227. Neuropathic Pain Model. *Brain Stimulation* (2015) 1-9.

Nijs J, Van Houdenhove B, Oostendorp RA. **Recognition of central sensitization in patients with musculoskeletal pain: Application of pain neurophysiology in manual therapy practice.** *Man Ther* 15: 135-41, 2010.

Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann E, Priori A, Lang N, Antal A, and others. 2008. **Transcranial direct current stimulation: state of the art 2008.** *Brain Stimul* 1:206–23.

Nitsche MA, Doemkes S, Karakose T, Antal A, Liebetanz D, Lang N, and others. 2007. **Shaping the effects of Transcranial direct current stimulation of the human motor cortex.** *J Neurophysiol* 97(4):3109–17.

Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N, and others. 2003. **Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans.** *J Physiol* 553(Pt 1):293–301.

Nitsche MA, Grundey J, Liebetanz D, Lang N, Tergau F, Paulus W. 2004. **Catecholaminergic consolidation of motor cortical neuroplasticity in humans.** *Cereb Cortex* 14(11):1240–5.

Nitsche MA, Kuo MF, Karrasch R, Wachter B, Liebetanz D, Paulus W. 2009. **Serotonin affects transcranial direct current induced neuroplasticity in humans.** *Biol Psychiatry* 66(5): 503–8.

Nitsche MA, Paulus W. 2000. **Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation.** *J Physiol* 527(3):633–9.

Nitsche MA, Paulus W. 2001. **Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans.** *Neurology* 57:1899–901.

Nitsche MA, Stagg CJ. **Physiological Basis of Transcranial Direct Current Stimulation.** 2011. *The Neuroscientist* 17(1) 37– 53.

Nurmikko T. J., Eldridge P. R. **Trigeminal neuralgia – pathophysiology and current treatment.** *British Journal of Anaesthesia* 87(1): 117-32 (2001).

Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. **Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease.** *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 71-109.

Parent A. 2004. **Giovanni Aldini: from animal electricity to human brain stimulation.** Can J Neurol Sci 31:576–84.

Piotrowski W, Foreman JC **Generelated peptide on histamine release.** Br J Dermatol. Some effects of calcitonin in human skin and 114: 37-46, 1986.

Poreisz C, Boros K, Antal A, Paulus W. 2007. **Safety aspects of transcranial direct current stimulation concernng healthy subjects and patients.** Brain Res Bull 72:208–14.

Priori A. 2003. **Brain polarization in humans: a reappraisal of an old tool for prolonged non-invasive modulation of brain excitability.** Clin Neurophysiol 14:889–95.

Rappaport ZH, Devor M (1994) **Trigeminal neuralgia: the role of self-sustaining discharge in the trigeminal ganglion.** Pain 56:127–138.

Reis J, Schambra HM, Cohen LG, Butch E R, Fritsch B, Zarahn E, and others. 2009. **Noninvasive cortical stimulation enhances motor skill acquisition over multiple days through an effect on consolidation.** Proc Natl Acad Sci U S A 106(5):1590–5.

Rieffel APK, de Souza JA, Santos MCQ, Horst A, Scheid T, Kolberg C, Belló-Klein A, Partata WA. **Systemic administration of vitamins C and E attenuates nociception induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats.** Brain Research Bulletin 121 (2016) 169–177.

Ritter M, Friedman A. **Trigeminal neuralgia. A debilitating pain syndrome.** Adv Nurse Pract 2009; 17: 51–52.

Russo CM, Brose WG. **CHRONIC PAIN.** Annu. Rev. Medicine 1998. 49:123.33

Scarabelot VL. **Abordagens Farmacológica e não Farmacológica em Modelo de Dor Crônica Orofacial: Avaliações Comportamentais e Neuroquímicas.** 2015. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

Schafers M, Lee DH, Brors D, Yaksh TL, Sorkin LS: **Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation.** J Neurosci 2003, 23:3028-3038.

Schaible, H.G. **Peripheral and central mechanisms of pain generation.** Handbook of Experimental Pharmacology, v.177, n.3, p.28, 2007.

Sessle B. J.; Lavigne G. J.; Lund J. P.; Dubner R. **Dor Orofacial** Ed. Quintessence, 2<sup>a</sup> ed, 2010).

Shao Q, Li Y, Wang Q, Zhao J. **IL-10 and IL-1b Mediate Neuropathic-Pain Like Behavior in the Ventrolateral Orbital Cortex.** Neurochem Res (2015) 40:733–739.

Silva GD, Lopes P, Fonoff ET, et al. **The spinal anti-inflammatory mechanism of motor cortex stimulation: cause of success and refractoriness in neuropathic pain.** J Neuroinflammation 2015;12(1):10.

Staud, R., 2006. **Biology and therapy of fibromyalgia: pain in fibromyalgia syndrome.** Arthritis Res. Ther. 8, 208–214.

Staud, R., Rodriguez, M.E., 2006. **Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome.** Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2, 90–98.

Tabas I, Glass CK. **Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities.** Science. 2013; 339(6116): 166-172.

Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. **Behavior evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve.** The journal of neuroscience, may 1994, 14(5): 2708-2723.

Wei F, Guo W, Zou S, Ren K, Dubner R: **Supraspinal glial-neuronal interactions contribute to descending pain facilitation.** J Neurosci 2008, 28:10482-10495.

Zakrzewska JM, Association TN (2006) **Insights: facts and stories behind trigeminal neuralgia** Trigeminal Neuralgia Association, Gainesville.

Zakrzewska JM, Linskey ME. **Trigeminal neuralgia**. Clin Evid (Online) 2009; 2009:1207.

Zakrzewska JM, McMillan R. **Trigeminal neuralgia: the diagnosis and management of this excruciating and poorly understood facial pain**. Postgraduate Medical Journal 2011; 87:410–6.

## 11 ANEXOS

### 11.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 140329

**Data da Versão do Projeto:** 24/07/2014

**Pesquisadores:**

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES  
LICIANE FERNANDES MEDEIROS  
VANESSA LEAL SCARABELOT  
CARLA DE OLIVEIRA  
ETIANE MICHELI MEYER CALLAI

**Título:** IMPACTO DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC) NA RESPOSTA COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE NEURALGIA TRIGEMINAL

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 02 de outubro de 2014.

Biol. Michael Everton Andrades  
Vice-coordenador CEUA/HCPA



**UFRGS**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRO-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 29370

**Título:** IMPACTO DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC) NA RESPOSTA COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE NEURALGIA TRIGEMINAL

**Vigência:** 01/06/2015 à 01/12/2016

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES - coordenador desde 01/06/2015  
 MARIA FLAVIA MARQUES RIBEIRO - pesquisador desde 01/06/2015  
 ALEXANDRE SILVA DE QUEVEDO - Outra Função desde 01/06/2015  
 VANESSA LEAL SCARABELOTTI - Aluno de Doutorado desde 01/06/2015  
 Carla de Oliveira - Aluno de Doutorado desde 01/06/2015

**Equipe Externa:**

Liciane Fernandes Medeiros - pesquisador desde 01/06/2015

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 223, ratos Wistar, 55 e 65 dias, machos, provenientes de Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Segunda-Feira, 5 de Outubro de 2015

CRISTIANE MATTE  
Coordenador da comissão de ética

## 11.2 DIVULGAÇÕES

Apresentações e publicações em anais de congressos relacionadas à Dissertação:

**Callai EMM**, Medeiros LF, Scarabelot VL, Oliveira C, Torres ILS. Efeito do tratamento com estimulação elétrica transcraniana por corrente contínua (ETCC) em ratos submetidos a um modelo de neuralgia trigeminal. **In: 35ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2001, Porto Alegre – RS.**

Rios DES, **Callai EMM**, Medeiros LF, Scarabelot VL, Oliveira C, Torres ILS. Curva de resposta nociceptiva em modelo de dor neuropática trigeminal em ratos Wistar. **In: 35ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2001, Porto Alegre – RS.**