

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAIS
GRUPO DE ESTUDOS EM NEUROCIÊNCIAS**

ETIANE MICHELI MEYER CALLAI

**ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA EM
MODELOS ANIMAIS DE DOR**

PORTO ALEGRE

2021

ETIANE MICHELI MEYER CALLAI

**ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA EM MODELOS
ANIMAIS DE DOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutor em Clínica Odontológica/Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais.

Orientadora: Profa. Dra. Deise Ponzoni.

PORTO ALEGRE

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Callai, Etiane Micheli Meyer
ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA EM
MODELOS ANIMAIS DE DOR. / Etiane Micheli Meyer Callai.
-- 2021.
75 f.
Orientadora: Deise Ponzoni.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2021.

1. Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua.
2. Dor. 3. Animais de laboratório. 4. Desenvolvimento
de tecnologia. I. Ponzoni, Deise, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a minha filha Rafaela por me ensinar diariamente a amar.”

AGRADECIMENTOS

O longo caminho percorrido até aqui não teria sido possível sem a participação de pessoas especiais às quais tenho muito a agradecer...

A Deus por me proporcionar todas as condições e oportunidades de aprendizado e evolução;

Ao meu mentor, Professor Alexandre Silva de Quevedo que me guiou com muita generosidade em cada passo durante meu doutorado, por sua sabedoria e amor à pesquisa que me levaram a me apaixonar pela vida científica;

À Professora Deise Ponzoni que me apoiou, acolheu e orientou nos momentos cruciais;

A minha família que me apoiou de todas as formas possibilitando que eu perseguisse meu sonho;

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Neurociência da Faculdade de Odontologia, em especial à doutoranda Luciana Santa Catarina pela parceria no estudo e pesquisa;

Ao colega pesquisador Dr. Henrique Müller de Quevedo que idealizou a técnica de colagem do estimulador em ratos usada neste projeto e esteve sempre disponível;

Às equipes da Unidade de Experimentação Animal e do Setor de Bioengenharia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à coordenadora Enfermeira Marta Cioato, às Veterinárias Dra. Daniela Campagnol e Dra. Tuane Garcez e ao Engenheiro Dr. Paulo Sanches sua disponibilidade e empenho em minha pesquisa;

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por todo o aprendizado;

E a todos que, direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para esta valorosa conquista.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Chales Darwin.

RESUMO

A busca por novas terapias que possam contribuir para o controle efetivo da dor é necessária, uma vez que as abordagens atualmente disponíveis consistem principalmente no emprego de fármacos com importantes efeitos adversos. Uma técnica pesquisada por seus potenciais efeitos analgésicos com efeitos adversos não importantes é a Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC). Esta terapia de estimulação do córtex cerebral tem apresentado resultados positivos em diferentes situações clínicas neuropsiquiátricas em pacientes e animais. Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado. Para tanto, pesquisas pré-clínicas têm sido executadas em número crescente. Entretanto, as pesquisas com animais apresentam limitações relativas aos modelos de aplicação da ETCC que acrescentam vieses importantes aos resultados. Além disso, são escassas revisões sistemáticas que sumarizem o conhecimento atual sobre os efeitos da ETCC em animais de experimentação. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da ETCC na analgesia na pesquisa pré-clínica em animais. Neste intuito, foram realizados dois protocolos de pesquisa. O primeiro avaliou o funcionamento e segurança de novo equipamento de estimulação para ratos em diferentes intensidades de corrente. O segundo consistiu em uma revisão sistemática de literatura sobre os efeitos no comportamento nociceptivo da ETCC em animais. Os resultados sugerem que o equipamento idealizado é viável quanto ao seu funcionamento e seguro na dose de 0,35mA. Também, a revisão da literatura demonstrou que a ETCC é capaz de induzir analgesia em animais em situação experimental.

Palavras-chave: estimulação transcraniana por corrente contínua; dor; animais de laboratório.

ABSTRACT

The search for new therapies that can contribute to the effective control of pain is important, since the currently available approaches consist mainly of the use of drugs with important adverse effects. One technique researched for its potential analgesic effects with few adverse effects is Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS). This cerebral cortex stimulation therapy has shown positive results in different neuropsychiatric clinical situations in patients and animals. However, its mechanisms are not fully understood. Therefore, pre-clinical research has been carried out in an increasing number. However, animal research has limitations regarding the application models of tDCS with important biases. In addition, there are few systematic reviews that summarize current knowledge about the effects of tDCS on experimental animals. Thus, the present study aimed to evaluate the analgesic effects of tDCS in animals. To this end, two research protocols were carried out. The first evaluated the functioning and safety of new stimulation equipment for rats at different current intensities. The second one consisted of a systematic review of the literature on the effects on nociceptive behavior of tDCS in animals. The results suggest that the idealized equipment is feasible in terms of its operation and safe at a dose of 0.35mA. Also, the literature review demonstrated that ETCC is capable of inducing analgesia in animals in experimental situation.

Keywords: transcranial direct current stimulation; pain; laboratory animals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Base Plástica e Estimulador.....	40
Figura 2 – Capacete.....	41
Figura 3 – Sessão de Estimulação.....	42
Figura 4 – Condições da Pele Abaixo do Eletrodo.....	43
Figura 5 - <i>Flow Diagram of Study Selection</i>	63
Figura 6 - <i>TDCS Publications</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Summary of Included Evidence of tDCS Effects on Pain Models in Animals</i>	62
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
ETCC	Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua
EUA	Estados Unidos da América
SNC	Sistema nervoso central
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartic acid</i>
IASP	<i>Association for the Study of Pain</i>
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i>
S1	Córtex somatossensorial primário
S2	Córtex somatossensorial secundário
M1	Córtex Motor Primário
DLPFC	Córtex pré-frontal dorsolateral
PAG	Área periaquedutal cinzenta
AA	Ácido araquidônico
COX	Ciclooxigenase
LOX	Lipoxigenase
ATP	Adenosina trifosfato
5-HT	Serotonina
H ⁺	Íon hidrogênio
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SP	Substância P
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurothrophic factor</i>
NO	Óxido nítrico
Ca ⁺⁺	Cálcio
Mg ⁺⁺	Magnésio
PKC	<i>Protein kinase C</i>
CaM-KII	<i>Calcium calmodulin-dependent protein kinase II</i>
AMPA	<i>Amino-3-hydroxy-5-ethyl-4-isoxazole propionate</i>
WDR	<i>Wide dynamic range</i>
ACC	Córtex anterior cingulado
GABA	Ácido gama-aminobutírico
TMS	<i>Transcranial magnetic stimulation</i>

LTP	<i>Long-term potentiation</i>
LTD	<i>Long-term depression</i>
PPMA	Polimetilmetacrilato
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
UEA	Unidade de Experimentação Animal
CREAL	Experimentação de Animais de Laboratório
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
ANG	Análise Neurológica Global
ENG	Escala Neurológica Global
DFN	Distribuição fase-neutro
LED	<i>Light Emitting Diodes</i>
TDCS	<i>Transcranial direct current stimulation</i>
CPS	<i>Chronic pain syndrome</i>
CPSP	<i>Chronic post-surgical pain</i>
UK	<i>United Kingdom</i>
US	<i>United States</i>
CFA	<i>Freund's Adjuvant</i>
CB1R	<i>Cannabinoid receptor 1</i>
RCT	<i>Randomized clinical trial</i>
PTSD	<i>Post-traumatic stress disorder</i>
CAP	<i>Chronic abdominal pain</i>
IBS-SSS	<i>Syndrome-Severity Scoring System</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
IL-1 β	<i>Interleukin 1β</i>
STh	<i>Sensory threshold</i>
PTh	<i>Pain threshold</i>
3Rs	<i>Replacement, Reduction and Refinement</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Revisão de Literatura	14
1.1.1	Dor e Nocicepção	14
1.1.2	Classificações de Dor	16
1.1.3	Sensibilização Central e Periférica	16
1.1.4	Modulação Endógena da Dor	17
1.1.5	Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua	18
1.1.6	Modelos Atuais de ETCC para Pesquisas Animais	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivos Gerais	23
2.1.1	Objetivos Específicos	23
3	ARTIGOS CIENTÍFICOS	24
3.1	Manuscrito em preparação para submissão ao periódico Clinical & Biomedical Research	24
3.2	Manuscrito em Preparação para Submissão ao Periódico THE JOURNAL OF PAIN	44
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

Técnicas de neuromodulação têm se consagrado como terapias em diferentes situações clínicas e experimentais nos últimos anos (Stagg *et al.*, 2018; Fishman *et al.*, 2019). Dentre elas está a Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) (Stagg *et al.*, 2018) que tem recebido atenção da comunidade científica devido a seus resultados promissores em patologias neuropsiquiátricas, inclusive quadros de dor (Ferreira *et al.*, 2019; Lloyd *et al.*, 2020). Estão disponíveis na literatura evidências de efeitos analgésicos em fibromialgia (Zhu *et al.*, 2017; Lloyd *et al.*, 2020), dor orofacial (Ferreira *et al.*, 2019), dor intra-abdominal (Bayer *et al.*, 2019) e até mesmo aumento do limiar de dor em indivíduos saudáveis (Vaseghi *et al.*, 2015). Entretanto, apesar do crescente aumento de publicações com estudos pré-clínicos, ainda são escassas revisões sistemáticas explorando tais efeitos em estudos animais.

A dor é uma queixa frequente em atendimentos de saúde e, apesar de sua função evolutiva de proteção, deve ser minimizada pois tem reflexos em diferentes áreas (Woolf, 2010; Pak *et al.*, 2018). Quadros algícos podem desencadear sofrimento, perda da qualidade de vida, agravamento de quadros de saúde, faltas laborais e altos custos aos indivíduos e à sociedade (Godinho *et al.*, 2006). O impacto dos casos de dor é da ordem de 560 bilhões de dólares ao ano somente nos Estados Unidos da América (EUA) (Dahlhamer *et al.*, 2018).

A importância da resolução adequada de quadros de dor aguda vai além do bem-estar dos pacientes, diminuição de internações ou do uso de analgésicos. Sabe-se que dores intensas ou persistentes podem tornar-se crônicas (Fine, 2011; Treede *et al.*, 2019) e que nessas situações, a sensibilização central decorrente da hiperestimulação periférica torna-se permanente (Woolf and Thompson, 1991; Latremoliere and Woolf, 2009). As alterações neuroplásticas de vias ascendentes e descendentes levam à facilitação da sinalização dolorosa e diminuição da modulação endógena da dor no sistema nervoso central (SNC) (Latremoliere and Woolf, 2009). Quando isso ocorre, a dor torna-se uma entidade independente da lesão inicial e seu tratamento passa a ser mais complexo e com pior prognóstico (Fine, 2011). As síndromes de dor crônica, geram intenso sofrimento e limitações podendo ser incapacitantes (Munce and Stewart, 2007; Fine, 2011) e por isso devem ser prevenidas pelo correto manejo da dor aguda.

Atualmente, os tratamentos disponíveis para dores agudas ou crônicas consistem principalmente em abordagens farmacológicas. Nos casos agudos, o emprego de opioides é muitas vezes necessário, mas traz consigo o risco de dependência (Smith *et al.*, 2014). Nas dores crônicas, o tratamento de primeira linha consiste em medicamentos das classes de antidepressivos tricíclicos, duais e anticonvulsivantes. Entretanto, tais fármacos apresentam efeitos adversos importantes que muitas vezes contraindicam seu uso (Smith *et al.*, 2014; Finnerup *et al.*, 2015). Além disso, a resposta analgésica nem sempre é satisfatória.

Sendo assim, a busca por terapias não farmacológicas que estimulem a analgesia endógena tem aumentado (Fishman *et al.*, 2019) e a ETCC surge como possível terapia no tratamento da dor. Apesar do seu potencial terapêutico em casos de dor, sua ação fisiológica não foi totalmente explorada (Stagg *et al.*, 2018). Nessa linha, a pesquisa com animais tem uma função única por fornecer mais possibilidades de investigação científica de mecanismos. Entretanto, os atuais modelos de ETCC para estudos em animais apresentam limitações que os tornam pouco translacionais. Alguns modelos requerem anestesia geral durante a aplicação (Takano *et al.*, 2011; Koo *et al.*, 2016). Esse fato em si já inibe a função do SNC. Além disso, muitas vezes os anestésicos usados na pesquisa animal atuam sobre os mesmos neurotransmissores afetados pela ETCC. Como exemplo, tem-se a cetamina que inibe os receptores de glutamato do tipo *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDA). Como as concentrações de glutamato são alteradas pela ação da ETCC, seu emprego torna-se um importante viés. Também o uretano se relaciona com os receptores NMDA (Rockhold *et al.*, 1994). Outros modelos, apesar da vantagem de permitir ao animal permanecer em estado de vigília, demandam a instalação de estimulador epicraniano, tornando a terapia invasiva (Liebetanz, Klinker, Hering, Koch, Nitsche, Potschka, Loscher, *et al.*, 2006). A necessidade da manutenção de um acesso ao osso no crânio pode gerar um estado basal de inflamação local que não é recomendada quando se estuda dor. Um terceiro tipo de abordagem permite a estimulação transcutânea com o animal acordado, porém requer imobilização (Callai *et al.*, 2019). Nesse caso, a imobilização pode acarretar estresse por se assemelhar a modelos já estabelecidos de estresse por imobilização (Hebert *et al.*, 2005). Além disso, algumas técnicas utilizam eletrodos grandes que não permitem limitar a estimulação a determinada área de interesse (Callai *et al.*, 2019). Em conjunto, todos os modelos trazem o risco de

lesão por queimadura no local de aplicação que podem ocorrer por falhas na condutância da corrente ou densidade de corrente demasiada. Definir a intensidade de corrente adequada para cada modelo é necessário para evitar tal problema. Evidentemente, ao se ajustar a intensidade, pode-se ter alteração da eficácia, o que demanda ajustes no tempo de aplicação. Portanto, a garantia da segurança deve acompanhar a confirmação da eficácia no estudo com ETCC.

Isso torna clara a necessidade de desenvolvimento de novos equipamentos e protocolos de estimulação que sejam mais translacionais, gerem menos vieses como estresse e inflamação, e permitam a entrega focal da corrente elétrica. Portanto, sabendo-se da necessidade de síntese do conhecimento científico disponível em publicações nesta área e de desenvolvimento de novos modelos de estudo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial da ETCC em produzir analgesia em animais.

Para tanto, a presente tese traz uma revisão da literatura situando o leitor no tema. Após, são apresentados dois artigos científicos. O primeiro artigo mostra o desenvolvimento e avaliação de um novo design de estimulador de ETCC para uso em pesquisa com ratos. Este artigo mostra inovações quanto a técnica de fixação do equipamento à cabeça do animal, ao tamanho do eletrodo que é menor e mais focal e à possibilidade do animal movimentar-se durante a sessão de estimulação. O segundo, trata-se de uma revisão sistemática da literatura disponível no intuito de avaliar o potencial da ETCC em gerar analgesia em animais de laboratório. A análise dos dados coletados confirma os efeitos analgésicos da ETCC em estudos pré-clínicos.

1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 Dor e Nocicepção

A dor é uma sensação com função evolutiva de proteção. Conceitua-se, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*, do inglês), como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada a dano real ou potencial a tecido” (Treede *et al.*, 2019). Trata-se da integração final de processos

neurofisiológicos, fatores contextuais, psicológicos e socioculturais (Cohen and Mao, 2014). Esta experiência multidimensional reflete em diferentes níveis como homeostasia, qualidade de vida, aspectos emocionais e cognitivos (Coghill *et al.*, 2003).

O processamento fisiológico de estímulos que desencadeiam o fenômeno doloroso chama-se nocicepção. A nocicepção inicia-se com a transdução de estímulo térmico, tátil ou químico em estímulo elétrico pelos receptores de membrana presentes em neurônios primários específicos, chamados nociceptores (Dai, 2016). Os nociceptores são classificados em dois tipos distintos: as fibras A δ que são de médio calibre, mielinizadas e com média velocidade de transmissão e as fibras C, com pequeno calibre, não mielinizadas e baixa velocidade de transmissão (Voscopoulos and Lema, 2010). Os receptores de membrana presentes nestes neurônios pertencem uma família de receptores do tipo canal iônico chamada de receptores de potencial transiente (*transient receptor potential – TRP*, do inglês) (Dai, 2016). Os subtipos de TRPs presentes em nociceptores são TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 e TRPA1. Quando a estimulação é suficiente para gerar potenciais de ação, a informação é passada adiante por meio de impulsos elétricos pelos nervos até o terminal sináptico presente no SNC. No caso de informações do corpo, os nervos espinhais fazem sinapse no corno posterior da medula espinhal. Informações provenientes da cabeça e região orofacial, trafegam pelo nervo trigêmeo (V par craniano), entram no SNC pela ponte e fazem sinapse no subnúcleo caudal no núcleo trigeminal no bulbo (Leclercq *et al.*, 2013). As informações nociceptivas ascendem até o tálamo, em sua maioria, por interneurônios que decussam ao lado oposto e formam os tratos espinotalâmico e trigeminotalâmico (Voscopoulos and Lema, 2010; Antony *et al.*, 2019). A partir do tálamo, as informações são distribuídas por projeções para diferentes regiões como córtex anterior cingulado, córtex insular, córtex pré-frontal, córtex somatossensorial primário (S1) e secundário (S2), núcleo *Accumbens*, amígdala e hipocampo. Tais regiões somadas ao córtex motor primário (M1), córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) e área periaquedutal cinzenta (PAG), que também participam do processamento da dor, formam a Matriz da Dor (D'mello and Dickenson, 2008). É importante salientar que dor e nocicepção são fenômenos independentes e podem, ou não, apresentarem-se juntos.

1.1.2 Classificações de Dor

A dor pode ser classificada por diferentes aspectos como temporais e fisiopatológicos. Temporalmente, pode ser aguda ou crônica. A dor aguda é aquela presente por breves períodos e tem função protetiva. Está relacionada diretamente com lesão tecidual e desaparece quando o fator desencadeante é resolvido (Woolf, 2010).

Já a dor crônica persiste por pelo menos 3 meses (Scholz *et al.*, 2019; Treede *et al.*, 2019). Não tem função protetiva, passa a ser uma patologia em si, podendo permanecer mesmo após a resolução da lesão inicial (Treede *et al.*, 2019). Seu tratamento é complexo e o prognóstico ruim. Além disso, síndromes de dor crônica estão associadas a comorbidades como ansiedade, depressão (Munce and Stewart, 2007) e diminuição na qualidade do sono (Fine, 2011).

Quanto à fisiopatologia, a dor é considerada nociceptiva quando desencadeada por ativação dos nociceptores (Woolf, 2010). Ela pode ser subdividida em musculoesquelética, visceral ou inflamatória. A dor nociceptiva pode ou não ter função protetiva. Quando a dor provém de lesão a qualquer componente do sistema somatossensorial como nervo, por exemplo, é denominada neuropática (Cohen and Mao, 2014). A dor neuropática é sempre mal adaptativa e não tem função de proteção ao organismo (Cohen and Mao, 2014).

1.1.3 Sensibilização Central e Periférica

Uma lesão tecidual desencadeia um processo inflamatório local. A ruptura da parede celular inicia cascatas de sinalização intra e extracelulares. No ambiente intracelular, inicia-se a cascata inflamatória onde os fosfolípidos de membrana são hidrolisados e liberam ácido araquidônico (AA) por ação da enzima fosfolipase A₂. O AA é metabolizado em produtos oxigenados pelas enzimas cicloxigenases (COXs), lipoxigenases (LOXs) e CYP. Seus produtos são eicosanoides como prostaglandina e leucotrienos (Samad *et al.*, 2001; Broz and Dixit, 2016).

Extracelularmente, juntamente com a prostaglandina, ocorre a liberação de histamina, adenosina trifosfato (ATP), serotonina (5-HT), íons hidrogênio (H⁺), espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS, do inglês) (Hucho and

Levine, 2007; Sommer *et al.*, 2018). As terminações nervosas liberam substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (*calcitonin gene related peptide – CGRP*, do inglês). Este acúmulo de substâncias algogênicas leva à vasodilatação, edema, e ativação receptores de dor silentes gerando alodínia (resposta dolorosa a estímulos inócuos) e hiperalgesia (aumento da resposta a estímulos nocivos) (Cohen and Mao, 2014). Este fenômeno limita-se a região inflamada e denomina-se sensibilização periférica (Hucho and Levine, 2007; Voscopoulos and Lema, 2010).

A nível central também ocorrem alterações neuroplásticas (Voscopoulos and Lema, 2010). Na sinapse entre o neurônio de primeira e o de segunda ordem, também ocorre a liberação de SP, CGRP, *brain-derived neurothrophic factor (BDNF)*, além do glutamato, por parte dos neurônios primários. Localmente na medula são liberados bradicinina e óxido nítrico (NO) (Woolf and Thompson, 1991; Latremoliere and Woolf, 2009). A liberação de tais mediadores de forma sustentada sensibiliza o neurônio central que passa a responder de forma amplificada a partir da ativação dos receptores de glutamato do tipo NMDA. Os receptores NMDA são canais de cálcio (Ca^{++}) voltagem-dependentes e têm um íon magnésio (Mg^{++}) obstruindo seu poro em situações basais (Woolf and Thompson, 1991). Entretanto, quando a despolarização atinge o limiar, o Mg^{++} é deslocado permitindo rápido aumento do influxo de Ca^{2+} na célula (Woolf and Thompson, 1991; Latremoliere and Woolf, 2009). A partir disso, o Ca^{++} do retículo endoplasmático é liberado levando a um aumento expressivo de sua concentração no citoplasma e ativação de vias como *protein kinase C (PKC)* e *calcium calmodulin-dependent protein kinase II (CaM-KII)*, responsáveis por alterações pós-translacionais nos receptores *amino-3-hydroxy-5-ethyl-4-isoxazole propionate* (AMPA) e NMDA que levam a sensibilização central (Latremoliere and Woolf, 2009).

Outro fenômeno que ocorre com a sensibilização central são alterações na condução das fibras do tipo A β de neurônios denominados *wide dynamic range* (WDR) presentes em lâminas profundas da medula. Em situações normais, estes neurônios respondem somente a estímulos táteis, entretanto, na sensibilização central, passam a responder a estímulos nociceptivos (Pedersen *et al.*, 1998; Sandkühler, 2009). Os fenômenos decorrentes da sensibilização central desencadeiam alodínia, hiperalgesia e dor espontânea (Latremoliere and Woolf, 2009).

1.1.4 Modulação Endógena da Dor

Nos anos 60, os pesquisadores Ronald Melzack e Patrick Wall lançaram a teoria dos Portões da Dor (Melzack and Wall, 1965). Esta teoria sugere que os estímulos nociceptivos provenientes do ambiente podem ser filtrados antes de chegar ao SNC. Na sinapse entre o neurônio primário vindo da periferia e o neurônio central na medula existe um interneurônio inibitório que é estimulado por inputs táteis. Sendo assim, estímulos táteis que se sobreponham a estímulos nociceptivos inibem total ou parcialmente a passagem destes (Melzack and Wall, 1965). Este fato é observado na prática quando esfregamos instintivamente o local dolorido devido a um trauma mecânico, por exemplo.

Outro mecanismo de modulação endógena da dor ocorre por estimulação de vias descendentes (Fields, 2000). Elas são compostas de projeções vindas do córtex somestésico, motor, insular, pré-frontal medial, córtex anterior cingulado (ACC) que passam pela PAG, núcleos da rafe e núcleo periaquedutal e dirigem-se até a medula (Fields, 2000). Estas regiões são ricas em neurotransmissores inibitórios como opioides endógenos (encefalinas, endorfinas e dinorfinas), canabinóides endógenos (Guindon and Hohmann, 2009) (Anandamida, 2-arachidonoylglycerol - 2-AG), serotonina (Sirek and Sirek, 1970), ácido gama-aminobutírico (GABA) (Lau and Vaughan, 2014) e glicina (Cioffi, 2018).

Indivíduos saudáveis têm os mecanismos de analgesia endógena funcionantes e são capazes de modular sua dor (Ossipov *et al.*, 2010). Entretanto, em situações patológicas como nas síndromes de dor crônica, eles passam a ser inibidos e as vias estimulatórias de dor ficam facilitadas (Ossipov *et al.*, 2010; Pergolizzi *et al.*, 2013). A modulação endógena pode ser estimulada de maneira exógena por técnicas com as de neuromodulação (Fishman *et al.*, 2019). Existem evidências da capacidade da ETCC em ativar, de maneira *top-down* mecanismos internos de modulação de dor (Spezia Adachi *et al.*, 2015). Como essas abordagens são mais fisiológicas e tendem a ter menos efeitos adversos, têm sido exploradas como possíveis terapias em diversas situações.

1.1.5 Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua

A ETCC é uma técnica de neuromodulação que surgiu entre o final dos anos 90 e início dos anos 2000 e está despertando interesse por seus resultados positivos

(Stagg and Nitsche, 2011). Existem fortes evidências de efeitos cognitivos, comportamentais e clínicos como benefícios em diferentes situações como epilepsia (Fregni *et al.*, 2006), depressão (Boggio *et al.*, 2008) e dor (Lloyd *et al.*, 2020).

Ela baseia-se na aplicação de uma corrente elétrica fraca sobre o córtex cerebral (Nitsche *et al.*, 2003). Há milhares de anos se sabe que a eletricidade aplicada no cérebro pode gerar efeitos benéficos. Na antiguidade os peixes elétricos eram usados como tratamento em casos de dor e epilepsia (Kellaway, 1946; Stagg and Nitsche, 2011). Os primeiros resultados de estudos com correntes elétricas fracas já mostraram que os efeitos observados são dependentes da intensidade da corrente, sua polaridade e do tempo de aplicação (Bindman *et al.*, 1964; Stagg and Nitsche, 2011). A eletricidade gera polarização da membrana plasmática das células sob sua influência (Jackson *et al.*, 2016). A polarização resultante da estimulação pela ETCC altera a taxa de disparo neuronal de maneira sublimiar pois não é capaz de deflagrar potenciais de ação, ao contrário de outras técnicas como a *transcranial magnetic stimulation (TMS)* (Carandini and Ferster, 2000). As correntes anodais despolarizam, enquanto as catodais, hiperpolarizam a membrana plasmática aproximando-a ou afastando-a, respectivamente, do limiar de disparo (Stagg and Nitsche, 2011). Com isso, os neurônios ficam mais ou menos propensos a disparar frente a estímulos. Sabe-se que o potencial de repouso dos neurônios é de aproximadamente -70mV e o limiar de disparo é de -50mV. A variação no potencial da membrana induzida pela ETCC é na ordem de 0.2 a 0.5mV com os protocolos utilizados (1 a 2mA/10 a 20 minutos em humanos) (Stagg *et al.*, 2018). Mesmo com a pequena variação, os efeitos observados são significativos. Provavelmente isso se deva à amplificação da resposta em redes neurais (Stagg *et al.*, 2018). Estes fenômenos elétricos alteram a condutância da membrana plasmática e das correntes iônicas que fluem através dela. As alterações elétricas observadas na membrana são agudas e não perduram após o término da estimulação (Radman *et al.*, 2007; Stagg *et al.*, 2018).

Entretanto, as modificações na taxa de disparo neuronal podem ser observadas por algum tempo, chegando até 24 horas, após o final da estimulação especialmente após sessões repetidas (Stagg and Nitsche, 2011). Estes efeitos prolongados que ocorrem após o silenciamento dos fenômenos elétricos agudos estão relacionados a plasticidade sináptica (Müller-Dahlhaus and Ziemann, 2015; Jackson *et al.*, 2016). Os estudos de mecanismos têm demonstrado que as sinapses GABAérgicas e

glutamatérgicas são moduladas pela ETCC anodal e catodal de maneira similar à *long-term potentiation (LTP)* e *depression (LTD)* (Márquez-Ruiz *et al.*, 2012). A estimulação leva a um aumento nas concentrações de glutamato e receptores do tipo NMDA e diminuição de GABA (Jackson *et al.*, 2016). Inclusive, o uso de antagonistas de receptores NMDA antes da estimulação é capaz de bloquear seu efeito, ao passo que, agonistas desses receptores aumentam a resposta ao ETCC (Stagg and Nitsche, 2011). Estes fatos tornam plausível a hipótese de que a diminuição de GABA viabiliza a plasticidade glutamatérgica (Nitsche *et al.*, 2005; Fritsch *et al.*, 2010). A ativação de receptores NMDA leva a aumento do influxo de Ca^{++} na célula. Modelos animais demonstram o papel do Ca^{++} na regulação da plasticidade sináptica onde baixo influxo de Ca^{++} intracelular desencadeia LTD ao passo que alto influxo leva a LTP (Lisman, 2001; Malenka and Bear, 2004). Também nestes casos, o bloqueio de canais de cálcio impede a indução de plasticidade sináptica (Stagg *et al.*, 2018).

Além dos mecanismos citados anteriormente, existem evidências do envolvimento de outros neurotransmissores e neuromoduladores nos mecanismos de ação da ETCC como dopamina, adenosina, serotonina e acetilcolina (Stagg and Nitsche, 2011; Nitsche *et al.*, 2012; Stagg *et al.*, 2018). Também têm surgido evidências de que não somente os neurônios sejam afetados pela corrente elétrica, mas também as células gliais, como os astrócitos, e células endoteliais (Monai *et al.*, 2016; Monai and Hirase, 2018). Esse fato sugere até mesmo efeitos sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Ruohonen and Karhu, 2012; Jackson *et al.*, 2016).

Clinicamente, o uso da ETCC em humanos tem geralmente o M1 como alvo e emprega a corrente entre 1 a 2 mA por 10 a 20 minutos (Stagg and Nitsche, 2011). Efeitos adversos importantes não são reportados, sendo comum apenas percepção de prurido/formigamento no local (Woods *et al.*, 2016). Entretanto vale ressaltar que relatos de casos isolados de queimaduras na pele estão presentes na literatura (Frank *et al.*, 2010). Geralmente o aquecimento da pele ocorre quando a condutância do eletrodo é prejudicada por apresentar-se seco ou com pouco gel. Estudos em animais costumam utilizar 0,5mA sobre o mesmo local, M1 e sessões repetidas, em geral 8.

1.1.6 Modelos Atuais de ETCC para Pesquisas Animais

Os estudos com modelos animais trazem importantes informações sobre mecanismos de diferentes terapias. Isso ocorre pela possibilidade de se fazer intervenções mais invasivas como entrega de drogas diretamente sobre regiões cerebrais desejadas e análise de virtualmente todos os tecidos no momento desejado. Pode-se, por exemplo, fazer a eutanásia do animal após a intervenção e analisar as alterações em tempo real. Ao contrário, em humanos as investigações mecanísticas se limitam a exames de imagem ou coleta de soro ou outros tecidos desde que não haja prejuízo ao paciente. Coleta de material do SNC é impossível com esta justificativa devido às possíveis sequelas geradas.

Entretanto, tais estudos mostram-se limitados no que se refere à extrapolação de seus resultados para a clínica. Sendo espécies diferentes em estudo, não se pode afirmar que, necessariamente o que ocorre em estudo pré-clínico, ocorrerá em um ser humano. Até mesmo porque as condições laboratoriais de estudos em animais permitem o controle quase total de qualquer variável. Tais estudos têm grande validade interna com baixa variabilidade dos resultados, mas pouca validade externa pela não representação de um mundo real, onde os indivíduos são diferentes. Também, nem sempre se consegue aplicar as terapias de maneira idêntica a uma situação clínica com humanos. No caso da ETCC, isso também se repete.

Vemos diferentes modelos de estudo de ETCC em animais, em geral ratos e camundongos. Todos apresentam vantagens e limitações. Existem modelos que utilizam ETCC epicraniano. Nesses casos, o eletrodo de estimulação é colado diretamente ao osso do crânio sobre a área de interesse para estimulação. Por se tratar geralmente de eletrodos pequenos, esta técnica é focal (Liebetanz, Klinker, Hering, Koch, Nitsche, Potschka, Löscher, *et al.*, 2006). Também a colagem garante a manutenção do aparato em posição durante a estimulação. Entretanto, isso difere bastante do equipamento utilizado em humanos que consiste em eletrodo externo, colocado sobre a pele do couro cabeludo, de maneira transcutânea (Woods *et al.*, 2016). A instalação do eletrodo epicraniano é invasiva e pode manter uma reação inflamatória local ou até sistêmica com a circulação dos mediadores produzidos ali. A intensidade de corrente que efetivamente chega ao córtex nesses casos é proporcionalmente maior por não haver interposição dos tecidos cutâneos. Ajustes de dose devem ser feitos.

Modelos mais modernos transpuseram esta limitação ao aplicar o ETCC de maneira transcutânea. Nesses casos, entretanto, usam-se eletrodos grandes que impossibilitam o foco na área alvo (Laste *et al.*, 2012). Além disso, requerem restrição de movimentos dos animais o que é um fator estressante. Ele se assemelha a um modelo utilizado no intuito de se induzir estresse. Mesmo com adaptação prévia ao modelo, ainda não é possível eliminar totalmente esse viés.

Ainda, existem estudos utilizando ratos anestesiados e ETCC (Takano *et al.*, 2011; Koo *et al.*, 2016). Eles trazem investigações sobre mecanismos, o que fica bastante limitado se considerarmos que a atividade cerebral está intensamente inibida nessas condições. Atualmente sabe-se que os efeitos dessa técnica dependem da alteração funcional das células neurais como neurônios e astrócitos (Monai and Hirase, 2016; Stagg *et al.*, 2018). Ao inibir seu funcionamento, pode-se diminuir ou até impedir a ação da ETCC. Além disso, anestésicos usados em pesquisa animal como cetamina ou uretano (Rockhold *et al.*, 1994) têm seus mecanismos de ação relacionados aos receptores NMDA. Entretanto, as alterações em tais receptores induzidas pelo ETCC são responsáveis por muitos de seus efeitos. Não parece indicado inibi-los ou alterar seu funcionamento por outros meios que não o ETCC durante a pesquisa.

Pode-se concluir que não existem modelos ideias de aplicação de ETCC em roedores na atualidade. Todos trazem limitações e geram vieses. Por isso, a tentativa de vencer tais limitações impulsiona a pesquisa nesta área para a evolução e desenvolvimento de técnicas mais inovadoras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo da presente tese é avaliar o potencial da ETCC em produzir analgesia em animais.

2.1.1 Objetivos Específicos

a) Avaliar nova técnica de fixação de capacete na cabeça de ratos com relação à resistência biocompatibilidade.

b) Determinar a segurança com relação ao risco de queimaduras na pele e prejuízo das funções neurológicas de novo modelo em desenvolvimento de estimulação transcutânea.

c) Avaliar o efeito analgésico da ETCC em animais com ou sem modelos de dor.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Manuscrito em preparação para submissão ao periódico *Clinical & Biomedical Research*.

**Avaliação de Novo Aparato de Estimulação Transcraniana por Corrente
Contínua para Pesquisa Animal**

**Evaluation of a Novel Transcranial Direct Current Stimulation Apparatus for
Animal Research**

Novo Aparato de Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua

*Etiane Micheli Meyer Callai^a, Henrique Muller de Quevedo^c, Luciana Santa Catarina^a, Cecília Almagro^b, Jamile Boff^b, Nayara Lopes Heidmann^b, Paulo Roberto Stefani Sanches^d, Deise Ponzoni^{a,b,d}, Alexandre Silva Quevedo^{a,b,,e,f}.

^aPrograma de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. ^bFaculdade de Odontologia, UFRGS. ^cPrograma de Pós-graduação em Reabilitação Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo – USP. ^dHospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA. ^ePrograma de Pós-graduação em Neurociências - UFRGS. ^fPrograma de Pós-graduação em Farmacologia – UFRGS.

***Autor Correspondente:**

Etiane Micheli Meyer Callai

Departamento de Cirurgia e Ortopedia

Faculdade de Odontologia- UFRGS

R. Ramiro Barcelos, 2492 - Santa Cecília, Porto Alegre - RS, Brasil,

CEP: 90035-004.

Telefone: +51 3308-5010

CONFLITO DE INTERESSE: Os autores reportam que não há conflito de interesse. Os autores são responsáveis sozinhos pelo conteúdo e escrita deste artigo.

RESUMO

A Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua tem sido alvo de pesquisas para diferentes patologias neuropsiquiátricas. Entretanto, os protocolos para roedores possuem vieses como estresse, invasividade ou estimulação não focal. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um estimulador transcraniano para roedores com estimulação focal permitindo a movimentação do animal. O estimulador tem 2,1mm de diâmetro e 3,5mm² de área de contato e foi usado com diferentes intensidades de corrente (0,5, 0,4 e 0,35mA) por 20 minutos. O equipamento foi fixado com material odontológico de reembasamento (Coe-Soft). A segurança foi avaliada por análise neurológica global e inspeção visual da pele com microscópio cirúrgico. A efetividade da fixação foi avaliada por tração mecânica e tempo de permanência da estrutura no local. Os resultados mostraram que o reembasador foi efetivo na colagem em conjunto com ancoragem por sutura nas margens. O equipamento mostrou-se seguro na intensidade de corrente de 0,35mA.

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

ABSTRACT

Transcranial Direct Current Stimulation has been the target of research for different neuropsychiatric pathologies. However, rodent protocols have biases as distress, invasiveness, or non-focal stimulation. Thus, the present work aimed to develop a transcranial stimulator for rodents with focal stimulation allowing the animal to move. The stimulator is 2.1mm in diameter and 3.5mm² of contact area and has been used with different current intensities (0.5, 0.4, and 0.35mA) for 20 minutes. The equipment was fixed with dental material (Coe-Soft). Safety was assessed by global neurological analysis and visual inspection of the skin with a surgical microscope. The effectiveness of the fixation was evaluated by mechanical traction and the time the structure remained in place. The results showed that the reloader was effective in bonding together with suture anchoring at the margins. The equipment proved to be safe at a current intensity of 0.35mA.

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

1. INTRODUÇÃO

Técnicas de neuromodulação têm despertado interesse da comunidade científica nos últimos anos devido a seu potencial terapêutico e segurança ¹. A Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) tem resultados positivos em diferentes situações clínicas como depressão ² e dor crônica³ em estudos clínicos e pré-clínicos. Os trabalhos com animais têm especial importância neste contexto por fornecerem informações sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos nos efeitos observados com a ETCC ^{4,5}. Entretanto, a pesquisa animal nesta área tem limitações metodológicas que a torna pouco translacional.

Em alguns casos os eletrodos de estimulação são instalados de maneira epicraniana que é invasiva⁶. Em outros, existe a necessidade de imobilização, gerando estresse ⁷. Há modelos onde os animais são estimulados sob anestesia geral ^{8, 9}, o que altera o funcionamento cerebral e neurotransmissores relacionados diretamente aos efeitos da ETCC como o glutamato ⁵. Também existe a questão da falta de foco na estimulação pelo uso de eletrodos grandes, o que acaba ocorrendo de maneira generalizada no cérebro em alguns modelos transcutâneos ¹⁰.

Tais fatos mostram a necessidade de aprimoramento dos modelos para pesquisa de ETCC com animais para que os resultados obtidos sejam mais translacionais e confiáveis. O desenvolvimento de inovações em terapias na área da saúde requer, além da investigação da eficácia, a garantia da segurança. Um dos riscos da eletroestimulação é a queimadura da região estimulada ¹¹. Por isso, quando a estimulação ocorre de maneira transcutânea, a condutibilidade e densidade de corrente devem ser controladas para minimizar a probabilidade de dano térmico aos tecidos. Por isso, a avaliação cuidadosa da integridade epitelial da região é imprescindível. Também, deve-se monitorar a motricidade e reflexos buscando a preservação das funções neurológicas ¹².

Outro melhoramento que pode ser obtido é a modificação da técnica de fixação do estimulador. Tradicionalmente, quando é necessária a fixação de estruturas no crânio de ratos, utiliza-se um capacete de resina acrílica (polimetilmetacrilato - PPMA) ancorado ao osso por parafusos ¹³. Este modelo promove estabilidade em casos em que se tem cânulas para entrega intracerebral de medicamentos e onde a movimentação da cânula pode levar a lesões no cérebro. Entretanto, sabe-se que a

resina acrílica é um material com reação de polimerização exotérmica e incompleta apresentando, portanto, pobre biocompatibilidade já que os monômeros livres são irritantes aos tecidos biológicos. Em casos em que não se necessita de rigidez absoluta no capacete, a escolha de outro material mais biocompatível é preferível. Também é desejável que a ancoragem seja menos invasiva possível evitando o risco de perfuração do crânio e formação de solução de continuidade com o conteúdo intracraniano.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e testar um novo aparato de ETCC para ratos capaz de promover estimulação transcutânea focal, com melhor biocompatibilidade e menor invasividade do material de fixação, que permita ao animal se movimentar durante a aplicação tornando-se mais próximo do modelo utilizado em humanos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido como parte integrante de um projeto maior em execução no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 2018-0555. Os experimentos foram realizados no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, nas Unidades de Experimentação Animal (UEA) e Serviço de Pesquisa e Desenvolvimento em Engenharia Biomédica do HCPA. Foram utilizados 18 ratos Wistar machos com idade entre 55 e 65 dias de vida (≥ 250 g) no início do experimento provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) /UFRGS.

Os animais foram alojados na UEA 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. Foram realizados todos os procedimentos necessários para minimizar dor e desconforto. Inicialmente, após a chegada, foram mantidos por 14 dias em habituação/quarentena antes do início das intervenções.

2.1 Análise Neurológica Global (ANG)

O teste de avaliação neurológica global tem o intuito de monitorar a preservação das funções neurológicas dos animais. Ele foi realizado no período basal e 24 horas após a última sessão de ETCC. Na avaliação neurológica global em ratos^{12, 14} são usados parâmetros da escala neurológica global (ENG) considerados presentes ou ausentes. O escore zero é atribuído a incapacidade em realizar um determinado comportamento, e dependendo da performance do animal um valor de 1-5 (em ordem crescente) é imputado. Desta forma, quanto menor a pontuação, maior o déficit neurológico. A ENG inclui: 1 – Reflexo corretivo: O reflexo estará intacto se o animal retornar à posição normal naturalmente após ser segurado na posição supina. 2 - Teste da barra horizontal: As patas anteriores são dispostas sobre uma barra horizontal a 30 cm de altura e o animal deve se segurar por 3 segundos. Abaixo da barra, é colocado um colchão macio para atenuar uma possível queda. 3 – Topo inclinado da gaiola: O animal é colocado sobre o topo inclinado de uma gaiola (45°). Se o animal ficar paralisado ou for para o fundo do topo, é considerado incapaz neste atributo. 4 – Reação à colocação: O animal será colocado em uma plataforma onde um lado do corpo está próximo da borda. Cada pata será gentilmente puxada para a borda. O animal é considerado incapaz se não recolocar a pata na plataforma. 5 – Colocação visual: o animal é segurado pelo torso distante da gaiola e, para o reflexo ser considerado preservado, ele deve alcançá-la com as patas dianteiras.

2.2 Equipamento de ETCC

Um novo design de eletrodo de estimulação para ETCC foi desenvolvido pelos pesquisadores em conjunto com o setor de Bioengenharia do HCPA com o intuito de tornar a estimulação elétrica focal sobre o M1. Este eletrodo consiste em um pino metálico (aço inox 316L) com a ponta rosqueável (macho) em uma base de material plástico com rosca (fêmea) pré-fixada à pele do animal (figura 1). O espaço entre o pino e a pele foi preenchido com gel condutor antes de cada sessão de tratamento para garantir a condutividade. A fixação por rosqueamento evita movimentos bruscos e deslocamento do aparato, o que poderia deslocá-lo do ponto cortical de interesse. A ponta ativa do pino que ficará em contato com o gel tem 1,5mm de comprimento. A superfície de contato tem as seguintes dimensões: diâmetro de 2,1mm e área de

contato de 3,5mm² similar à usada em outros estudos ⁶ mostrado na figura 3. Este eletrodo de estimulação é conectado a um equipamento com as seguintes especificações: microcontrolador PIC12F1840 em encapsulamento distribuição fase-neutro (DFN), amplificador operacional duplo em encapsulamento DFN, chave analógica e regulador de tensão em encapsulamentos SOT23, além de resistores, capacitores, *Light Emitting Diodes* (LEDs) e diodos, em encapsulamentos 0603, que, soldados a uma placa de circuito impresso dupla-face com 1mm de espessura, permitem reduzir suas dimensões e peso. O equipamento liga automaticamente ao conectar-se o cabo dos eletrodos, de forma que o consumo de corrente é nulo quando não está em uso. Ao ligar, a tensão da bateria é amostrada 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 estimulador inicia a aplicação do estímulo pré-programado, o contador de tempo é disparado, e 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. O consumo de corrente de 1,5mA, durante a aplicação do estímulo, permite uma autonomia de aproximadamente 75 sessões de ETCC. A intensidade do estímulo elétrico pode ser pré-programada por software, de 0 a 0,5mA, com resolução de 500nA, considerando uma carga máxima de 20kΩ. Para este estudo foram utilizados equipamentos com as intensidades de estímulo elétrico diferentes partindo de 0,35mA.

Inserir figura 1 aqui

2.3 Estereotaxia

Para a localização da região de interesse para a estimulação, o córtex motor primário (M1) esquerdo foi realizada estereotaxia de acordo com uma adaptação da técnica descrita por Geiger¹⁵. Os animais foram anestesiados com isoflurano (5% – indução; 2,5% - manutenção) por inalação e posicionados no estereotáxico. A adaptação consistiu em uma incisão semilunar contralateral para exposição da calota craniana. Após a incisão, os tecidos foram descolados ultrapassando a linha média e rebatidos para visualização do bregma. Após, o estereotáxico foi ajustado de acordo

com as coordenadas: ventral: -1mm; látero-lateral: +4mm; anteroposterior: +4,2mm. O equipamento foi travado na posição e a agulha elevada distanciando-se do crânio. Após, os tecidos foram reposicionados e a incisão, suturada. A seguir, o cursor com a agulha foi baixado até a altura da pele mostrando o local correspondente ao M1. Este ponto foi marcado com tinta de tatuagem para visualização futura.

2.4 Fixação da Base do Estimulador: Técnica Maleável

Esta técnica de fixação da base do estimulador à cabeça do animal sobre a região de M1 foi realizada a confecção de um capacete de material reembasador Coe-Soft, marginalmente à base, sobre a pele (figura 2). Para a confecção do capacete, o pó e o líquido do reembasador foram misturados e aplicados ao redor da base plástica em um diâmetro de aproximadamente 1cm. Pontos de sutura (Seda 3-0) foram confeccionados no perímetro do capacete para evitar o descolamento e elevação das margens.

Inserir figura 2 aqui

2.5 Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua

Foram realizadas sessões diárias de estimulação por 8 dias consecutivos com duração de 20 minutos. Durante a estimulação, cada animal foi colocado dentro de uma caixa plástica transparente (figura 3). O eletrodo de estimulação (anodal) foi conectado à base plástica colada na cabeça do animal. O eletrodo de referência era de eletrocardiograma adaptado com 11mm de diâmetro. Ele posicionado no tórax do animal e fixado com fita microporosa e uma faixa de tecido sobreposta. Os animais foram adaptados previamente ao local e ao uso da faixa no tórax por 7 dias para redução do estresse e do efeito da novidade. A extremidade oposta dos cabos foi ligada a uma bateria posicionada externamente à caixa plástica. O cabo utilizado era extensível por conexão a um elástico permitindo que permanecesse esticado e evitando avarias por parte do animal. A intensidade de estímulo elétrico da bateria foi pré-programada por software e pôde ser ajustada ao longo das atividades. Ao se

observar queimadura na pele, as sessões eram interrompidas antes de se completarem as 8 propostas.

Inserir figura 3 aqui

3. RESULTADOS

Com relação à fixação, a técnica maleável mostrou-se efetiva sendo capaz de manter a base plástica sobre o local referente a M1 (marcação com tinta) durante o período do estudo. O material empregado mostrou-se biocompatível não provocando reações inflamatórias na pele. Os pontos de sutura não causaram reação de corpo estranho perceptível durante o tempo avaliado.

O correto funcionamento do equipamento mostrou sua viabilidade. Isso foi comprovado pela passagem da corrente durante o tempo de aplicação. Esse fato observado pela permanência da luz azul ligada no equipamento e uso de multímetro. Além disso, o aparato manteve-se em posição e os animais puderam se movimentar.

Para avaliar a segurança, o conjunto capacete/base plástica foi removido dos animais. Foram observadas queimaduras na pele de alguns ratos com o uso das correntes de 0,5mA e 0,4mA (figura 4). As queimaduras se configuraram como alterações na cor da pele, sendo consideradas mais intensas as mais escuras. A corrente de 0,35mA não causou queimadura perceptível (figura 4). Os animais foram testados com relação ao desempenho no teste de ANG previamente (basal) e 24 horas após as 8 sessões de ETCC. Todos os indivíduos se mostraram capazes de realizar todas as tarefas nos dois momentos do teste e obtiveram escore de 5.

Inserir figura 4 aqui

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram testados a técnica de fixação maleável, o funcionamento, condutância (viabilidade) e segurança do estimulador. Os parâmetros usados foram a permanência da base sobre o local alvo durante todo o período do estudo, passagem da corrente confirmada pela luz azul da bateria durante as sessões

de estimulação e presença ou ausência de queimadura na pele com as correntes de 0,5mA, 0,4mA e 0,35mA.

Quando se faz estimulação elétrica em roedores deve-se ter em mente que a dimensão do crânio desses animais é menor do que de um humano. Muitas vezes são usados eletrodos humanos reduzidos em tamanho para os estudos ¹⁰. Isso já traz um viés inicial que é a falta de especificidade da estimulação. Mesmo obtendo-se o efeito desejado na estimulação, perdem-se detalhes importantes quanto aos circuitos neurais responsáveis por tais efeitos. Na tentativa de se resolver esta questão, pode-se optar por eletrodos pequenos, com a área de superfície exatamente do tamanho desejado para determinado alvo. Entretanto, esse tipo de eletrodo é usado fixado ao crânio ¹⁶. Cria-se assim uma solução de continuidade com o meio interno que inevitavelmente gera inflamação e tem o risco de gerar infecção. Quando se pretende avaliar o nível de dor, não é indicado se ter inflamação presente de forma basal, ainda mais na região que recebe a intervenção. Os mediadores inflamatórios influenciam diretamente o limiar de dor ¹⁷. Na presença de tais substâncias, as terminações nervosas livres ficam sensibilizadas. E, dependendo do grau inflamatório, pode-se ter esses mediadores circulantes, com efeitos sistêmicos. A necessidade de imobilização também se apresenta em alguns modelos ¹⁸. Sabe-se que a restrição de movimentos é estressora para os animais ¹⁹.

Diante dos desafios impostos pelos modelos atuais de pesquisa com ETCC em roedores, torna-se imprescindível o aprimoramento da técnica. O desenvolvimento de novas terapias, além de verificar sua eficácia, deve necessariamente investigar a segurança ²⁰. Seu emprego deve sempre trazer mais benefícios do que malefícios. Quando os indivíduos são animais, pela incapacidade de verbalizar o desconforto, é importante que se preste atenção aos detalhes para garantir seu bem-estar. Esta prática, além de estar em acordo com princípios éticos, traz melhores desfechos. A menor presença de vieses gera menos confusão na interpretação dos dados, trazendo confiabilidade.

A técnica maleável proposta no estudo mostrou-se efetiva e superior à tradicional, de acordo com os objetivos deste estudo, com relação ao bem-estar animal. O material utilizado não é rígido, gerando mais conforto aos ratos. Também, evitou-se a toxicidade do PPMA e o desconforto térmico gerado durante sua polimerização. Por se tratar de fixação de uma base sobre a pele para passagem de

corrente elétrica, a ancoragem por sutura permitiu a resistência necessária com menos invasividade do que parafusos e sem o risco de perfuração acidental do crânio e exposição das meninges.

Com relação ao aparato de ETCC, as correntes partiram de um valor amplamente utilizado na literatura que é de 0,5mA²¹. Apesar de estudos empregarem esta corrente com sucesso, o novo design do equipamento poderia gerar lesões por possuir área de superfície menor levando ao aumento da densidade. A aplicação de eletricidade sobre os tecidos biológicos gera calor. O calor gerado é inversamente proporcional à condutância da superfície²². Quando a passagem da eletricidade é facilitada, a corrente elétrica passa sem grande aquecimento. Ao contrário, quando ocorre maior resistência a essa passagem, uma parte da eletricidade se converte em calor. Para garantir maior condutância à pele, utiliza-se água ou géis condutores²³. Qualquer contato do metal seco diretamente sobre a pele gera queimaduras. No presente piloto, a abundância de gel condutor durante todo o procedimento foi monitorada. Em momentos em que se observou extravasamento do gel, o equipamento era desligado e o gel, repostado. Mesmo assim, a intensidade de 0,5mA desencadeou lesões por queimadura, provavelmente devido à alta densidade de corrente. Isso levou à necessidade de sua redução.

A próxima corrente testada foi de 0,4mA. Ao exame com lupa, observou-se eritema persistente na região. Tal fato levou à contra-indicação de seu emprego e experimentação de dose menor. Somente com 0,35mA observou-se a pele intacta ao final da estimulação. Este valor de corrente se aproxima de outros da literatura, como no caso de Wen, 2017²⁴ que utilizou correntes a partir de até 0,1mA, entretanto a forma de entrega da corrente foi epicraniana. O contato direto do estimulador com o osso nesse caso reduz a dispersão da eletricidade e aumenta a carga recebida pelo córtex.

Os resultados obtidos com o protótipo de estimulador são promissores por trazerem refinamento à pesquisa com animais seguindo o princípio dos 3Rs preconizados pela ética em pesquisa e a legislação²⁵. Também promovem melhora do bem-estar animal pelo uso de material biocompatível e mais confortável quando comparado com os tradicionais. Com isso este novo design de estimulador de ETCC tem potencial para aprimorar a pesquisa pré-clínica na área e trazer resultados mais fidedignos, diminuir vieses e melhorar o bem-estar dos animais.

As limitações do estudo referem-se ao fato de ter sido usado um n pequeno de animais. Fatos novos podem surgir quando o equipamento for utilizado em larga escala em pesquisas maiores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stagg, C. J.; Antal, A.; Nitsche, M. A., Physiology of Transcranial Direct Current Stimulation. *J ECT* **2018**, *34* (3), 144-152.
2. Wang, Y., Transcranial direct current stimulation for the treatment of major depressive disorder: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Psychiatry Res* **2019**, *276*, 186-190.
3. Zhu, C. E.; Yu, B.; Zhang, W.; Chen, W. H.; Qi, Q.; Miao, Y., Effectiveness and safety of transcranial direct current stimulation in fibromyalgia: A systematic review and meta-analysis. *J Rehabil Med* **2017**, *49* (1), 2-9.
4. Jackson, M. P.; Rahman, A.; Lafon, B.; Kronberg, G.; Ling, D.; Parra, L. C.; Bikson, M., Animal models of transcranial direct current stimulation: Methods and mechanisms. *Clin Neurophysiol* **2016**, *127* (11), 3425-3454.
5. Stagg, C. J.; Nitsche, M. A., Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *Neuroscientist* **2011**, *17* (1), 37-53.
6. Liebetanz, D.; Klinker, F.; Hering, D.; Koch, R.; Nitsche, M. A.; Pötschka, H.; Löscher, W.; Paulus, W.; Tergau, F., Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy. *Epilepsia* **2006**, *47* (7), 1216-24.
7. Spezia Adachi, L. N.; Quevedo, A. S.; de Souza, A.; Scarabelot, V. L.; Rozisky, J. R.; de Oliveira, C.; Marques Filho, P. R.; Medeiros, L. F.; Fregni, F.; Caumo, W.; Torres, I. L., Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Exp Brain Res* **2015**, *233* (5), 1377-89.
8. Koo, H.; Kim, M. S.; Han, S. W.; Paulus, W.; Nitsche, M. A.; Kim, Y. H.; Kim, H. I.; Ko, S. H.; Shin, Y. I., After-effects of anodal transcranial direct current stimulation on the excitability of the motor cortex in rats. *Restor Neurol Neurosci* **2016**, *34* (5), 859-68.
9. Takano, Y.; Yokawa, T.; Masuda, A.; Niimi, J.; Tanaka, S.; Hironaka, N., A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. *Neurosci Lett* **2011**, *491* (1), 40-3.
10. Cioato, S. G.; Medeiros, L. F.; Marques Filho, P. R.; Vercelino, R.; de Souza, A.; Scarabelot, V. L.; de Oliveira, C.; Adachi, L. N.; Fregni, F.; Caumo, W.; Torres, I. L., Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model. *Brain Stimul* **2016**, *9* (2), 209-17.
11. Wang, J.; Wei, Y.; Wen, J.; Li, X., Skin burn after single session of transcranial direct current stimulation (tDCS). *Brain Stimul* **2015**, *8* (1), 165-6.
12. de Souza, A. H.; Lima, M. C.; Drewes, C. C.; da Silva, J. F.; Torres, K. C. L.; Pereira, E. M. R.; de Castro, C. J.; Vieira, L. B.; Cordeiro, M. N.; Richardson, M.; Gomez, R. S.; Romano-Silva, M. A.; Ferreira, J.; Gomez, M. V., Antiallodynic effect and side effects of Ph α 1 β , a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*: Comparison with ω -conotoxin MVIIA and morphine. *Toxicon* **2011**, *58* (8), 626-633.
13. Vasconcelos, M.; Stein, D. J.; Albrechet-Souza, L.; Miczek, K. A.; de Almeida, R. M. M., Recovery of stress-impaired social behavior by an antagonist of the CRF binding protein, CRF. *Behav Brain Res* **2019**, *357-358*, 104-110.
14. Capdeville, C.; Pruneau, D.; Allix, M.; Plotkine, M.; Boulu, R. G., Model of global forebrain ischemia in the unanesthetized rat. *J Pharmacol* **1986**, *17* (4), 553-60.
15. Geiger, B. M.; Frank, L. E.; Caldera-Siu, A. D.; Pothos, E. N., Survivable stereotaxic surgery in rodents. *J Vis Exp* **2008**, (20).
16. Liebetanz, D.; Klinker, F.; Hering, D.; Koch, R.; Nitsche, M. A.; Pötschka, H.; Löscher, W.; Paulus, W.; Tergau, F., Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy. *Epilepsia* **2006**, *47* (7), 1216-24.
17. Hucho, T.; Levine, J. D., Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* **2007**, *55* (3), 365-76.

18. Spezia Adachi, L. N.; Caumo, W.; Laste, G.; Fernandes Medeiros, L.; Ripoll Rozisky, J.; de Souza, A.; Fregni, F.; Torres, I. L., Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res* **2012**, *1489*, 17-26.
19. Hebert, M. A.; Serova, L. I.; Sabban, E. L., Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus. *J Neurochem* **2005**, *95* (2), 484-98.
20. Liebetanz, D.; Koch, R.; Mayenfels, S.; König, F.; Paulus, W.; Nitsche, M. A., Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin Neurophysiol* **2009**, *120* (6), 1161-7.
21. Santos, D. S.; Lopes, B. C.; Medeiros, L. F.; Assumpção, J. A. F.; de Souza, A.; Salvi, A. A.; da Silva, L. S.; Fregni, F.; Caumo, W.; Torres, I. L. S., Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Induces Analgesia in Rats with Neuropathic Pain and Alcohol Abstinence. *Neurochem Res* **2020**, *45* (11), 2653-2663.
22. Kunze, T.; Hunold, A.; Haueisen, J.; Jirsa, V.; Spiegler, A., Transcranial direct current stimulation changes resting state functional connectivity: A large-scale brain network modeling study. *Neuroimage* **2016**, *140*, 174-87.
23. Liebetanz, D.; Nitsche, M. A.; Tergau, F.; Paulus, W., Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain* **2002**, *125* (Pt 10), 2238-47.
24. Wen, H. Z.; Gao, S. H.; Zhao, Y. D.; He, W. J.; Tian, X. L.; Ruan, H. Z., Parameter Optimization Analysis of Prolonged Analgesia Effect of tDCS on Neuropathic Pain Rats. *Front Behav Neurosci* **2017**, *11*, 115.
25. Hooijmans, C. R.; Ritskes-Hoitinga, M., Progress in using systematic reviews of animal studies to improve translational research. *PLoS Med* **2013**, *10* (7), e1001482.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Base Plástica e Estimulador. **A)** Estimulador metálico focal e base plástica que será fixada à cabeça do animal. **B)** Base e estimulador conectados.

Figura 2. Capacete. Capacete de Coe-soft instalado com ancoragem por sutura. A base plástica fixada à cabeça do animal pelo capacete é preenchida por gel condutor e o estimulador metálico é rosqueado a ela no momento da estimulação.

Figura 3. Sessão de Estimulação. Durante a estimulação o animal pode se movimentar e o cabo da bateria fica esticado acima de sua cabeça impedindo avarias por parte do rato.

Figura 4. Condições da Pele Abaixo do Eletrodo. **A)** Queimadura intensa (0,5mA). **B)** Queimadura leve (0,4mA). **C)** Pele íntegra (0,35mA).

FIGURAS

Figura 1.

A



B



Figura 2.

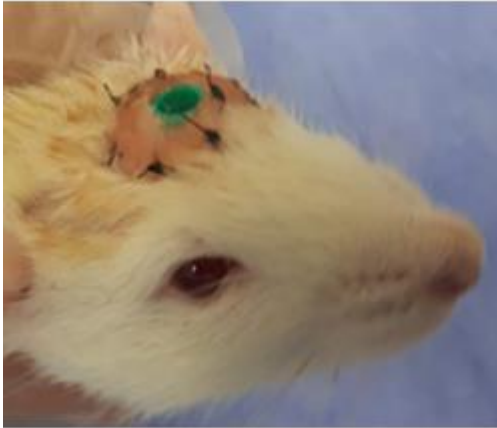


Figura 3.

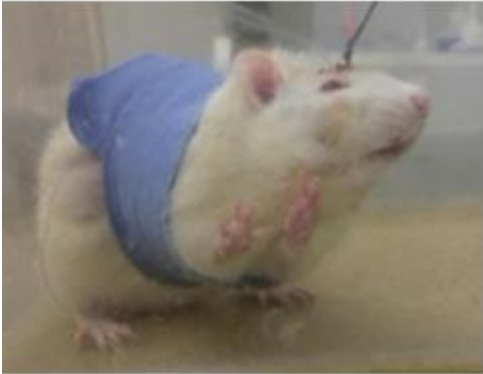
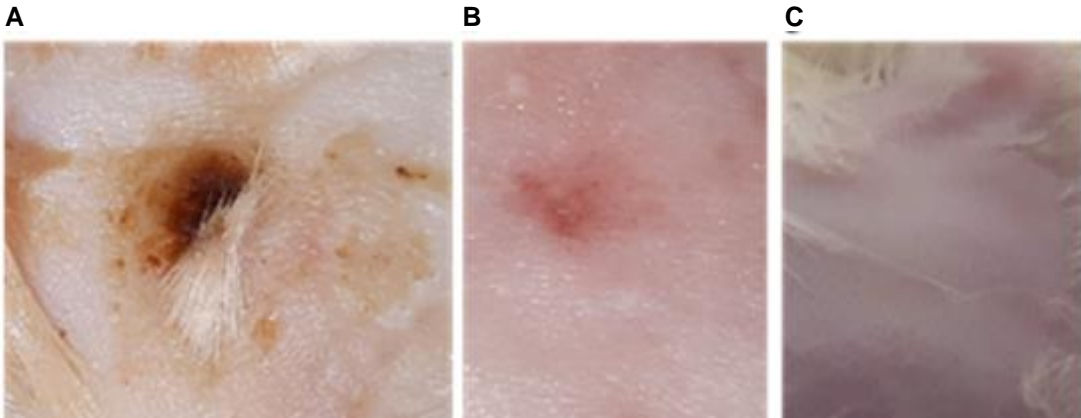


Figura 4.



3.2 Manuscrito em Preparação para Submissão ao Periódico *THE JOURNAL OF PAIN*.

Analgesic Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in Animal Studies – A Systematic Review

*Etiane Micheli Meyer Callai^a, Adriana Fernanda Kuckartz Vizuete^b Luciana Santa Catarina^a, Deise Ponzoni^a, Alexandre Silva Quevedo^{a,c,d}

^aPostgraduate Program in Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil. ^bDepartment of Biochemistry – UFRGS. ^cNeuroscience Graduate Program, UFRGS. ^dPharmacology Graduate Program – UFRGS.

***Corresponding author:**

Etiane Micheli Meyer Callai^a

Department of Surgery and Orthopedic

School of Dentistry - UFRGS

R. Ramiro Barcelos, 2492 - Santa Cecilia, Porto Alegre - RS, Brazil,

Zip code: 90035-004.

Phone: +51 3308-5010+54 9 9671 1072 (mobile)

CONFLICT OF INTEREST: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this paper.

ABSTRACT

Pain is a major health problem to individuals and the society. Currently, treatments for acute and chronic pain conditions consist of pharmacological management. Nonetheless, the drugs used to treat pain have limitations as the potential for abuse and important side effects. In this context, transcranial direct current stimulation (tDCS) is emerging as a non-pharmacological technique that may bring positive results in pain relief. The quantity of studies with animal experimentation has increased in the recent years. Nevertheless, systematic reviews are rare in this field. The present systematic review aimed to evaluate analgesic effects of tDCS in animals. The search was performed in three databases, PubMed, EMBASE and Lilacs. Eligibility criteria was primary animal studies with tDCS as an intervention and pain modulation as an outcome. In the initial screening, titles and abstracts were read. In the second evaluation, articles were thoroughly analyzed, and relevant data were extracted. Twelve reports reached inclusion criteria and were used in the present review. The studies used naïve rats and different models of pain like neuropathic, stress-induced, inflammatory, ovariectomy-induced. Most studies used: bimodal polarity, the current intensity of 0.5 mA, eight-session treatment, and the primary motor cortex as the preferential target. All results demonstrated the tDCS ability to reduce the nociceptive behavior in different models of pain. The heterogeneity of methodology between the studies was a limitation to the review, but it was still possible to conclude that tDCS effectively produces analgesia in animals in experimental conditions. It may provide evidence of the potential use of tDCS as a tool to treat pain in the future.

Keywords: transcranial direct current stimulation, pain, animal experimentation.

1 INTRODUCTION

Pain conditions are present in the everyday practice of physicians and dentists. It is one of the major causes of people to search for medical services [86]. Adequate treatment is essential to reach better welfare to the patient. The management of pain, especially in chronic states, is a challenge to clinicians, who usually use a primarily pharmacological approach for treatment [86]. Mainly, in situations where the initial pain is not eliminated, the central sensitization may become permanent and might lead to a chronic pain syndrome (CPS) [14]. The treatment of CPS is complex and, sometimes, not efficient. The pain is considered chronic when it is present for at least three months [13]. When it occurs, the pain can become independent of the initial injury and turns into a pathology itself [5, 8].

There are many examples of CPS as chronic post-surgical pain (CPSP) [87], neuropathic pain [88], inflammatory pain [8]. They are commonly associated with comorbidities as anxiety, depression [16], sleep disorders [12], and even an increase of mortality in severe cases [89]. In addition, CPS affect directly and indirectly the society in economic aspects. The prevalence of chronic pain in United Kingdom (UK) is between 1/3 and 1/4 of population (28 million of adults) [90] and 2.4% in United States (US) (50 million of adults) [11] with an impact of \$560 billion each year [11].

Although the primary treatment strategy for acute and chronic pain is pharmacological treatment, many patients do not respond appropriately [18, 86]. In moderate and severe acute pain cases, opioids are necessary, but they bring the risk of addiction [86, 91, 92]. Moreover, tricyclic antidepressants, serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors, and anticonvulsants are the first-line treatment in chronic situations. However, those drugs have significant side effects [18, 93, 94] and do not eliminate the pain in every case.

Because of side effects and the potential for abuse of drugs, non-pharmacological techniques, such as neuromodulation [2] have been pain relief options [2]. One of these promising techniques is the Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) that has shown positive results and has emerged as a candidate therapy in pain treatment [4, 6, 48]. This therapy consists of applying a low-intensity continuous current over the cerebral cortex [1]. This electrical energy leads to changes

in the ion currents and alteration in membrane potential of the neuron [1]. The tDCS is a simple, non-invasive, and secure technique [1, 95].

Effects of tDCS in pain conditions are demonstrated in several studies with different pathologies. There are results with patients in fibromyalgia [4, 5], chronic abdominal pain [6] and orofacial pain [3]. Also, evidence in animal studies is available using several pain models [47, 70, 73]. The preclinical studies have provided some clues about the physiological mechanisms related to analgesic effects of tDCS [47]. For example, in this electrotherapy, there is a modulation of inflammatory molecules and neurotrophins in CNS in a top-down manner [47, 73].

Clinical reviews are widespread and provide scientific support to professional decisions; however, they are unusual in the animal experimentation field [96]. Despite of the growing body of evidence-based on tDCS research with animals, there are few systematic reviews in this field. The summarization of knowledge is essential to comprehend the effects and mechanisms of tDCS and guide future investigations. Therefore, the present study aimed to evaluate the analgesic effects of tDCS in different animal models or naïve animals.

2 METHODS

All procedures adopted to search, select the articles, and extract the data followed PRISMA guidelines that consist in a flow diagram e a checklist of 27 items to ensure the quality of data report and correct systematic review [97, 98]. The processes of search and data extraction were made independently by 2 researchers. The results were compared at the end of the process, and the incompatibilities were discussed and eliminated.

Articles eligible for the review were derived from animal intervention studies (AIS) with any pain model or naïve animals using tDCS of any polarity (anodal, cathodal or bicephalic) and any protocol as intervention with analgesia as the outcome. The criteria for exclusion of articles were studies that used pharmacological intervention or any other therapy in conjunction with tDCS; employed stimulation methods different from tDCS; studies using humans as subjects (clinical trials), *in silico* or *in vitro* studies; reviews, abstracts and data from congresses, and thesis.

The search was performed in three databases on internet. They were chosen because they represent the most important sources of publications in health sciences. The databases were PUBMED, EMBASE and Lilacs. The search strategy in PubMed used the key words (MESH terms) and booleans in the title and abstract: Transcranial Direct Current Stimulation **OR** tDCS or cathodal Transcranial Direct Current Stimulation **OR** anodal Transcranial Direct Current Stimulation **OR** bimodal Transcranial Direct Current Stimulation **AND** Pain **OR** ache **OR** acute pain or chronic pain **OR** pain threshold **OR** hyperalgesia **OR** allodynia or nociception. The filter applied was “other animals”. There was no restriction about the year of the publication. The search was made on September 27, 2020. The search found 32 papers in PubMed, 8 in EMBASE and zero in Lilacs.

The articles were initially selected by reading the abstracts. In the next phase, the complete papers were examined to define which ones would remain in the review or excluded. The two researchers that extracted the data made that independently. The data were inserted in the table shown in the table 1. The duplicity of the papers was detected using the software Excel. Risk of bias present in the articles were evaluated by SYRCLE’s RoB tool [96, 99]. That tool is an adaptation of Cochrane Collaboration to systematic reviews with animal studies to establish consistency and avoid discrepancies in the assessment of methodology of studies [96].

3 RESULTS

In the first stage, 40 articles were selected from databases. Thirty-two were from PubMed and 8 were from EMBASE. Five were excluded for duplication. Remained in the review 35 documents. After analyzing the title and abstracts, 22 were excluded because they were not original studies (review articles). One was excluded after reading the complete text because dopamine antagonists was administrated before the stimulation [100]. Twelve filled the inclusion criteria and were left in the systematic review. The sequence of events is shown in figure 1.

Insert figure 1 here

All the manuscripts included in the present review are primary experimental animal studies using rodents. The sample sizes varied between 18 to 130 subjects. The studies' experimental design was heterogeneous concerning the animal and pain model, polarization, the intensity of the current, number of sessions, and target region in the brain. Rats were the subjects in all studies, except one that used mice [101]. Pain models were 5 neuropathic (4 ischiatic nerve constriction, 1 infraorbital constriction) [23, 73, 81, 84, 101], 3 stress-induced [47, 79, 102] 2 inflammatory (1 temporomandibular joint injection of Freund's Adjuvant (CFA) and 1 paw CFA) [70, 103], 1 ovariectomy-induced [104], 1 with no pain model (naïve animals) [105]. In regarding to polarity of stimulation, 7 articles used bimodal [23, 47, 73, 79, 81, 101, 102], 3 anodal [70, 84, 103], and 2 cathodal [104, 105]. The current intensity applied in the studies was 0.5mA, only one used 0.25 [105] and one used three different current intensities: 0.05, 0.2, and 0.5 mA [84]. The only cases that did not applied 8 sessions of tDCS were Souza, 2018 [101] and Dimov 2016 [105] with one session, and Wen, 2017 [84] with 5 sessions. The cerebral region stimulated also varied. Eight studies targeted M1 [23, 47, 70, 73, 79, 81, 84, 105], 2 specified the region in the head, but not in the brain [101, 104], and 2 did not specified any region [102, 103]. The stimulation electrode installation was epicranial in 2 manuscripts [84, 105], and transcutaneous in the others.

The bias present in some of the publications were related to small sample size and the absence of sample size calculation reporting, and lack of some information related to the execution [96].

Behavioral tests used to measure the nociceptive behavior varied between experiments, but the outcome of all studies included was analgesia in any degree, see Table 1.

Insert table 1 here

4 DISCUSSION

Findings of the totality of the 12 articles reviewed in the present work demonstrated that tDCS were capable of decrease nociception behavior or increase the pain threshold in rodents. The analgesic effects of tDCS have been demonstrated

over time. There are robust results with randomized clinical trials, systematic reviews, and meta-analysis showing a decrease in pain symptoms in several conditions [4, 5]. Curiously, tDCS evidence is more abundant in studies with humans than animals. This may be the empirical knowledge about the effects of electrical currents that motivate clinical investigation about the effects [48, 52]. AIS are now been performed to explain the mechanisms behind it.

The interest about tDCS is increasing rapidly. A current search found 5,811 results with “transcranial direct current stimulation” in PubMed. The first publication was in 1984. In the next decade, until 1994, there was 11 manuscripts. In 2004, were found 58 results. From 2004 to 2014, there were 1,542 articles about this issue. In the next 7 years, there were 4,730 results. The exponential growth in the publications demonstrate the high interest in this field in the last decades, especially in the last years (figure 2). When it comes to tDCS and pain in animal research, Brazil has been highlighted since most studies were performed in this country. Only 1 of the 12 studies included in this review were not from Brazilian authors from Brazilian research groups.

Insert figure 2 here

The AIS are fundamental to describe the mechanisms behind any treatment. The full understanding of them allows a better exploration of the therapeutic potential. There is a consensus that in evidence hierarchy, pre-clinical studies are considered lower than clinical trials [106]. The results obtained of AIS cannot be extrapolated to clinical practice. The low external validity is inherent to them [96]. However, these results should not be disregarded. They provide initial results that give support to clinical trials and have the unique potential to explore physiological mechanisms of pathologies and potential treatments fully. It is important to remember the high level of internal validity of this kind of study. The animal research environment is totally controlled. The researchers may define animal species, line, sex, age, weight, food, cage temperature, humidity, and luminosity. It is possible to isolate virtually any variable and define more clearly the influence of the intervention. The combination of pre-clinical and clinical stages of research makes the scientific method the best way to confirm any hypothesis. Therefore, animal studies and clinical trials are complementary and have fundamental importance in science.

This review demonstrated that the studies with neuropathic models of pain have indicated antinociceptive effects with tDCS [23, 73, 81, 84, 101]. This is in agreement with a meta-analysis that found a decrease of pain in patients with pain after spinal cord injury [107]. The pain models employed in the articles varied, but the pathophysiology is similar in all cases [25]. The neural inflammation, decurrent of a lesion, triggers neuroplastic changes. Those changes generate neuropathic pain characteristics like allodynia, hyperalgesia, and spontaneous pain [25, 108]. Furthermore, BDNF-induced modulation is one factor that may be related to the analgesia in these cases [36, 47]. because BDNF regulates neuroplasticity and is altered in neuropathic pain [36, 47, 54, 60, 109].

Fregni in 2018 [102] and Spezia in 2012 and 2015 [47, 79, 102] found that the exposure to tDCS in chronic stress pain model reverted the thermal and mechanical hyperalgesia in rats. The stress effects are paradoxical. While acute stress is analgesic [110], chronic stress leads to a decrease in the pain threshold. [111]. Stress exposure for long periods deregulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical (HPA) axis leading to a glucocorticoid imbalance and neural circuits alterations [112]. TDCS have been demonstrated to be beneficial in physiological alterations induced by stress states. One example was the anti-anxiety effect in a rat acute stress model, probably via amygdala cannabinoid receptor 1 (CB1R) [113]. In the same direction, a systematic review with 13 randomized clinical trials (RCT), 11 case series, and 6 case reports demonstrated that neuromodulation strategies, including tDCS, were able to reduce post-traumatic stress disorder (PTSD) and depressive symptoms [114]. A RCT with psychosocial stress and tDCS showed attenuation of autonomic and neuroendocrine effects with a single session [115]. These results reinforce the potential tDCS in stress-related conditions, including pain.

TDCS led to thermal and mechanical analgesia in inflammatory models in Scarabelot [103] and Laste [70] works. Literature provides evidence that tDCS reduces pain in inflammatory syndromes. A randomized, sham-controlled, double blind, parallel-designed study including 20 patients with either Crohn disease or ulcerative colitis with chronic abdominal pain (CAP) demonstrated reduction in pain in treated patients when compared with sham treated (placebo) [116]. There was also a decrease on pain catastrophizing and on Syndrome-Severity Scoring System (IBS-SSS). The effects were unrelated to disease activity, but with central pain mechanisms [116].

However, tDCS is capable of reducing local inflammation. The pro-inflammatory markers tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) were reduced in CNS as seen in a study with obese rats [117]. The modulation in inflammatory mediators in CNS seems to be a central element on analgesic effects of tDCS and may be helpful and several diseases.

Naïve rats had the mechanical threshold increased with cathodal stimulation [105]. A meta-analysis with cathodal tDCS and healthy patients had the same result with increase in sensory and pain thresholds (STh and PTh) [7]. This is interesting to think in tDCS as a preventive strategy, not only therapeutic. Especially because this is a secure, easy, and inexpensive technique [48].

Studies suggest that the analgesic effects of tDCS are due to alterations in the membrane polarization of neurons affected by the electric field [54]. The electric current modifies the rest potential and the conductance [54, 118]. Anodal and cathodal currents lead to depolarization or hyperpolarization, respectively [1]. This is not sufficient to generate action potentials [1] but increase or decrease the firing rate of stimulated cells with other stimulus in the presence of other stimuli [56]. Calcium influx is increased by the augmentation of glutamate levels and activation of N-methyl-D-aspartic acid receptors (NMDAr) [54, 71, 119]. Gamma-aminobutyric acid (GABA) concentrations decrease in consequence of tDCS [48, 59]. Repeated sessions modulate synaptic plasticity similarly to a long-term potentiation/depression (LTP/LTD) [1, 54, 57]. Probably, these alterations lead to intracellular signalization that activate different streams and guide protein synthesis and cell functions [48, 120, 121]. However, the complete mechanisms are not described yet, and more pre-clinical studies are needed to elucidate its details.

The studies presented in this review were heterogeneous, and they might have some common flaws found in animal research. For example, some biases related to methodology and reporting were present. Another factor influencing the results is related to the implanted electrodes that require invasive procedures [84, 105]. Other methods required animals' immobilization during the session in a similar way to a stress model [24]. The inflammation due to electrode implantation and restraint stress used in different tDCS models does not allow that data from those studies to be translational. Refinement of the tDCS animal models is essential to understand the mechanisms of this electrotherapy. Another issue refers to the lack of information in

methodology. For example, some articles did not describe the target region of stimulation [24, 103] or the current intensity applied [102]. The timeline of interventions was not clearly explained [102]. Those limitations may interfere in the reproducibility of the experiments. To minimize the report problems in animal studies, ARRIVE checklist may be useful [122]. Nevertheless, the cited limitations did not decrease the quality of evidence and were insufficient to exclude the review studies. All the 12 articles were sufficiently well designed and executed to consider their results.

In summary, the present review results are in the concordance of clinical trials, systematic reviews, and meta-analysis with patient [3-7]. There was no systematic review with the same PICO question using animals in databases demonstrating the present work's novelty aspect. After the evaluation of the data, it is possible to answer the initial question and confirm the potential of tDCS to produce analgesia.

5 CONCLUSION

After reviewing the data, it is possible to suggest that tDCS has the potential to become a pain prevention and treatment technique. The benefits beyond pain relief are safety, easy handling, and low cost. In order to fully explain the physiological mechanisms behind the analgesia, research with animal models is an imperative need. Meantime, the number of studies in this area is incipient. This is a large field to be explored. Nonetheless, refinement and enhancements in methodology are still necessary to eliminate bias in animal studies and make the results more reproducible and translational.

After reviewing the data, is possible to suggest that tDCS has the potential to become a pain prevention and treatment technique. The benefits beyond the pain relief are the safety, the easy handling and the low cost. In order to fully explain the physiological mechanisms behind the analgesia, research with animal models is an imperative need. Meantime, the number of studies in this area is incipient. This is a large field to be explored. Nonetheless, refinement and enhancements in methodology are still necessary to eliminate bias in animal studies and make the results more reproducible.

REFERENCES

- [1] N. Hylands-White, R. V. Duarte, and J. H. Raphael, "An overview of treatment approaches for chronic pain management," (in eng), *Rheumatol Int*, vol. 37, no. 1, pp. 29-42, Jan 2017, doi: 10.1007/s00296-016-3481-8.
- [2] A. Latremoliere and C. J. Woolf, "Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity," (in eng), *J Pain*, vol. 10, no. 9, pp. 895-926, Sep 2009, doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.
- [3] R. D. Treede *et al.*, "Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11)," (in eng), *Pain*, vol. 160, no. 1, pp. 19-27, Jan 2019, doi: 10.1097/j.pain.0000000000001384.
- [4] C. E. Zhu, B. Yu, W. Zhang, W. H. Chen, Q. Qi, and Y. Miao, "Effectiveness and safety of transcranial direct current stimulation in fibromyalgia: A systematic review and meta-analysis," (in eng), *J Rehabil Med*, vol. 49, no. 1, pp. 2-9, Jan 2017, doi: 10.2340/16501977-2179.
- [5] C. J. Woolf, "What is this thing called pain?," (in eng), *J Clin Invest*, vol. 120, no. 11, pp. 3742-4, Nov 2010, doi: 10.1172/JCI45178.
- [6] W. A. Macrae, "Chronic post-surgical pain: 10 years on," (in eng), *Br J Anaesth*, vol. 101, no. 1, pp. 77-86, Jul 2008, doi: 10.1093/bja/aen099.
- [7] T. Renton, "Chronic orofacial pain," (in eng), *Oral Dis*, vol. 23, no. 5, pp. 566-571, Jul 2017, doi: 10.1111/odi.12540.
- [8] S. E. Munce and D. E. Stewart, "Gender differences in depression and chronic pain conditions in a national epidemiologic survey," (in eng), *Psychosomatics*, vol. 48, no. 5, pp. 394-9, 2007 Sep-Oct 2007, doi: 10.1176/appi.psy.48.5.394.
- [9] P. G. Fine, "Long-term consequences of chronic pain: mounting evidence for pain as a neurological disease and parallels with other chronic disease states," (in eng), *Pain Med*, vol. 12, no. 7, pp. 996-1004, Jul 2011, doi: 10.1111/j.1526-4637.2011.01187.x.
- [10] N. Torrance, A. M. Elliott, A. J. Lee, and B. H. Smith, "Severe chronic pain is associated with increased 10 year mortality. A cohort record linkage study," (in eng), *Eur J Pain*, vol. 14, no. 4, pp. 380-6, Apr 2010, doi: 10.1016/j.ejpain.2009.07.006.
- [11] A. Fayaz, P. Croft, R. M. Langford, L. J. Donaldson, and G. T. Jones, "Prevalence of chronic pain in the UK: a systematic review and meta-analysis of population studies," (in eng), *BMJ Open*, vol. 6, no. 6, p. e010364, 06 2016, doi: 10.1136/bmjopen-2015-010364.
- [12] J. Dahlhamer *et al.*, "Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults - United States, 2016," (in eng), *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, vol. 67, no. 36, pp. 1001-1006, Sep 2018, doi: 10.15585/mmwr.mm6736a2.
- [13] N. B. Finnerup *et al.*, "Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis," (in eng), *Lancet Neurol*, vol. 14, no. 2, pp. 162-73, Feb 2015, doi: 10.1016/S1474-4422(14)70251-0.
- [14] M. J. Edlund, B. C. Martin, J. E. Russo, A. DeVries, J. B. Braden, and M. D. Sullivan, "The role of opioid prescription in incident opioid abuse and dependence among individuals with chronic noncancer pain: the role of opioid prescription," (in eng), *Clin J Pain*, vol. 30, no. 7, pp. 557-64, Jul 2014, doi: 10.1097/AJP.000000000000021.

- [15] N. Khawaja and T. Renton, "Pain Part 3: Acute Orofacial Pain," (in eng), *Dent Update*, vol. 42, no. 5, pp. 442-4, 447-50, 453-7 passim, Jun 2015, doi: 10.12968/denu.2015.42.5.442.
- [16] M. J. McLean, "Gabapentin," (in eng), *Epilepsia*, vol. 36 Suppl 2, pp. S73-86, 1995, doi: 10.1111/j.1528-1157.1995.tb06001.x.
- [17] S. Kinkade, "Evaluation and treatment of acute low back pain," (in eng), *Am Fam Physician*, vol. 75, no. 8, pp. 1181-8, Apr 2007.
- [18] M. A. Fishman, A. Antony, M. Esposito, T. Deer, and R. Levy, "The Evolution of Neuromodulation in the Treatment of Chronic Pain: Forward-Looking Perspectives," (in eng), *Pain Med*, vol. 20, no. Suppl 1, pp. S58-S68, 06 2019, doi: 10.1093/pm/pnz074.
- [19] D. M. Lloyd, P. G. Wittkopf, L. J. Arendsen, and A. K. P. Jones, "Is Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Effective for the Treatment of Pain in Fibromyalgia? A Systematic Review and Meta-Analysis," (in eng), *J Pain*, Jan 2020, doi: 10.1016/j.jpain.2020.01.003.
- [20] C. J. Stagg and M. A. Nitsche, "Physiological basis of transcranial direct current stimulation," (in eng), *Neuroscientist*, vol. 17, no. 1, pp. 37-53, Feb 2011, doi: 10.1177/1073858410386614.
- [21] K. E. Bayer, L. Neeb, A. Bayer, J. J. Wiese, B. Siegmund, and M. S. Prütz, "Reduction of intra-abdominal pain through transcranial direct current stimulation: A systematic review," (in eng), *Medicine (Baltimore)*, vol. 98, no. 39, p. e17017, Sep 2019, doi: 10.1097/MD.00000000000017017.
- [22] C. J. Stagg, A. Antal, and M. A. Nitsche, "Physiology of Transcranial Direct Current Stimulation," (in eng), *J ECT*, vol. 34, no. 3, pp. 144-152, 09 2018, doi: 10.1097/YCT.0000000000000510.
- [23] A. Fertonani, C. Ferrari, and C. Miniussi, "What do you feel if I apply transcranial electric stimulation? Safety, sensations and secondary induced effects," (in eng), *Clin Neurophysiol*, vol. 126, no. 11, pp. 2181-8, Nov 2015, doi: 10.1016/j.clinph.2015.03.015.
- [24] N. R. Ferreira *et al.*, "The efficacy of transcranial direct current stimulation and transcranial magnetic stimulation for chronic orofacial pain: A systematic review," (in eng), *PLoS One*, vol. 14, no. 8, p. e0221110, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0221110.
- [25] S. G. Cioato *et al.*, "Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model," (in eng), *Brain Stimul*, vol. 9, no. 2, pp. 209-17, 2016 Mar-Apr 2016, doi: 10.1016/j.brs.2015.12.001.
- [26] L. N. Spezia Adachi *et al.*, "Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation," (in eng), *Exp Brain Res*, vol. 233, no. 5, pp. 1377-89, May 2015, doi: 10.1007/s00221-015-4212-1.
- [27] G. Laste *et al.*, "After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation," (in eng), *Exp Brain Res*, vol. 221, no. 1, pp. 75-83, Aug 2012, doi: 10.1007/s00221-012-3149-x.
- [28] C. R. Hooijmans, M. M. Rovers, R. B. de Vries, M. Leenaars, M. Ritskes-Hoitinga, and M. W. Langendam, "SYRCLE's risk of bias tool for animal studies," (in eng), *BMC Med Res Methodol*, vol. 14, p. 43, Mar 2014, doi: 10.1186/1471-2288-14-43.

- [29] A. Liberati *et al.*, "The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration," (in eng), *PLoS Med*, vol. 6, no. 7, p. e1000100, Jul 2009, doi: 10.1371/journal.pmed.1000100.
- [30] D. Moher, A. Liberati, J. Tetzlaff, D. G. Altman, and P. Group, "Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement," (in eng), *PLoS Med*, vol. 6, no. 7, p. e1000097, Jul 2009, doi: 10.1371/journal.pmed.1000097.
- [31] D. Krauth, T. J. Woodruff, and L. Bero, "Instruments for assessing risk of bias and other methodological criteria of published animal studies: a systematic review," (in eng), *Environ Health Perspect*, vol. 121, no. 9, pp. 985-92, Sep 2013, doi: 10.1289/ehp.1206389.
- [32] A. Roostaei, G. Vaezi, M. Nasehi, A. Haeri-Rohani, and M. R. Zarrindast, "The Involvement of D1 and D2 Dopamine Receptors in the Restoration Effect of Left Frontal Anodal, but not Cathodal, tDCS on Streptozocin-Induced Amnesia," (in eng), *Arch Iran Med*, vol. 22, no. 3, pp. 144-154, 03 2019.
- [33] A. Souza *et al.*, "Neurobiological mechanisms of antiallodynic effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a mice model of neuropathic pain," (in eng), *Brain Res*, vol. 1682, pp. 14-23, 03 2018, doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.005.
- [34] E. M. M. Callai *et al.*, "Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) and trigeminal pain: a pre-clinical study," (in eng), *Oral Dis*, Jan 2019, doi: 10.1111/odi.13038.
- [35] H. Z. Wen, S. H. Gao, Y. D. Zhao, W. J. He, X. L. Tian, and H. Z. Ruan, "Parameter Optimization Analysis of Prolonged Analgesia Effect of tDCS on Neuropathic Pain Rats," (in eng), *Front Behav Neurosci*, vol. 11, p. 115, 2017, doi: 10.3389/fnbeh.2017.00115.
- [36] D. S. Santos *et al.*, "Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Induces Analgesia in Rats with Neuropathic Pain and Alcohol Abstinence," (in eng), *Neurochem Res*, vol. 45, no. 11, pp. 2653-2663, Nov 2020, doi: 10.1007/s11064-020-03116-w.
- [37] F. Fregni *et al.*, "Transcranial direct current stimulation (tDCS) prevents chronic stress-induced hyperalgesia in rats," (in eng), *Brain Stimul*, vol. 11, no. 2, pp. 299-301, 2018 Mar - Apr 2018, doi: 10.1016/j.brs.2017.11.009.
- [38] L. N. Spezia Adachi *et al.*, "Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model," (in eng), *Brain Res*, vol. 1489, pp. 17-26, Dec 2012, doi: 10.1016/j.brainres.2012.10.009.
- [39] V. L. Scarabelot *et al.*, "Transcranial direct-current stimulation reduces nociceptive behaviour in an orofacial pain model," (in eng), *J Oral Rehabil*, vol. 46, no. 1, pp. 40-50, Jan 2019, doi: 10.1111/joor.12726.
- [40] S. F. da Silva Moreira *et al.*, "Transcranial direct current stimulation (tDCS) neuromodulatory effects on mechanical hyperalgesia and cortical BDNF levels in ovariectomized rats," (in eng), *Life Sci*, vol. 145, pp. 233-9, Jan 2016, doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.011.
- [41] L. F. Dimov, A. C. Franciosi, A. C. Campos, A. R. Brunoni, and R. L. Pagano, "Top-Down Effect of Direct Current Stimulation on the Nociceptive Response of Rats," (in eng), *PLoS One*, vol. 11, no. 4, p. e0153506, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0153506.

- [42] P. KELLAWAY, "The part played by electric fish in the early history of bioelectricity and electrotherapy," (in eng), *Bull Hist Med*, vol. 20, no. 2, pp. 112-37, Jul 1946.
- [43] B. Petrisor and M. Bhandari, "The hierarchy of evidence: Levels and grades of recommendation," (in eng), *Indian J Orthop*, vol. 41, no. 1, pp. 11-5, Jan 2007, doi: 10.4103/0019-5413.30519.
- [44] S. Mehta, A. McIntyre, S. Guy, R. W. Teasell, and E. Loh, "Effectiveness of transcranial direct current stimulation for the management of neuropathic pain after spinal cord injury: a meta-analysis," (in eng), *Spinal Cord*, vol. 53, no. 11, pp. 780-5, Nov 2015, doi: 10.1038/sc.2015.118.
- [45] S. P. Cohen and J. Mao, "Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications," (in eng), *BMJ*, vol. 348, p. f7656, Feb 2014, doi: 10.1136/bmj.f7656.
- [46] M. Zain and R. P. Bonin, "Alterations in evoked and spontaneous activity of dorsal horn wide dynamic range neurons in pathological pain: a systematic review and analysis," (in eng), *Pain*, vol. 160, no. 10, pp. 2199-2209, 10 2019, doi: 10.1097/j.pain.0000000000001632.
- [47] C. Sommer, M. Leinders, and N. Üçeyler, "Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain," (in eng), *Pain*, vol. 159, no. 3, pp. 595-602, 03 2018, doi: 10.1097/j.pain.0000000000001122.
- [48] M. P. Jackson *et al.*, "Animal models of transcranial direct current stimulation: Methods and mechanisms," (in eng), *Clin Neurophysiol*, vol. 127, no. 11, pp. 3425-3454, Nov 2016, doi: 10.1016/j.clinph.2016.08.016.
- [49] B. Fritsch *et al.*, "Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning," (in eng), *Neuron*, vol. 66, no. 2, pp. 198-204, Apr 2010, doi: 10.1016/j.neuron.2010.03.035.
- [50] L. F. Medeiros *et al.*, "Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: a review," (in eng), *Front Psychiatry*, vol. 3, p. 110, 2012, doi: 10.3389/fpsy.2012.00110.
- [51] A. L. Cecconello, I. L. Torres, C. Oliveira, P. Zanini, G. Niches, and M. F. Ribeiro, "DHEA administration modulates stress-induced analgesia in rats," (in eng), *Physiol Behav*, vol. 157, pp. 231-6, Apr 2016, doi: 10.1016/j.physbeh.2016.02.004.
- [52] I. L. Torres, A. P. Vasconcellos, S. N. Silveira Cucco, and C. Dalmaz, "Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats," (in eng), *Braz J Med Biol Res*, vol. 34, no. 2, pp. 241-4, Feb 2001, doi: 10.1590/s0100-879x2001000200012.
- [53] J. P. Herman, "Neural control of chronic stress adaptation," (in eng), *Front Behav Neurosci*, vol. 7, p. 61, 2013, doi: 10.3389/fnbeh.2013.00061.
- [54] G. Fang and Y. Wang, "Transcranial direct current stimulation (tDCS) produce anti-anxiety response in acute stress exposure rats via activation of amygdala CB1R," (in eng), *Behav Brain Res*, vol. 400, p. 113050, Feb 2021, doi: 10.1016/j.bbr.2020.113050.
- [55] F. V. Gouveia *et al.*, "Treating Post-traumatic Stress Disorder with Neuromodulation Therapies: Transcranial Magnetic Stimulation, Transcranial Direct Current Stimulation, and Deep Brain Stimulation," (in eng), *Neurotherapeutics*, vol. 17, no. 4, pp. 1747-1756, Oct 2020, doi: 10.1007/s13311-020-00871-0.

- [56] L. Carnevali, E. Pattini, A. Sgoifo, and C. Ottaviani, "Effects of prefrontal transcranial direct current stimulation on autonomic and neuroendocrine responses to psychosocial stress in healthy humans," (in eng), *Stress*, vol. 23, no. 1, pp. 26-36, 01 2020, doi: 10.1080/10253890.2019.1625884.
- [57] M. S. Volz, A. Farmer, and B. Siegmund, "Reduction of chronic abdominal pain in patients with inflammatory bowel disease through transcranial direct current stimulation: a randomized controlled trial," (in eng), *Pain*, vol. 157, no. 2, pp. 429-437, Feb 2016, doi: 10.1097/j.pain.0000000000000386.
- [58] C. de Oliveira *et al.*, "Transcranial direct current stimulation (tDCS) modulates biometric and inflammatory parameters and anxiety-like behavior in obese rats," (in eng), *Neuropeptides*, vol. 73, pp. 1-10, Feb 2019, doi: 10.1016/j.npep.2018.09.006.
- [59] B. Vaseghi, M. Zoghi, and S. Jaberzadeh, "A meta-analysis of site-specific effects of cathodal transcranial direct current stimulation on sensory perception and pain," (in eng), *PLoS One*, vol. 10, no. 5, p. e0123873, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0123873.
- [60] W. Paulus and J. C. Rothwell, "Membrane resistance and shunting inhibition: where biophysics meets state-dependent human neurophysiology," (in eng), *J Physiol*, vol. 594, no. 10, pp. 2719-28, 05 2016, doi: 10.1113/JP271452.
- [61] T. Radman, Y. Su, J. H. An, L. C. Parra, and M. Bikson, "Spike timing amplifies the effect of electric fields on neurons: implications for endogenous field effects," (in eng), *J Neurosci*, vol. 27, no. 11, pp. 3030-6, Mar 2007, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0095-07.2007.
- [62] M. A. Nitsche, W. Jaussi, D. Liebetanz, N. Lang, F. Tergau, and W. Paulus, "Consolidation of human motor cortical neuroplasticity by D-cycloserine," (in eng), *Neuropsychopharmacology*, vol. 29, no. 8, pp. 1573-8, Aug 2004, doi: 10.1038/sj.npp.1300517.
- [63] H. Monai and H. Hirase, "Astrocytic calcium activation in a mouse model of tDCS-Extended discussion," (in eng), *Neurogenesis (Austin)*, vol. 3, no. 1, p. e1240055, 2016, doi: 10.1080/23262133.2016.1240055.
- [64] M. A. Nitsche *et al.*, "Modulating parameters of excitability during and after transcranial direct current stimulation of the human motor cortex," (in eng), *J Physiol*, vol. 568, no. Pt 1, pp. 291-303, Oct 2005, doi: 10.1113/jphysiol.2005.092429.
- [65] F. Müller-Dahlhaus and U. Ziemann, "Metaplasticity in human cortex," (in eng), *Neuroscientist*, vol. 21, no. 2, pp. 185-202, Apr 2015, doi: 10.1177/1073858414526645.
- [66] I. B. Gartside, "Mechanisms of sustained increases of firing rate of neurones in the rat cerebral cortex after polarization: role of protein synthesis," (in eng), *Nature*, vol. 220, no. 5165, pp. 383-4, Oct 1968, doi: 10.1038/220383a0.
- [67] I. B. Gartside, "Mechanisms of sustained increases of firing rate of neurons in the rat cerebral cortex after polarization: reverberating circuits or modification of synaptic conductance?," (in eng), *Nature*, vol. 220, no. 5165, pp. 382-3, Oct 1968, doi: 10.1038/220382a0.
- [68] M. A. Hebert, L. I. Serova, and E. L. Sabban, "Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus," (in eng), *J Neurochem*, vol. 95, no. 2, pp. 484-98, Oct 2005, doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03386.x.

- [69] C. Kilkenny, W. J. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson, and D. G. Altman, "Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research," (in eng), *PLoS Biol*, vol. 8, no. 6, p. e1000412, Jun 2010, doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Flow Diagram of Study Selection.

Figure 2. A) TDCS publications. Number of articles with tDCS published in PubMed over the years. **B) Origin of articles.** Countries where the articles were produced.

Author, year	Subject	Sex	N	Pain model	Target region	TDCS modality	Polarity	Sessions	Current	Duration	Behavioral test	Outcome
Callai, 2019	rats	male	130	CCI-ION	M1	Transcutaneous	Bimodal	8	0.5mA	20min	VF filaments	Analgesia in CCI-ION treated group
Eyegoni, 2017	rats	male	32	Stress induced hyperalgesia	NI	Transcutaneous	Bicephalic	8	NI	20min	HP, TFL	Increase of the thermal pain threshold in stressed group
Scarabelot, 2018	rats	male	52	TMJ inflammatory pain induced by CFA	NS	Transcutaneous	Anodal	8	0.5mA	20min	VF, HP	Thermal and mechanical analgesia
Moreira, 2016	rats	female	45	Hiperalgesia induced by ovariectomy	NS	Transcutaneous	Cathodal	8	0.5mA	20min	VF, HP, TFL	Partial reversion of pain in treated group
Souza, 2017	mice	male	NI	PSNL	NS	Transcutaneous	Bimodal	1	0.5mA	15 - 20min	VF filaments	Mechanical analgesia up to 20 min
Dimov, 2016	rats	male	21	Naïve	M1	Epicranial	Cathodal	1	0.25mA	15min	TFL, RS	Increase in mechanical pain threshold
Cioato, 2016	rats	male	84	CCI - sciatic	M1	Transcutaneous	Bimodal	8	0.5mA	20min	VF, HP	Thermal and mechanical analgesia up to 24h
Laste, 2012	rats	male	18	Hindpaw CFA	M1	Transcutaneous	Anodal	8	0.5mA	20min	VF filaments, HP	Thermal analgesia up to 24h
Spezia Adachi, 2012	rats	male	48	Stress induced hyperalgesia	M1	Transcutaneous	Bimodal	8	0.5mA	20min	VF, HP	Thermal and mechanical analgesia up to 24h
Spezia Adachi, 2015	rats	male	78	Stress induced hyperalgesia	M1	Transcutaneous	Bimodal	8	0.5mA	20min	VF	Mechanical analgesia up to 24h
Wen, 2017	rats	NI	NI	CCI - sciatic	M1	Epicranial	Anodal	5	0.05; 0.1; 0.2mA	5 - 20min	VF filaments, radiant heat test	Mechanical and thermal analgesia
Santos, 2020	rats	male	36	CCI-sciatic and alcohol abstinence	M1	Transcutaneous	Bimodal	8	0.5mA	20min	HP	Thermal analgesia

Table 1. Summary of Included Evidence of TDCS Effects on Pain Models in Animals. Transcranial direct current stimulation (tDCS); Chronic constriction injury (CCI); Intraorbital nerve (CCI-ION); Primary motor cortex (M1); minutes (min); Von Frey test (VF); not informed (NI); hot plate test (HP); tail flick test (TFL); temporomandibular joint (TMJ); Freund's Adjuvant (CFA); not specific (NS); Partial Sciatic Nerve Ligation (PSNL); Randall-Selitto test (RS); chronic constriction injury (CCI).

Table 1.

Figure 1

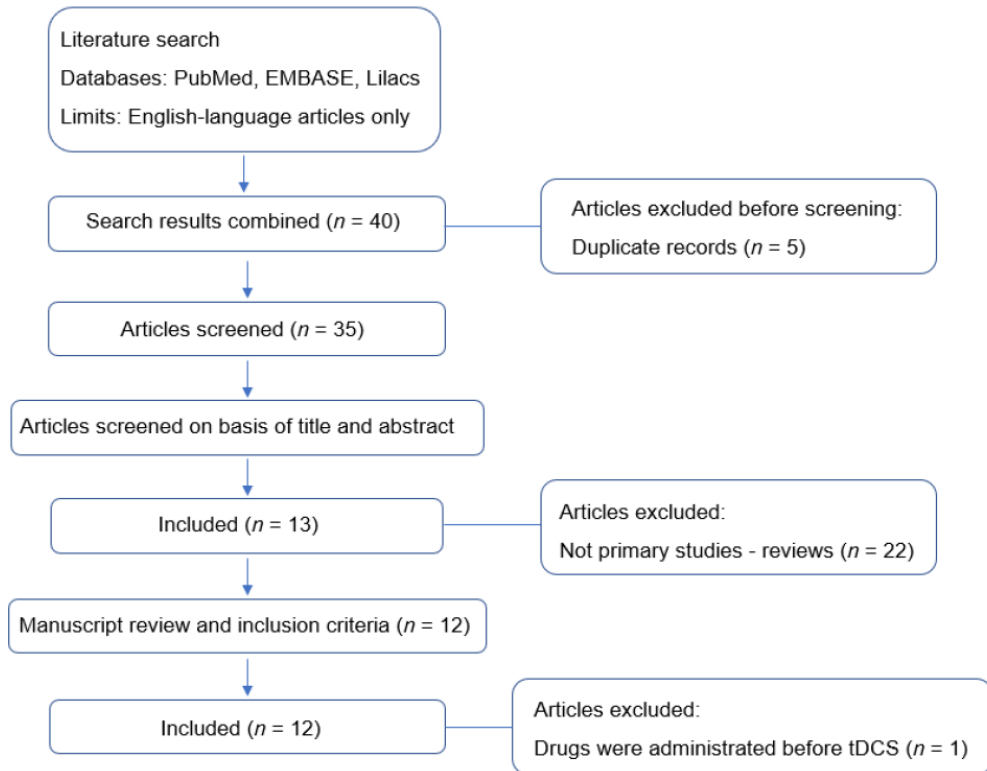
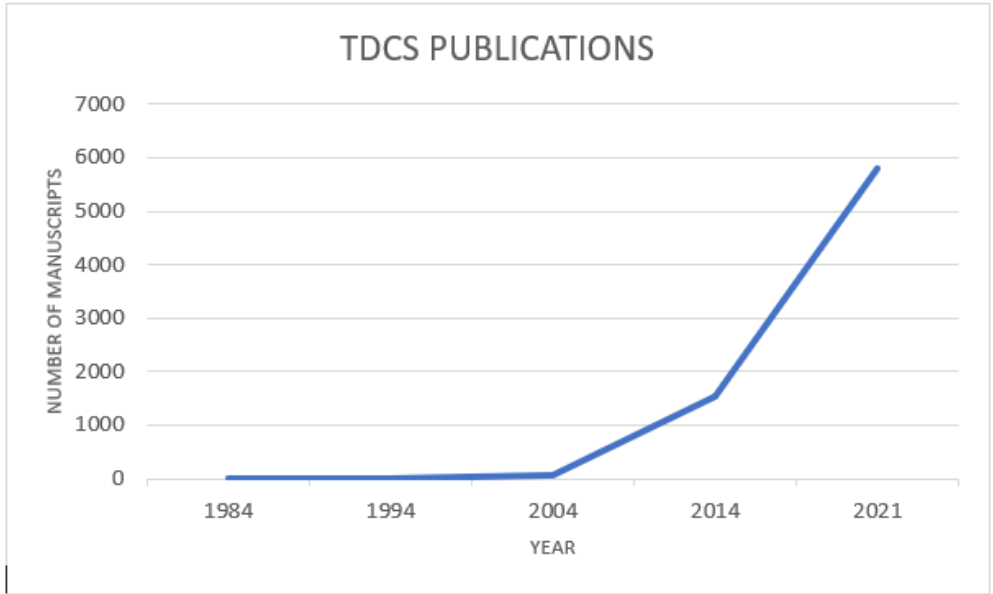
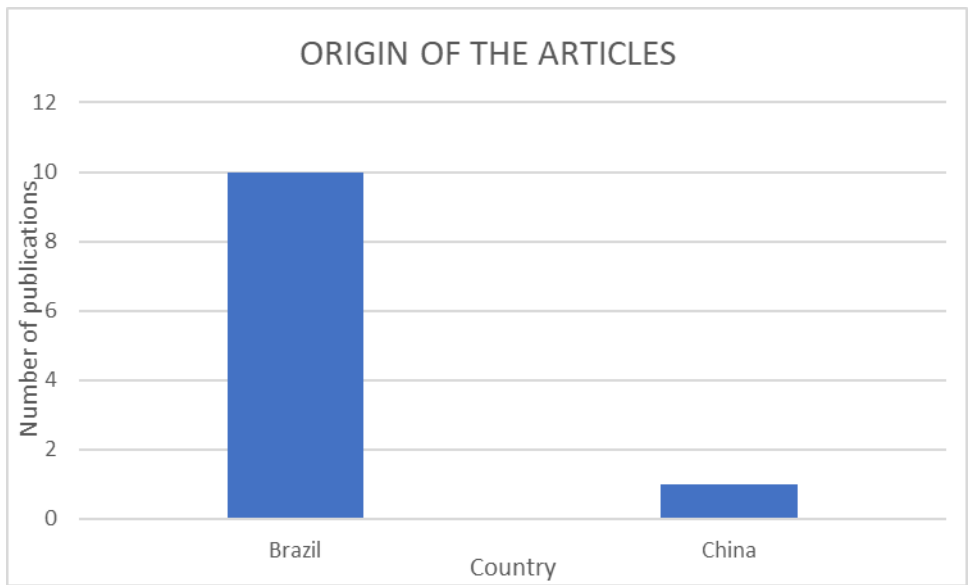


Figure 2

A



B



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista as análises da literatura apresentadas no presente trabalho, pode-se sugerir que a ETCC é capaz de prevenir e reduzir o comportamento nociceptivo em animais nas condições do estudo. Isso confirma seu potencial analgésico observado em humanos e serve de escopo para futuras pesquisas. Infere-se, portanto que o uso dessa técnica pode possibilitar a diminuição emprego de fármacos com mínimos efeitos adversos e baixos custos. Ou ainda, conferir sinergia de efeito analgésico quando empregada de forma adjuvante com outras abordagens.

Sabe-se que investigação de seus mecanismos ainda precisa ser explorada para proporcionar máxima exploração do potencial da ETCC com maiores benefícios. Isso somente é possível com estudos intervencionais em animais. O equipamento em desenvolvimento pelos pesquisadores mostrou-se seguro. Tal fato habilita seu uso subsequente no estudo para avaliar sua eficácia terapêutica. O desenvolvimento de novos equipamentos ou aprimoramento dos existentes traz refinamento à pesquisa e vai ao encontro da proposta dos 3Rs (*Replacement, Reductio and Refinement*). Com isso, são melhoradas as condições de bem-estar animal e os resultados de pesquisas pré-clínicas tendem a ser mais reprodutíveis e confiáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONY, A. B. et al. Neurostimulation for the Treatment of Chronic Head and Facial Pain: A Literature Review. **Pain Physician**, v. 22, n. 5, p. 447-477, 09 2019. ISSN 2150-1149. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31561646> >.

BAYER, K. E. et al. Reduction of intra-abdominal pain through transcranial direct current stimulation: A systematic review. **Medicine (Baltimore)**, v. 98, n. 39, p. e17017, Sep 2019. ISSN 1536-5964. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31574799> >.

BINDMAN, L. J.; LIPPOLD, O. C.; REDFEARN, J. W. THE ACTION OF BRIEF POLARIZING CURRENTS ON THE CEREBRAL CORTEX OF THE RAT (1) DURING CURRENT FLOW AND (2) IN THE PRODUCTION OF LONG-LASTING AFTER-EFFECTS. **J Physiol**, v. 172, p. 369-82, Aug 1964. ISSN 0022-3751. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14199369> >.

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. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 11, n. 2, p. 249-54, Mar 2008. ISSN 1461-1457. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17559710> >.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 7, p. 407-20, 07 2016. ISSN 1474-1741. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27291964> >.

CALLAI, E. M. M. et al. Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) and trigeminal pain: a pre-clinical study. **Oral Dis**, Jan 2019. ISSN 1601-0825. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30636099> >.

CARANDINI, M.; FERSTER, D. Membrane potential and firing rate in cat primary visual cortex. **J Neurosci**, v. 20, n. 1, p. 470-84, Jan 2000. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627623> >.

CIOFFI, C. L. Modulation of Glycine-Mediated Spinal Neurotransmission for the Treatment of Chronic Pain. **J Med Chem**, v. 61, n. 7, p. 2652-2679, 04 2018. ISSN 1520-4804. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28876062> >.

COGHILL, R. C.; MCHAFFIE, J. G.; YEN, Y. F. Neural correlates of interindividual differences in the subjective experience of pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8538-42, Jul 8 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **BMJ**, v. 348, p. f7656, Feb 2014. ISSN 1756-1833. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24500412> >.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br J Anaesth**, v. 101, n. 1, p. 8-16, Jul 2008. ISSN 1471-6771. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417503> >.

DAHLHAMER, J. et al. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults - United States, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 67, n. 36, p. 1001-1006, Sep 2018. ISSN 1545-861X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30212442> >.

DAI, Y. TRPs and pain. **Semin Immunopathol**, v. 38, n. 3, p. 277-91, 05 2016. ISSN 1863-2300. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26374740> >.

FERREIRA, N. R. et al. The efficacy of transcranial direct current stimulation and transcranial magnetic stimulation for chronic orofacial pain: A systematic review. **PLoS One**, v. 14, n. 8, p. e0221110, 2019. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31415654> >.

FIELDS, H. L. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. **Prog Brain Res**, v. 122, p. 245-53, 2000. ISSN 0079-6123. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737063> >.

FINE, P. G. Long-term consequences of chronic pain: mounting evidence for pain as a neurological disease and parallels with other chronic disease states. **Pain Med**, v. 12, n. 7, p. 996-1004, Jul 2011. ISSN 1526-4637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21752179> >.

FINNERUP, N. B. et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Neurol**, v. 14, n. 2, p. 162-73, Feb 2015. ISSN 1474-4465. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25575710> >.

FISHMAN, M. A. et al. The Evolution of Neuromodulation in the Treatment of Chronic Pain: Forward-Looking Perspectives. **Pain Med**, v. 20, n. Suppl 1, p. S58-S68, 06 2019. ISSN 1526-4637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31152176> >.

FRANK, E. et al. Anodal skin lesions after treatment with transcranial direct current stimulation. **Brain Stimul**, v. 3, n. 1, p. 58-9, Jan 2010. ISSN 1876-4754. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20633432> >.

FREGNI, F. et al. A controlled clinical trial of cathodal DC polarization in patients with refractory epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 2, p. 335-42, Feb 2006. ISSN 0013-9580. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16499758> >.

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, Apr 2010. ISSN 1097-4199. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20434997> >.

GODINHO, F. et al. Emotional modulation of pain: is it the sensation or what we recall? **J Neurosci**, v. 26, n. 44, p. 11454-61, Nov 1 2006. ISSN 0270-6474.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. The endocannabinoid system and pain. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 8, n. 6, p. 403-21, Dec 2009. ISSN 1996-3181. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19839937> >.

HEBERT, M. A.; SEROVA, L. I.; SABBAN, E. L. Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus. **J Neurochem**, v. 95, n. 2, p. 484-98, Oct 2005. ISSN 0022-3042. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16190871> >.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 365-76, Aug 2007. ISSN 0896-6273. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17678851> >.

JACKSON, M. P. et al. Animal models of transcranial direct current stimulation: Methods and mechanisms. **Clin Neurophysiol**, v. 127, n. 11, p. 3425-3454, Nov 2016. ISSN 1872-8952. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27693941> >.

KELLAWAY, P. The part played by electric fish in the early history of bioelectricity and electrotherapy. **Bull Hist Med**, v. 20, n. 2, p. 112-37, Jul 1946. ISSN 0007-5140. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20277440> >.

KOO, H. et al. After-effects of anodal transcranial direct current stimulation on the excitability of the motor cortex in rats. **Restor Neurol Neurosci**, v. 34, n. 5, p. 859-68, 09 2016. ISSN 1878-3627. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27567759> >.

LASTE, G. et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. **Exp Brain Res**, v. 221, n. 1, p. 75-83, Aug 2012. ISSN 1432-1106. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752510> >.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, Sep 2009. ISSN 1526-5900.

LAU, B. K.; VAUGHAN, C. W. Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. **Curr Opin Neurobiol**, v. 29, p. 159-64, Dec 2014. ISSN 1873-6882. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25064178> >.

LECLERCQ, D.; THIEBAUT, J. B.; HÉRAN, F. Trigeminal neuralgia. **Diagn Interv Imaging**, v. 94, n. 10, p. 993-1001, Oct 2013. ISSN 2211-5684. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24007773> >.

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. 1216-24, Jul 2006. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580.

_____. Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 7, p. 1216-24, Jul 2006. ISSN 0013-9580. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16886986> >.

LISMAN, J. E. Three Ca²⁺ levels affect plasticity differently: the LTP zone, the LTD zone and no man's land. **J Physiol**, v. 532, n. Pt 2, p. 285, Apr 2001. ISSN 0022-3751. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306649> >.

LLOYD, D. M. et al. Is Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Effective for the Treatment of Pain in Fibromyalgia? A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Pain**, Jan 2020. ISSN 1528-8447. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31982685> >.

MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 5-21, Sep 2004. ISSN 0896-6273. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15450156> >.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-9, Nov 1965. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5320816> >.

MONAI, H.; HIRASE, H. Astrocytic calcium activation in a mouse model of tDCS-Extended discussion. **Neurogenesis (Austin)**, v. 3, n. 1, p. e1240055, 2016. ISSN 2326-2133. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27830161> >.

_____. Astrocytes as a target of transcranial direct current stimulation (tDCS) to treat depression. **Neurosci Res**, v. 126, p. 15-21, Jan 2018. ISSN 1872-8111. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29079367> >.

MONAI, H. et al. Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. **Nat Commun**, v. 7, p. 11100, Mar 2016. ISSN 2041-1723. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27000523> >.

MUNCE, S. E.; STEWART, D. E. Gender differences in depression and chronic pain conditions in a national epidemiologic survey. **Psychosomatics**, v. 48, n. 5, p. 394-9, 2007 Sep-Oct 2007. ISSN 0033-3182. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878497> >.

MÁRQUEZ-RUIZ, J. et al. Transcranial direct-current stimulation modulates synaptic mechanisms involved in associative learning in behaving rabbits. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 17, p. 6710-5, Apr 2012. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22493252> >.

MÜLLER-DAHLHAUS, F.; ZIEMANN, U. Metaplasticity in human cortex. **Neuroscientist**, v. 21, n. 2, p. 185-202, Apr 2015. ISSN 1089-4098. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24620008> >.

NITSCHKE, M. A. et al. The pharmacology of neuroplasticity induced by non-invasive brain stimulation: building models for the clinical use of CNS active drugs. **J Physiol**, v. 590, n. 19, p. 4641-62, Oct 2012. ISSN 1469-7793. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22869014> >.

_____. Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. **Clin Neurophysiol**, v. 114, n. 4, p. 600-4, Apr 2003. ISSN 1388-2457. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12686268> >.

_____. Modulating parameters of excitability during and after transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. **J Physiol**, v. 568, n. Pt 1, p. 291-303, Oct 2005. ISSN 0022-3751. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002441> >.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3779-87, Nov 2010. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041960> >.

PAK, D. J. et al. Chronification of Pain: Mechanisms, Current Understanding, and Clinical Implications. **Curr Pain Headache Rep**, v. 22, n. 2, p. 9, Feb 2018. ISSN 1534-3081. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29404791> >.

PEDERSEN, J. L. et al. Hyperalgesia and temporal summation of pain after heat injury in man. **Pain**, v. 74, n. 2-3, p. 189-97, Feb 1998. ISSN 0304-3959. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520233> >.

PERGOLIZZI, J. et al. The development of chronic pain: physiological CHANGE necessitates a multidisciplinary approach to treatment. **Curr Med Res Opin**, v. 29, n. 9, p. 1127-35, Sep 2013. ISSN 1473-4877. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23786498> >.

RADMAN, T. et al. Spike timing amplifies the effect of electric fields on neurons: implications for endogenous field effects. **J Neurosci**, v. 27, n. 11, p. 3030-6, Mar 2007. ISSN 1529-2401. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360926> >.

ROCKHOLD, R. W. et al. Urethane anesthesia reverses the protective effect of noncompetitive NMDA receptor antagonists against cocaine intoxication. **Life Sci**, v. 54, n. 5, p. 321-30, 1994. ISSN 0024-3205. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8289593> >.

RUOHONEN, J.; KARHU, J. tDCS possibly stimulates glial cells. **Clin Neurophysiol**, v. 123, n. 10, p. 2006-9, Oct 2012. ISSN 1872-8952. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480602> >.

SAMAD, T. A. et al. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 471-5, Mar 2001. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11260714> >.

SANDKÜHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiol Rev**, v. 89, n. 2, p. 707-58, Apr 2009. ISSN 0031-9333. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19342617> >.

SCHOLZ, J. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 53-59, Jan 2019. ISSN 1872-6623. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30586071> >.

SIREK, A.; SIREK, O. V. Serotonin: a review. **Can Med Assoc J**, v. 102, n. 8, p. 846-9, Apr 1970. ISSN 0008-4409. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4910705> >.

SMITH, B. H. et al. Managing chronic pain in the non-specialist setting: a new SIGN guideline. **Br J Gen Pract**, v. 64, n. 624, p. e462-4, Jul 2014. ISSN 1478-5242. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24982501> >.

SOMMER, C.; LEINDERS, M.; ÜÇEYLER, N. Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain. **Pain**, v. 159, n. 3, p. 595-602, 03 2018. ISSN 1872-6623. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29447138> >.

SPEZIA ADACHI, L. N. et al. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. **Exp Brain Res**, v. 233, n. 5, p. 1377-89, May 2015. ISSN 1432-1106. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25665871> >.

STAGG, C. J.; ANTAL, A.; NITSCHKE, M. A. Physiology of Transcranial Direct Current Stimulation. **J ECT**, v. 34, n. 3, p. 144-152, 09 2018. ISSN 1533-4112. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29877965> >.

STAGG, C. J.; NITSCHKE, M. A. Physiological basis of transcranial direct current stimulation. **Neuroscientist**, v. 17, n. 1, p. 37-53, Feb 2011. ISSN 1089-4098. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21343407> >.

TAKANO, Y. et al. A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. **Neurosci Lett**, v. 491, n. 1, p. 40-3, Mar 2011. ISSN 1872-7972. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215288> >.

TREEDE, R. D. et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). **Pain**, v. 160, n. 1, p. 19-27, Jan 2019. ISSN 1872-6623. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30586067> >.

VASEGHI, B.; ZOGHI, M.; JABERZADEH, S. A meta-analysis of site-specific effects of cathodal transcranial direct current stimulation on sensory perception and pain. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0123873, 2015. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25978673> >.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **Br J Anaesth**, v. 105 Suppl 1, p. i69-85, Dec 2010. ISSN 1471-6771. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148657> >.

WOODS, A. J. et al. A technical guide to tDCS, and related non-invasive brain stimulation tools. **Clin Neurophysiol**, v. 127, n. 2, p. 1031-1048, Feb 2016. ISSN 1872-8952. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26652115> >.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3742-4, Nov 2010. ISSN 1558-8238. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041955> >.

WOOLF, C. J.; THOMPSON, S. W. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. **Pain**, v. 44, n. 3, p. 293-9, Mar 1991. ISSN 0304-3959. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1828878> >.

ZHU, C. E. et al. Effectiveness and safety of transcranial direct current stimulation in fibromyalgia: A systematic review and meta-analysis. **J Rehabil Med**, v. 49, n. 1, p. 2-9, Jan 2017. ISSN 1651-2081. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27983739> >.

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:

MILTON VASCONCELOS	JAMILE BOFF	THAÍS 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.