



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DE TERAPIAS UP-DOWN E/OU BOTTOM-UP EM RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE RATOS SUBMETIDOS A
UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA**

Lisiane Santos da Silva

Porto Alegre

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EFEITO DE TERAPIAS UP-DOWN E/OU BOTTOM-UP EM RESPOSTAS
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE RATOS SUBMETIDOS A
UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA**

Autora: Lisiane Santos da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Coorientadora: Profa. Dra. Carla de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

da Silva, Lisiane Santos
EFEITO DE TERAPIAS UP-DOWN E/OU BOTTOM-UP EM
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE RATOS
SUBMETIDOS A UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA / Lisiane
Santos da Silva. -- 2019.

58 f.

Orientadora: Iraci Lucena da Silva Torres.

Coorientadora: Carla de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2019.

1. Dor neuropática. 2. Acupuntura. 3. ETCC. 4.
Modelo animal. I. da Silva Torres, Iraci Lucena,
orient. II. de Oliveira, Carla, coorient. III.
Título.

*Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje. Mas continue em frente
de qualquer jeito. (Martin Luther King)*

Ao meu avô Sady e minha avó Eva

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Iraci Lucena da Silva Torres, que me aceitou em seu grupo de pesquisa há cerca de 4 anos, e desde o primeiro momento dedicou-se ao meu crescimento científico e intelectual na área de pesquisa. Agradeço por sua dedicação, ensinamentos e alguns puxões de orelha.

Aos meus pais, Jorge César Felitti da Silva e Nadia Santos da Silva, obrigada é pouco para agradecer por todos os anos de compreensão, carinho e investimento. Desculpem as ausências, o mau humor e a preocupação em excesso. Essas poucas linhas escritas são para vocês e por vocês. Afinal, segundo meu pai “Ensino e estudo são a maior herança que podemos deixar para os filhos”.

À minha querida Coorientadora, parceira de vida, amiga e confidente Dra. Carla de Oliveira, tua presença, apoio e carinho foram essenciais nesta louca jornada. Me recebestes sempre de braços abertos, do primeiro ao último dia. Contribuístes com conhecimento, ensinamentos, conselhos e palavras de apoio e incentivo. És meu exemplo de profissional e principalmente ser humano.

A meu querido Coorientador do coração, Dr. Rafael Vercelino, fostes o meu primeiro “Sim”. Obrigada por estar disposto e presente quando as dúvidas existiram. Obrigada pela tua disponibilidade e de todos os sábados e domingos de ensinamentos na UEA.

A todos integrantes e ex-integrantes do grupo de pesquisa Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-Clínicas, a parceira de laboratório Larisse Longo, muito obrigada por todos os anos de companheirismo, parceria e risadas. Tenho certeza de que essa jornada seria muito mais árdua sem a presença de cada um de vocês. Todos marcaram sua trajetória na minha vida e sou eternamente grata, principalmente a todo o auxílio nestes 2 anos de mestrado.

A minha maior parceira, meu Batman, ou seria meu Robin? Meu tesouro da pós-graduação Roberta Ströher, obrigada é muito pouco para descrever o sentimento que tenho por ti. Fostes durante essa jornada minhas pernas e meus braços. Temos uma ligação só nossa, que foi construída nestes 2 anos de mestrado. Não vou falar muito pois tens o poder de ler meus pensamentos, então tu já sabes né? Obrigada, obrigada e obrigada. Essa dissertação é NOSSA.

As amigas do coração e da vida Vanessa Leal Scarabelot, Gabriela Gregory Regner, Natália de Paula Silveira e Fernanda Pereira, desculpem os almoços perdidos e os encontros desmarcados. Obrigada, por de perto ou de longe, manterem a torcida e o apoio. As vibrações positivas de vocês foram essenciais.

Aos amigos da pós-graduação, Josimar Macedo de Castro, Helouise Medeiros, Natália Oliveira e meus queridos IC Artur Alban Salvi e Thais Moraes, obrigada pelo auxílio e parceria em tantos dias de experimento e aulas. Foram dias e finais de semana intensos e contar com vocês foi maravilhoso.

Aos meu irmão de sangue Diego Santos da Silva e os irmãos de vida Luiz Felipe Velho, Rochele Velho e Rafael Kunst, obrigada por todos os dias e madrugadas de apoio e carinho. Vocês são demais e estão gravados no meu coração.

Agradeço a todos os funcionários da Unidade de Experimentação Animal (UEA), Unidade de Análises Moleculares e Proteínas (UAMP), onde desenvolvi todos os meus experimentos. É gratificante e emocionante, poder contar com vários locais equipados e com profissionais de excelência em épocas onde a pesquisa sofre com cortes, sucateamento e dúvidas perante seus valores.

Agradeço aos órgãos de fomento Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por meio do GPPG/HCPA, a CAPES pelos 23 meses de bolsa de pesquisa essencial para desenvolvimento e dedicação nesta pesquisa.

Enfim, em memória agradeço aos meus anjinhos da guarda, meu avô Sady Francisco da Silva e minhas avós Zuleika Felitti e Eva Santos, que infelizmente não puderam acompanhar, neste plano, esta trajetória comigo, mas que tenho certeza que de onde quer que estejam, me auxiliaram a escolher os melhores caminhos.

RESUMO

Dor Neuropática (DN) resulta de lesões do Sistema Nervoso Periférico (SNP) ou central (SNC), caracterizada alodinia e hiperalgesia decorrentes do processo de sensibilização central. As terapias farmacológicas disponíveis, muitas vezes, induzem analgesia parcial e são relacionadas a efeitos adversos, por vezes intoleráveis para o paciente. Desta forma, torna-se premente a busca de novas opções terapêuticas como os tratamentos não invasivos, que são de baixo custo e apresentam poucos efeitos adversos. Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC), vem se destacando na última década no tratamento de doenças neuropsiquiátricas, bem como da dor crônica. Adicionalmente, a Acupuntura (Ac), técnica da Medicina Tradicional Chinesa, também tem sido utilizada no tratamento de quadros de dores crônicas. Desta forma, esta dissertação teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento repetido com duas terapias não farmacológicas (ETCC e Ac) isoladas e em associação sobre a resposta nociceptiva e inflamatória em ratos submetidos a um modelo de DN, por contração do nervo isquiático. Foram avaliados os impactos destes tratamentos sobre os níveis de interleucina pró-inflamatória (IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-4 e IL-10) em córtex pré-frontal, e sobre a alodinia e hiperalgesia mecânica. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA) protocolo número: 2018-0025. Cento e vinte ratos Wistar machos foram divididos em 12 grupos experimentais: Sham-Dor, Sham-Dor + Sham-ETCC, Sham-Dor + Sham-ETCC + Ac, Sham-Dor + Ac, Sham-Dor + ETCC, Sham-Dor + ETCC + Ac, Dor, Dor + Sham-ETCC, Dor + Sham-ETCC + Ac, Dor + Ac, Dor + ETCC, Dor + ETCC + Ac. Modelo experimental de DN foi induzido por meio de 3 ligaduras no nervo da pata esquerda dos animais. O Sham foi submetido ao mesmo procedimento, porém o nervo foi somente manipulado. ETCC e/ou Ac foram plicados por 20 minutos/8dias. Na ETCC foi utilizada uma intensidade de 0,5mA. No tratamento Sham-ETCC, os eletrodos foram posicionados, mas mantidos desligados. Os animais que receberam tratamento com Ac foram previamente anestesiados com isoflurano (5% indução e 2,5% manutenção). Para avaliação da alodinia mecânica foi utilizado o teste de Von Frey no dia basal, 14^o pós-cirurgia e 24 horas pós-tratamento; para avaliar a hiperalgesia mecânica foi utilizado o teste de Randal-Selitto nos tempos 14^o pós-cirurgia e 24 horas pós-tratamento. Os níveis corticais de IL-1 β , IL-4 e IL-10 foram avaliados por Ensaio Imunoenzimático (ELISA), 48 horas pós-tratamento. A análise estatística dos testes nociceptivos e bioquímicos foi por ANOVA de 1 ou 3 vias/Bonferroni. Dados expressos em média \pm erro padrão da média, sendo considerado significativo o $P \leq 0,05$. Nossos resultados demonstram que a DN altera os níveis de IL-1 β , IL-4 e IL-10 em córtex pré-frontal em curto prazo, além de promover alodinia e hiperalgesia mecânica. Os tratamentos com ETCC e/ou Ac revertem o aumento da resposta nociceptiva e dos níveis de IL-4 e IL-10 em córtex pré-frontal e não alteraram os níveis de IL-1 β . Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram: 1. que ETCC ou Ac revertem alodinia e hiperalgesia mecânica induzidas pelo modelo de constrição do nervo isquiático, e este efeito não é potencializado quando as 2 técnicas foram associadas; 2. o envolvimento do sistema neuroimune no processo de DN; 3. o provável envolvimento da neuroinflamação no efeito analgésico induzido pelas técnicas neuromodulatórias avaliadas.

Palavras chaves: Dor Neuropática, Acupuntura, ETCC, Citocinas pro-inflamatórias, Citocinas anti-inflamatórias.

ABSTRACT

Neuropathic pain (NP) results from lesions of the Peripheral or Central Nervous System, characterized by allodynia and hyperalgesia resulting from the process central sensitization. Available pharmacological therapies often induce partial analgesia and are related to adverse effects, sometimes intolerable to the patient. The search for new therapeutic options is necessary, as noninvasive treatments, which are low cost and few adverse effects. Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) has been highlighted in the last decade in the treatment of neuropsychiatry diseases, as well as, chronic pain. Additionally, Acupuncture (Ac), a technique of Traditional Chinese Medicine, is also used to treat many diseases, including chronic pain. Thus, this dissertation had the objective to investigate the effects of the repeated treatment with two non-pharmacological therapies (tDCS and Ac), isolated and combined on nociceptive and inflammatory response of rats submitted to a NP model, by contraction of the sciatic nerve. The impacts of these treatments on pro-inflammatory (IL-1 β) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) interleukin levels in the prefrontal cortex, and on mechanical allodynia and hyperalgesia were evaluated. This study was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Porto Alegre Hospital de Clínicas (GPPG-HCPA) protocol number: 2018-0025. 120 male Wistar rats were divided into 12 experimental groups: Sham Pain, Sham Pain-Sham tDCS, Sham Pain-Sham tDCS-Ac, Sham Pain-Ac, Sham Pain-tDCS, Sham Pain-tDCS-Ac, Pain, Pain-Sham tDCS, Pain-Sham tDCS-Ac, Pain-Ac, Pain-tDCS, Pain-tDCS-Ac. Experimental NP model was induced by 3 ligatures on the left paw nerve of the animals. The sham was submitted to the same procedure, but the nerve was only manipulated. The treatments, with tDCS and / or Ac had a duration of 20 minutes / 8 days, and tDCS was applied with an intensity of 0.5mA. In the Sham-tDCS treatment, the electrodes were positioned, however, it kept off. Animals treated with Ac were previously anesthetized with isoflurane (5% induction and 2.5% maintenance). Mechanical allodynia was evaluated using von Frey test at baseline, 14th post-surgery and 24 hours post-treatment; To evaluate mechanical hyperalgesia, the Randal-Selitto test was used at 14th post-surgery and 24 hours post-treatment. Cortical levels of IL-1 β , IL-4 and IL-10 were assessed by immunoenzymatic assay (ELISA) 48 hours after treatment. Statistical analysis of nociceptive and biochemical tests was performed by 1 or 3-way ANOVA/Bonferroni. Data expressed as mean \pm standard error of the mean, $P \leq 0.05$ being considered significant. Our results demonstrate that NP alters IL-1 β , IL-4 and IL-10 levels in the short-term prefrontal cortex, as well as promoting allodynia and mechanical hyperalgesia in the paw where the experimental model was induced. Treatments with tDCS and / or Ac reversed the increase in nociceptive response and IL-4 and IL-10 levels in prefrontal cortex; however, there was no difference in the IL-1 β levels. The results obtained in this dissertation demonstrate: 1. that tDCS or Ac techniques reverse the allodynia and mechanical hyperalgesia induced by the sciatic nerve constriction model, and this effect is not potentialized by association of techniques; 2. the involvement of the neuroimmune system in the DN process; 3. the possible involvement of neuroinflammation in the analgesic effect induced by neuromodulatory techniques.

Keywords: Neuropathic Pain, Acupuncture, TDCS, Proinflammatory cytokines, Antiinflammatory cytokines.

Lista de Figuras

Revisão da Literatura:

Figura 1: Modulação de Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Periférico das Terapias Up-Down e Bottom-Up.

Figura 2: Fluxograma da pesquisa realiza com as palavras-chave.

Figura 3: Acupontos. Descrição dos pontos de acupuntura utilizados no estudo.

Lista de Abreviaturas

DN – Dor Neuropática
ETCC – Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua
Ac – Acupuntura
MTC – Medicina Tradicional Chinesa
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
GPPG – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
IASP - International Association for the Study of Pain
NMDA – N-metil D-Aspartato
AVE – Acidente Vascular Encefálico
SCP – Substância Cinzenta Periaquedutal
SNS – Sistema Nervoso Somatossensorial
IL1 β – Interleucina 1beta
IL4 – Interleucina 4
IL10 – Interleucina 10
OMS – Organização Mundial de Saúde
EA – Eletroacupuntura
SNP – Sistema Nervoso Periférico
SNC – Sistema Nervoso Central
GABA – Ácido gama-aminobutírico
TNF – Fator de necrose tumoral
TDAH – Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
SHR – Ratos Espontaneamente Hipertensivos
TrpV1 – Receptor de Potencial Transitório Vanilóide tipo 1
RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro
KO - Knockout

Sumário

1.Introdução	13
2. Referencial teórico	19
2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações	20
2.2 Dor	22
2.2.1 Dor Neuropática.....	23
2.2.2 Terapêutica Farmacológica	24
2.3 Terapêutica não farmacológica	25
2.3.1 Acupuntura	25
2.3.2 Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua	28
2.3.3 Mediadores Inflamatórios.....	30
3.0 Justificativa	33
4.0 Objetivo	35
4.1 Objetivo Geral	36
4.2 Objetivos Específicos	36
5.0 Referências	37
6.0 Artigo.....	42
7.0 Considerações finais.....	69
8.0 Perspectivas	71
9.0 Divulgações.....	73
10.0 Anexos.....	77
A. Aprovação Comitê de Ética.....	78
B. Co-autoria em artigos.....	79
C. ARRIVE Guideline Checklist.....	80

I - INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

A Dor, evento que acompanha diversos momentos da vida, a partir do nascimento, durante o crescimento, nas experiências com o passar dos anos, até a morte. É descrita pela *International Association for the Study of Pain (IASP)* (Loeser e Treede 2008) como uma sensação ou experiência emocional desagradável, associada com dano tecidual real ou potencial. Esta sensação tem papel fisiológico fundamental, atuando como um sistema de alerta quanto a ameaças ao organismo, sendo, portanto, uma proteção natural, que gera respostas reflexas e comportamentais mantendo o dano tecidual real ou potencial controlado (Vitor et al. 2008; Suzuki, Chapman, e Dickenson 1999). Trata-se de uma experiência complexa que envolve, além da tradução da experiência ambiental nociva, também o processamento central do estímulo emocional e cognitivo envolvido no processo nociceptivo (Vitor et al. 2008; Suzuki, Chapman, e Dickenson 1999). Atualmente, os principais sistemas para classificar a dor englobam fatores anatômicos, etiológicos, intensidade, duração e classificação fisiopatológica. A classificação anatômica descreve região ou área onde localiza-se a dor, já a etiológica, subdivide em aguda, lesão ou lesão subjacente, no nível de intensidade usa-se atualmente métodos de medida por escala variando conforme o quadro da doença inicial e o nível de consciência do indivíduo a ser avaliado. Os dois últimos níveis de classificação da dor são as mais específicas, sendo a duração da dor subdividido entre aguda e crônica. A aguda de resolução de curto prazo (3 a 6 meses) e a crônica que é descrita como contínua ou intermitente, podendo contínua após o tempo previsto para cicatrização. E finalmente, a classificação fisiopatológica que usa como base o mecanismo de ação da lesão e divide-se em 2 vias fisiológicas principais a nociceptiva e a neuropática (Orr, Shank, e Black 2017).

A Dor neuropática (DN) resulta de lesões do Sistema Nervoso Periférico (SNP) ou central (SNC), sendo caracterizada por alodinia mecânica e hiperalgesia térmica e mecânica (Loeser e Treede 2008), hiperatividade autonômica, dor do tipo contínua localizada em tecidos

cutâneos superficiais e/ou profundos, descrita em forma de queimação, agulhadas ou ardência, dormência e por ser altamente prevalente e incapacitante (Merskey H e Bogduk N 1986; Schestatsky e Nascimento 2009). Seu diagnóstico clínico é complexo, pois o paciente apresenta queixas múltiplas, podendo ser confundida com dor do tipo nociceptiva (Finnerup et al. 2016). Quadros de dor crônica, como a DN, tem como característica principal a presença de sensibilização central, decorrente de impulsos nociceptivos repetitivos, alterando a permeabilidade ao cálcio em neurônios de segunda ordem, aumentando a produção de prostaglandinas e óxido nítrico. Esse processo desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios, contribuindo para amplificar o processo doloroso e sensibilização das vias supra espinhais, hiperativando microglia e aumentando os impulsos excitatórios centrais. Por outro lado, também se instala o quadro de sensibilização periférica decorrente de alterações na densidade e na hiperexcitabilidade de fibras mielinizadas A δ e fibras amielinizadas do tipo C. Este fenômeno desencadeia o processo de degeneração de fibras, devido a alteração da expressão e da composição destas, caracterizada por múltiplos disparos ectópicos. Ocorre também alteração da transmissão do sinal e da resposta ao estímulo doloroso via células da glia e neurônios autonômicos (Meacham et al. 2017). Quadros de dor neuropática estão relacionados a doenças crônicas como Diabetes, Neuralgia Trigeminal ou pós-herpética e Câncer, bem como as doenças que acometem o SNC como Acidente Vascular Encefálico (AVE), Esclerose múltipla e lesões medulares pós-trauma (Finnerup et al. 2016).

O tratamento farmacológico disponível atualmente para DN tem como fármacos de primeira escolha, os antidepressivos tricíclicos, e como fármacos de segunda escolha, os anticonvulsivantes, como a gabapentina, ou pregabalina (Merskey H e Bogduk N 1986; Schestatsky e Nascimento, 2009). Estes tratamentos são de alto custo e muitas vezes ineficazes além de serem relacionados a efeitos adversos por vezes intoleráveis. O alívio parcial do quadro algico, pode ser decorrente da atuação do fármaco na sensibilização periférica, não alterando a

sensibilização central (Felix 2014). Dessa forma, buscam-se terapias alternativas de baixo custo e maior eficácia analgésica, como as técnicas utilizadas em fisioterapia como massoterapia, correntes analgésicas e condutas cinesioterapêuticas sem impacto, muitas vezes utilizadas em associação a terapia farmacológica disponível (Gierthmühlen e Baron 2016).

As terapêuticas usadas pela Ac e ETCC, podem agir por mecanismos *Bottom-up*, onde atua no periférico buscando a modulação central ou *Top-down* onde se buscar atua no central buscando modular o periférico. Como demonstrado na Figura 1, a Ac (acupuntura) pela inserção de agulhas nas regiões periféricas, pode atuar por meio de vias *Bottom-up* e a ETCC, através de uma estimulação central pode atuar por meio de vias *Up-Down*. De fato, a plasticidade central de mapas sensoriais no encéfalo e medula espinhal são dependentes de estímulos advindos da periferia, bem como demandas cognitivas (Quevedo e Coghill 2007). Portanto, terapêuticas que estimulem esses mecanismos podem intervir na transmissão e processamento da dor.

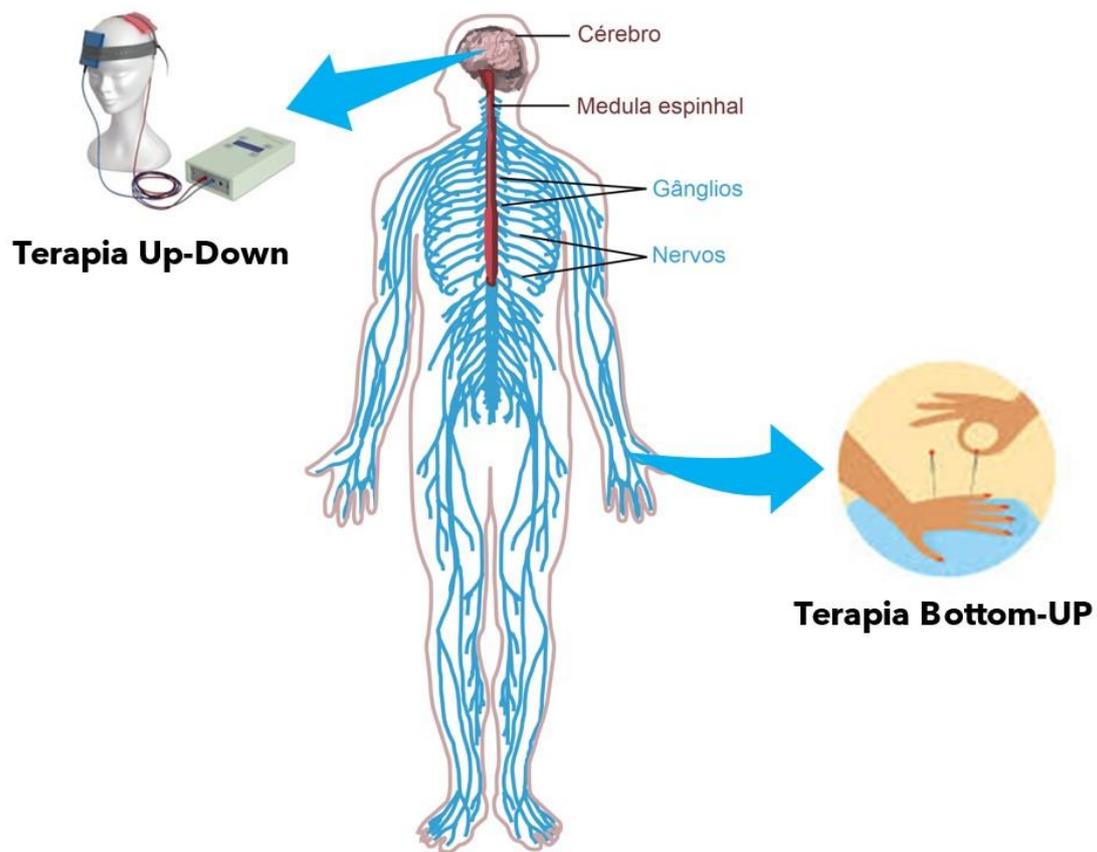


Figura 1: Modulação SNC e SNP das Terapias *Up-Down* e *Bottom-Up* (Imagem: o autor).

Acupuntura (Ac), terapia não farmacológica que se utiliza de vias *bottom-up*, vem sendo utilizada há cerca de dois mil anos, quando começou a ser utilizada na China e extremo oriente, para tratamento de diversas doenças, como síndromes dolorosas, hemiplegias, transtornos mentais, obesidade entre outras, baseando-se na teoria dos meridianos descrita inicialmente pelo Livro do Imperador Amarelo (Zhou e Benharash 2014; Cabýoglu, Ergene, e Tan 2006). A teoria dos meridianos é utilizada como forma de diagnóstico e facilita a localização dos diversos pontos de Ac, ou acupontos, utilizados para o tratamento. Para tal técnica utiliza-se as agulhas de Ac, que são manipuladas manualmente ou associada a correntes de baixa frequência, buscando modular as vias neurais envolvidas (Zhou e Benharash 2014). O efeito analgésico promovido pela Ac,

ocorre por meio da liberação de neurotransmissores opioides, como a encefalina, nas fibras nervosas da substância cinzenta periaquedutal (SCP), inibindo a pré e pós sinapse das fibras C e A δ (Cabýoglu, Ergene, e Tan 2006).

Nas últimas décadas, a Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC), uma terapia não farmacológica e não invasiva que utiliza vias top-down, vem sendo utilizada como adjuvante ao tratamento da dor crônica (Dimov et al. 2016). Esta técnica consiste na utilização de corrente elétrica contínua de baixa intensidade, aplicada sobre o escalpo do indivíduo por meio de eletrodos. Em quadros de DN, a ETCC parece modular a atividade neural de áreas hiperexcitadas no córtex somatossensorial e motor. Busca-se com essa técnica produzir alteração no limiar de potencial de repouso da membrana plasmática e, conseqüentemente, modificações na plasticidade sináptica dos neurônios, ocorrendo portanto, a ativação do sistema inibitório (Cioato et al. 2016) .

A partir dos fatores acima citados, esta dissertação buscou associar os benefícios milenares da Ac aos benefícios atuais da ETCC, buscando assim potencializar o efeito analgésico sobre quadros dolorosos de DN, sendo um tratamento não farmacológico adjuvante ao tratamento farmacológico amplamente utilizado na atualidade.

II - REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações

Nesse referencial teórico buscou-se ressaltar os principais aspectos da DN, Ac, ETCC e sua relação com os biomarcadores (Citocinas Pro-inflamatórias e Anti-inflamatórias). A estratégia de busca envolveu os seguintes bancos de dados: MEDLINE (site PubMed), Scielo, EMBASE e LILACS. Foram selecionados artigos publicados entre 1999 e 2019.

Nos sites PubMed, Scielo, EMBASE e LILACS foram realizadas buscas utilizando os seguintes termos: *Neuropathic Pain*, *Acupuncture*, *tDCS*, *Proinflammatory cytokines* e *Anti-inflammatory cytokines*. Durante a busca o termo *Neuropathic Pain*, foram encontrados 20135 artigos no PubMed, 328 artigos no Scielo, 37033 artigos no EMBASE e 216 artigos no LILACS. Com o termo *Acupuncture*, foram encontramos 15528 artigos no PubMed, 376 artigos no Scielo, 39171 artigos no EMBASE e 370 artigos no LILACS. Já com o termo *tDCS*, foram encontrados 5509 artigos no PubMed, 31 artigos no Scielo, 6375 artigos no EMBASE e 24 artigos no LILACS. Com o descritor, *Pro-inflammatory cytokines*, foram encontrados 57554 artigos no PubMed, 116 artigos no Scielo, 66977 artigos no EMBASE e 279 artigos no LILACS. Finalizando com o descritor *Anti-inflammatory cytokines*, foram encontrados 32428 artigos no PubMed, 192 artigos no Scielo, 74519 artigos no EMBASE e 183 artigos no LILACS.

Ao refinar a busca, realizando cruzamento entre as palavras-chave verifica-se na Figura 2 um restrito número de artigos publicados.

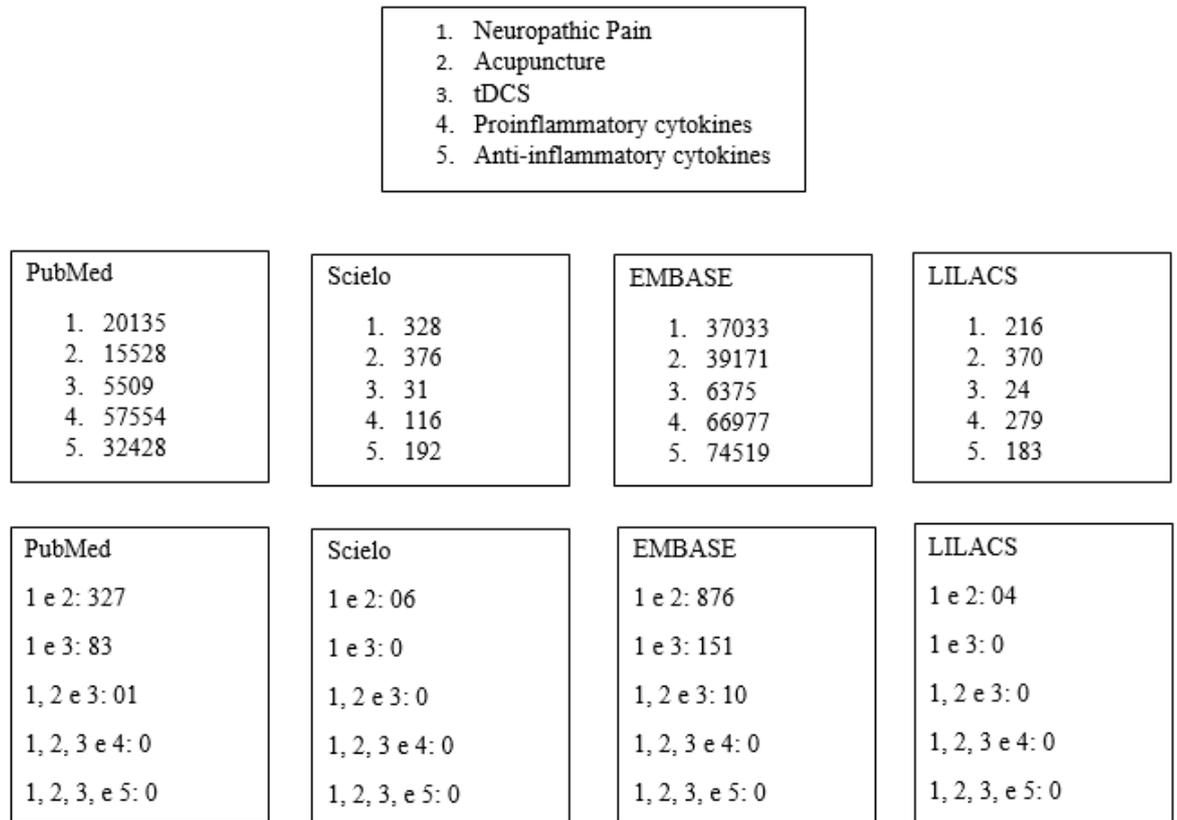


Figura 2: Fluxograma da pesquisa realizada com as palavras-chave.

2.2 Dor

Dor, experiência emocional desagradável, que pode ser associada a alterações nas percepções cognitivas, físicas e alterações na funcionalidade e atividades de vida diária (Hatch et al. 2018). A dor atinge cerca de 80% da população e está presente em diversas doenças. Dores podem ser aguda ou dores crônicas. A dor crônica é classificada em nociceptiva, neuropática (DN) e dor mista, com caráter inflamatório e neuropático, associada aos mais diversos tipos de câncer (López-González, Landry, e Favereaux 2017).

Dor crônica é um importante problema de saúde pública, com prevalência de cerca de 20-25% na população mundial, e tem sido considerada uma das condições de mais difícil tratamento na atualidade (López-González, Landry, e Favereaux 2017). A dor do tipo crônica, caracteriza-se por ser extremamente incapacitante, levando a limitações nas atividades de vida diária. Em quadros mais graves, pode levar ao isolamento social e à doenças psiquiátricas, como ansiedade e depressão (Cohen e Mao 2014). Sua fisiopatologia é descrita por meio de uma sensibilização de uma via nociceptiva aferente primária, que realiza sinapses no corno dorsal da medula espinal e transmite essa informação para centros superiores, em áreas supra-espinhais, como o córtex pré-frontal, córtex cingulado e parietal, levando a conscientização da dor (López-González, Landry, e Favereaux 2017). A dor Crônica se caracteriza por um sistema sensorial em desequilíbrio, que promove interpretações alteradas de estímulos sensoriais, gerando quadros constantes de dor espontânea. A dor do tipo nociceptiva é definida como dor consequente de um dano real ou potencial ao tecido não neural, alterando terminações nervosas ou os nociceptores periféricos, mantendo o Sistema Nervoso Somatossensorial (SNS) íntegro (Gierthmühlen e Baron 2016; Hatch et al. 2018). Já a DN é descrita como lesão neural de origem central ou periférica (Gierthmühlen e Baron 2016; Hatch et al. 2018). A DN periférica ou central é do tipo lancinante ou em queimação, com quadros de hiperalgesia, definida como exacerbação da resposta a estímulos dolorosos e de alodinia, resposta nociceptiva a um estímulo não

doloroso, características de sensibilização central (López-González, Landry, e Favereaux 2017; Meacham et al. 2017). A constante ativação do sistema nervoso mantém o quadro álgico espontâneo mesmo após a resolução da lesão geradora (Hatch et al. 2018; Gierthmühlen e Baron 2016).

2.1.1 Dor Neuropática (DN)

DN, presente em inúmeros quadros que cursam com dor crônica, afeta aproximadamente 5 a 8% da população geral, trazendo prejuízos à qualidade de vida e aumento da demanda de recursos de saúde (Burke et al. 2017; Macone e Otis 2018). Os sintomas descritos são formigamento, dor em queimação ou evocada e dormência (Hatch et al. 2018; Gierthmühlen e Baron 2016).

A fisiopatologia da DN do tipo periférica inicia a partir de múltiplas lesões ao longo do axônio do nervo afetado, lesões essas resultantes de traumas, compressões, hipóxia, inflamação e danos químicos que geram processos degenerativos nas fibras nervosas, além de alterações na expressão e composição dos canais iônicos (Meacham et al. 2017). Os processos degenerativos induzem disparos ectópicos e transmissão errônea do sinal, gerando como resposta erros de transdução e transmissão da resposta neuronal e, conseqüentemente, um quadro de dor crônica. Os disparos neuronais excessivos geram hiperexcitabilidade neuronal, modificando a expressão de neurotransmissores, fatores de crescimento neuronal, receptores e diversas outras moléculas neuroativas de neurônios aferentes primários. Levando a sensibilização dos neurônios e processos de hiperalgesia térmica e mecânica pela indução de liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) (Gierthmühlen e Baron 2016; Meacham et al. 2017; Hatch et al. 2018). De forma semelhante, ocorre a sensibilização central, porém esta inicia-se a partir de uma lesão ou trauma, gerando estímulos intensos que causam sensibilização das vias espinhais

e nociceptivas, fazendo com que as fibras do tipo C aferentes aumentem a excitabilidade de neurônios nociceptivos localizados na medula espinhal, tronco encefálico e córtex cerebral, levando a um processo primário de alodinia tátil e secundário de hiperalgesia (Gierthmühlen e Baron 2016; Meacham et al. 2017). Ocorrem também, alterações em receptores, canais iônicos e na expressão de alguns transmissores neurais, fazendo com que o sistema imune tenha uma papel essencial na manutenção e desenvolvimento da DN pelo meio das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Scholz e Woolf 2007)

2.2.2 Terapêutica Farmacológica

A terapia farmacológica atualmente disponível, apesar de considerada a principal ferramenta para manejo das diferentes classificações de dor (Macone e Otis 2018), mostra-se muitas vezes ineficaz no tratamento da DN, promovendo analgesia parcial (Meacham et al. 2017). Além disso, estes fármacos são relacionados a diversos efeitos adversos nos chamados tratamentos de primeira linha, que englobam o uso de anticonvulsivantes, sendo os mais utilizados a gabapentina e pregabalina, que promovem analgesia reduzindo a excitabilidade e descargas neuronais por ação gabaérgica, bloqueio ou modulação de canais de cálcio. Tais fármacos, porém, têm como efeitos colaterais sonolência, tontura e alguns medicamentos promovem a redução do número de plaquetas (Dworkin et al. 2010).

Os antidepressivos tricíclicos também são utilizados em casos de DN, promovendo analgesia independente de sua ação antidepressiva, pois atuam pela modulação de vias da dor por meio da ativação dos sistemas inibitório descendentes, como os sistemas opioidérgicos e adenosinérgicos, e inibição da recaptação de monoaminas (Macone e Otis 2018). No entanto, devem ser utilizados com cautela em pacientes cardiopatas, devido à ativação do sistema adrenérgico, e podem ser relacionados a efeitos adversos como aumento de peso, sonolência, xerostomia, constipação, entre outros (Macone e Otis 2018; Peixoto et al. 2008).

Por outro lado, o uso de opioides em dor crônica não oncológica é bastante controverso devido à indução de dependência e tolerância, além de efeitos adversos muitas vezes intoleráveis, como xerostomia, visão turva, retenção urinária, constipação intestinal, arritmia e rash cutâneo (Hatch et al. 2018; Macone e Otis 2018).

Anestésicos locais, assim como cirurgia para bloqueio do nervo afetado, têm efeitos analgésicos limitados devido a curtos períodos de tempo de recidiva (Hatch et al. 2018; Macone e Otis 2018).

Nos últimos anos, a classe dos canabinoides vem ganhando destaque devido a pesquisas que demonstram seus efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e poucos efeitos adversos. Seu uso no Brasil ainda é experimental, e a maioria das pesquisas os utiliza na terapêutica de DN refratária, apresentando maior eficácia em uso tópico do que uso sistêmico. Desta forma, têm sido propostos como coadjuvantes no tratamento da dor crônica (Hatch et al. 2018; Macone e Otis 2018).

Considerando o exposto acima, torna-se premente a busca de novas opções terapêuticas farmacológicas e não farmacológicas no tratamento de quadros de dores crônicas.

2.3 Terapêutica não farmacológica

2.3.1 Acupuntura (Ac)

Ac é uma terapêutica que teve início há mais de 2000 anos na China, baseada na teoria dos meridianos, foi descrita primeiramente pelo clássico livro do Imperador Amarelo (Zhou e Benharash 2014). A Teoria dos Meridianos relata a existência de 12 canais *Jing Luo* no corpo humano, onde estão localizados cerca de 324 pontos de Ac, ou acupontos. Estes podem ser utilizados para tratamento e alívio de sintomas de grande parte das doenças no extremo oriente e cerca de 43 doenças no ocidente, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo amplamente utilizado no alívio de dores crônicas (Zhao 2008; Zhou e Benharash 2014).

Ac, vem do latim *acus*, que significa agulha, e *pungere*, que significa puncionar. É uma técnica da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) que utiliza agulhas longas e finas posicionadas em acupontos específicos, localizado em meridianos energéticos com o objetivo de obtendo analgesia em patologias dolorosas ou tratar as diversas doenças (Zhao 2008).

Os meridianos (ou canais *Jing Luo*), não possuem base anatômica sua existência é baseada em dados empíricos e experiência adquirida ao longo dos anos de prática da MTC. Sugere-se que as regiões onde se localizam os acupontos, bem como ao longo dos meridianos, apresentam maior concentração de terminações nervosas aferentes e fibras do tipo A δ e C, assim como grande densidade de receptores sensoriais profundos (Zhou e Benharash 2014; Zhao 2008).

A analgesia da Ac pode ser induzida por meio de 2 tipos de manipulação: manual, ou Ac clássica (Ac); e estimulada pelo uso de corrente elétrica de baixa frequência, a Eletroacupuntura (EA). Ambas atuam em quadros álgicos modulando vias nociceptivas centrais e periféricas (Zhou e Benharash 2014). Neste estudo, utilizou-se a manipulação manual em 2 pontos bilaterais periféricos, como descrito na Figura 3, buscando, portanto, o uso de terapia bottom-up.

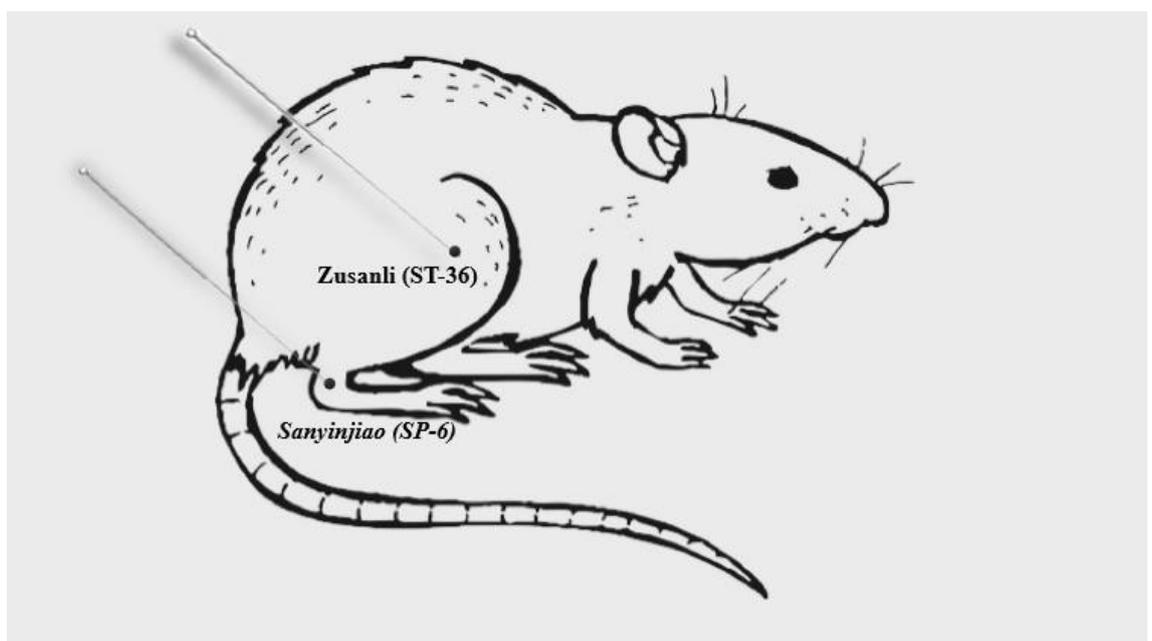


Figura 3: Acupontos. Descrição dos pontos de acupuntura utilizados no estudo (Imagem: o autor)

A agulha de Ac inserida em um acuponto, pode ser estimulada por movimentos crânio-caudal ou cauda-cranial, para se obter a sensação do DeQi. O *DeQi* pode ser descrita como dor, dormência, peso e plenitude do tecido profundo, imediatamente abaixo do acuponto, sendo esta sensação essencial para que ocorra analgesia por Ac (Zhao 2008). Imediatamente após a aplicação da técnica, o limiar doloroso aumenta gradativamente, sendo este um fator limitante para a obtenção da analgesia imediata. O efeito analgésico geralmente é observado ao final do período de tratamento, sendo, portanto, um efeito terapêutico cumulativo e prolongado (Zhao 2008).

O mecanismo neurofisiológico da analgesia por Ac pode ocorrer em nível periférico ou central. Sugere-se que ao puncionar o acuponto com a agulha de Ac diretamente no músculo, ocorra um acoplamento do tecido conjuntivo ao redor da agulha e, ao manipular a agulha nas direções crânio-caudal e caudo-crânial. Desta forma, a analgesia é promovida pela estimulação dos nociceptores por meio da manipulação do acuponto, levando à liberação de mediadores pró-inflamatórios, como substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, e analgésicos como a β -endorfina (Zhou e Benharash 2014; Zhao 2008; Zijlstra et al. 2003). A substância P atua sobre os mastócitos, secretando serotonina, histaminas e citocinas e, secundariamente, sobre os macrófagos, secretando citocinas e eicosanoides, principalmente o ácido araquidônico, importante regulador da atividade neuronal (Zijlstra et al. 2003). Ao manipular o acuponto, promovem-se mudanças do aporte sanguíneo periférico, por meio da vasodilatação local causada pela liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina que estimula fibras A δ e C (Zijlstra et al. 2003). As fibras do tipo A δ mielinizadas são ativadas com estímulos mais brandos e suaves, porém promovem um curto tempo de analgesia. Já as fibras

do tipo C não mielinizadas são ativadas com estimulações mais vigorosas e rápidas e promovem um prolongado tempo de analgesia (Zhao 2008).

Observou-se que, no SNC, as vias neurais ascendentes e descendentes de processamento da dor, estão intimamente envolvidas com a analgesia por Ac (Zhao 2008). As vias ascendentes envolvidas são o trato espinoparabraquial e o trato espinotalâmico, localizadas no corno dorsal superficial da medula espinhal, que participam da transmissão do estímulo doloroso e, em ramos mais profundos, o tálamo, envolvido na discriminação sensorial e emocional da dor. Ao ocorrer despolarização em terminais pré-sinápticos aferentes tipo C, ocorre a liberação de neurotransmissores como substância P e glutamato na fenda sináptica, inibindo a ativação de neurônios nociceptivos espinhais, promovendo alívio da dor. Se os acupontos selecionados, para o tratamento de doenças forem localizados no mesmo dermatomo do local fonte de dor, a inibição mostra-se mais eficaz (Zhao 2008).

2.3.2 Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC)

ETCC é uma técnica de neuromodulação não invasiva capaz de modular a atividade neural e a excitabilidade de áreas corticais do encéfalo humano (Dimov et al. 2016). Esta técnica baseia-se na aplicação de uma corrente elétrica contínua de baixa frequência que flui entre dois eletrodos, um anodo e um catodo. Os eletrodos são posicionados sobre áreas pré-determinadas do escalpo do indivíduo a serem estimuladas. A eficácia da ETCC em diferentes doenças é dependente das áreas a serem estimuladas, decorrente de diferentes montagens (posicionamento) dos eletrodos. É importante considerar que as regiões adjacentes e distantes das áreas onde os eletrodos estão posicionados também são moduladas por meio das interconexões neurais primárias (Filho et al. 2016; Dimov et al. 2016).

A aplicação de ETCC altera o potencial de membrana do neurônio. De acordo com a montagem utilizada, anódica (ou positiva) ou catódica (ou negativa), induzirá, respectivamente,

despolarização ou hiperpolarização da membrana neuronal por meio de atração e repulsão de íons sódio e potássio no meio extracelular (C. de Oliveira et al. 2019). Estudos recentes utilizando ETCC em ratos sugerem que além de induzir mudanças de polarização na membrana, podem ocorrer modificações nas células da glia, modulando vias inflamatórias em modelos animais (Leffa et al. 2018). Esta modulação nas descargas espontâneas neuronais induzem efeitos funcionais e adaptações nas vias encefálicas (Leffa et al. 2018).

A analgesia induzida pela ETCC em processos dolorosos é atribuída à estimulação de áreas do córtex motor primário, região adjacente à área doloroso. A estimulação desta região, promove alterações de excitabilidade cortical, sugere-se, portanto, que a analgesia do ETCC dependa da modulação das fibras do córtex envolvidos neste processo doloroso, para outras áreas também atuantes no processamento da dor, como os núcleos talâmicos, tronco encefálico e cíngulo anterior. Além de promover modulação da liberação de neurotransmissores, como glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA) e a atividade dos opioides, em vias descendentes (Dimov et al. 2016).

Estudos do nosso grupo mostram que a ETCC é capaz de induzir analgesia em diferentes modelos animais de dor crônica, como no de DN (Cioato et al. 2016; Filho et al. 2016), dor inflamatória (Laste et al, 2011), hiperalgesia induzida por estresse crônico (Spezia Adachi et al. 2012a; Adachi et al. 2017), dor crônica pós menopausa (da Silva Moreira et al. 2016), dor orofacial inflamatória (Scarabelot et al. 2019) e neuralgia do trigêmeo (Callai et al. 2019). Cioato e col, (2016) demonstrou que a ETCC bicefálica, aplicada em ratos submetidos a um modelo de DN por constrição do nervo isquiático, reverteu a hiperalgesia térmica e mecânica imediatamente e 24 horas após o término do tratamento, e este efeito se manteve em longo prazo (7 dias após o final do tratamento com ETCC). Neste estudo, observamos um aumento nos níveis de IL-1 β e de IL-10 após 7 dias do final do tratamento no córtex cerebral e redução dos níveis na medula espinhal (Cioato et al. 2016). Corroborando estes resultados,

outro estudo do nosso grupo demonstrou que a ETCC anódica reverteu completamente a alodinia mecânica e hiperalgesia térmica induzida por estresse crônico e diminuiu os níveis do Fator de necrose tumoral- α (TNF) no hipocampo de ratos (Spezia Adachi et al. 2012a). Considerando outros contextos neuronais, nós demonstramos que a aplicação repetida de ETCC bicefálica reverteu o déficit de memória e diminuiu a hiperatividade de ratos espontaneamente hipertensos (*Spontaneously hypertensive rats - SHR*), utilizado como um modelo de Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH). Desta forma, podemos sugerir que a ETCC modula centros superiores, promovendo alterações significativas em testes de memória de curta duração, além de promover o aumento dos níveis de dopamina em hipocampo e estriado, mediador químico envolvido no aprendizado e memória (Leffa et al. 2018; 2017; 2016). Nosso grupo demonstrou que a aplicação de ETCC, em ratos submetidos a dieta hiperacalórica modula o córtex pré-frontal, diminuindo a compulsão alimentar, o comportamento do tipo ansioso e níveis de parâmetros inflamatórios (de Oliveira et al. 2019; Macedo et al. 2016). Mais recentemente, utilizamos um modelo de epilepsia, no qual os resultados mostraram um aumento no tempo de latência para a primeira convulsão após aplicação repetida de ETCC catodal (Regner et al. 2018).

2.3.3 Mediadores Inflamatórios:

Processos inflamatórios teciduais e respostas neuroimunes locais ou centrais são induzidas por estímulos nocivos. A DN pode surgir após a cronificação de uma lesão de nervo periférico, consequente da ativação das células da glia, liberação de substâncias algogênicas (glutamato e substância P), e de mediadores inflamatórios, promovendo alterações em nível central (Hung, Lim, e Doshi 2017). A ativação do sistema imunológico e o desequilíbrio entre os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias tem sido associadas à presença de dor crônica como a DN, sendo considerados biomarcadores de dor (Hung, Lim, e Doshi 2017).

No sistema nervoso central, células imunes, como os macrófagos M1, são ativados em um primeiro momento pela microglia, como agentes pro-inflamatórios, fazendo parte da resolução da inflamação local e periférica e importante para a restauração da integridade dos tecidos afetados. De maneira alternada, são ativados os macrófagos M2, agentes anti-inflamatórios, responsável pela secreção de interleucinas anti-inflamatórias como IL-10, responsáveis por promover o reparo tecidual (da Silva et al. 2015). A interleucina 1 β (IL-1 β) é a principal citocina envolvida na cronificação do processo patológico, atuando na modulação neuronal e no processo nociceptivo (Vania et al. 2006; Hung, Lim, e Doshi 2017; del Rey et al. 2012; Bobinski et al. 2018). Recentemente, descobriu-se que a IL-1 β é expressa em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal (de Oliveira et al. 2011). Logo após a lesão, a IL-1 β atua estimulando a liberação de glutamato dos terminais aferentes primários e aumentando a expressão de receptores de glutamato em neurônios pós-sinápticos da medula espinhal. IL-1 β , também ativa a liberação de substância P em neurônios aferentes da medula espinhal, aumentando a fosforilação da tirosina do receptor NMDA. Em altos níveis, IL-1 β modula a excitabilidade neuronal, atuando em canais de sódio, receptores TRPV1, GABA e NMDA (Pilat et al. 2015).

Estudo mostrou que molécula antagonista de IL-1 β , ao ser ministrado por via intratecal em modelos animais de constrição crônica do nervo isquiático, induziu hiperalgesia e alodinia, comprovando a função analgésica dessa interleucina em doses elevadas (Hung, Lim, e Doshi 2017). Corroborando este dado, um estudo prévio demonstrou que a administração intratecal de um antagonista do receptor de IL-1 preveniu a apoptose neuronal e diminuiu os sintomas da DN (Pilat et al. 2015). Atualmente, sugere-se que a IL-1 β regula a expressão da proteína transportadora de glutamato em astrócitos, associando-a ao desenvolvimento dos sintomas de DN e a eficácia parcial de fármacos opioides (Pilat et al. 2015).

Já os macrófagos do tipo M2 liberam as citocinas anti-inflamatórias que em níveis elevados são relacionadas a inibição do sistema imune, promovendo analgesia local (Eijkelkamp et al. 2016). Dentre estas citocinas, podemos citar a Interleucina 4 (IL-4) como moduladora na DN, promovendo analgesia. IL-4 atua sobre macrófagos ativados, reduzindo os efeitos das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8, e levando à inibição da produção de radicais livres de oxigênio (C. M. B. de Oliveira et al. 2011). Após constrição crônica do isquiático os baixos níveis de IL-4 na medula espinhal podem levar a alodinia mecânica (Üçeyler et al. 2011a). Em estudos com camundongos IL-4 nocaute, a administração de IL-4 reduz o processo inflamatório, diminui os níveis de citocinas pró-inflamatórias e reduz as medidas em testes de alodinia mecânica (Hung, Lim, e Doshi 2017).

A Interleucina 10 (IL-10) inibe as citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias, aumenta a proliferação de mastócitos e impede a produção de IFN γ (Vanderwall et al. 2018). A IL-10 é dependente do tipo de lesão para que seus níveis estejam aumentados ou reduzidos, mas seus mecanismos de ação ainda não são claros. Deficiência em seus níveis induz hiperalgesia mecânica e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias gerando um prolongado quadro doloroso após constrição do nervo isquiático (Üçeyler et al. 2011a). Por outro lado, em casos de lesão ou sensibilização periférica, inicialmente ocorre um aumento compensatório nos seus níveis de IL-10, seguido de redução em sua secreção, chegando a níveis abaixo do fisiológico no local da lesão (Vanderwall et al. 2018). Já em modelos de lesão por constrição completa do nervo, é observada elevação em seus níveis (Hung, Lim, e Doshi 2017).

III - JUSTIFICATIVA

3.0 JUSTIFICATIVA

Quadros algícos crônicos, acarretam altos custos para o sistema público de saúde, além de prejuízos a sua qualidade de vida devido a incapacidades funcionais nas atividades de vida diária. Considerando o aumento progressivo de quadros de dor crônica, a ampla prevalência de DN e a escassez de alternativas farmacológicas efetivas, devido ao alto custo, limitada analgesia e uma ampla gama de efeitos adversos, torna-se premente a busca de novas alternativas terapêuticas. A associação de técnicas de neuroestimulação central e periférica (terapias up-down e/ou bottom-up), como a ETCC e a Ac, respectivamente, pode ser uma alternativa promissora, inovadora e potencialmente efetiva. Esta combinação pode potencializar os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios de ambas as técnicas contribuindo para uma melhor aplicação clínica em quadro de dores crônicas, como a DN.

IV – OBJETIVO

4.0 OBJETIVO:

4.1 Objetivo Geral:

Esta dissertação propõe como objetivo principal avaliar o efeito isolado e da associação de duas técnicas neuromodulatórias, ETCC e Ac em parâmetros nociceptivos e neuroquímicos de ratos submetidos a um modelo de DN por constrição do isquiático.

4.2 Objetivos específicos:

- A) Avaliar o efeito da ETCC e/ou da Ac na alodinia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático em ratos;
- B) Avaliar o efeito da ETCC e/ou da Ac na hiperalgesia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático em ratos;
- C) Avaliar o efeito da ETCC e/ou da Ac sobre os níveis de citocina pró-inflamatórias IL-1 β em córtex pré-frontal de ratos submetidos à constrição do nervo isquiático;
- D) Avaliar o efeito da ETCC e/ou Ac sobre os níveis de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 em córtex pré-frontal de ratos submetidos à constrição do nervo isquiático;

V – REFERÊNCIAS REFERENCIAL TEÓRICO

5.0 REFERÊNCIAS

- Adachi, Lauren Naomi Spezia, Carla de Oliveira, Rafael Vercelino, Isabel Cristina de Macedo, Gabriela Laste, Alexandre Silva Quevedo, Vanessa Leal Scarabelot, Wolnei Caumo, e Iraci Lucena da Silva Torres. 2017. "Evaluation of Different Procedure Involved in the Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) Technique Experimental Application". *Clinical & Biomedical Research* 37 (2). <https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/71299>.
- Apkarian, A. Vania, Simona Lavarello, Anke Randolph, Hector H. Berra, Dante R. Chialvo, Hugo O. Besedovsky, e Adriana del Rey. 2006. "Expression of IL-1beta in Supraspinal Brain Regions in Rats with Neuropathic Pain". *Neuroscience Letters* 407 (2): 176–81. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.034>.
- Apkarian, A. Vania, Yamaya Sosa, Sreepadma Sonty, Robert M. Levy, R. Norman Harden, Todd B. Parrish, e Darren R. Gitelman. 2004. "Chronic Back Pain Is Associated with Decreased Prefrontal and Thalamic Gray Matter Density". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (46): 10410–15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2541-04.2004>.
- Bennett, G. J., e Y. K. Xie. 1988. "A Peripheral Mononeuropathy in Rat That Produces Disorders of Pain Sensation like Those Seen in Man". *Pain* 33 (1): 87–107. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6).
- Bobinski, Franciane, Juliana Maia Teixeira, Kathleen Anne Sluka, e Adair Roberto Soares Santos. 2018. "IL-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain". *Pain* 159 (3): 437–50. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001109>.
- Burke, D., B. M. Fullen, D. Stokes, e O. Lennon. 2017. "Neuropathic Pain Prevalence Following Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis". *European Journal of Pain (London, England)* 21 (1): 29–44. <https://doi.org/10.1002/ejp.905>.
- Cabýoglu, Mehmet Tugrul, Neyhan Ergene, e Uner Tan. 2006. "The Mechanism of Acupuncture and Clinical Applications". *The International Journal of Neuroscience* 116 (2): 115–25. <https://doi.org/10.1080/00207450500341472>.
- Callai, Etiane Micheli Meyer, Vanessa Leal Scarabelot, Liciane Fernandes Medeiros, Carla de Oliveira, Andressa de Souza, Isabel Cristina Macedo, Stefania Giotti Cioato, et al. 2019. "Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) and Trigeminal Pain: A Preclinical Study". *Oral Diseases* 25 (3): 888–97. <https://doi.org/10.1111/odi.13038>.
- Chang, Kyung Ha, Sun Joon Bai, Hyejung Lee, e Bae Hwan Lee. 2014. "Effects of Acupuncture Stimulation at Different Acupoints on Formalin-Induced Pain in Rats". *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology : Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 18 (2): 121–27. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.2.121>.
- Cioato, Stefania Giotti, Liciane Fernandes Medeiros, Paulo Ricardo Marques Filho, Rafael Vercelino, Andressa de Souza, Vanessa Leal Scarabelot, Carla de Oliveira, et al. 2016. "Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model". *Brain Stimulation* 9 (2): 209–17. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.12.001>.

- Clark, Anna K, Elizabeth A Old, e Marzia Malcangio. 2013. “Neuropathic pain and cytokines: current perspectives”. *Journal of Pain Research* 6 (novembro): 803–14. <https://doi.org/10.2147/JPR.S53660>.
- Cohen, Steven P., e Jianren Mao. 2014. “Neuropathic Pain: Mechanisms and Their Clinical Implications”. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 348 (fevereiro): f7656. <https://doi.org/10.1136/bmj.f7656>.
- Deuis, Jennifer R., Lucie S. Dvorakova, e Irina Vetter. 2017. “Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents”. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (setembro). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>.
- Dimov, Luiz Fabio, Adriano Cardozo Franciosi, Ana Carolina Pinheiro Campos, André Russowsky Brunoni, e Rosana Lima Pagano. 2016. “Top-Down Effect of Direct Current Stimulation on the Nociceptive Response of Rats”. *PloS One* 11 (4): e0153506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153506>.
- Dworkin, Robert H., Alec B. O’Connor, Joseph Audette, Ralf Baron, Geoffrey K. Gourlay, Maija L. Haanpää, Joel L. Kent, et al. 2010. “Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update”. *Mayo Clinic Proceedings* 85 (3 Suppl): S3-14. <https://doi.org/10.4065/mcp.2009.0649>.
- Eijkelkamp, Niels, Cristine Steen-Louws, Sarita A. Y. Hartgring, Hanneke L. D. M. Willemsen, Judith Prado, Floris P. J. G. Lafeber, Cobi J. Heijnen, C. E. Hack, Joel A. G. van Roon, e Annemieke Kavelaars. 2016. “IL4-10 Fusion Protein Is a Novel Drug to Treat Persistent Inflammatory Pain”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36 (28): 7353–63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0092-16.2016>.
- Falk, S., D. H. Ipsen, C. K. Appel, A. Ugarak, D. Durup, A. H. Dickenson, e A. M. Heegaard. 2015. “Randall Selitto Pressure Algometry for Assessment of Bone-Related Pain in Rats”. *European Journal of Pain (London, England)* 19 (3): 305–12. <https://doi.org/10.1002/ejp.547>.
- Felix, Elizabeth Roy. 2014. “Chronic Neuropathic Pain in SCI: Evaluation and Treatment”. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* 25 (3): 545–71, viii. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2014.04.007>.
- Filho, Paulo Ricardo Marques, Rafael Vercelino, Stefania Giotti Cioato, Liciane Fernandes Medeiros, Carla de Oliveira, Vanessa Leal Scarabelot, Andressa Souza, et al. 2016. “Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) Reverts Behavioral Alterations and Brainstem BDNF Level Increase Induced by Neuropathic Pain Model: Long-Lasting Effect”. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 64 (janeiro): 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016>.
- Finnerup, Nanna B., Simon Haroutounian, Peter Kamerman, Ralf Baron, David L. H. Bennett, Didier Bouhassira, Giorgio Cruccu, et al. 2016. “Neuropathic Pain: An Updated Grading System for Research and Clinical Practice”. *Pain* 157 (8): 1599–1606. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000492>.
- Fruhstorfer, H., W. Gross, e O. Selbmann. 2001. “Von Frey Hairs: New Materials for a New Design”. *European Journal of Pain (London, England)* 5 (3): 341–42. <https://doi.org/10.1053/eujp.2001.0250>.
- Gierthmühlen, Janne, e Ralf Baron. 2016. “Neuropathic Pain”. *Seminars in Neurology* 36 (5): 462–68. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584950>.
- Grachev, I. D., B. E. Fredrickson, e A. V. Apkarian. 2000. “Abnormal Brain Chemistry in Chronic Back Pain: An in Vivo Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study”. *Pain* 89 (1): 7–18. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(00\)00340-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(00)00340-7).

- Hatch, Maya N., Timothy R. Cushing, Gregory D. Carlson, e Eric Y. Chang. 2018. “Neuropathic Pain and SCI: Identification and Treatment Strategies in the 21st Century”. *Journal of the Neurological Sciences* 384 (janeiro): 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.11.018>.
- Hung, Alice L., Michael Lim, e Tina L. Doshi. 2017. “Targeting Cytokines for Treatment of Neuropathic Pain”. *Scandinavian Journal of Pain* 17: 287–93. <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2017.08.002>.
- Ju, Ziyong, Huashun Cui, Xiaohui Guo, Huayuan Yang, Jinsen He, e Ke Wang. 2013. “Molecular Mechanisms Underlying the Effects of Acupuncture on Neuropathic Pain”. *Neural Regeneration Research* 8 (25): 2350–59. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.25.006>.
- Kiguchi, Norikazu, Yuka Kobayashi, Fumihiko Saika, Haruka Sakaguchi, Takehiko Maeda, e Shiroh Kishioka. 2015. “Peripheral Interleukin-4 Ameliorates Inflammatory Macrophage-Dependent Neuropathic Pain”. *Pain* 156 (4): 684–93. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000097>.
- Kilkenny, Carol, William J. Browne, Innes C. Cuthill, Michael Emerson, e Douglas G. Altman. 2010. “Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research”. *PLoS Biology* 8 (6): e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.
- Leffa, Douglas Teixeira, Bruna Bellaver, Carla de Oliveira, Isabel Cristina de Macedo, Joice Soares de Freitas, Eugenio Horacio Grevet, Wolnei Caumo, Luis Augusto Rohde, André Quincozes-Santos, e Iraci L. S. Torres. 2017. “Increased Oxidative Parameters and Decreased Cytokine Levels in an Animal Model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder”. *Neurochemical Research* 42 (11): 3084–92. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2341-6>.
- Leffa, Douglas Teixeira, Bruna Bellaver, Artur Alban Salvi, Carla de Oliveira, Wolnei Caumo, Eugenio Horacio Grevet, Felipe Fregni, André Quincozes-Santos, Luis Augusto Rohde, e Iraci L. S. Torres. 2018. “Transcranial Direct Current Stimulation Improves Long-Term Memory Deficits in an Animal Model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Modulates Oxidative and Inflammatory Parameters”. *Brain Stimulation* 11 (4): 743–51. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.04.001>.
- Leffa, Douglas Teixeira, Andressa de Souza, Vanessa Leal Scarabelot, Liciane Fernandes Medeiros, Carla de Oliveira, Eugenio Horacio Grevet, Wolnei Caumo, Diogo Onofre de Souza, Luis Augusto Paim Rohde, e Iraci L. S. Torres. 2016. “Transcranial Direct Current Stimulation Improves Short-Term Memory in an Animal Model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder”. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 26 (2): 368–77. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.11.012>.
- Liu, Jian, Xiaomei Feng, Min Yu, Weiyang Xie, Xin Zhao, Weiyan Li, Ren Guan, e Jianguo Xu. 2007. “Pentoxifylline Attenuates the Development of Hyperalgesia in a Rat Model of Neuropathic Pain”. *Neuroscience Letters* 412 (3): 268–72. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.11.022>.
- Loeser, John D., e Rolf-Detlef Treede. 2008. “The Kyoto Protocol of IASP Basic Pain Terminology”. *Pain* 137 (3): 473–77. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>.
- López-González, María José, Marc Landry, e Alexandre Favereaux. 2017. “MicroRNA and Chronic Pain: From Mechanisms to Therapeutic Potential”. *Pharmacology*

- & *Therapeutics* 180 (dezembro): 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.06.001>.
- Macedo, I. C., C. de Oliveira, R. Vercelino, A. Souza, G. Laste, L. F. Medeiros, V. L. Scarabelot, et al. 2016. “Repeated Transcranial Direct Current Stimulation Reduces Food Craving in Wistar Rats”. *Appetite* 103: 29–37.
<https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.03.014>.
- Maciel, Leonardo Yung dos Santos, Kamilla Mayara Lucas da Cruz, Ariane Martins de Araujo, Zak Moreira de Andrade Silva, Daniel Badauê-Passos, Valter Joviniano Santana-Filho, e Josimari Melo DeSantana. 2014. “Electroacupuncture Reduces Hyperalgesia after Injections of Acidic Saline in Rats”. Research article. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/485043>.
- Macone, Amanda, e James A. D. Otis. 2018. “Neuropathic Pain”. *Seminars in Neurology* 38 (6): 644–53. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1673679>.
- Meacham, Kathleen, Andrew Shepherd, Durga P. Mohapatra, e Simon Haroutounian. 2017. “Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms”. *Current Pain and Headache Reports* 21 (6): 28. <https://doi.org/10.1007/s11916-017-0629-5>.
- Medeiros, Magda Alves de, Newton Sabino Canteras, Deborah Suchecki, e Luiz Eugênio A. M. Mello. 2003. “Analgesia and C-Fos Expression in the Periaqueductal Gray Induced by Electroacupuncture at the Zusanli Point in Rats”. *Brain Research* 973 (2): 196–204. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02479-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02479-x).
- Meotti, F. C., R. Campos, Kabs da Silva, A. F. Paszcuk, R. Costa, e J. B. Calixto. 2012. “Inflammatory Muscle Pain Is Dependent on the Activation of Kinin B₁ and B₂ Receptors and Intracellular Kinase Pathways”. *British Journal of Pharmacology* 166 (3): 1127–39. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01830.x>.
- Merskey H, e Bogduk N. 1986. “Classification of Chronic Pain. Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy”. *Pain. Supplement* 3: S1-226.
- Oliveira, Caio Marcio Barros de, Rioko Kimiko Sakata, Adriana Machado Issy, Luis Roberto Gerola, e Reynaldo Salomão. 2011. “Citocinas e dor”. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 61: 260–65.
- Oliveira, Carla de, Joice Soares de Freitas, Isabel Cristina Macedo, Vanessa Leal Scarabelot, Roberta Ströher, Daniela Silva Santos, Andressa Souza, Felipe Fregni, Wolnei Caumo, e Iraci L. S. Torres. 2019. “Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) Modulates Biometric and Inflammatory Parameters and Anxiety-like Behavior in Obese Rats”. *Neuropeptides* 73 (fevereiro): 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.09.006>.
- Orr, Patty Montgomery, Bettina Cobb Shank, e Amy Conner Black. 2017. “The Role of Pain Classification Systems in Pain Management”. *Critical Care Nursing Clinics of North America* 29 (4): 407–18.
<https://doi.org/10.1016/j.cnc.2017.08.002>.
- Peixoto, Helicinia Giordana Espíndola, Ivana Aragão Lira Vasconcelos, Ana Cláudia Moreira Sampaio, e Marina Kiyomi Ito. 2008. “Antidepressivos e alterações no peso corporal”. *Revista de Nutrição* 21 (3): 341–48.
<https://doi.org/10.1590/S1415-52732008000300009>.
- Pilat, Dominika, Ewelina Rojewska, Agnieszka M. Jurga, Anna Piotrowska, Wioletta Makuch, Barbara Przewlocka, e Joanna Mika. 2015. “IL-1 receptor antagonist improves morphine and buprenorphine efficacy in a rat neuropathic pain

- model”. *European Journal of Pharmacology* 764 (outubro): 240–48.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.058>.
- Quevedo, Alexandre S., e Robert C. Coghill. 2007. “Attentional Modulation of Spatial Integration of Pain: Evidence for Dynamic Spatial Tuning”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (43): 11635–40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3356-07.2007>.
- Regner, Gabriela G., Patrícia Pereira, Douglas T. Leffa, Carla de Oliveira, Rafael Vercelino, Felipe Fregni, e Iraci L. S. Torres. 2018. “Preclinical to Clinical Translation of Studies of Transcranial Direct-Current Stimulation in the Treatment of Epilepsy: A Systematic Review”. *Frontiers in Neuroscience* 12: 189. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00189>.
- Rey, Adriana del, A. Vania Apkarian, Marco Martina, e Hugo O. Besedovsky. 2012. “Chronic Neuropathic Pain-like Behavior and Brain-Borne IL-1 β ”. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1262 (julho): 101–7.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06621.x>.
- Santos-Nogueira, Eva, Elena Redondo Castro, Renzo Mancuso, e Xavier Navarro. 2012. “Randall-Selitto Test: A New Approach for the Detection of Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury”. *Journal of Neurotrauma* 29 (5): 898–904.
<https://doi.org/10.1089/neu.2010.1700>.
- Scarabelot, Vanessa L., Carla de Oliveira, Liciane F. Medeiros, Isabel C. de Macedo, Stefania G. Cioato, Lauren Naomi S. Adachi, Ana Helena Paz, Andressa de Souza, Wolnei Caumo, e Iraci L. S. Torres. 2019. “Transcranial Direct-Current Stimulation Reduces Nociceptive Behaviour in an Orofacial Pain Model”. *Journal of Oral Rehabilitation* 46 (1): 40–50.
<https://doi.org/10.1111/joor.12726>.
- Schestatsky, Pedro. [s.d.]. “DEFINIÇÃO, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA”, 11.
- Schestatsky, Pedro, e Osvaldo José M. Nascimento. 2009. “What Do General Neurologists Need to Know about Neuropathic Pain?” *Arquivos De Neuro-Psiquiatria* 67 (3A): 741–49. <https://doi.org/10.1590/s0004-282x2009000400039>.
- Scholz, Joachim, e Clifford J. Woolf. 2007. “The Neuropathic Pain Triad: Neurons, Immune Cells and Glia”. *Nature Neuroscience* 10 (11): 1361–68.
<https://doi.org/10.1038/nn1992>.
- Silva Moreira, Sônia Fátima da, Liciane Fernandes Medeiros, Andressa de Souza, Carla de Oliveira, Vanessa Leal Scarabelot, Felipe Fregni, Wolnei Caumo, e Iraci L. S. Torres. 2016. “Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) Neuromodulatory Effects on Mechanical Hyperalgesia and Cortical BDNF Levels in Ovariectomized Rats”. *Life Sciences* 145 (janeiro): 233–39.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.011>.
- Silva, Morgana D. da, Franciane Bobinski, Karina L. Sato, Sandra J. Kolker, Kathleen A. Sluka, e Adair R. S. Santos. 2015. “IL-10 Cytokine Released from M2 Macrophages Is Crucial for Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of Acupuncture in a Model of Inflammatory Muscle Pain”. *Molecular Neurobiology* 51 (1): 19–31. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8790-x>.
- Spezia Adachi, Lauren Naomi, Wolnei Caumo, Gabriela Laste, Liciane Fernandes Medeiros, Joanna Ripoll Rozisky, Andressa de Souza, Felipe Fregni, e Iraci L. S. Torres. 2012a. “Reversal of Chronic Stress-Induced Pain by Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) in an Animal Model”. *Brain Research* 1489 (dezembro): 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.10.009>.

- . 2012b. “Reversal of Chronic Stress-Induced Pain by Transcranial Direct Current Stimulation (TDCS) in an Animal Model”. *Brain Research* 1489 (dezembro): 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.10.009>.
- Suzuki, R., V. Chapman, e A. H. Dickenson. 1999. “The Effectiveness of Spinal and Systemic Morphine on Rat Dorsal Horn Neuronal Responses in the Spinal Nerve Ligation Model of Neuropathic Pain”. *Pain* 80 (1–2): 215–28.
- Uçeyler, Nurcan, e Claudia Sommer. 2008. “Cytokine Regulation in Animal Models of Neuropathic Pain and in Human Diseases”. *Neuroscience Letters* 437 (3): 194–98. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.03.050>.
- Üçeyler, Nurcan, Tengü Topuzoğlu, Peter Schiesser, Saskia Hahnenkamp, e Claudia Sommer. 2011a. “IL-4 Deficiency Is Associated with Mechanical Hypersensitivity in Mice”. *PLoS One* 6 (12): e28205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028205>.
- . 2011b. “IL-4 Deficiency Is Associated with Mechanical Hypersensitivity in Mice”. *PLoS One* 6 (12): e28205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028205>.
- Vanderwall, Arden G., Shahani Noor, Melody S. Sun, Jacob E. Sanchez, Xuexian O. Yang, Lauren L. Jantzie, Nikolaos Mellios, e Erin D. Milligan. 2018. “Effects of spinal non-viral interleukin-10 gene therapy formulated with D-mannose in neuropathic interleukin-10 deficient mice: behavioral characterization, mRNA and protein analysis in pain relevant tissues”. *Brain, behavior, and immunity* 69 (março): 91–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.11.004>.
- Vania, Apkarian A., Lavarello Simona, Randolph Anke, Berra Hugo H., Chialvo Dante R., Besedovsky Hugo O., e Adriana del Rey. 2006. “Expression of IL-1 β in supraspinal brain regions in rats with neuropathic pain”. *Neuroscience letters* 407 (2): 176–81. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.034>.
- Vitor, Aline Oliveira, Edson Lopes da Ponte, Paula M. Soares, Krihsnamurti de M. Carvalho, Maria E. de Sousa Rodrigues, Manoel Cláudio A. Patrocínio, Raquel C. de Sousa Lima, e Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos. 2008. “Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica”. <https://doi.org/10.3395/reciis.v2i1.133pt>.
- Vivancos, G. G., W. A. Verri Jr., T. M. Cunha, I. R. S. Schivo, C. A. Parada, F. Q. Cunha, e S. H. Ferreira. 2004. “An Electronic Pressure-Meter Nociception Paw Test for Rats”. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37 (3): 391–99. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000300017>.
- Wang, Jun-Ying, Yong-Hui Gao, Li-Na Qiao, Jin-Ling Zhang, Pei-Jing Rong, e Jun-Ling Liu. 2019. “[Electroacupuncture alleviated incisional neck pain possibly by suppressing TNF- α expression and increasing IL-4/IL-4 receptor signaling in cervical dorsal part of spinal cord in incisional neck pain rats]”. *Zhen Ci Yan Jiu = Acupuncture Research* 44 (10): 703–8. <https://doi.org/10.13702/j.1000-0607.190355>.
- Zhao, Zhi-Qi. 2008. “Neural Mechanism Underlying Acupuncture Analgesia”. *Progress in Neurobiology* 85 (4): 355–75. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.05.004>.
- Zhou, Wei, e Peyman Benharash. 2014. “Effects and Mechanisms of Acupuncture Based on the Principle of Meridians”. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies* 7 (4): 190–93. <https://doi.org/10.1016/j.jams.2014.02.007>.
- Zijlstra, Freek J., Ineke van den Berg-de Lange, Frank J. P. M. Huygen, e Jan Klein. 2003. “Anti-Inflammatory Actions of Acupuncture”. *Mediators of Inflammation* 12 (2): 59–69. <https://doi.org/10.1080/0962935031000114943>.

6.0 ARTIGO

Transcranial current stimulation and acupuncture
induce analgesia and alter inflammatory parameter of rats submitted to neuropathic pain
model

Lisiane Santos da Silva^{1,2,3}, Carla de Oliveira^{1,6}, Rafael Vercelino^{1,5}, Roberta
Ströher^{1,3,4}, Artur A. Salvi^{1,3}, Stefania Giotti Cioato^{1,3}, Helouise R. Medeiros^{1,2,3},
Vanessa L. Scarabelot¹, Wolnei Caumo², Iraci L.S. Torres^{1,2,3,4}.

¹ Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Pre-clinical studies- Centro de Pesquisa Experimental (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil;

² Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

³ Animal Experimentation Unit and Graduate Research Group, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil;

⁴ Post-Graduate Program in Biological Sciences, Pharmacology and Therapeutics, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

⁵ Faculdade de Desenvolvimento do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, Health and Wellness School Laureate International Universities

⁶ Faculdades São Francisco de Assis, Porto Alegre, RS, Brazil.

***CORRESPONDING AUTHOR:**

Iraci Lucena da Silva Torres, PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos, n. 2350. Bairro Santa Cecilia

90035-903- Porto Alegre, RS, Brazil.

e-mail: iltorres@hcpa.edu.br

VII – CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta dissertação demonstram que a DN altera os níveis de IL-1 β , IL-4 e IL-10 em córtex pré-frontal em curto prazo, demonstrando o envolvimento destas citocinas no processo de cronificação da dor, além de promover alodinia e hiperalgesia mecânica na pata onde o modelo experimental foi induzido. Os tratamentos com ETCC e/ou Ac revertem o aumento da resposta nociceptiva em curto prazo e dos níveis de IL-4 e IL-10 em córtex pré-frontal e não alteraram os níveis de IL-1 β . Adicionalmente, esta dissertação demonstrou: 1. que ETCC ou Ac revertem alodinia e hiperalgesia mecânica induzidas pelo modelo de constrição do nervo isquiático, e este efeito não é potencializado quando as 2 técnicas são associadas; 2. o envolvimento do sistema neuroimune no processo de DN; 3. o provável envolvimento da neuroinflamação no efeito analgésico induzido pelas técnicas neuromodulatórias avaliadas.

Este estudo translacional demonstram o potencial analgésico das técnicas modulatórias podendo ser um adjuvante no tratamento da DN. É importante enfatizar que este foi um estudo pré-clínico, sendo necessários novos estudos para uma melhor compreensão dos efeitos destas duas técnicas isoladas ou em associação e as vias de neuroinflamação alteradas por elas.

VIII - PERSPECTIVAS

8.0 PERSPECTIVAS

Para melhor compreender as vias de sinalização da dor crônica e o papel das citocinas na neuroinflamação será importante dosar os níveis de glutamato em áreas encefálicas envolvidas no processo nociceptivo e buscar um melhor entendimento do papel da microglia no processo de cronificação da dor.

Além disso, se faz necessário um melhor entendimento do papel das citocinas em estruturas como tálamo, intimamente envolvido na recepção do sinal nociceptivo e na transmissão deste sinal até o córtex cerebral.

Em futuro estudo serão analisados dados já obtidos da associação entre ETCC e Acupuntura em longo prazo, analisando o comportamento da analgesia também em longo prazo.

IX - DIVULGAÇÕES

9.0 DIVULGAÇÕES

2018

1. **Lisiane Santos da Silva**; Gabriela Gregory Regner; Iraci L.S. Torres; Pricila Pflüger; Carla de Oliveira; Vanessa Leal Scarabelot; Roberta Ströher; Andressa de Souza; Felipe Fregni; Patrícia Pereira. Estimulação Elétrica Transcraniana Catodal Aumenta a Latência para Primeira Convulsão e os Níveis de BDNF e NGF em Animais Submetidos ao Modelo Kindling. Apresentado sobre a forma de e-pôster. Em II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018, Porto Alegre, RS. Livro de Resumos do II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018. v. 2. p. 21-21.
2. Helouise Medeiros; Mayra Zancanaro; Carla de Oliveira; Vanessa L Scarabelot; Roberta Stroher; Isabel Cristina de Macedo; Bettega Costa Lopes; **Lisiane Santos da Silva**; João Pedro de Abreu; Wolnei Caumo; Iraci LS Torres. Analgesia Preemptiva Induzida em Modelo Animal Cirúrgico por Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC). Apresentado sobre a forma de e-pôster. Em II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018, Porto Alegre, RS. Livro de Resumos do II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018. v. 2. p. 17-17.
3. Natalia P Silveira; Carla de Oliveira; Vanessa L Scarabelot; Rafael Vercelino; **Lisiane S Silva**; Gabriela G Regner; Andressa de Souza; Diego Evandro da Silva Rios; Wolnei Caumo; Iraci LS Torres. Morphine Exposure and Maternal Deprivation in the Early Postnatal Period Modify Neuromotor Development and Nerve Growth Factor Levels. Apresentado sobre a forma de e-pôster. Em II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018, Porto Alegre, RS. Livro de Resumos do II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018. v. 2. p. 25-25.
4. **Lisiane Santos da Silva**; Gabriela Gregory Regner; Iraci Lucena da Silva Torres; Pricila Pflüger; Carla de Oliveira; Vanessa Leal Scarabelot; Roberta Stroher; Andressa de Souza; Felipe Fregni; Patrícia Pereira. Estimulação Elétrica Transcraniana Catodal (ETCC-C) Aumenta a Latência para Primeira Convulsão e os Níveis de Neurotrofinas em Córtex Cerebral de Ratos Submetidos ao Modelo de Kindling. Apresentado sobre a forma de e-pôster. Em: 38º Semana Científica do HCPA, 2018, Porto Alegre, RS. Anais da 38º Semana Científica do HCPA, 2018. v. 38. p. 242-242.
5. Natalia de Paula Silveira; Carla de Oliveira; Vanessa Leal Scarabelot; Roberta Passos Palazzo; Laura Reck Cechinel; Ionara Rodrigues; Rafael Vercelino; **Lisiane S. Silva**; Wolnei Caumo; Iraci L. S. Torres. Exposição à Morfina e Deprivação Materna no Período Pós-natal Altera Parâmetros Epigenéticos em Medula Espinhal de Ratos. Apresentado sobre a forma de e-pôster. Em: 38º Semana Científica do HCPA, 2018, Porto Alegre, RS. Anais da 38º Semana Científica do HCPA, 2018. v. 38. p. 182-182.
6. Roberta Ströher; Carla de Oliveira; Andressa de Souza; **Lisiane Santos da Silva**; Helouise Richardt Medeiros; Artur Aban Salvi; Isabel Cristina de Macedo; Iraci L. S. Torres. Alteração Gênero Dependente dos Níveis Hipocâmpais de Fator de Crescimento Nervoso (NGF) Induzida por Deprivação Materna e Alimento Palatável. Apresentado sobre a forma de e-pôster. Em: 38º Semana Científica do HCPA, 2018, Porto Alegre, RS. Anais da 38º Semana Científica do HCPA, 2018. v. 38. p. 241-241.

7. Bettega Costa Lopes; Luana Xavier Marques; Gabriela Regner; Roberta Stroher; **Lisiane Santos da Silva**; Stefania Cioato; João Pedro Abreu da Silva; Artur Alban Salvi; Carla de Oliveira; Iraci L. S. Torres. Exercício Físico e Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) Induz Analgesia e Altera os Níveis de BDNF na Medula de Ratos Submetidos a um Modelo de Dor Neuropática. Apresentado sobre a forma de e-pôster. Em: 38ª Semana Científica do HCPA, 2018, Porto Alegre, RS. Anais da 38ª Semana Científica do HCPA, 2018. v. 38. p. 246-246.

8. Luana Xavier Marques; Bettega Costa Lopes; Gabriela Regner; Roberta Stroher; Stefania Cioato; **Lisiane S. da Silva**; Diego Rios; Josimar Macedo; Carla de Oliveira; Iraci L. S. Torres. Exercício Físico Associado a Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) Induz Analgesia em Ratos Submetidos a um Modelo de Dor Neuropática. Apresentado sobre a forma de e-pôster. Em: 38ª Semana Científica do HCPA, 2018, Porto Alegre, RS. Anais da 38ª Semana Científica do HCPA, 2018. v. 38. p.246-246.

9. **Lisiane Santos da Silva**; Carla de Oliveira; Joice Soares de Freitas; Isabel Cristina Macedo; Vanessa Leal Scarabelot; Roberta Ströher; Daniela Silva dos Santos; Andressa de Souza; Felipe Fregni; Wolnei Caumo; Iraci L. S. Torres. Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Modulates Biometric, Inflammatory and Behavior Parameters In Obese Rats. Apresentado sobre a forma de pôster. Em X Simpósio Internacional em Neuromodulação, São Paulo, SP. Anais do X Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2018. v. 1. p.1-27.

2019

1. Roberta Ströher; Carla de Oliveira; **Lisiane Santos da Silva**; Helouise Richardt Medeiros; Isabel Cristina de Macedo; Iraci Lucena da Silva Torres. Exposição ao Alimento Palatável na Adolescência não Altera os Níveis Hipotalâmicos e Hipocámpais de Citocinas Pró-inflamatórias entre Ratos Machos e Fêmeas Submetidos à Deprivação Materna no Período Neonatal. Apresentado sobre a forma de pôster. Em 39ª Semana Científica do HCPA, 2019, Porto Alegre, RS.

2. **Lisiane Santos da Silva**; Carla de Oliveira; Roberta Ströher; Artur Alban Salvi; Helouise R. Medeiros; Josimar Macedo de Castro; Fernanda dos Santos Pereira; Rafael Vercelino; Iraci Lucena da Silva Torres. Terapias Up-Down e Bottom-up Alteram Comportamento Antinociceptivo e Parâmetro Inflamatório em Modelo Animal de Dor Neuropática. Apresentado sobre a forma de pôster. Em 39ª Semana Científica do HCPA, 2019, Porto Alegre, RS.

3. Artur Alban Salvi; **Lisiane Santos da Silva**; Carla de Oliveira; Roberta Ströher; Stefania Giotti Cioato; Rafael Vercelino; Iraci Lucena da Silva Torres. Acupuntura e ETCC Altera Parâmetro Inflamatório em Modelo Animal de Construção do Nervo Isquiático. Apresentado sobre a forma de pôster. Em 39ª Semana Científica do HCPA, 2019, Porto Alegre, RS.

4. Josimar Macedo de Castro; Vanessa Silva de Souza; Jeovana Ceresá; **Lisiane Santos da Silva**; Roberta Ströher; Helouise Richardt Medeiros; Fernanda dos Santos Pereira; José Assumpção; Carla de Oliveira; Iraci Lucena da Silva Torres. Ribosídeo de Nicotinamida, um Nad⁺ Percursor, Atenua a Adiposidade e Resistência Periférica à Insulina em Ratos Obesos Induzidos por Dieta. Apresentado sobre a forma de pôster. Em 39ª Semana Científica do HCPA, 2019, Porto Alegre, RS.

5. **Lisiane Santos da Silva**; Carla de Oliveira; Roberta Ströher; Artur A. Salvi; Helouise R. Medeiros; Wolnei Caumo; Paulo Roberto S. Sanches; Rafael Vercelino; Felipe Fregni e Iraci LS Torres. Effect of Acupuncture and/or Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) on Nociceptive Response and Central Levels of IL-1 β and IL-10 in Rats Submitted to a Neuropathic Pain Model. Apresentado sobre a forma de pôster. Em XI Simpósio Internacional em Neuromodulação, São Paulo, SP. Anais da XI Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2019. v. 2. p.15-16.

6. Roberta Ströher; Paulo Roberto Stefani Sanches; **Lisiane Santos da Silva**; Helouise Richardt Medeiros; Dirson João Stein; Felipe Fregni; Wolnei Caumo; Iraci LS Torres. Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS): Development of Preclinical Equipment. Apresentado sobre a forma de pôster. Em XI Simpósio Internacional em Neuromodulação, São Paulo, SP. Anais da XI Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2019. v.2. p.16-17.

7. Josimar Macedo de Castro; **Lisiane Santos da Silva**; Carla de Oliveira; Roberta Ströher; Helouise Richardt Medeiros; Wolnei Caumo; Rafael Vercelino; Iraci LS Torres. Acupuncture Improves Articular Function and, Combined with Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS), Modulates Anti-inflammatory Cytokine IL-4 in Animal Model of Neuropathic Pain. Apresentado sobre a forma de pôster. Em X Congresso de Atualização em Neurociências, São Paulo, SP.

X - ANEXOS

10.0 ANEXOS

A. Aprovação Comitê de Ética



**GRUPO DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



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: 180025

Data de Aprovação do Projeto: 05/03/2018

Título:

Data de Término: 16/03/2020

EFEITO DE TERAPIAS UP-DOWN E/OU BOTTOM-UP EM RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA

Equipe de pesquisa:

CAELA DE OLIVEIRA

LEISANE SANTOS DA SILVA

ROBERTA STROHER

Submissão
23/02/2018

Documento
APROVAÇÃO

Especie/Linhagem
RATO - WISTAR

Sexo/Idade
Machos

Qtd.
211

Data Recurso
27/02/2018

Situação
APROVADO

Total de Animais: 211


MICHAEL EVERTON ANDRADES
Vice-Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais

- 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.

B. Co-autoria em artigos

1. de Oliveira C; Scarabelot VL; Vercelino R; Silveira NP; Adachi LNS; Regner GG; Silva LS; de Macedo IC; de Souza A; Caumo W; Torres ILS. Morphine Exposure and Maternal Deprivation During the Early Postnatal Period After Neuromotor Development and Nerve Growth Factor Levels. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2017; doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.09.001.

2. Ströher R; de Oliveira C; Lopes BC; **da Silva, LS**; Regner, GG; Medeiros HR; Macedo, IC; Caumo W; Torres IL. Maternal Deprivation Alters Nociceptive Response in a Gender-Dependent Manner in Rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2019; <https://doi.org/10.1016/j.ijdevn>

3. Ströher R; de Oliveira C; Stein DJ; Macedo IC; Goularte JF; **da Silva LS**; Regner GG; Medeiros HR; Caumo W; Torres ILS. Maternal Deprivation and Sex Alter Central Levels of Neurotrophins and Inflammatory Cytokines in Rats Exposed to Palatable Food in Adolescence. *Development Neuroscience*. **Accepted for publication**. 2020.

C. ARRIVE Guideline Checklist

The ARRIVE Guidelines Checklist

Animal Research: Reporting In Vivo Experiments

Carol Kilkenny¹, William J Browne², Innes C Cuthill³, Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman⁵

¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK.

	ITEM	RECOMMENDATION	Section/ Paragraph
Title	1	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.	Page 2 and 43
Abstract	2	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.	Page 8 and 44
INTRODUCTION			
Background	3	<p>a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study and explain the experimental approach and rationale.</p> <p>b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.</p>	Page 23-32, 45, 46
Objectives	4	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.	Page 36 and 46
METHODS			
Ethical statement	5	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.	Page 46
Study design	6	<p>For each experiment, give brief details of the study design including:</p> <p>a. The number of experimental and control groups.</p> <p>b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when).</p> <p>c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals).</p> <p>A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.</p>	<p>Page 46 and 47</p> <p>Page 47 and 50</p> <p>Page 46</p>
Experimental procedures	7	<p>For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example:</p> <p>a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s).</p> <p>b. When (e.g. time of day).</p> <p>c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze).</p> <p>d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).</p>	<p>Page 47,48 and 49</p> <p>Page 46</p>
Experimental animals	8	<p>a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range).</p> <p>b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naïve, previous procedures, etc.</p>	<p>Page 46</p> <p>Page 46</p>

The ARRIVE guidelines. Originally published in *PLoS Biology*, June 2010

Housing and husbandry	9	Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free (SPF); type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.	Page 46 Page 46
Sample size	10	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.	Page 46 Page 47, 48
Allocating animals to experimental groups	11	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.	Page 47
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).	Page 52, 53
Statistical methods	13	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.	Page 51 Page 64-67 Page 51
RESULTS			
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).	
Numbers analysed	15	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50%). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why.	
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).	Page 52 - 53
Adverse events	17	a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.	
DISCUSSION			
Interpretation/ scientific implications	18	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results? c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.	Page 53 - 56 Page 70 e 72
Generalisability/ translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.	Page 70
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.	Page 58