

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

NAYARA LOPES HEIDMANN

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO EQUIPAMENTO PARA APLICAÇÃO DE
ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA EM RATOS:
ESTUDO PILOTO**

Porto Alegre

2021

NAYARA LOPES HEIDMANN

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO EQUIPAMENTO PARA APLICAÇÃO DE
ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA EM RATOS:
ESTUDO PILOTO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso 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

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Lopes Heidmann, Nayara
DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO EQUIPAMENTO PARA
APLICAÇÃO DE ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE
CONTÍNUA EM RATOS: ESTUDO PILOTO / Nayara Lopes
Heidmann. -- 2021.
37 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, 2021.

1. Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua.
2. Animais de laboratório. 3. Tecnologia biomédica. I.
Silva de Quevedo, Alexandre, orient. II. Título.

NAYARA LOPES HEIDMANN

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO EQUIPAMENTO PARA APLICAÇÃO DE
ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA EM RATOS:
ESTUDO PILOTO**

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

Porto Alegre, 23 de Novembro de 2021.

Pro. Dr. Ângelo Luiz Freddo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ma. Luciana Santa Catarina

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Alexandre Silva de Quevedo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Dedico, primeiramente, os agradecimentos aos meus pais, pois lutaram para proporcionar a mim uma boa educação e condições para isso. Agradeço todos os dias pela família que tenho, por acreditarem e me incentivarem a sempre buscar o melhor. Apesar da distância e dos poucos encontros ao longo dos 5 anos de faculdade, nunca me senti sozinha. Meus pais são a minha maior influência e inspiração para me manter forte e correr atrás dos meus objetivos. Espero um dia poder lhes retribuir tudo que eles fizeram por mim.

Ao meu primo, José Demilson May, por ter fornecido toda a ajuda e apoio que precisei para chegar até aqui. Serei eternamente grata pela a chance e confiança que recebi. Certamente foi o maior responsável por eu ter trilhado esse caminho profissional.

Agradeço as minhas amigas da faculdade, que me acompanharam por toda essa jornada. Dedico lhes todo o apoio e companheirismo nos bons e maus momentos.

Em especial, ao meu orientador, Prof^o. Dr. Alexandre Silva de Quevedo, agradeço pela oportunidade de me mostrar o mundo da pesquisa científica. Obrigada por acreditar na minha capacidade e fornecer ensinamentos que foram fundamentais para a minha evolução ao longo da faculdade.

Também deixo meu agradecimento a minha coorientadora, Dr. Etiane Callai, pela orientação e oportunidade de participar do projeto. Pelo aprendizado e todo o apoio e esforço para que o estudo fosse concluído.

E, finalmente, agradeço à Faculdade de odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me proporcionar um ambiente de ensino qualificado, com um corpo docente de excelência. Assim como, a todos aqueles que participaram da minha trajetória e que, de alguma forma, contribuíram para o encerramento desse ciclo.

RESUMO

A Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) tem mostrado resultados promissores no tratamento de diferentes situações patológicas, sendo uma alternativa não farmacológica para o tratamento de quadros dolorosos. Entretanto, os protocolos de pesquisa em animais apresentam limitações metodológicas, vieses como estresse, invasividade ou estimulação não focal que prejudicam a interpretação dos resultados das pesquisas. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um novo equipamento de ETCC em ratos, com área de aplicação menor, menos manipulação do animal e com intensidade de corrente adequada. Foram utilizadas 10 cadáveres para treinamento da equipe e realização de testes com a técnica de fixação tradicional (polimetilmetacrilato) e a maleável (resina Coe-Soft Gc America). Também foram utilizados 18 ratos *Wistar* machos, 55 e 65 dias de vida (≥ 250 g), para o teste com o novo equipamento de ETCC desenvolvido pelo setor de Bioengenharia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), usando diferentes intensidades de corrente (0,5, 0,4 e 0,35 mA) por 20 minutos. A técnica escolhida para a fixação da base foi a técnica maleável. O material que formava o capacete se manteve em posição pelo período necessário, além de ser mais biocompatível, provavelmente mais confortável e menos invasivo (não necessita da fixação de parafusos), atendendo melhor aos princípios de translacionalidade e bem-estar animal. O novo equipamento de ETCC desenvolvido pelo Setor de Bioengenharia para o projeto é uma adaptação ao utilizado atualmente no HCPA em projetos com roedores. Neste novo modelo, ocorre a diminuição do tamanho do eletrodo de estimulação que é acoplado à base plástica no momento da aplicação e posteriormente removido, e à possibilidade de movimentação do animal durante a sessão (diminuindo o estresse). A bateria foi colocada externamente à caixa transparente, o que eliminou a necessidade de uso de colete. O eletrodo de referência foi mantido em posição no torso do animal (favorecendo a aplicação de apenas um tipo de corrente) por uma faixa e não impediu a movimentação do animal. Após a remoção da base ao final do tratamento foram observadas macroscopicamente queimaduras na pele de alguns ratos onde correntes de maiores intensidades foram aplicadas. Assim, a corrente mais adequada ser utilizada é a de 0,35 mA, pois não produziu queimadura clinicamente identificável. O correto funcionamento do equipamento mostrou sua viabilidade. A corrente passou normalmente, o aparato manteve-se em posição e os animais puderam se movimentar. A segurança foi demonstrada pela condição normal da pele após tratamento com a ETCC de 0,35 mA. Os resultados em relação ao efeito analgésico do tratamento com ETCC serão mensurados durante o experimento principal. Conclui-se que será possível iniciar o estudo dos

efeitos analgésicos de diferentes intensidades (0,35 mA, 0,175 mA e 0,08 mA) de corrente de ETCC (curva dose-efeito), utilizando o novo estimulador, com segurança e confiabilidade. O emprego do novo dispositivo permitirá resultados mais translacionais e com menos vieses como a redução do estresse e a garantia de manutenção do bem-estar animal.

Palavras-chave: Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua; animais de laboratório; tecnologia biomédica.

ABSTRACT

Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) has shown promising results in the treatment of different pathological situations, being a non-pharmacological alternative for the treatment of painful conditions. However, research protocols in animals have methodological limitations, biases such as stress, invasiveness or non-focal stimulation that impair the interpretation of research results. Thus, the present work aimed to develop a new tDCS equipment in rats, with a smaller application area, less animal handling and with adequate current intensity. Ten cadavers were used to train the team and perform tests with the traditional fixation technique (polymethylmethacrylate) and the malleable one (Coe-Soft Gc America resin). Eighteen male Wistar rats, 55 and 65 days old (≥ 250 g), were also used for testing with the new tDCS equipment developed by the Bioengineering sector of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), using different current intensities (0.5, 0.4 and 0.35 mA) for 20 minutes. The technique chosen for fixing the base was the malleable technique. The material that formed the helmet remained in position for the necessary period, in addition to being more biocompatible, probably more comfortable and less invasive (does not require the fixation of screws), better meeting the principles of translationality and animal welfare. The new tDCS equipment developed by the Bioengineering Sector for the project is an adaptation to the one currently used at HCPA in projects with rodents. In this new model, there is a reduction in the size of the stimulation electrode, which is attached to the plastic base at the time of application and later removed, and the possibility of moving the animal during the session (reducing stress). The battery was placed outside the transparent case, which eliminated the need to wear a vest. The reference electrode was kept in position on the animal's torso (favoring the application of only one type of current) by a strap and did not impede the animal's movement. After removal of the base at the end of the treatment, skin burns were macroscopically observed in some rats where currents of greater intensity were applied. Thus, the most suitable current to be used is 0.35 mA, as it did not produce a clinically identifiable burn. The correct functioning of the equipment showed its viability. The current passed normally, the apparatus remained in position and the animals were able to move. Safety was demonstrated by normal skin condition after treatment with the 0.35 mA tDCS. The results regarding the analgesic effect of the tDCS treatment will be measured during the main experiment. It is concluded that it will be possible to start the study of the analgesic effects of different intensities (0,35 mA, 0,175 mA and 0,08 mA) of tDCS current (dose-effect curve), using the new stimulator, safely and reliably. The use of the new device will allow more translational results and with less bias, such as reducing stress and ensuring the maintenance of animal welfare.

Keywords: Transcranial Direct Current Stimulation, Animal Experimentation, Biomedical Technology.

LISTA DE TABELA E FIGURAS

Tabela 1 – Número de animais utilizados em determinada etapa do projeto piloto.....	15
Figura 1 – Desenho experimental.....	16
Figura 2 – Eletrodo de estimulação focal.....	18
Figura 3 – Aparelho Estereotáxico.....	19
Figura 4 – Aplicação de material maleável ao redor da base plástica.....	20
Figura 5 – Tratamento com novo aparato de ETCC.....	21
Figura 6 – Novo equipamento de estimulação.....	22
Figura 7 – Bateria da ETCC colocada externamente.....	23
Figura 8 – Bateria do equipamento de ETCC.....	23
Figura 9 – Rato usando capacete de material maleável.....	24
Figura 10 – Rato usando capacete com pontos de sutura.....	25
Figura 11 – Queimaduras na pele dos animais com as intensidades de correntes altas.....	25
Figura 12 – Pele íntegra no animal com a intensidade de 0,35 mA.....	26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ETCC	Estimulação Transcraniana por Corrente contínua
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
UEA	Unidade de Experimentação Animal
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
PPMA	Polimetilmetacrilato
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
cm ²	Centímetro quadrado
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
mA	<i>Milliampere</i>
g	Gramas
n ^o	número
%	Porcentagem
=	Igual
°C	Graus Celsius
≥	Maior ou igual a

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivos Gerais.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Animais	15
3.2	Local de pesquisa	16
3.3	Delineamento experimental	16
3.4	Etapa 1	17
<i>3.4.1</i>	<i>Equipamento da ETCC</i>	<i>17</i>
3.5	Etapa 2	18
<i>3.5.1</i>	<i>Ancoragem da base plástica no aparelho estereotáxico</i>	<i>19</i>
3.6	Etapa 3	20
<i>3.6.1</i>	<i>Aplicação de ETCC</i>	<i>20</i>
4	RESULTADOS	22
4.1	Equipamento de ETCC	22
4.2	Intensidade de corrente.....	25
5	DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÃO.....	30
7	RECONHECIMENTOS	31
	REFERÊNCIAS.....	32
	ANEXO	35

1 INTRODUÇÃO

A aplicação de técnicas elétricas para modular a cognição humana e tratar doenças iniciou a partir das descobertas dos fenômenos elétricos por Galvani e Aldini (1792) e Alexandre Volta (1800). Ao longo das décadas as técnicas de estimulação elétrica foram tornando-se cada vez mais sofisticadas e tecnológicas, com a criação de correntes específicas para modular a excitabilidade de regiões cerebrais. Recentemente a Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) ressurgiu como ferramenta promissora com efeitos benéficos em diferentes cenários e condições de saúde (GEBODH *et al.*, 2019).

A ETCC é uma técnica de neuromodulação do sistema nervoso central, não invasiva, indolor e bem tolerada pelos pacientes (STAGG; NITSCHKE, 2011b). É considerada uma modalidade terapêutica econômica e de fácil aplicação (ZAGHI; HEINE; FREGNI, 2009). Embora exista uma grande variabilidade de protocolos de aplicação, em geral, os estudos sugerem que a ETCC pode ser uma opção terapêutica para o tratamento de várias doenças como epilepsia (FREGNI *et al.*, 2006a), acidente vascular cerebral (ORRÙ *et al.*, 2020), e condições psiquiátricas como a depressão (BOGGIO *et al.*, 2008). Estudos em animais também mostram que a ETCC pode ter indicação para dores de origem inflamatória (LASTE *et al.*, 2012) e neuropática (CIOATO *et al.*, 2016). Outro ponto positivo desta técnica é a sua combinação com a farmacoterapia, melhorando os resultados do tratamento e evitando o uso exagerado de medicamentos (BRUNONI; VALIM; FREGNI, 2011).

O protocolo mais usado para o tratamento de condições dolorosas é a aplicação da ETCC no couro cabeludo sobre a região do córtex motor primário (M1), área cortical que possui conexões com regiões responsáveis pelo processamento nociceptivo (FREGNI *et al.*, 2006b; FENTON *et al.*, 2009). A aplicação de ETCC necessita a presença de dois eletrodos, um de estimulação e outro de referência. A estimulação anodal despolariza a membrana e aumenta a excitabilidade do neurônio, enquanto a catodal hiperpolariza e induz à redução da excitação, ou à inibição neuronal (NITSCHKE; PAULUS, 2000). Deste modo, é possível alcançar diferentes efeitos de acordo intensidade, polaridade e tempo da corrente utilizada (STAGG; NITSCHKE, 2011b). Alguns estudos em animais usam intensidades de corrente de 0,5 mA por 20 minutos, através de eletrodos de eletrocardiograma humano colocado sobre a pele do crânio do rato (SPEZIA ADACHI *et al.*, 2012). Já em humanos, é aplicada uma corrente direta constante de intensidade entre 0,5 a 2 mA por 10 a 20 minutos.

As evidências mostram que os efeitos da ETCC podem ser observados em alguns minutos após a aplicação e, também, por semanas quando é utilizada mais de uma sessão de tratamento

(LASTE *et al.*, 2012; CIOATO *et al.*, 2016), com efeitos antinociceptivos de curto e longa duração (LASTE *et al.*, 2012). Apesar do crescente interesse e seu uso em ensaios clínicos, os mecanismos de ação da ETCC não foram completamente elucidados e precisam ser profundamente investigados (FRITSCH *et al.*, 2010). Devido às limitações dos estudos em humanos, os testes pré-clínicos em animais são essenciais para a melhor compreensão dos mecanismos, explorar os efeitos e limites de segurança dessa terapia.

Entretanto, os modelos usados em animais apresentam limitações metodológicas, com técnicas que podem prejudicar a interpretação dos resultados da pesquisa. Uma revisão sistemática mostrou que grande parte dos estudos são heterogêneos e não translacionais, as montagens da ETCC em animais são diferentes dos modelos humanos (BRUNONI; FREGNI; PAGANO, 2011). Quanto a aplicação da ETCC, esta é considerada uma modalidade de estimulação não invasiva para humanos, contudo durante as pesquisas com roedores, para a aplicação da estimulação, o pesquisador precisa restringir os movimentos do rato, para manter o aparato da ETCC estável na cabeça do animal, no entanto, essa imobilização é um agente estressante (SPEZIA ADACHI *et al.*, 2012). Esse tipo de imobilização lembra ao usado em pesquisas que estudam o estresse, por assemelhar-se a modelos já estabelecidos de estresse por imobilização. Além desse modelo, outras pesquisas realizam a cirurgia epicraniana, fazendo a implantação do eletrodo no crânio do rato, tornando a terapia invasiva (LIEBETANZ *et al.*, 2006b). Contudo, essa técnica pode gerar um estado de inflamação local, não sendo recomendada para o estudo da dor.

Um ponto que difere entre modelos animais *versus* humanos é a intensidade de corrente e a área do eletrodo. Embora a ETCC não use intensidades de correntes altas, esta pode ser superior nos animais. Em geral, os estudos em humanos usam correntes de até 1 mA, com eletrodos de 35 cm² (NITSCHKE; PAULUS, 2000). Já nos animais a corrente varia entre 0,1 mA a 1 mA em eletrodos de 3,5 mm² (LIEBETANZ *et al.*, 2009). Quanto a isso, dependendo da intensidade de corrente aplicada, pode ocorrer lesões cutâneas e queimaduras na interface eletrodo-pele quando usada de forma inapropriada (FRANK *et al.*, 2010). Logo, é necessário ajustar a intensidade da corrente elétrica, o que pode demandar ajustes no tempo de aplicação. Desse modo, a segurança da técnica deve ser acompanhada da eficácia do estudo.

Além da corrente utilizada, o tamanho do eletrodo também é um ponto importante a ser estudado, tanto para a segurança da técnica quanto para se chegar ao efeito desejado. Alguns estudos usam eletrodos de eletrocardiograma humano colocado na pele do rato (SPEZIA ADACHI *et al.*, 2012). Contudo, o tamanho do eletrodo pode ser desproporcional as estruturas anatômicas dos pequenos animais, sendo que a colocação desses eletrodos na região cortical

alvo pode causar uma estimulação cortical generalizada, alterando a sensibilidade nociceptiva (GAMARO *et al.*, 1998).

Tendo em vista que tais modelos causam vieses metodológicos, podendo prejudicar a interpretação e inferência dos dados, torna-se claro a necessidade de desenvolvimento de novos equipamentos e protocolos de estimulação. Considerando o importante papel terapêutico da ETCC já descrito na literatura, é essencial a existência de estudos com modelos que empreguem técnicas seguras e mais apropriadas para o uso nos animais. Sendo assim, visando o refinamento da técnica de aplicação de ETCC em roedores na pesquisa, de acordo com o princípio dos 3Rs (*replacement, reduction and refinement*), o presente estudo tem como objetivo o desenvolvimento de um novo equipamento para aplicação de ETCC em ratos, com área de aplicação menor (mais focal), menos invasiva, mínima manipulação do animal e com intensidade de corrente adequada para o tratamento de dor neuropática em ratos. O novo equipamento de ETCC desenvolvido será capaz de gerar efeitos analgésicos, sendo mais confortável para o experimento animal gerando menos estresse e com o propósito de tornar os resultados mais translacionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente estudo tem como objetivo desenvolver e avaliar a segurança de um novo equipamento de aplicação de ETCC que apresente vantagens quando comparados aos equipamentos atuais (menos manipulação do animal, menos invasiva, mais focal nas áreas corticais de interesse e intensidade de corrente segura).

2.2 Objetivos específicos

- a. Desenvolver um equipamento menor, transcutâneo e que possibilite a movimentação do animal;
- b. Determinar a melhor técnica de ancoragem da ETCC, sendo menos invasiva e mais confortável ao animal;
- c. Avaliar a fixação da técnica de colagem;
- d. Aplicar corrente elétrica focalmente sobre o córtex motor primário (M1);
- e. Avaliar a permanência do equipamento na região de interesse;
- f. Avaliar a preservação da integridade epitelial dos tecidos sob o eletrodo de estimulação;
- g. Determinar a intensidade de corrente mais segura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um estudo piloto do projeto de pesquisa principal número 18-0555 da UFRGS, aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) em abril de 2019. 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). Bem como, foi seguida a Lei 11794/08 de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei AROUCA). Além disso, todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (Resolução Normativa N. 30, 2016) e o procedimento de eutanásia dos animais seguiu as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), (Resolução Normativa Nº 37, 2018).

3.1 Animais

Foram utilizados 10 cadáveres e 18 ratos *Wistar* machos com idade entre 55 e 65 dias de vida (≥ 250 g) (tabela 1) provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS (ICBS). Os animais foram alojados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em caixas-moradia (2 a 4 animais por caixa), confeccionadas em polipropileno, medindo 49x34x17,8cm, com assoalho recoberto de serragem, ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$), umidade 40 – 60% e livre acesso à água e ração Nuvilab (Quimtia, Paraná/Brasil). As caixas contaram com enriquecimento ambiental (rolos de papel, semente de girassol, estopa, palitos de madeira) adotados pela UEA conforme orientação Técnica nº 12 do CONCEA. Inicialmente, após a chegada dos animais, eles foram mantidos por 14 dias em quarentena. Foram realizados todos os procedimentos necessários para minimizar dor e desconforto.

Tabela 1 – Número de animais utilizados em determinada etapa do projeto piloto.

Projeto Piloto	Cadáveres	Ratos vivos
Etapa 1	0	0
Etapa 2	10	
Etapa 3		18

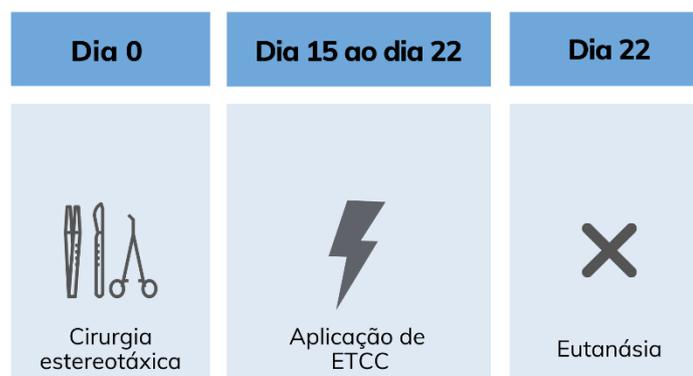
3.2 Local de pesquisa

Este projeto foi desenvolvido no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), na unidade de Experimentação Animal (UEA) e Serviço de Pesquisa e Desenvolvimento em Engenharia Biomédica do HCPA.

3.3 Delineamento experimental

O experimento piloto foi dividido em 3 etapas: A etapa 1 consistiu na revisão da literatura, planejamento e desenvolvimento do equipamento da ETCC; A etapa 2 consistiu na organização, treinamento da equipe em cirurgia estereotáxica e com técnica de fixação na pele do animal (10 cadáveres); Já a etapa 3, com 18 animais, compreendeu na instalação do equipamento de ETCC, teste com o material de fixação maleável avaliando a sua efetividade, avaliação da segurança do equipamento em relação à queimadura na pele em diferentes intensidades de corrente (0,5 mA, 0,4 mA e 0,35 mA) e submissão dos ratos a uma sessão diária de ETCC por 20 minutos, durante 8 dias, com a intensidade de corrente mais adequada (figura 1).

Figura 1 - Desenho experimental da etapa 3 (n=18 animais). Dia 0: Cirurgia estereotáxica para colagem da base do equipamento da ETCC e aplicação do material de fixação maleável. Dia 15: Início tratamento de aplicação da ETCC por 8 dias. Dia 22: Último dia de tratamento e eutanásia.



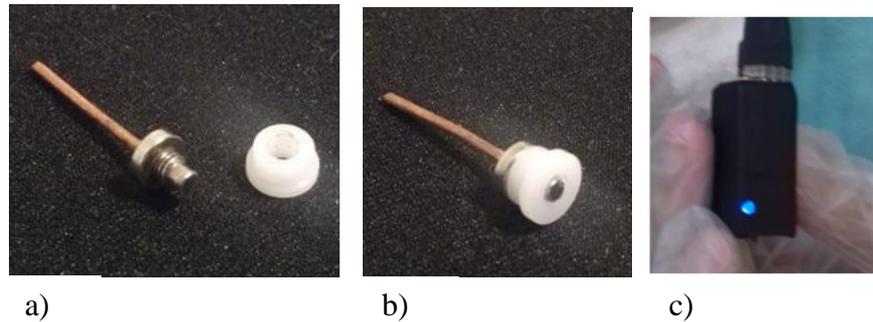
3.4 Etapa 1

A concepção do novo equipamento compreendeu, inicialmente, no estudo da literatura vigente para a definição do design do estimulador, considerando o tamanho e sua posição de aplicação, sendo o novo protótipo do eletrodo de estimulação inspirado em modelo já existente (LIEBETANZ *et al.*, 2006b). Por meio de reuniões com o setor de **Engenharia Biomédica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)**, chefiado pelo Engenheiro Dr. Paulo Sanche, foi criado o novo equipamento de aplicação da ETCC.

3.4.1 Equipamento da ETCC

O protótipo do equipamento ETCC consistiu em um pino metálico (aço inox 316L) com ponta ativa de 1,5 mm, rosqueado (macho) a uma base de material plástico com rosca (fêmea) produzido em uma impressora 3D, que foi pré-fixada à pele do animal. A superfície de contato tem as seguintes dimensões: diâmetro de 2,1mm e área de contato de 3,5mm². O espaço entre o pino e a pele é para ser preenchido com gel condutor antes de cada sessão de tratamento para garantir a condutividade. O eletrodo de principal (anodal) foi conectado à base plástica colada na cabeça do animal, e ligado a uma bateria. Já o eletrodo catodal consistiu em um eletrodo de eletrocardiograma, posicionado ventralmente no torso do animal e a cada sessão fixada com fita adesiva. A corrente elétrica partiu de uma bateria posicionada fora da caixa dos animais, com os eletrodos esticados. Ao ligar, a tensão da bateria é mostrada e, se estiver abaixo do nível mínimo necessário para correta estimulação, o LED vermelho é acionado de forma intermitente, alertando o operador. Se o nível de carga da bateria estiver adequado, o LED azul é ligado. O equipamento de ETCC desenvolvido possui dimensões externas de 35x16x16 mm e peso total, incluindo a bateria, de apenas 14,5g (figura 2). O consumo de corrente de 1,5 mA, durante a aplicação do estímulo, permitiu uma autonomia de aproximadamente 75 sessões de ETCC. A intensidade de estímulo elétrico da bateria foi pré-programada por software e pode ser ajustada ao longo das atividades.

Figura 2 – Eletrodo de estimulação focal. A) Estimulador focal e base plástica. B) Eletrodo e base rosqueados. C) Bateria.



Fonte: Produzido pelo setor de Engenharia Biomédica do HCPA.

3.5 Etapa 2

Na etapa 2 foi realizado o treinamento em cirurgia estereotáxica, o que favoreceu a familiarização da equipe no posicionamento do animal, e no uso de instrumentos cirúrgicos. Além disso, foi praticado o teste com o material para fixação do equipamento de ETCC (n=10 cadáveres). Nessa fase foi testado o equipamento de ETCC desenvolvido, incluindo a sua condutância e a comparação das técnicas de colagem da base plástica na pele do animal, fixação tradicional e fixação maleável.

Nessa etapa foi praticado a técnica tradicional com a colocação do parafuso. A **fixação tradicional**, utiliza resina acrílica odontológica de polimetilmetacrilato (PPMA) sobre a pele e 2 parafusos monocorticais, fixados na calota craniana sem perfurar a cortical interna do crânio. A resina acrílica é colocada externamente à base de encaixe do eletrodo (base plástica onde o eletrodo anodal é rosqueado).

O segundo método de fixação do aparato constitui em uma técnica inovadora, idealizada pelos pesquisadores, denominada de **técnica de fixação maleável**, que visa tornar-se uma alternativa ao uso de parafusos para fixação do estimulador da ETCC. O material empregado nesta técnica é o reembasador resiliente (Coe-Soft GC America) de uso odontológico. Esse material é utilizado para o condicionamento dos tecidos bucais após procedimentos cirúrgicos e para auxiliar na adaptação dos pacientes usuários de próteses totais (RODRIGUES; SHENOY; SHETTY, 2013). O reembasador deve ser aplicado sobre a pele/pelo do animal, em contato com o perímetro externo da base plástica, deixando o orifício interno livre para a passagem da corrente pela pele.

3.5.1 Ancoragem da base plástica no aparelho estereotáxico

A base plástica faz parte do equipamento de ETCC, e para a ancoragem essa base na região de interesse é necessário a produção de um capacete com material de fixação. Para isso, o animal foi colocado no aparelho estereotáxico. No aparelho estereotáxico foi realizada a cirurgia de estereotaxia, para localizar a região do córtex motor primário M1 e ancorar a base plástica sobre a região de interesse (figura 3).

O material de fixação foi aplicado sobre a pele e somente ao redor da base plástica, deixando o orifício central livre e com a pele exposta para passagem da corrente elétrica.

Os passos operatórios de cirurgia estereotáxica seguiram a sequência a baixo:

- a) Anestesia.
- b) Tricotomia
- c) Posicionamento do rato no estereotáxico.
- d) Incisão semilunar para visualização do ponto bregma e região M1 (lado direito), passando a direita da linha média.
- e) Descolamento do escalpo e visualização do ponto bregma.
- f) Ajustes do estereotáxico para M1 em relação a este ponto.
- g) Marcação do ponto correspondente ao M1 do lado esquerdo com caneta permanente.
- h) Fechamento e sutura da incisão.
- i) Posicionamento da base plástica sobre o M1 (lado esquerdo) (figura 4).
- j) Aplicação do material ao redor da base formando um capacete.

Figura 3 – Aparelho Estereotáxico.



Figura 4 – Aplicação de material maleável ao redor da base plástica.



3.6 Etapa 3

Após assegurar o correto funcionamento do aparato de ETCC e a escolha da técnica de fixação do estimulador, iniciou-se a etapa 3 (n=18 animais). Nessa fase foi avaliada a segurança do equipamento em relação à queimadura na pele em diferentes intensidades de corrente (0,5 mA, 0,4 mA e 0,35 mA), com a inspeção visual da existência de queimaduras na pele do rato. Se fosse observado queimaduras na pele, as sessões seriam interrompidas e a dose de corrente menor seria administrada. Foi avaliada também a técnica que fixa a base plástica do equipamento de ETCC na pele do animal, se esta se manteve estável durante todo o tratamento.

Por ser um projeto de caráter experimental, muitas questões poderiam surgir, sendo necessário a identificação e correção de possíveis dificuldades técnicas ao longo do estudo. Ao final dos testes com as intensidades e também após o tratamento descrito na sessão 5.6.1, os animais (n=18 ratos) foram eutanasiados por overdose anestésica de isoflurano 5%.

3.6.1 Aplicação de ETCC

Após assegurar a corrente mais adequada, os novos roedores passaram pelos procedimentos estereotáticos e colagem da base plástica na pele do animal com a técnica de fixação maleável. Os animais foram expostos a 8 sessões por 20 minutos, durante 8 dias consecutivos, de ETCC anodal, sempre no mesmo horário (08:00 às 12:00). No início da sessão, foi colocada uma pequena porção de gel condutor no interior da base plástica (rosqueável) e fixado o eletrodo ativo (anodal) à base. O eletrodo de referência (catodal) foi posicionado ventralmente no torso do animal a cada sessão fixada com fita adesiva. A corrente elétrica partiu de uma bateria posicionada fora da caixa transparente, o que não limitou os movimentos e locomoção do rato. Os animais permaneceram em suas caixas durante as sessões (figura 5).

Para a realização do tratamento, os ratos foram adaptados ao uso do dispositivo nos 7 dias prévios ao início do tratamento, porém com a bateria desligada, pelo mesmo tempo e condições do tratamento visando minimizar o estresse e efeito da novidade do aparato.

Figura 5 – Tratamento com novo aparato de ETCC



4 RESULTADOS

Este projeto resultou no desenvolvimento e padronização de aplicação do novo equipamento de ETCC. O presente projeto ainda está em execução e neste capítulo busca-se apresentar os resultados parciais obtidos a partir do estudo piloto.

4.1 Equipamento de ETCC

Foi desenvolvido um novo design do equipamento de ETCC juntamente com o Setor de Bioengenharia do HCPA, que consistiu em uma adaptação e aperfeiçoamento ao utilizado atualmente no HCPA em projetos com roedores. A diferença principal é a diminuição do tamanho do eletrodo de estimulação, que é um pino metálico acoplado à base plástica no momento da aplicação da estimulação e posteriormente removido (figura 6). Esse eletrodo possui uma área de contato de 3,5 mm², enquanto o usado nas pesquisas no HCPA possui uma área de contato de 150 mm², de 11 mm de diâmetro. Essa nova aplicação de ETCC permitiu que a estimulação fosse mais focal na área de interesse, córtex motor primário (M1). Além disso, a nova montagem possibilita a movimentação do animal durante a sessão de tratamento, já que a imobilização não é necessária para o tratamento com ETCC.

Figura 6 – Novo equipamento de estimulação (capacete ancorando a base plástica e o eletrodo metálico).



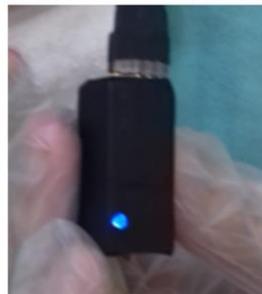
Para deixar a movimentação do animal dentro da caixa transparente, a bateria foi colocada externamente, sobre a grade, com o fio esticado e preso a um elástico (figura 7). Isto eliminou a necessidade de uso do colete de contenção no animal. O eletrodo de referência foi mantido em posição por uma faixa e não impediu a movimentação.

Figura 7 – Bateria da ETCC colocada externamente.



Em relação a estimulação do equipamento, este funcionou de forma correta e constante. O Led azul da bateria permaneceu aceso durante todo o tratamento, mostrando que a passagem da corrente elétrica pelos eletrodos, durante os 20 minutos, fluiu de forma correta (figura 8)

Figura 8 – Bateria do equipamento de ETCC.



6.1.2 Técnica de colagem da base do equipamento de ETCC

Foram realizados testes de comparação das duas técnicas de colagem, a técnica convencional e a maleável. Sendo a técnica maleável escolhida por ter atingido os objetivos do estudo.

Na técnica convencional, que se usa resina acrílica de uso odontológico fixada no crânio com 2 parafusos, foram encontradas dificuldades na sua execução: a) invasividade - os parafusos foram fixados no osso da calota craniana de forma invasiva; b) a espessura do osso no local é pequena, cerca de 1,1mm, o que dificulta a instalação de parafuso monocortical e diminui a estabilidade para a ancoragem adequada sem transfixá-lo. Durante os testes, ocorreu diversas vezes perfuração da cortical interna da calota craniana, provocando o contato do parafuso com o conteúdo intracraniano, trazendo o risco de contaminação e vazamento do líquido cefalorraquidiano, o que seria danoso ao animal e um viés para o estudo. A pequena espessura do osso não permitiu o atarraxamento adequado, mantendo o parafuso instável,

perdendo-se a vantagem da ancoragem. Além disto, o tempo de colocação do parafuso e produção do capacete com a resina acrílica foi maior do que a técnica alternativa (maleável) aumentando o período de anestesia dos animais, o que aumenta o risco de óbito trans-cirúrgico. Devido às limitações encontradas, essa técnica foi descartada desde o início dos testes com as 10 carcaças e o experimento seguiu com os testes da técnica maleável.

A técnica maleável foi a escolhida para a realização dos testes de tratamento visto que permite ancorar o equipamento de ETCC de forma transcutânea. Esta técnica possibilita que o eletrodo de estimulação fique sobre a pele do animal, não necessitando implantar o eletrodo sobre o osso do crânio do rato. Em comparação com a técnica tradicional, não houve a perfuração do crânio, realizada apenas a colagem do capacete maleável na pele do animal e ancorando a base plástica da ETCC na pele sobre a área de interesse.

Contudo, nos últimos dias de tratamento com a ETCC, foi observado descolamento das bordas do material que passaram a ficar elevadas/soltas. Isso se deu devido ao crescimento do pelo do animal abaixo do equipamento. Desta forma, alguns ratos conseguiram interpor a unha na fenda criada e removeram parcial ou totalmente o material de ancoragem (figura 9). Com isso, para manter o equipamento estável e garantir a sua permanência até a finalização do tratamento de aplicação de ETCC por 8 dias, foram realizados pontos de sutura nas bordas do capacete (figura 10). No local das suturas não foi observado inflamação clinicamente detectável e o comportamento dos animais não denotou desconforto/irritação. A instalação de pontos de sutura manteve a vedação do perímetro do capacete e garantiu sua fixação.

Durante a etapa 3 foi avaliado a efetividade e a viabilidade da fixação do capacete com a técnica maleável. Além de ser empregado um material mais biocompatível, confortável e menos invasivo (não necessita de parafusos), o capacete de fixação se manteve em posição e estável por todo o tempo de tratamento. Portanto, essa técnica se mostrou efetiva e atendeu melhor aos princípios de translacionalidade e bem-estar animais.

Figura 9 – Rato usando capacete de material maleável.



Figura 10 – Rato usando capacete com pontos de ancoragem.



4.2 Intensidade de corrente

Para avaliar a segurança do equipamento em relação a queimadura, foram testados diferentes intensidades de corrente na etapa 3. Inicialmente, foi aplicado a corrente de 0,5 mA por 20 minutos em 1 rato, no entanto, após a remoção do equipamento, foi observado macroscopicamente queimaduras intensas na pele do rato. Para dar sequência aos testes e chegar a uma corrente segura, foi aplicado no próximo rato (n=1) a corrente de 0,4 mA, ainda assim, foi observado queimaduras leves na pele do animal (figura 11). A corrente mais baixa utilizada foi a de 0,35 mA, por 20 minutos e, felizmente, essa não causou queimaduras na pele do animal (n=1) após a remoção do equipamento (figura 12). Dessa forma, nos ratos seguintes (n=15) foi aplicado a corrente de 0,35 mA, durante o tratamento por 8 dias consecutivos. Sendo assim, a segurança do equipamento foi constatado pela condição normal da pele após tratamento de ETCC com a corrente de 0,35 mA.

Figura 11 – Queimaduras da pele dos animais com intensidades de correntes altas. a) 0,5 mA. b) 0,4 mA.

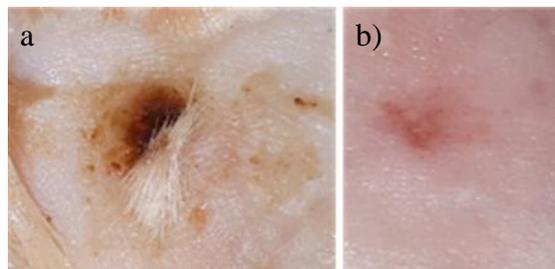
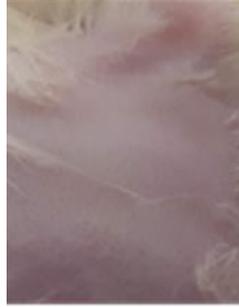


Figura 12 - Pele íntegra no animal com a intensidade de 0,35 mA.



5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos permitiram determinar a funcionalidade e a viabilidade do novo equipamento de ETCC, bem como a sua segurança, que foi demonstrada com o uso da intensidade de 0,35 mA. Além disso, os resultados possibilitaram a decisão do uso da técnica maleável, com reembasador resiliente (Coe-Soft GC America), empregando pontos de sutura nas margens do capacete, como a mais apropriada para ancorar o equipamento de ETCC na cabeça do rato.

Em relação ao equipamento de ETCC, uma diferença metodológica importante dos estudos é o tamanho do aparato de estimulação. Para superar essa limitação, foi desenvolvido um equipamento menor com o intuito de tornar a estimulação elétrica focal e confortável ao animal. O eletrodo de estimulação, feito de pino metálico com ponta rosqueável a uma base plástica, foi desenvolvido para ser pré-fixado à pele do rato, diferente de outros estudos que usam eletrodos epicranianos (STAGG; NITSCHKE, 2011a; LIU *et al.*, 2019). Esse eletrodo é acoplado à base plástica no momento da aplicação e posteriormente removido. Já o eletrodo de referência consistiu em um eletrodo de eletrocardiograma posicionado ventralmente (DHAMNE *et al.*, 2015) e mantido em posição por uma faixa que não impediu a movimentação do animal.

A estimulação elétrica pode ser aplicada por diferentes montagens (BRUNONI; FREGNI; PAGANO, 2011). Quando o eletrodo principal não é fixado diretamente no crânio do animal (LIEBETANZ, *et al.*, 2009), este pode ser aplicado na pele na forma de um eletrodo de disco de eletroencefalografia (DHAMNE *et al.*, 2015) ou eletrocardiograma (LASTE *et al.*, 2012). No entanto, o equipamento pode ser consideravelmente maior que o cérebro dos pequenos animais, tendo baixa focalização na área de interesse (LIU *et al.*, 2019). Além de que a forma e o tamanho dos eletrodos podem alterar a distribuição da corrente fornecida (SATURNINO; ANTUNES; THIELSCHER, 2015). Essa limitação pode ser contornada por eletrodos menores, colocados de forma mais precisa na região de interesse (WOODS *et al.*, 2015).

Essa nova configuração de aplicação da estimulação elétrica possibilitou que a bateria, conectada aos eletrodos por um cabo de alimentação, ficasse externamente à caixa do animal. Diferente de outros estudos, os animais ficaram livres dentro de suas caixas, não sendo necessário a contenção e restrição de seus movimentos (DHAMNE *et al.*, 2015; LASTE *et al.*, 2012). Além disso, sabe-se que a contenção é um agente estressor (SPEZIA ADACHI *et al.*, 2012) e que induz alterações na resposta nociceptiva (TORRES *et al.*, 2001), podendo levar a

alterações nos resultados comportamentais e bioquímicos que não sejam necessariamente provenientes do tratamento.

Atualmente, não existe um sistema de fixação ideal para ancorar o eletrodo de ETCC na cabeça do animal (PAULUS; PRIORI, 2019). Grande parte dos estudos com ratos aplicam uma montagem com a remoção da camada mais externa da calota craniana, fixando o eletrodo diretamente no crânio (LIEBETANZ *et al.*, 2006a). Sendo assim, a técnica maleável com reembasador resiliente pode ser uma estratégia mais adequada para ancorar o eletrodo alvo de estimulação da ETCC na pele do animal.

Para fixar o eletrodo estimulação na cabeça do animal, alguns estudos usam a técnica com resina acrílica autopolimerizável (WU *et al.*, 2017), contudo, esse material apresenta algumas desvantagens. Entre as desvantagens, então a baixa resistência a flexão (FONSECA *et al.*, 2015), o que torna a fixação mais rígida, a reação exotérmica (SCHIAVETTI *et al.*, 2009), que pode causar desconforto ao animal, e alergia ao monômero (MINAMOTO, 2014), podendo causar dermatite na pele do animal. Sendo assim, essas características negativas limitam o uso dessa técnica nos modelos animais.

Como resultado inovador deste projeto, a nova forma de fixar do eletrodo de ETCC com reembasador maleável foi escolhida pois usa um material mais biocompatível e de menor toxicidade. É um material mais apropriado para usar em testes em animais, pois tem baixa reação exotérmica quando em contato aos tecidos comparado à resina acrílica de uso convencional (ATAY *et al.*, 2012). Outro fator que influenciou na escolha desse material são suas propriedades elásticas (HASHEM, 2015), adaptando-se à movimentação da pele do rato e dificultando a sua remoção, garantindo o conforto do animal.

Além disso, a técnica maleável é mais benéfica para os roedores, pois segue uma montagem transcutânea, não necessitando da implantação do eletrodo de ETCC na cabeça do animal. Diferente de modelos epicranianos, que usam a técnica tradicional com resina acrílica e necessitam de acesso cirúrgico para implantam parafusos diretamente no crânio e, assim, possibilitar a ancoragem do eletrodo de estimulação (FENG *et al.*, 2020). Dessa forma, a técnica maleável é menos invasiva, em comparação aos modelos convencionais, pois dispensa o uso de parafusos e segue uma montagem transcutânea.

Como o tamanho do eletrodo influencia na densidade da corrente aplicada (JABERZADEH *et al.*, 2019), e no estudo houve a diminuição da área de contato do eletrodo, que conseqüentemente aumenta a densidade de corrente, foram testados diferentes intensidades de corrente, 0,5 mA, 0,4 mA e 0,35 mA. Essas correntes são consideradas seguras e estando dentro da faixa de segurança de outros estudos (JACKSON *et al.*, 2016). Apesar disso, as

densidades de 0,5 mA e 0,4 mA causaram queimaduras na pele dos ratos submetidos a essas correntes. Embora esse efeito adverso não seja observado em outras pesquisas, isso pode se dar visto que a maioria dos estudos implantam os eletrodos diretamente no crânio (BRUNONI; FREGNI; PAGANO, 2011). À vista disso, o equipamento se mostrou efetivo na condutância e segurança na corrente de 0,35 mA, sendo esta a corrente escolhida para ser a corrente mais alta a ser aplicada durante o estudo.

6 CONCLUSÃO

A ETCC é uma terapia promissora para diferentes condições clínicas, contudo, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado. Logo, pesquisas experimentais em animais podem ajudar a esclarecer melhor estes mecanismos. No entanto, os estudos em animais apresentam limitações metodológicas e são poucos translacionais. Nesse sentido, esse estudo se mostrou mais vantajoso quando comparado aos equipamentos atuais.

O novo design do equipamento de ETCC desenvolvido segue uma aplicação mais próxima ao utilizado em humanos e mais adequada para o uso em pequenos animais. O aparato proporciona maior conforto ao animal, devido à ausência de imobilização durante o tratamento e não o submete a cirurgia para inserir o eletrodo no crânio do animal. O estudo desenvolveu uma técnica inovadora de fixação do equipamento, o eletrodo de estimulação é ancorado na cabeça do animal por um capacete de reembasador resiliente. Essa nova técnica de fixação se mostrou efetiva e manteve o equipamento de ETCC na região de interesse durante todo o tratamento. O eletrodo do novo equipamento de ETCC ficou menor, comparando-se a de outros estudo. Para avaliar a segurança do mesmo, foi analisado a preservação da pele do animal com diferentes intensidade. Assim, o novo equipamento se mostrou correto e seguro na intensidade de 0,35 mA.

Dessa forma, essa nova metodologia de aplicação da ETCC se mostrou segura e viável, seguindo os princípios de bem estar animal. Sendo um protocolo promissor para os estudos dos mecanismos de ação da ETCC em animais. Por ser tratar de um estudo piloto, os resultados em relação ao efeito analgésico do tratamento com ETCC serão mensurados futuramente, podendo ser realizadas modificações na forma de aplicação desse novo equipamento. Como exemplo, a técnica de fixação maleável com sutura será realizado caso haja necessidade, para garantir a retenção do capacete durante todo o tratamento da ETCC. Para garantir a segurança do novo equipamento com uma corrente de estimulação adequada, foi necessário usar uma corrente de baixa intensidade, assim, pode ser necessário a alteração do tempo de aplicação da ETCC para que se consiga alcançar efeitos analgésicos.

A nova abordagem de aplicação de ETCC produzido por este estudo pode ser útil para identificar de forma mais detalhada os efeitos da estimulação elétrica, resultando em uma abordagem mais translacional para a pesquisa experimental com animais. Nessa perspectiva, os primeiros passos já foram dados, todavia, deverão ser realizados mais estudos de análise e consolidação dessa nova técnica de ETCC em ratos.

7 RECONHECIMENTOS

O projeto foi apoiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), vinculado ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRGS. Os animais utilizados foram fornecidos sem custo financeiro pelo CREAL por haver pesquisadores do projeto vinculados ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS e da unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA

REFERÊNCIAS

- ATAY, A. *et al.* Cytotoxicity of hard and soft denture lining materials. **Dental Materials Journal**, v. 31, n. 6, p. 1082–1086, 2012.
- 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. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 2, p. 249–254, 2008.
- BRUNONI, A. R.; FREGNI, F.; PAGANO, R. L. Translational research in transcranial direct current stimulation (tDCS): A systematic review of studies in animals. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, n. 4, p. 471–481, 2011.
- BRUNONI, A. R.; VALIM, C.; FREGNI, F. Combination of noninvasive brain stimulation with pharmacotherapy. **Expert Review of Medical Devices**, v. 8, n. 1, p. 31–39, 2011.
- 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**, v. 9, n. 2, p. 209–217, 1 mar. 2016.
- DHAMNE, S. C. *et al.* Acute seizure suppression by transcranial direct current stimulation in rats. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 2, n. 8, p. 843–856, 2015.
- FENG, X. J. *et al.* Early transcranial direct current stimulation treatment exerts neuroprotective effects on 6-OHDA-induced Parkinsonism in rats. **Brain Stimulation**, v. 13, n. 3, p. 655–663, 2020.
- FENTON, B. W. *et al.* A preliminary study of transcranial direct current stimulation for the treatment of refractory chronic pelvic pain. **Brain Stimulation**, v. 2, n. 2, p. 103–107, 2009.
- FONSECA, R. B. *et al.* The influence of polymerization type and reinforcement method on flexural strength of acrylic resin. **Scientific World Journal**, v. 2015, p. 11–13, 2015.
- FRANK, E. *et al.* Anodal skin lesions after treatment with transcranial direct current stimulation. **Brain Stimulation**, v. 3, n. 1, p. 58–59, 2010.
- FREGNI, F. *et al.* A controlled clinical trial of cathodal DC polarization in patients with refractory epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 2, p. 335–342, 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**, v. 122, n. 1–2, p. 197–209, maio 2006b.
- FRITSCH, B. *et al.* Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: Potential implications for motor learning. **Neuron**, v. 66, n. 2, p. 198–204, 2010.
- GAMARO, G. D. *et al.* The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. **Physiology and Behavior**, v. 63, n. 4, p. 693–697, 1998.
- GEBODH, N. *et al.* Transcranial direct current stimulation among technologies for low-intensity transcranial electrical stimulation: classification, history, and terminology.

- In: **Practical guide to transcranial direct current stimulation**. Springer, Cham, 2019. p. 3-43.
- HASHEM, M. I. Advances in Soft Denture Liners: An Update. **The journal of contemporary dental practice**, v. 16, n. 4, p. 314–318, 2015.
- JABERZADEH, S. *et al.* Practical Guide to Transcranial Direct Current Stimulation. **Practical Guide to Transcranial Direct Current Stimulation**, 2019.
- JACKSON, M. P. *et al.* Animal models of transcranial direct current stimulation: Methods and mechanisms. **Clinical Neurophysiology**, v. 127, n. 11, p. 3425–3454, 2016.
- LASTE, G. *et al.* After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. **Experimental Brain Research**, v. 221, n. 1, p. 75–83, 3 ago. 2012.
- LIEBETANZ, D. *et al.* After-effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on cortical spreading depression. **Neuroscience Letters**, v. 398, n. 1–2, p. 85–90, 2006a.
- LIEBETANZ, D. *et al.* Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 7, p. 1216–1224, jul. 2006b.
- LIEBETANZ, D. *et al.* Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. **Clinical Neurophysiology**, v. 120, n. 6, p. 1161–1167, 2009.
- LIU, H. H. *et al.* Neuromodulatory Effects of Transcranial Direct Current Stimulation on Motor Excitability in Rats. **Neural Plasticity**, v. 2019, n. Lici, 2019.
- MINAMOTO, K. Allergic contact dermatitis from two-component acrylic resin in a manicurist and a dental hygienist. **Journal of Occupational Health**, v. 56, n. 3, p. 229–234, 2014.
- NITSCHKE, M. A.; PAULUS, W. tDCS. **Journal of Physiology**, p. 633–639, 2000.
- ORRÙ, G. *et al.* Motor stroke recovery after tDCS: A systematic review. **Reviews in the Neurosciences**, v. 31, n. 2, p. 201–218, 2020.
- PAULUS, W.; PRIORI, A. Practical Guide to Transcranial Direct Current Stimulation. **Practical Guide to Transcranial Direct Current Stimulation**, p. 115–131, 2019.
- RODRIGUES, S.; SHENOY, V.; SHETTY, T. Resilient liners: A review. **Journal of Indian Prosthodontist Society**, v. 13, n. 3, p. 155–164, 2013.
- SATURNINO, G. B.; ANTUNES, A.; THIELSCHER, A. On the importance of electrode parameters for shaping electric field patterns generated by tDCS. **NeuroImage**, v. 120, p. 25–35, 2015.
- SCHIAVETTI, R. *et al.* Control and reduction of peak temperature in self-curing resins. **Oral & implantology**, v. 2, n. 3, p. 21, 2009.

SPEZIA ADACHI, L. N. *et al.* Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. **Brain Research**, v. 1489, p. 17–26, 13 dez. 2012.

STAGG, C. J.; NITSCHKE, M. A. Physiological basis of transcranial direct current stimulation. **Neuroscientist**, v. 17, n. 1, p. 37–53, 2011a.

STAGG, C. J.; NITSCHKE, M. A. **Physiological basis of transcranial direct current stimulation** **Neuroscientist**, fev. 2011b.

TORRES, I. L. S. *et al.* Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 2, p. 241–244, 2001.

WOODS, A. J. *et al.* Effects of electrode drift in transcranial direct current stimulation. **Brain Stimulation**, v. 8, n. 3, p. 515–519, 2015.

WU, Y. J. *et al.* Repeated transcranial direct current stimulation improves cognitive dysfunction and synaptic plasticity deficit in the prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. **Brain Stimulation**, v. 10, n. 6, p. 1079–1087, 2017.

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**, v. 2, n. 3, p. 339, 2009.

ANEXO



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 2018/0555

Título: Proposta de um Novo Modelo Translacional para a Investigação dos Efeitos Comportamentais e Bioquímicos da Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) em Ratos Submetidos a um Modelo de Dor Neuropática Orofacial.

Pesquisador Responsável: DEISE PONZONI

Equipe de Pesquisa:

MAILTON VASCONCELOS	JAMILE BOFF	THÁIS NUNES SANTOS
MILTON CRISTIAN RODRIGUES COUGO	CAMILA OLIVEIRA DA COSTA	EDUARDA SPADER ALMEIDA
EDELA PURICELLI	ETIANE MICHELI MEYER CALLAI	BIANCA FERST BALBINOT
BEATRIZ RODRIGUES PÓVOA	HENRIQUE MULLER DE	ELISSA KERLI FERNANDES
CAROLINE BRASIL	LISANDRA EDA FUSINATO ZIN CIAPPARINI	NAYARA LOPES HEIDMANN
LUCIANA SANTA CATARINA	CECÍLIA LAÍS DE SOUZA ALMAGRO	ALEXANDRE SILVA DE QUEVEDO

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Data de Aprovação:

Data de Término: 31/12/2021

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade	Data Reunião	Documento
RATO HETEROGÊNICO	M/60 Dia(s)	18	12/03/2019	Projeto

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação 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.