

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

JAMILE BOFF

EFEITO DE SESSÃO ÚNICA DE ETCC SOBRE RESULTADO DO
COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO MECÂNICO E SOBRE OS NÍVEIS CEREBRAIS
DE TNF- α EM RATOS *NAIVE*

PORTO ALEGRE

2020

JAMILE BOFF

EFEITO DE SESSÃO ÚNICA DE ETCC SOBRE RESULTADO DO
COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO MECÂNICO E SOBRE OS NÍVEIS CEREBRAIS
DE TNF- α EM RATOS *NAIVE*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Silva de Quevedo

Porto Alegre
2020

CIP - Catalogação na Publicação

Boff, Jamile
EFEITO DE SESSÃO ÚNICA DE ETCC SOBRE RESULTADO DO
COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO MECÂNICO E SOBRE OS NÍVEIS
CEREBRAIS DE TNF- α EM RATOS NAIVE / Jamile Boff. --
2020.
47 f.
Orientador: Alexandre Silva de Quevedo.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2020.

1. Estimulação Transcraniana por Corrente
Contínua.. 2. Nocicepção.. 3. TNF- α .. 4. Dor.. I. de
Quevedo, Alexandre Silva, orient. II. Título.

JAMILE BOFF

EFEITO DE SESSÃO ÚNICA DE ETCC SOBRE RESULTADO DO
COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO MECÂNICO E SOBRE OS NÍVEIS CEREBRAIS
DE TNF- α EM RATOS *NAIVE*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Cirurgiã-Dentista em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Silva de Quevedo.

Aprovada em: Porto Alegre, 13 de novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Alexandre Silva de Quevedo

Professor adjunto do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Odontologia da UFRGS, membro permanente do PPG-Neurociências, PPG-Odontologia, PPG-Farmacologia e Terapêutica e Coordenador do Grupo de Estudos em Neurociência da Faculdade de Odontologia-UFRGS. Membro titular da CEUA/UFRGS.

Profa. Dra. Adriana Fernanda Kuckartz Vizuet

Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica (UFRGS-2012 e 2017). Atualmente, bolsista PNPd CAPES de pós-doc, no PPG de Ciências Biológicas: Bioquímica.

Ma. Etiane Micheli Meyer Callai

Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Atualmente é doutoranda do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, venho agradecer os meus pais por sempre terem me apoiado em todos os momentos da minha trajetória na faculdade de Odontologia da UFRGS. Agradeço, dessa forma, a dedicação, o incentivo e a confiança depositada em mim independentemente de qualquer adversidade. Amo vocês, e agradeço todos os dias por ter uma família tão maravilhosa, alegre e linda como vocês; meu amor é incondicional, amarei eternamente.

Agradeço ao meu namorado, Mateus Francisco Ambros da Silva, por sempre estar me ajudando em todos os momentos que eu mais precisava, por ter nunca reclamando dos meus dias de tristeza e de apreensão. Sempre esteve me incentivando, apoiando e me ajudando de todas as maneiras possíveis. Diante disso, eu agradeço por estar ao meu lado e ser essa pessoa incrível que és. Obrigada por estar em minha vida. Te amo.

Agradeço de antemão o meu orientador, Professor Doutor Alexandre Silva de Quevedo, por sua paciência, generosidade, compreensão e apoio nos momentos em que mais necessitei. Obrigada por ser essa pessoa que me dá forças para seguir em frente, por ser um exemplo a ser seguido. Espero um dia poder ser assim como você, uma pessoa iluminada, inteligente, lutando em prol dos estudos e da pesquisa.

Agradeço à farmacêutica, mestra e cirurgiã-dentista Lisandra Eda Fusinato Zin, por ser um anjo que literalmente caiu do céu. Anjo que está para cuidar, zelar, proteger dos males. É meu arcanjo que sempre me apoiou, ajudou e me incentivou para nunca desistir dos meus sonhos. Muito obrigada por ser, estar presente, por me levantar dos momentos difíceis, por sanar minhas dúvidas, por ser essa pessoa incrível e admirável que és. Um anjo de nome Lisandra.

A todos do Grupo de Estudos em Neurociências, que se mostraram colegas excepcionais e junto dos quais adquiri muito conhecimento; torço muito pelo sucesso de todos!

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação, ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e à Financiadora de Estudos e Projetos (FIPE) por possibilitarem a realização deste projeto.

RESUMO

A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) tem se mostrado uma alternativa de tratamento para várias patologias neuropsiquiátricas. Destaca-se como uma abordagem não invasiva e indolor. Estudos têm demonstrado que ela atua sobre células do sistema, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Assim sendo, objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de sessão única de ETCC sobre resultado do comportamento nociceptivo mecânico em relação aos níveis cerebrais de TNF- α em ratos *naive*. Foram utilizados 100 ratos *Wistar* machos, divididos em 10 grupos experimentais (n=10/grupo), de acordo com o período transcorrido entre a intervenção (ETCC) e o teste nociceptivo mecânico (von Frey) e a eutanásia. Os grupos foram: controle total (CT), controle comportamento (CC), ETCC 30 minutos, ETCC 60 minutos, ETCC 120 minutos, ETCC 24 horas, *Sham* ETCC 30 minutos, *Sham* ETCC 60 minutos, *Sham* ETCC 120 minutos e *Sham* ETCC 24 horas. A intervenção consistiu na submissão do animal a uma sessão de 20 minutos de ETCC bimodal, com intensidade de corrente de 0,5 mA sobre o córtex motor primário (M1). Os grupos dos animais *Sham* ETCC permaneceram sob as mesmas condições, porém com os eletrodos de ETCC desligados (falsa estimulação). A dosagem de TNF- α em córtex cerebral foi realizado com *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Os resultados mostraram que os animais que receberam ETCC apresentaram aumento do limiar mecânico (Grupo Basal *versus* pós-tratamento) 30 e 60 minutos após o tratamento ($p < 0.05$). Os níveis de TNF- α foram diminuídos em 30 minutos nos animais tratados quando comparados aos que receberam procedimento *sham* ($p < 0.05$). Em decorrência disso, os dados desta pesquisa poderão contribuir para formular novos protocolos para prevenir processos inflamatórios e dolorosos, em humanos, reduzindo custos e melhorando a qualidade de vida através do uso da ETCC.

Palavras-chave: Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua. Nocicepção. TNF- α . Dor.

ABSTRACT

Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) has been shown to be an alternative treatment for various neuropsychiatric pathologies. It stands out as a non-invasive and painless approach. Studies have shown that it acts on cells in the system, decreasing the release of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of a single session of ETCC on the result of mechanical nociceptive behavior in relation to brain levels of TNF- α in naive rats. 100 male Wistar rats were used, divided into 10 experimental groups (n =10/group), according to the period between the intervention (ETCC) and the mechanical nociceptive test (von Frey) and euthanasia. The groups were: total control (CT), behavior control (CC), ETCC 30 minutes, ETCC 60 minutes, ETCC 120 minutes, ETCC 24 hours, *Sham* ETCC 30 minutes, *Sham* ETCC 60 minutes, *Sham* ETCC 120 minutes and *Sham* ETCC 24 hours. The intervention consisted of submitting the animal to a 20-minute session of bimodal ETCC, with a current intensity of 0.5 mA over the primary motor cortex (M1). The groups of *Sham* ETCC animals remained under the same conditions, but with the ETCC electrodes turned off (false stimulation). The measurement of TNF- α in the cerebral cortex was performed with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The results showed that the animals that received ETCC showed an increase in the mechanical threshold (Basal Group *versus* post-treatment) 30 and 60 minutes after treatment ($p < 0.05$). The levels of TNF- α were decreased in 30 minutes in the treated animals when compared to those that received a sham procedure ($p < 0.05$). As a result, the data from this research may contribute to formulating new protocols to prevent inflammatory and painful processes in humans, reducing costs and improving quality of life through the use of ETCC.

Keywords: Transcranial Direct Current Stimulation. Nociception. TNF- α . Pain

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental.....	22
Figura 2 – Adaptação à contenção dos animais dos grupos ETCC e <i>Sham</i> -ETCC.....	24
Figura 3 – Sessão de ETCC em ratos <i>Wistar</i>	28
Figura 4 – Sessão de ETCC em ratos <i>Wistar</i> grupo <i>Sham</i> -ETCC.....	28
Figura 5 – Quantificação dos dados do von Frey após o tratamento com a ETCC.....	34
Figura 6 – Avaliação quantitativa do TNF- α	36

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	Controle total
CC	Controle comportamento
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos
E30	Grupo tratamento 30 minutos
E60	Grupo tratamento 60 minutos
E120	Grupo tratamento 120 minutos
E24h	Grupo tratamento 24 horas
EEC	Comissão das Comunidades Europeias
EEG	Eletroencefalograma
EGTA	Etileno ácido glicol-bis (-aminoetil) -N, N, N, N-tetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ETCC	Estimulação trancraniana por Corrente Contínua
ETCC 30	Eutanasiados 30 minutos após ETCC
ETCC 60	Eutanasiados 60 minutos após ETCC
ETCC 120	Eutanasiados 120 minutos após ETCC
ETCC 24h	Eutanasiados 24 horas após ETCC
EUA	Estados Unidos da América
FNTR	Fator de necrose tumoral
FNTR1	Fator de necrose tumoral R1
FNTR2	Fator de necrose tumoral R2
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IL-1 β	Interleucina um-beta

IL-6	Interleucina seis
IL-10	Interleucina dez
IASP	International Association for the Study of Pain
NACL	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Hidrogenofosfato dissódico
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	Fosfato de sódio monobásico
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
pH	Potencial hidrogeniônico
S1	Somatossensorial
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
S30	Grupo que recebeu o falso tratamento 30 minutos
S60	Grupo que recebeu o falso tratamento 60 minutos
S120	Grupo que recebeu o falso tratamento 120 minutos
S24h	Grupo que recebeu o falso tratamento 24 horas
<i>Sham</i> ETCC 30	Grupo que recebeu o falso tratamento 30 minutos
<i>Sham</i> ETCC 60	Grupo que recebeu o falso tratamento 60 minutos
<i>Sham</i> ETCC 120	Grupo que recebeu o falso tratamento 120 minutos
<i>Sham</i> ETCC 24h	Grupo que recebeu o falso tratamento 24 horas
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UAMP	Unidade de Análise Molecular e de Proteínas
UEA	Unidade de Experimentação Animal
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE ABREVIações

cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
I/A	Intensidade da corrente elétrica/medida em Ampére
g	Gramma
kDa	Kilodalton
M1	Córtex Cerebral Motor M1
mA	<i>Milliampere</i>
mg/ml	Miligramma/mililitro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Nº	Número
pg/ml	Picogramma/mililitro
pg/mg	Picogramma/miligramma
rpm	Rotação por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μL	Microlitro
%	Porcentagem
=	Igual
\pm	Mais ou menos
®	Marca registrada
A/m^2	Ampére/metros quadrados
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 HIPÓTESE	19
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	20
4 OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GERAL.....	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
5 MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	22
5.2 LOCAL DA PESQUISA.....	23
5.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	23
5.4 CÁLCULO AMOSTRAL.....	24
5.5 CONTENÇÃO.....	24
5.6 DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
5.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	25
5.8 GRAU DE SEVERIDADE	26
5.9 GRAU DE INVASIVIDADE	26
5.10 ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA EM RATOS ..	27
5.11 TESTE NOCICEPTIVO MECÂNICO (VON FREY).....	29
5.12 RANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS	30
5.13 FATORES DE EXCLUSÃO DE ANIMAIS E PONTO FINAL HUMANITÁRIO	30
5.14 PERDA DE ANIMAIS.....	30
5.15 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	31
6 PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DO TECIDO NERVOSO	32
6.1 ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	32
6.1.1 Preparo da amostra	32
6.1.2 Quantificação dos níveis teciduais de TNF-α	32
6.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
7 RESULTADOS	34
7.1 TESTE NOCICEPTIVO MECÂNICO.....	34

7.1.2 Von Frey	34
7.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS: QUANTIFICAÇÃO DA TNF- α	35
8 DISCUSSÃO	37
9 RECONHECIMENTOS	39
10 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXO	47

1 INTRODUÇÃO

A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) é uma técnica de ativação do sistema nervoso central, não invasiva (NITSCHKE *et al.*, 2003; 2011; 2008). Possui fácil execução, aplicação simples e oferece pouco ou nenhum risco para os indivíduos (BENHAMOU *et al.*, 2008; NITSCHKE *et al.*, 2011). *A priori*, é uma modalidade de estimulação cerebral e indolor (LANG *et al.*, 2005). Além disso, trata-se de método seguro em seres humanos e pode ser combinada com outras intervenções, como no tratamento de epilepsia, depressão, das dores de origem inflamatória e neuropática (FREGNI *et al.*, 2016a; BOGGIO *et al.*, 2008; LASTE *et al.*, 2012; CIOATO *et al.*, 2016).

Em síntese, a ETCC configura-se como uma ótima ferramenta para a modulação da excitabilidade neuronal cortical (STAGG; NITSCHKE, 2011), uma vez que apresenta baixo risco e pouco desconforto para os pacientes. Em virtude disso, a utilização em sessões repetidas tem como provável o efeito duradouro da estimulação (LANG *et al.*, 2005). Logo, o efeito da ETCC em um curto prazo (efeito imediato) é devido a uma diminuição (anódica) ou aumento (catódica) do limiar de repouso neuronal (RUSCHEWEYH *et al.*, 2011). Por conseguinte, a ETCC envolve a aplicação de corrente direta constante de baixa intensidade 1 – 2 mA no escalpo, através de eletrodos (20 – 35 cm²) para modular a excitabilidade de áreas corticais.

Embora a ETCC não envolva correntes de altas intensidades, ela altera a excitabilidade neuronal espontânea em regiões corticais (FREGNI *et al.*, 2006a; 2006b; PLOW; PASCUAL-LEONE; MACHADO, 2012). Isto é, ela normalmente causa o deslocamento da corrente elétrica no sentido do cátodo para o ânodo, visto que a estimulação anódica despolariza e, assim, aumenta a excitação, enquanto a estimulação catódica hiperpolariza, ou seja, diminui a excitação das membranas dos neurônios corticais. Assim sendo, esta estimulação pode modular a percepção da dor causada pelo estímulo nociceptivo (NITSCHKE *et al.*, 2008; ROSEN *et al.*, 2009; ADACHI *et al.*, 2017).

O tamanho dos eletrodos é particularmente importante tanto para os efeitos quanto para a segurança no uso da ETCC. A neuroestimulação apresenta outras vantagens, como a possibilidade da utilização residencial, de modo que os pacientes possam fazer uso por longos períodos com pouco ou nenhum custo adicional (NITSCHKE *et al.*, 2003;

2008; ZAGHI; HEINE; FREGNI, 2009). Com isso, esse método terapêutico poderá ser uma alternativa na prevenção e no tratamento da dor pós-operatória e neuropática, porém, estudos adicionais devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

Quanto a isso, a título de exemplo, Liebetanz *et al.* (2009) realizou um estudo no qual buscou identificar os limites de segurança para o uso da ETCC catódica em ratos. Ele determinou um “limiar de lesão” em função da densidade de carga aplicada. Essa relação ressalta a importância da combinação dos parâmetros da ETCC para seu uso, e não a avaliação de um deles isoladamente. A densidade de corrente (i/A) usada nos estudos com modelos animais varia entre: 1.27 a 57.14 A/m² (BRUNONI *et al.*, 2011), consideravelmente superior àquela usada em humanos, cerca de 0,06mA/m² (LIEBETANZ *et al.*, 2009).

Nesse sentido, a ETCC induz mudanças em vários níveis do sistema nervoso, resultando em polarização tecidual e, conseqüentemente, na modulação da atividade neuronal (LANG *et al.*, 2005). Em suma, os efeitos dessa estimulação baseiam-se em interações cortico-corticais, com alguns componentes subcorticais, incluindo o córtex cingulado anterior (ACC) (JACKSON *et al.*, 2017). Em estudos feitos com ratos, há efeitos duradouros do tratamento da ETCC na inflamação crônica e hiperalgesia induzida por estresse crônico por restrição (NITSCHKE *et al.*, 2003; BIKSON *et al.*, 2016).

Desse modo, devido à limitação de estudos em humanos, os modelos em animais são essenciais para futuras avaliações, sendo o rato o mais utilizado (ADACHI *et al.*, 2012). Ademais, é relevante que os resultados das pesquisas utilizando modelos em animais sejam translacionais, pois os atuais protótipos utilizados para o estudo da ETCC têm restrições, o que gera viés metodológico, ocasionando interferências nos dados da investigação, como também ataranta a interpretação das informações. Entretanto, ainda não se tem conhecimento sobre os efeitos agudos temporais dessa técnica em animais *naïve*, ou seja, animais que não possuem nenhuma alteração patológica induzida.

O conhecimento sobre melhores parâmetros para uso da ETCC tornou-a uma técnica que tem se mostrado eficaz no tratamento de diversas desordens neurológicas e em 19 desordens psiquiátricas (WILLIAMS; CRAIG 2016). Isso tem despertado interesse crescente da comunidade científica, tanto é que havia, até 2003, apenas algumas dezenas de artigos científicos publicados sobre isso, enquanto que atualmente há

centenas de estudos focados nessa técnica, principalmente estudos clínicos que demonstram efeitos sobre condições patológicas. No entanto, apenas um pequeno percentual desses estudos foi realizado em animais com o intuito de investigar as alterações celulares e teciduais envolvidas nos efeitos observados.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foi descoberto em 1975 por Carswell *et al.* (1975). É considerado uma citocina pró-inflamatória, existente em duas formas: uma transmembrana de 26 kDa e outra secretada de 17 kDa, ambas biologicamente ativas. O TNF- α também é conhecido como caquetina, produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T, que são abundantes no peritônio e no tecido esplâncnico (LIN *et al.*, 2000). Além disso, está presente nos neurônios e células da glia, desempenhando funções importantes tanto na hiperalgesia inflamatória quanto na neuropática (ZHANG, 2007).

O TNF- α apresenta grande afinidade por receptores solúveis de fator de necrose tumoral (FNTR), fator de necrose tumoral R1 (TNFR1), ou fator de necrose tumoral R2 (TNFR2). (LIN *et al.*, 2000). O TNF- α liga-se com o receptor (TNFR1), ou (TNFR2), que induz a transdução do sinal intracelular que pode resultar na ativação de diferentes eventos como regulação de apoptose, indução de genes de resposta imediata e ativação da transcrição de genes de resposta inflamatória, inclusive genes codificadores de outras citocinas como interleucina um-beta (IL-1 β), interleucina seis (IL-6) e interleucina (IL-10) (JI, R.R. *et al.*, 2002 SCHAFFERS, M. *et al.*, 2003). Nessa perspectiva, a citocina pró-inflamatória passa por uma clivagem antes de ser liberada para a circulação como uma molécula solúvel. Consoante isso, estudos indicam que a hipertrofia do tecido adiposo leva ao aumento da expressão de TNF- α , tendo ações predominantemente autócrinas e parácrinas. (ARSLAN *et al.*, 2010). Quanto à técnica ETCC, ela atua sobre células do sistema imune, diminuindo, dessa forma, a liberação de citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α (HADDAD; SAADE; SAFIEH-GARABEDIAN, 2003). Para além dos efeitos da ETCC, notou-se que em modelos animais com lesões nervosas a eletroestimulação apresentou efeitos de curto prazo, causando redução nos níveis de TNF- α (ZHOU; RIGOUTSOS, 2014). Além disso, parece haver participação do TNF- α no mecanismo de ação da ETCC, tendo em vista de que há resultados que apresentam seus níveis alterados pela estimulação em córtex cerebral (CIOATO *et al.*, 2016).

Sendo assim, este estudo tem como objetivo investigar os efeitos de uma única sessão de ETCC sobre resultado comportamental nociceptivo mecânico quanto aos níveis cerebrais de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em ratos *naive* (sem prévia manipulação terapêutica ou de modelos experimentais).

2 HIPÓTESE

A ETCC é capaz de induzir diminuição do limiar nociceptivo e redução de mediadores inflamatórios após uma única sessão.

3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os dados resultantes deste projeto poderão auxiliar na investigação e no esclarecimento dos efeitos da ETCC nas alterações fisiológicas envolvidas na prevenção de mecanismos de desencadeamento e cronicidade de estados dolorosos em humanos. E, principalmente, a aplicação de terapias alternativas pode colaborar no pré-operatório de pacientes, reduzindo, com isso, os custos com medicação analgésica pós-operatória, internação hospitalar prolongada e consultas recorrentes.

4 OBJETIVOS

A seguir serão apresentados os objetivos desta pesquisa.

4.1 OBJETIVO GERAL

Esta pesquisa tem o objetivo de avaliar o efeito de sessão única de ETCC sobre resultado do comportamento nociceptivo mecânico e parâmetros bioquímicos em ratos *naive*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A fim de responder o objetivo geral, seguir-se-ão os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar a ação da ETCC na variação dos mediadores inflamatórios. Para isso, foram mensurados os níveis teciduais de citocinas pró-inflamatória (TNF- α) em córtex cerebral total por meio da técnica de Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA).
- b) Avaliar o efeito nociceptivo mecânico na aplicação de uma única sessão ETCC em ratos *naive* utilizando von Frey.
- c) Avaliar o efeito temporal de uma única sessão de ETCC sobre resultado do comportamento nociceptivo mecânico e parâmetros bioquímicos em ratos *naive*.

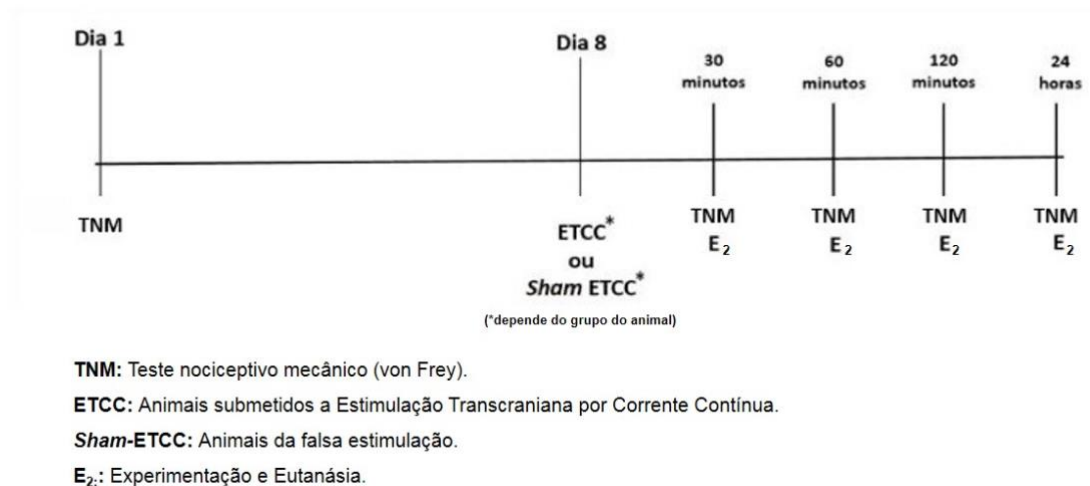
5 MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo, foi usado o material biológico proveniente do projeto de pesquisa número 160408 da UFRGS, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em 14 de outubro de 2016. Esse material está congelado em ultrafreezer, em temperatura de -80°C , na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o experimento, ratos *naive* foram expostos a uma sessão única de estimulação ETCC e, após o tempo determinado pelo grupo experimental, foram testados quanto à sensibilidade mecânica e, em seguida, eutanasiados.

Figura 1 – Desenho experimental



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Realização do teste nociceptivo mecânico (von Frey), tratamento da ETCC de acordo com os grupos (ETCC ou *Sham-ETCC*) e eutanásia dos animais.

Conforme mostra a figura acima, no dia 1, foram realizados os testes nociceptivos mecânicos. No dia 8 (sete dias após o primeiro dia), realizou-se o tratamento com a ETCC

e foram feitos novos testes nociceptivos mecânicos, de acordo com o grupo (ETCC ou *Sham*-ETCC) de 30, 60 ou 120 minutos e 24 horas. Imediatamente após os testes, procederam-se a eutanásia dos animais, como também a retirada do córtex cerebral total deles.

5.2 LOCAL DA PESQUISA

Esta pesquisa foi desenvolvida no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), na Unidade de Experimentação Animal (UEA) e Análise Molecular e Proteínas (UAMP) e no Laboratório de Análise de Proteínas Ligantes de Cálcio do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

5.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 100 ratos *Wistar* machos¹, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), os quais tinham entre 55 e 65 dias de idade (\geq 250g). Eles foram divididos em 5 levas de 20 animais. Foram alojados na UEA no HCPA, em caixas-moradia de polipropileno, as quais medem 49 x 34 x 17,8 cm, com assoalho recoberto de serragem, tendo entre 2 e 4 animais por caixa, conforme a Resolução Normativa Nº 15 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2013a). Os animais foram adaptados a um ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), e livre acesso à água e ração Nuvilab® (a qual vem da empresa Quimtia, do Paraná/Brasil), com o teor de umidade do ambiente controlado entre 40-60%.

¹ Foram utilizados apenas machos nesta pesquisa, uma vez que as fêmeas têm variâncias hormonais, o que interfere nas análises bioquímicas.

5.4 CÁLCULO AMOSTRAL

Foram alocados 10 animais por grupo para o experimento comportamental, com base em estudos prévios da literatura e utilizando os mesmos materiais e métodos propostos neste projeto (LASTE *et al.*, 2012, ADACHI *et al.*, 2012; 2015). Para as análises bioquímicas, foram utilizados 6 animais por grupo, sendo essa proporção de animais necessária para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de efeito grande), considerando o nível de significância (α) de 0,05 e poder de confiança de 90% ($\beta=0.1$) (ADACHI *et al.*, 2012; 2015; CIOATO *et al.*, 2016).

5.5 CONTENÇÃO

Para a realização da contenção, foi exercido um modelo de imobilização com bandagens para restrição dos movimentos dos animais. Para isso, as bandagens foram enroladas em torno de todo o corpo dos animais, com o intuito de restringir o movimento das quatro patas e do dorso, como pode ser observado na figura 2. Os animais submetidos a esse modelo foram os dos grupos ETCC e *Sham*-ETCC.

Figura 2 – Adaptação à contenção dos animais dos grupos ETCC e *Sham*-ETCC



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Adaptação à contenção dos animais dos grupos ETCC e *Sham*-ETCC a um modelo de imobilização com bandagens para restrição dos movimentos dos mesmos.

5.6 DESENHO EXPERIMENTAL

De caráter experimental, esta pesquisa teve como objetivo realizar teste bioquímico nas amostras obtidas (córtex cerebral total) de ratos *naive* expostos a uma única sessão de estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) previamente submetidos a teste de avaliação nociceptivo mecânico.

5.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram alocados em 10 grupos experimentais, os quais são apresentados a seguir:

a) **Controle total (CT):** os animais eutanasiados por decapitação 7 dias após o teste comportamental mecânico basal, mas não sofreram manipulação terapêutica.

b) **Controle comportamento (CC):** os animais foram submetidos ao teste comportamental 7 dias após os testes basais e, em seguida, eutanasiados por decapitação, entretanto, sem a manipulação terapêutica.

c) **ETCC 30 (E30):** os animais receberam a aplicação de ETCC 7 dias após os testes basais e, 30 minutos após o final da aplicação, foram submetidos ao teste comportamental mecânico e, então, mortos por decapitação.

d) **ETCC 60 (E60):** os animais receberam a aplicação de ETCC 7 dias após os testes basais e, 60 minutos após a aplicação, foram submetidos ao teste comportamental mecânico e, por fim, mortos por decapitação.

e) **ETCC 120 (E120):** os animais receberam a aplicação de ETCC 7 dias após os testes basais e, 120 minutos após a aplicação, foram mortos por decapitação.

f) **ETCC 24h (E24h):** os animais receberam a aplicação de ETCC 7 dias após os testes basais e, 24 horas após a aplicação, foram submetidos ao teste comportamental mecânico e, em seguida, mortos por decapitação.

g) **Sham ETCC 30 (S30):** os animais receberam a aplicação de *sham* ETCC 7 dias após os testes basais e, decorridos 30 minutos, foram submetidos ao teste comportamental mecânico e, então, mortos por decapitação.

h) **Sham ETCC 60 (S60):** a aplicação de *sham* ETCC foi feita 7 dias após os

testes basais e, 60 minutos decorridos, foram submetidos ao teste comportamental mecânico e, por fim, mortos por decapitação.

i) **Sham ETCC 120 (S120)**: os animais receberam a aplicação de *sham* ETCC 7 dias após os testes basais e, 120 minutos depois disso, foram submetidos ao teste comportamental mecânico e, em seguida, mortos por decapitação.

j) **Sham ETCC 24h (S24h)**: os animais receberam a aplicação de *sham* ETCC 7 dias após os testes basais e, 24 horas após, foram submetidos ao teste comportamental mecânico e, logo depois, mortos por decapitação.

5.8 GRAU DE SEVERIDADE

Para realizar os testes, os procedimentos seguidos visaram minimizar a dor e o desconforto dos animais. Desse modo, quando há procedimentos que envolvem experimentos com animais, eles são classificados *a priori* conforme seu grau de severidade, segundo a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS². Esta tem como base o relatório da Comissão das Comunidades Europeias (ECC), publicado no fim de julho de 2009, o qual é uma revisão da Directive 86/609/EEC, que define os testes com animais em 4 categorias: sem recuperação, leve, moderada e severa. Neste estudo, a definição do grau de severidade foi descrita após cada procedimento realizado.

5.9 GRAU DE INVASIVIDADE

Nos experimentos com animais, deve-se levar em conta que o grau de invasividade, o qual é concedido como a classificação dos procedimentos quanto ao risco de dor e/ou distresse a que eles foram submetidos durante os procedimentos. Isso tem como base a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) – Resoluções Normativas Nº 30 e 37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2016; 2018). Os graus variam de 1 a 4, sendo o nível de número 4 o mais severo. Diante disso, a definição do grau de invasividade neste estudo foi analisado após cada procedimento feito.

² Para mais informações, acesse: <http://www.propesq.ufrgs.br/>.

5.10 ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA EM RATOS

Os ratos Wistar foram submetidos a uma sessão única de ETCC bimodal *in vivo* durante 20 minutos, utilizando uma corrente de 0,5 mA. Foi realizada a tricotomia prévia na região anterior da cabeça em todos os animais para melhor aderência dos eletrodos com 11 mm de diâmetro. A região onde os eletrodos foram colocados tinha corrente constante de 0,5 mA (FREGNI *et al.*, 2006b). De acordo com Liebetanz *et al.* (2006), uma corrente constante com intensidade de 1 mA causa lesões cutâneas no animal. Assim, a corrente mais baixa capaz de gerar efeito sem causar dano ao tecido é de 0,5 mA.

Os animais foram submetidos a apenas uma sessão de ETCC bimodal por 20 minutos. Um curso de tempo das respostas demonstrou o mesmo efeito antialodínico após esse tempo e, portanto, foi definido como a duração para evitar a imobilização do animal. A corrente contínua foi gerada a partir de uma bateria contendo um estimulador constante, conectado a eletrodos de eletroencefalograma (EEG) e adaptado por meio de um hidrogel condutor. Após o posicionamento (ver figura 3), os eletrodos foram fixados com fita adesiva (Micropore®) (FREGNI *et al.*, 2006b; 2006c).

Feito isso, o eletrodo do cátodo foi posicionado na região supraorbital, e o eletrodo anodal, no córtex parietal. A posição dos eletrodos aumenta a excitabilidade do córtex motor primário e induz alívio na dor (NITSCHKE; PAULUS, 2001; FREGNI *et al.*, 2006d). Para a estimulação dos animais do grupo *Sham* (falsa estimulação) da ETCC, os eletrodos foram colocados e fixados na mesma posição e tempo (de 20 minutos) que a estimulação real. No entanto, o estimulador permaneceu na posição "desligado" durante todo o procedimento, como demonstra a figura 4. Quanto ao teste, obteve-se como grau de severidade: leve; e quanto ao grau de invasividade: GI 2.

As figuras abaixo são referentes à sessão de ETCC.

Figura 3 – Sessão de ETCC em ratos *Wistar* machos



Fonte: Adachi *et al.* (2012).

Legenda: Posição do eletrodo catodal na linha média entre os olhos. O eletrodo anodal, na linha média, entre as orelhas.

Figura 4 – Sessão de ETCC em ratos *Wistar* machos do grupo *Sham*-ETCC



Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Posição do eletrodo catodal na linha média entre os olhos. O eletrodo anodal, na linha média, entre as orelhas. Não há ETCC (falsa estimulação).

Apresentado isso, no próximo subcapítulo será abordado sobre o teste von Frey.

5.11 TESTE NOCICEPTIVO MECÂNICO (VON FREY)

O teste de von Frey refere-se à retirada da pata do animal em resposta a um estímulo que foi determinado usando um microtubo plástico de von Frey (DOR, 2012; LAI *et al.*, 2002). Em síntese, os animais são colocados em uma gaiola de acrílico transparente com piso de malha metálica, permitindo, assim, que eles se movam livremente. Ainda, eles foram aclimatados ao ambiente por aproximadamente dez minutos antes do teste, permitindo a acomodação comportamental.

Para o teste, o microtubo do von Frey é aplicado no meio plantar na superfície da pata traseira através do piso de malha. Segundo a literatura o preconizado no von Frey é realizar a leitura de três medidas consecutivas, ou seja, fazer a pressão na pata traseira direita do animal por três vezes consecutivas, para minimizar o erro que poderá acontecer ao realizar o teste. Com isso, o teste de von Frey é um teste não invasivo que não causa danos ao animal. Ademais, a sondagem do teste é realizada apenas quando todas as patas do animal estão em contato com o chão (CHAPLAN *et al.*, 1994). O sensor do analgesímetro localizou-se perpendicularmente à pata traseira direita do animal, pois foi uma convecção do grupo de pesquisa utilizar na para traseira direita. Desse modo, o teste baseia-se na pressão máxima em gramas (g) necessária para que o animal retire a pata (TAYLOR; FINN, 2001). Utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon que é correspondente ao teste t pareado porque os dados não apresentavam normalidade. Os dados foram normalizados para minimizar possíveis interferências que poderiam existir entre os animais pertencentes ao mesmo grupo. Haja vista, o teste compara os grupos de animais em diferentes tempos (ETCC *versus Sham*-ETCC), não compara o animal por grupo, mas sim, ao grupo que o animal pertence. O mesmo analisa variáveis independentes compostas por grupos dependentes (pareados), compara o mesmo grupo antes e depois do teste, e compara a mediana e com isso, as observações são pareadas. Considerando isso, o teste de von Frey provou ser uma ferramenta confiável no trabalho clínico e experimental animal (FRUHSTORFER; GROSS; SELBMANN, 2001).

5.12 RANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram randomizados nos grupos experimentais de acordo com o peso corporal. Como não houve diferença significativa na resposta entre os grupos após o primeiro teste nociceptivo mecânico (von Frey), eles não foram novamente randomizados.

5.13 FATORES DE EXCLUSÃO DE ANIMAIS E PONTO FINAL HUMANITÁRIO

Estabeleceram-se *endpoints* para as etapas em que houve intervenção. Assim sendo, se o animal apresentasse sinais de dor/desconforto, distresse ou, ainda, disfunções e patologias severas durante alguma etapa, ele seria encaminhado para ser avaliado pelo médico veterinário para, então, serem decididas as medidas de conforto para ele e sobre sua continuidade no projeto.

Quanto à dor/desconforto, alguns sinais podem indicar isso, como: imobilidade maior que o normal, vocalização possivelmente provocada por dor, isolamento, falta de interação com os demais animais da caixa, falta de alimentação e perda de peso. Caso o animal não apresentasse condições de recuperação, o ponto final humanitário (eutanásia) seria indicado, o qual é realizada de acordo com Resolução Normativa Nº 37 do CONCEA (BRASIL, 2018).

5.14 PERDA DE ANIMAIS

Durante a pesquisa, houve a perda de dois animais, os quais estavam sendo submetidos ao tratamento do ETCC durante os experimentos. A causa da morte foi uma parada respiratória, segundo o diagnóstico realizado pela médica veterinária da UEA. Por causa disso, o “n” final foi de 98.

5.15 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais foram eutanasiados após o teste nociceptivo mecânico. O método utilizado foi a decapitação sem o uso de anestésicos. Como este estudo foi realizado a partir de um projeto guarda-chuva, haverá estudos bioquímicos que serão realizados a partir do mesmo experimento e utilizando as amostras desses animais. A decapitação se tornou necessária a fim de facilitar a coleta de grande volume de sangue e impedir a interferência neuroquímica dos agentes anestésicos.

Ademais, os métodos farmacológicos podem interferir nos resultados dos experimentos bioquímicos que são realizados no sistema nervoso central dos ratos. Além disso, estudos já demonstraram que a decapitação causa inconsciência rápida e indolor. Consoante isso, para este procedimento, foi obedecida a Resolução Normativa nº 13 do Conselho Nacional de Experimentação Animal, de 20 de setembro de 2013, que versa sobre as diretrizes da prática de eutanásia em animais (BRASIL, 2013b).

Cabe dizer que foram utilizadas medidas como procedimento de refinamento e proteção/preservação do bem-estar animal. Os pesquisadores responsáveis têm experiência nessa forma de eutanásia e na utilização de equipamento específico para esse fim. Em suma, o procedimento foi realizado sem apresentar problemas na Unidade de Experimentação Animal do HCPA e aprovado pelo CEUA. O grau de severidade foi constatado como sem recuperação.

6 PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DO TECIDO NERVOSO

Para o processamento e armazenamento do tecido nervoso dos animais foram coletados e armazenados o córtex cerebral total dos 100 ratos. O armazenamento foi feito em tubos plásticos com tampa de 1,5 ml, estando identificados, estéreis e inseridos em um recipiente apropriado contendo nitrogênio líquido. Após o término da coleta da estrutura neural, foram armazenadas em caixas apropriadas, as quais foram acondicionadas no ultrafreezer a temperatura aproximada de -80 °C, na UAMP, até serem utilizadas para análises bioquímicas (TRACEY; WALKER, 1995).

6.1 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Neste subcapítulo, são esclarecidos os processos quanto à análise bioquímica do processo de pesquisa com os ratos.

6.1.1 Preparo da amostra

Foram separadas aleatoriamente 70 amostras de córtex cerebral total, a fim de realizar a análise bioquímica, contemplando, assim, todos os grupos experimentais. Após isso, foi inserido um outro tubo plástico de 2 ml no córtex cerebral total e 1,5 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (mM) (50 NaCl, 18 Na₂HPO₄, 83 NaH₂PO₄.H₂O, pH 7,4), contendo 1 mM EGTA e 1 mM PMSF, seguido por centrifugação a 1000 x g durante cinco minutos a 4°C. Finalizado isso, as amostras foram armazenadas no gelo para serem analisadas bioquimicamente (TRAMONTINA *et al.*, 2007).

6.1.2 Quantificação dos níveis teciduais de TNF- α

A técnica utilizada para análise do córtex cerebral total foi a *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), que se trata de um kit comercial, um método sanduíche (TRAMONTINA *et al.*, 2007). O TNF- α no córtex cerebral total foi quantificado utilizando o ensaio imuno ELISA (eBioscience, Ref. 88-7340, San Diego, EUA). Com isso,

homogeneizou-se o córtex em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (mM) (50 NaCl, 18 Na₂HPO₄, 83 NaH₂PO₄.H₂O, pH 7,4), contendo 1 mM EGTA e 1 mM PMSF, seguido por centrifugação a 1000 x g durante 5 minutos a 4°C. Os dados desta investigação foram expressos em porcentagem do grupo controle.

6.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No teste nociceptivo mecânico von Frey, calculou-se a média das três medidas do limiar mecânico (von Frey) e aplicou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon (Grupo Basal *versus* pós-tratamento). Para o doseamento bioquímico da citocina TNF- α , o grupo controle foi utilizado como padrão e, a partir dele, observou-se quanto variava os níveis bioquímicos. Foi realizado o *t-test* para medidas independentes, comparando o grupo ETCC *versus* o grupo *Sham*-ETCC em cada tempo. O nível de significância estabelecido para todos os dados estatísticos foi de $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o SPSS v. 20.0 (IBM® SPSS *Statistics*, New York, USA).

7 RESULTADOS

Neste capítulo busca-se apresentar os resultados obtidos a partir dos testes.

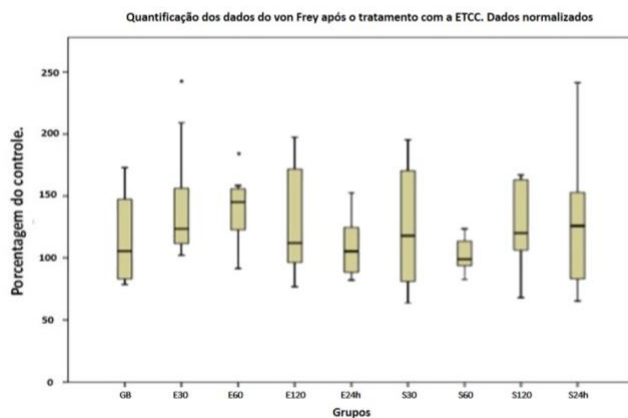
7.1 TESTE NOCICEPTIVO MECÂNICO

O teste nociceptivo mecânico foi realizado no dia um e sete dias após ter sido feito o experimento. Foi realizado o teste nociceptivo mecânico pós-tratamento (ETCC) nos seguintes tempos: 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos e 24 horas. A eutanásia foi conduzida logo após esse teste, para a coleta do material biológico (córtex cerebral total).

7.1.2 Von Frey

Os animais que receberam ETCC apresentaram aumento do limiar mecânico (Grupo Basal *versus* pós-tratamento) 30 e 60 minutos após o tratamento ($p < 0.05$) (E 30, E 60). Em contraste, não foi observada uma diferença significativa nos demais tempos após o tratamento com ETCC ($p > 0.05$). Quanto aos animais do grupo *Sham*-ETCC, eles não apresentaram diferenças nos limiares basais e pós-*Sham* ($p > 0.05$) em todos os tempos estudados.

Figura 5 – Quantificação dos dados do von Frey após o tratamento com a ETCC.



Fonte: Zin (2019).

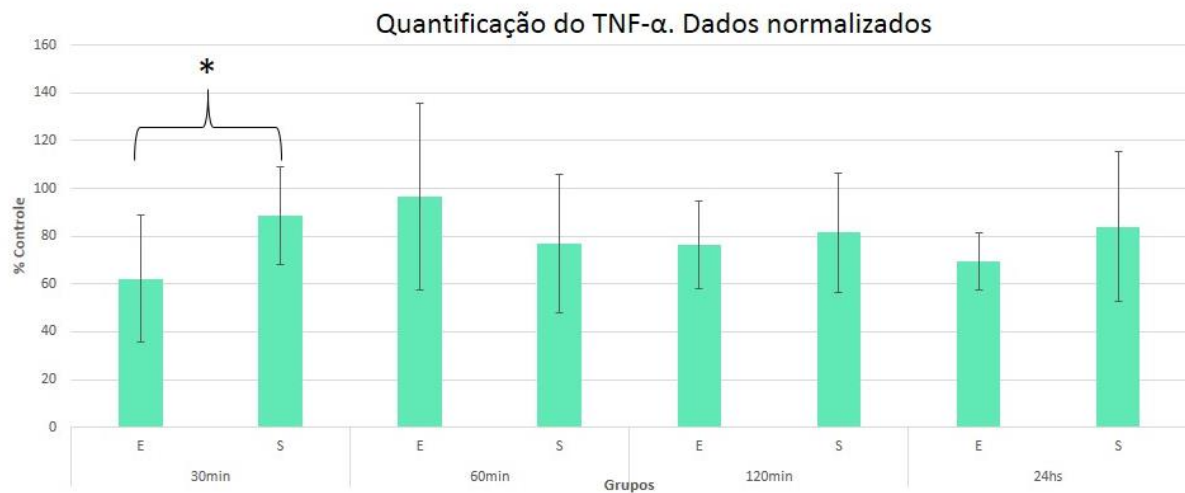
Legenda: Diferenças estatísticas comparadas às do grupo basal.

A figura 5 mostra as diferenças estatísticas comparadas ao grupo basal. Como resultados, tem-se que: GB = grupo basal, E30 = grupo ETCC, eutanasiados em 30 minutos; E60 = grupo ETCC, eutanasiados em 60 minutos; E120 = grupo ETCC, eutanasiados em 120 minutos; E24 = grupo ETCC, eutanasiados em 24 horas; S30 = grupo *Sham*, eutanasiados em 30 minutos; S60 = grupo *Sham*, eutanasiados 60; S120 = grupo *Sham*; eutanasiados em 120 minutos; S24 = grupo *Sham*; eutanasiados em 24 horas. T – grupo que recebeu a ETCC; S – grupo *Sham*. Utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon (Grupo Basal *versus* pós-teste) $p = 0,008$ (T30, $p = 0,021$ (T60)), $n = 90$ animais. Sendo: $p = 0,008$ (T30) $p = 0,021$ (T60).

7.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS: QUANTIFICAÇÃO DA TNF-A

A seguir são apresentados os resultados quanto à análise bioquímica. Foram encontradas diferenças estatísticas significativas, nos níveis corticais cerebrais de TNF- α entre os grupos, diminuindo a concentração, como demonstra a figura 6.

Figura 6 – Avaliação Quantitativa do TNF- α .



Fonte: Zin (2019).

Legenda: Diferenças estatísticas significantes comparadas entre os grupos (ETCC tratados *versus* Sham-ETCC).

Quanto aos resultados apresentados na figura 6, as diferenças estatisticamente significantes comparadas entre os grupos são: E30 = grupo ETCC, eutanasiados em 30 minutos; E60 = grupo ETCC, eutanasiados em 60 minutos; E120 = grupo ETCC, eutanasiados em 120 minutos; E24 = grupo ETCC, eutanasiados em 24 horas; S30 = grupo Sham, eutanasiados em 30 minutos; S60 = grupo Sham, eutanasiados 60; S120 = grupo Sham; eutanasiados em 120 minutos; S24 = grupo Sham; eutanasiados em 24 horas. T – grupo que recebeu a ETCC; S – grupo Sham. Utilizando *t-test* para medidas independentes (*Sham versus* tratados) $p = 0,043$ (E30) $p = 0,044$ (S30) $n = 70$ animais.

Técnica de doseamento: ELISA.

8 DISCUSSÃO

Os resultados presentemente obtidos mostraram mudanças no comportamento nociceptivo mecânico por até 60 minutos após aplicação da ETCC bimodal em animais *naive*. Em relação aos fatores inflamatórios, observou-se diminuição no TNF- α após 30 minutos (E30).

Quanto à região eleita na neuromodulação não invasiva para o tratamento da dor foi a região do córtex cerebral motor M1. Os córtices M1, somatossensorial (S1) e dorsolateral pré-frontal integram o que se chama "matriz da dor", que podem ser diretamente alcançadas pela ETCC e, desse modo, influenciar a via disfuncional de como a dor está sendo processada, atingindo componentes subcorticais de modo indireto (ANTAL *et al.*, 2017; DOSSANTOS *et al.*, 2016; LEGRAIN *et al.*, 2011).

O teste de von Frey avaliou a nocicepção através do estímulo mecânico inócuo e crescente (alodinia mecânica) (DWORKIN *et al.*, 2010). Autores como, Sakrajai *et al.* (2014) e Dargo *et al.* (2017) observaram em seus estudos diferença significativa no quadro de dor no grupo que recebeu ETCC ativa, ressaltando que esse último utilizou um aparelho de ETCC de alta definição sobre o córtex M1, o qual permite a emissão da corrente de forma mais focal. Existem vários mecanismos neurofisiológicos que explicam a eficácia clínica da estimulação M1 para o alívio da dor, porém não são completamente compreendidos. Entretanto, acredita-se que seus mecanismos analgésicos envolvem a ativação de controles de "cima para baixo" (*top down*) relacionados à excitação de fibras horizontais intracorticais e facilitação do controle descendente de inibição da dor (DOSSANTOS *et al.*, 2016; LEFAUCHER; BOËRIO; CRÉANGE, 2006; O'CONNELL *et al.*, 2014).

Os efeitos da ETCC na excitabilidade cortical são dependentes da polaridade dos eletrodos. O estímulo anódico aumenta a excitabilidade, enquanto o estímulo catódico reduz a excitabilidade da membrana neuronal (LANG *et al.*, 2005; NITSCHKE *et al.*, 2008). O ânodo contribui para a hiperpolarização de interneurônios inibitórios de camadas superficiais, e a estimulação catódica tem uma contribuição reversa nesses neurônios (NITSCHKE; PAULUS, 2001). A ETCC não gera o potencial de ação neuronal por

despolarização da membrana neuronal, mas, sim, modula a atividade da rede neuronal espontânea (NITSCHE *et al.*, 2008).

Corroborando com os resultados encontrados, estudos demonstraram que a ETCC bimodal diminui os níveis de interleucinas pró-inflamatórias em modelos animais de obesidade e dor (PARIMISSETTY *et al.*, 2016). Ainda, ela pode induzir mudanças nos níveis de biomarcadores, dentre eles mediadores pró e anti-inflamatórios, como o TNF- α , que está associado à dor e ativa outras citocinas (CALLAI *et al.*, 2019; CHO *et al.*, 2018). Essas citocinas secretadas pelas células gliais oriundas do SNC estão envolvidas no desenvolvimento da dor neuropática, e o TNF- α produz alodínia e hiperalgesia em modelo animal, no entanto, a aplicação da ETCC nesses animais induziu a diminuição desse fator inflamatório (MIKA *et al.*, 2013).

Na citocina pró-inflamatória, TNF- α , ocorreram mudanças no hipocampo e córtex cerebral em relação a percepção cognitiva da dor (AIDA *et al.*, 1999). A ETCC mostrou-se capaz de alterar níveis de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , induzindo a diminuição desses índices e demonstrando um método promissor para diminuição de processos inflamatórios ou prevenção de tais eventos no organismo (ZHOU; RIGOUTSOS, 2014; ZHOU *et al.*, 2011).

9 RECONHECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE). Os autores participantes desse grupo de pesquisa declaram não haver conflitos de interesse quanto à pesquisa aqui apresentada.

10 CONCLUSÃO

A ETCC vem demonstrando ser um método promissor para a diminuição de processos inflamatórios no organismo, prevenindo-os. A neuromodulação vem ganhando evidência na experimentação científica como uma ferramenta promissora para modulação de diversas funções cerebrais. Nessa perspectiva, este estudo mostrou mudanças no comportamento nociceptivo mecânico por até 60 minutos após aplicação da ETCC bimodal em animais *naive*.

Os animais que receberam ETCC apresentaram aumento no limiar mecânico (Grupo Basal *versus* pós-tratamento) 30 e 60 minutos após o tratamento (E30), (E60) ($p < 0,05$). Foi observado nos tempos de 30 e 60 minutos, pois segundo a literatura é o tempo mínimo para que ocorra formação de citocinas anti-inflamatórias. Haja vista, a degradação dessas citocinas são rápidas, por isso não observamos resultados nos tempos após 60 minutos. Além disso, também foi notado uma diminuição no TNF- α após 30 minutos em relação aos fatores inflamatórios. Ademais, houve uma diminuição no (E30) e aumento no (S30), pois foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos tratamento 30 minutos (E30), diminuindo a concentração e *Sham* (S30) aumentando a sua concentração. O grupo (E30) o ETCC parece estar atuando como um anti-inflamatório, já no grupo (S30) não houve inibição da expressão do TNF- α .

A ETCC, tem se mostrado promissor em seus estudos sobre eficácia deste tratamento anteriormente à procedimentos médicos/odontológicos invasivos devido à neuromodulação causada pela eletroestimulação. Algumas limitações puderam ser identificadas durante a execução deste trabalho. Uma delas foi a translacionalidade do estudo, que tem se mostrado um problema nas metodologias que utilizam animais. Sob esse viés, esta investigação faz parte de um projeto guarda-chuva, no qual posteriormente serão realizados testes bioquímicos nos tecidos dos animais coletados após a eutanásia, possibilitando esclarecer melhor os resultados encontrados. Dessa forma, sabe-se que os primeiros passos foram dados, todavia, há de se levar em consideração de que mais estudos devem ser analisados para a consolidação dessa técnica como uma abordagem clínica para prevenção e tratamento/procedimentos médicos/odontológicos.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, L. N. S. *et al.* Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. **Brain Research**, [S.L.], v. 1489, p. 17-26, dez. 2012.
- ADACHI, L. N. S. *et al.* Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. **Experimental Brain Research**, [S.L.], v. 233, n. 5, p. 1377-1389, fev. 2015.
- ADACHI, L. N. S. *et al.* Evaluation of different procedure involved in the Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) technique experimental application. **Clin. Biomed. Res.**, [S.L.], v.37, n. 2, p. 9, 2017.
- AIDA, S. *et al.* The effectiveness of preemptive analgesia varies according to the type of surgery: a randomized, double-blind study. **Anesthesia & Analgesia**, [S.], v. 89, n. 3, p. 711, set. 1999.
- ANTAL, A. *et al.* Low intensity transcranial electric stimulation: Safety, ethical, legal regulatory and application guidelines. **Clinical Neurophysiology**, [S.L.], v. 128, n. 9, p. 1774–1809, 2017.
- ARSLAN, N.; ERDUR, B.; AYDIN, A. Hormones and cytokines in childhood obesity. **Indian pediatrics**, [S.L.], v. 47, n. 10, p. 829–39, out. 2010.
- BENHAMOU, D. *et al.* Postoperative analgesic therapy observational survey (PATHOS): a practice pattern study in 7 central/southern European countries. **Pain**, [S.L.], v. 136, n. 1-2, p. 134-41, maio 2008. ISSN 1872-6623. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17703887/>. Acesso em: 17 out. 2020.
- BIKSON, M. *et al.* Safety of transcranial direct current stimulation: evidence based update 2016. **Brain Stimulation**, v. 9, n. 5, p. 641–661, set. 2016.
- BOGGIO, P. S. *et al.* A randomized, double-blind clinical trial on the efficacy of cortical direct current stimulation for the treatment of major depression. **The international journal of neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 249-54, 2008.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Resolução Normativa nº 15, de 16 de dezembro de 2013**. Brasília, 2013a. Disponível em: http://www.lex.com.br/legis_25182844_RESOLUCAO_NORMATIVA_N_15_DE_16_DE_DEZEMBRO_DE_2013.aspx. Acesso em: 17 out. 2020.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Portaria MCTI nº 465, de 23 de maio de 2013**. Brasília, 2013b. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/2013/p_mcti_465_2

013_diretriz_cuidado_utilização_animais_finscient%C3%ADficos_didáticos.pdf. Acesso em: 17 out. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Resolução Normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016**. Brasília, 2016. Disponível em: <https://www.ceua.ufv.br/wp-content/uploads/2018/04/RESOLUÇÃO-NORMATIVA-Nº-301.pdf>. Acesso em: 21 out. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Resolução Normativa nº 37, de 17 de abril de 2018**. Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.ceua.ufv.br/wp-content/uploads/2018/04/RESOLUÇÃO-NORMATIVA-Nº-38-2018.pdf>. Acesso em: 17 out. 2020.

BRUNONI, A. R.; FREGNI, F.; PAGANO, R. L. Translational research in transcranial direct current stimulation (tDCS): a systematic review of studies in animals. **Rev Neurosci.**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 471-81, 1. jan. 2011.

CALLAI, E. M. M. *et al.* Transcranial direct current stimulation (tDCS) and trigeminal pain: a preclinical study. **Oral Diseases**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 888–897, 2019.

CARSWELL, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, [S.L.], v. 72, n. 3666, 1975.

CHAPLAN, S. R. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 55–63, jul. 1994.

CHO, C. *et al.* The effect of magnesium sulfate concentration on the effective concentration of rocuronium, and sugammadex-mediated reversal, in isolated left phrenic nerve hemi-diaphragm preparations from the rat. **Korean Journal of Anesthesiology**, [S.L.], v. 71, n. 5, p. 401-406, out. 2018.

CIOATO, S. G. *et al.* Long-lasting effect of transcranial direct current stimulation in the reversal of hyperalgesia and cytokine alterations induced by the neuropathic pain model. **Brain Stimulation**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 209–217, mar. 2016.

DARGO, L.; ROBINSON, K. J.; GAMES, K. E. Prevention of knee and anterior cruciate ligament injuries through the use of neuromuscular and proprioceptive training: an evidence-based review. **Journal of Athletic Training**, [S.L.], v. 52, n. 12, p. 1171–1172, 2017.

DOL. Dor on Line. **Métodos experimentais para o estudo da dor**. 2012. Disponível em: <http://www.dol.inf.br/Html/MetodosExperimentais.html>. Acesso em: 24 mar. 2020.

DOSSANTOS, M. F. *et al.* Potential mechanisms supporting the value of motor cortex stimulation to treat chronic pain syndromes. **Frontiers in Neuroscience**, [S.L.], v. 10, n. fev. 2016.

DWORKIN, R. H. *et al.* Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update supplement article. **Mayo Clin Proc.**, [S.L.], v. 8585, n. 33, p. 3–14, 2010.

FREGNI, F. *et al.* A controlled clinical trial of cathodal DC polarization in patients with refractory epilepsy. **Epilepsia**, [S.L.], v. 47, n.2, p. 335-42, fev. 2006a.

FREGNI, F. *et al.* A sham-controlled, phase II trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of central pain in traumatic spinal cord injury. **Pain**, [S.L.], v. 122, n. 1, p. 197–209, maio 2006b.

FREGNI, F. *et al.* A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. **Arthritis Rheum**, [S.L.], v. 54, n. 12, p. 3988-3998, dez. 2006c. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17133529/>. Acesso em: 17 out. 2020.

FREGNI, F. *et al.* Treatment of major depression with transcranial direct current stimulation. **Bipolar Disorders**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 203-204, abr. 2006d. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16542193/>. Acesso em: 17 out. 2020.

FRUHSTORFER, H.; GROSS, W.; SELBMANN, O. von Frey hairs: new materials for a new design. **European Journal of Pain**, [S.L.], v. 5, p. 341-342, jun. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090380101902502>. Acesso em: 21 out. 2020.

HADDAD, J. J.; SAADE, N. E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Interleukin-10 and the regulation of mitogen- activated protein kinases: are these signalling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? **Cell Signal**, v. 15, n. 3, p. 255-267, 2003.

JACKSON, M. P. *et al.* Toward comprehensive tDCS safety standards. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S.L.], v. 66, p. 413, nov. 2017.

Jl, R.R. *et al.* P38 MAPk activation by ngf in primary sensory neurons after inflammation increases trpv1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, [S.L.], v. 36, p. 57-68, set. 2002.

LAI, J. *et al.* Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin resistant sodium channel, NaV1.8. **Pain**, v. 95, n. 1, p. 143–152, jan. 2002.

LANG, N. *et al.* How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? Europe PMC Funders Group. **Eur J Neurosci**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 495–504, 2005.

LASTE, G. *et al.* After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. **Exp. Brain Res.**, [S.L.], v. 221,

n. 1, p. 75-83, ago. 2012. ISSN 1432-1106 (Electronic) 0014-4819 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752510>. Acesso em: 10 jul. 2020.

LEFAUCHEUR, J.-P.; BOËRIO, D.; CRÉANGE, A. Nerve conduction blocks and peripheral neuropathies. **Journal de la Societe de biologie**, [S.L.], v. 200, n. 4, p. 307–21, 2006.

LEGRAIN, V. *et al.* The pain matrix reloaded: a salience detection system for the body. **Progress in Neurobiology**, [S.L.], v. 93, n. 1, p. 111–124, 2011.

LIEBETANZ, D. *et al.* Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy. **Epilepsia**, [S.L.], v. 47, n. 7, p. 1216–1224, jul. 2006.

LIEBETANZ, D. *et al.* Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. **Clinical Neurophysiology**, [S.L.], v. 120, n. 6, p. 1161-1167, 2009. ISSN 1388-2457.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F – Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, [S.L.], v.127, p. 117-126, fev. 2000.

MIKA, J. *et al.* Importance of glial activation in neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 716, n. 1–3, p. 106–119, set. 2013.

NITSCHKE, M. A.; PAULUS, W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. **Neurology**, [S.L.], v. 57, n. 10, p. 1899-1901, 2001. ISSN 0028-3878.

NITSCHKE, M. A. *et al.* Safety criteria for transcranial direct current stimulation (tDCS) in humans. **Clinical neurophysiology**, [S.L.], v. 114, n. 11, p. 2220- 2222, nov. 2003.

NITSCHKE, M. A. *et al.* Transcranial direct current stimulation: state of the art 2008. **Brain stimulation**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 206-223, jul. 2008. ISSN 1935-861X.

NITSCHKE, M. A.; STAGG, C. J. Physiological Basis of Transcranial Direct Current Stimulation. **The Neuroscientist**, [S.L.], v, 17, n. 1, p. 37– 53, fev. 2011. ISSN 10.1177/1073858410386614

O'CONNELL, N. E. *et al.* Non-invasive brain stimulation techniques for chronic pain. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [S.L.], v. 2014, n. 4, abr. 2014.

PARIMISSETTY, A. *et al.* Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors-an emerging frontier in the neurodegenerative research. **Journal of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1–13, mar. 2016.

PLOW, E. B.; PASCUAL-LEONE, A.; MACHADO, A. Brain stimulation in the treatment of chronic neuropathic and non-cancerous pain. **J Pain**, [S.L.], v. 13, p. 411-424, 2012.

ROSEN, A. C. *et al.* Noninvasive transcranial brain stimulation and pain. *Curr. Pain Headache Rep.*, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 12-7, jan. 2009. ISSN 1534-3081 (Electronic) 1534-3081 (Linking). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2697608/>. Acesso em: 17 out. 2020.

RUSCHEWEYH, R. *et al.* Pain catastrophizing and pain-related emotions. **The Clinical Journal of Pain**, [S.L.], v. 27, n. 7, p. 578–586, set. 2011.

SAKRAJAI, P. *et al.* Pain reduction in myofascial pain syndrome by anodal transcranial direct current stimulation combined with standard treatment a randomized controlled study. **Clinical Journal of Pain**, [S.L.], v. 30, n. 12, p. 1076–1083, 2014.

STAGG, C. J.; NITSCHKE, M. A. Physiological basis of transcranial direct current stimulation. **The Neuroscientist**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 37-53, fev. 2011.

TRACEY, D. J.; WALKER, J. S. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 44, n. 10, p. 407–411, out. 1995.

TRAMONTINA, F. *et al.* Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: Antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **Journal of Neuroscience Methods**, [S.L.], v. 162, n. 1–2, p. 282–286, 2007.

TAYLOR, B. K.; FINN, D. (ed.). **Behavioral neurobiology of chronic pain**. Londres: Springer, 2014.

ZAGHI, S.; HEINE, N.; FREGNI, F. Brain stimulation for the treatment of pain: a review of costs, clinical effects, and mechanisms of treatment for three different central neuromodulatory approaches. **Journal of pain management**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 339, 2009.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int. Anesthesiol Clin.**, [S.L.], n. 45, p. 27-37, 2007.

ZIN, L. E. F. **Efeitos agudos da estimulação transcraniana por corrente contínua (TCC) em ratos naive**: parâmetros comportamentais, inflamatórios e astrocitários dentro de uma janela temporal. 2019. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

ZHOU, L. J. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity by activation of spinal microglia in rat. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 322–334, 2011.

ZHOU, H.; RIGOUTSOS, I. The emerging roles of GPRC5A in diseases. **Oncoscience**, [S.L.], v. 1, n. 12, p. 765-776, 25 nov. 2014.

WILLIAMS, A. C. C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **Pain**, [S.L.], v. 157, n. 11, p. 2420–2423, nov. 2016.

ANEXO

Comprovante de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Uso com Animais (CEUA).



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós Graduação
Comissão Científica

Projeto: 2019/0126

Título: Avaliação Sistemática dos Efeitos Agudos da Estimulação Transcraniana com Corrente Contínua (ETCC) na Atividade Neurotrófica e Ativação das Vias Neurais Descendentes em Ratos Naive

Pesquisador Responsável: DEISE PONZONI

Equipe de Pesquisa:

JAMILE BOFF

ETIANE MICHELI MEYER CALLAI

CAMILA OLIVEIRA DA COSTA

EDELA PURICELLI

BIANCA FERST BALBINOT

LISANDRA EDA FUSINATO ZIN C...

ELISSA KERLI FERNANDES

NAYARA LOPES HEIDMANN

ALEXANDRE SILVA DE QUEVEDO

LUCIANA SANTA CATARINA

CECÍLIA LAÍS DE SOUZA
ALMAGRO

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Data de Aprovação: 25/04/2019