

## EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC) NO LIMAR DE DOR E NOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO (EO) DE RATOS COM DOR NEUROPÁTICA (DN)

THAINÁ LEITE PALUDETO<sup>1</sup>; LARA COELHO SIQUEIRA<sup>2</sup>; FRANCIELI MORO STEFANELLO<sup>3</sup>; PRISCILA CENTENO CRESPO<sup>4</sup>; LEO ANDERSON MEIRA MARTINS<sup>5</sup>; IZABEL CRISTINA CUSTODIO DE SOUZA<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas – paludetothaina@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – coelholar@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – francieli.stefanello@ufpel.edu.br

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas – priscrespo@gmail.com

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas – leomeiram@gmail.com

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas – izabel.souza@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A DN ocorre por uma alteração nociceptiva causada por uma lesão no sistema nervoso somatossensorial (MERSKEY, H., 1986). Segundo os estudos A. KHAN et. al (2021) e S.REZQ et. al. (2020) o EO é relevante no desenvolvimento e na manutenção da DN. Pesquisas prévias demonstraram que o EO está relacionado à alodinia, à hiperalgesia e à resposta inflamatória. Ademais, há evidências de que tratamentos capazes de reduzir os danos ocasionados pelas espécies reativas de oxigênio (EROS) e de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes atuam na redução da hiperalgesia em modelos de DN.

O tratamento da DN é restrito devido aos efeitos indesejáveis dos fármacos disponíveis. Então, a ETCC, técnica capaz de modular a função cerebral de forma não invasiva, mostra-se bastante promissora, sobretudo, a ETCC anódica por induzir uma modificação duradoura da excitabilidade cortical que modela a plasticidade sináptica, os níveis de EO, a neuroinflamação e a autofagia, reduzindo a dor. Portanto, o presente estudo objetiva demonstrar os efeitos da ETCC em diversos biomarcadores de EO relacionados com a DN.

### 2. METODOLOGIA

No estudo, aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA-10480-2014), utilizou-se 88 ratos machos Wistar com 60 dias de idade. Esses ratos foram randomizados em 3 grandes grupos: controle (C), lesão simulada (SL) e lesão (L), que foram mantidos e em gaiolas com comida e água à vontade e ciclo claro-escuro de 12 horas. A medição da dor foi baseada no teste von Frey, no qual foram realizadas quatro medidas de força aplicada na pata direita do animal, determinando a força em que o animal retirou a pata (NETTO et al, 1987; VIVANCOS, 2004). Já o modelo de DN, foi induzido por uma lesão constritiva no nervo ciático do animal conforme descrito por BENNETT and XIE (1988). O grupo controle não foi exposto a nenhum procedimento cirúrgico, enquanto o grupo de lesão simulada foi exposto a cirurgia, mas a constrição nervosa não foi realizada. Catorze dias após o procedimento cirúrgico, os animais foram expostos ao teste de von Frey e foram divididos, então, em subgrupos: controle (C), controle com eletrodo desligado (CEoff), controle eletricamente estimulado (C-tDCS), lesão simulada (SL), lesão simulada com eletrodo desligado (SLEoff), lesão simulada eletricamente estimulado (SL-tDCS), lesão (L), lesão com eletrodo desligado (LEoff) e lesão eletricamente estimulado (L-tDCS). Os ratos eletricamente estimulados receberam 8 sessões diárias, consecutivas, de estimulação elétrica bimodal, com duração de 20 minutos cada sessão, conforme descrito por LOPES et al (2021) e SANTOS et al

(2020). Após 24 horas e 7 dias da ETCC, os ratos foram submetidos novamente ao teste de von frey e, 8 dias após o final do tratamento, foram eutanasiados. A medula espinhal de 45 ratos foi congelada até o processamento. Posteriormente, foram analisados os seguintes parâmetros de EO: medida de EROS (ALI et al, 1992), quantificação dos níveis de nitrito (STUEHR et al, 1989), do conteúdo total de sulfidrilas (AKSENOV et al, 2001), de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTERBAUER et al, 1990), ensaio de atividade da superóxido dismutase (SOD) (MISRA, FRIDOVICH, 1972) e da catalase (CAT) (AEBI, 1984), da glutathione S-transferase (GST) (HABIG et al, 1974). Por fim, para as análises estatísticas realizou-se a análise de variância (ANOVA) bidirecional seguida do teste de Tukey, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 8.4.3.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A respeito dos parâmetros de EO na medula espinhal de ratos, ao avaliar as EROS não se observou diferença entre o grupo com efeito da dor ( $F(2,24) = 2,828$ ,  $P = 0,0790$ ) e da ETCC ( $F(2,24) = 2,937$ ,  $P = 0,0723$ ). Em comparação do grupo L e o C não houve diferença estatisticamente significativa ( $P$  ajustado = 0,0622) com efeito da dor e da ETCC. Além de ter um efeito menor de sulfidrilas totais no grupo L do que o grupo C ( $P$  ajustado = 0,0064), CEoff ( $P$  ajustado = 0,0417), C-tDCS ( $P$  ajustado < 0,0001), SL ( $P$  ajustado = 0,0009), SLEoff ( $P$  ajustado < 0,0001) e SL-tDCS ( $P$  ajustado = 0,0216), corroborando com FOROUZANFAR et al (2019), que demonstrou a mesma diminuição do conteúdo sulfidrilas após a indução de ICC.

Ainda nos níveis de sulfidrilas, os grupos C-ETCC e SLEoff indicaram valores maiores do que o grupo LEoff (respectivamente,  $P$  ajustado = 0,0147 e  $P$  ajustado = 0,0120). Já os níveis de sulfidrilas no L-ETCC foram aumentados em relação ao C ( $P$  ajustado < 0,0001), CEoff ( $P$  ajustado < 0,0001), C-tDCS ( $P$  ajustado = 0,0015), SL ( $P$  ajustado < 0,0001), SLEoff ( $P$  ajustado = 0,0019), SL-tDCS ( $P$  ajustado < 0,0001), L ( $P$  ajustado < 0,0001) e grupos LEoff ( $P$  ajustado < 0,0001), demonstrando efeito do tratamento. No grupo C-ETCC versus o CEoff ( $P$  ajustado = 0,0438) houve maiores níveis de sulfidrilas, sugerindo um possível efeito desse tratamento nos ratos saudáveis. Verificou-se ainda que o grupo LESoff versus CEoff ( $P$  ajustado = 0,0363) revelou aumento de sulfidrilas. Em relação ao efeito de dor encontrou-se  $F(2,27) = 0,2561$ ,  $P = 0,7759$ ; efeito ETCC,  $F(2,27) = 29,60$ ,  $P < 0,0001$  e interação dor  $\times$  ETCC,  $F(4,27) = 27,72$ ,  $P < 0,0001$ .

Não se obteve discordâncias dos níveis de TBARS entre os grupos para dor ( $F(2,28) = 2,108$ ,  $P = 0,6626$ ) ou ETCC ( $F(2,28) = 0,3707$ ,  $P = 0,6936$ ).

Os níveis de nitrito no grupo L-ETCC foram menores do que no grupo L ( $P$  ajustado = 0,0237). Já entre os grupos L-tDCS e LEoff e LEoff e L não se analisou diferenças (respectivamente,  $P$  ajustado = 0,9900 e  $P$  ajustado = 0,1967). E tais níveis de nitrito em relação ao efeito dor demonstrou valores  $F(2,30) = 0,2947$ ,  $P = 0,7759$ , efeito ETCC  $F(2,27) = 29,60$ ,  $P < 0,0001$  e a relação entre ETCC e dor:  $F(4,30) = 4,070$ ,  $P = 0,0094$ . Ao se verificar o valor  $P$ , o grupo L sugere uma tendência ao aumento dos níveis de nitrito em comparação ao grupo C ( $p$  ajustado = 0,0622), apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas entre tais grupos.

Entre os grupos não houve discrepâncias significativas estatisticamente sobre a atividade SOD (Efeito dor,  $P = 0,3421$  e efeito ETCC ( $P = 0,4347$ ). E o mesmo resultado para o CAT, com Efeito dor ( $P = 0,6559$ ) e efeito ETCC ( $P = 0,5796$ ). Porém, na atividade CAT existiu uma interação dor e tDCS ( $F(4,26) = 4,045$ ,  $P = 0,0111$ ). Diferentemente de ZHANG et al (2019), que por meio de um modelo CCI

de camundongos, observaram menor atividade de SOD e CAT e maiores níveis de MDA na medula espinhal lombar, neste estudo, não se verificou mudanças nas ações SOD e CAT, nem nos níveis de RS e TBARS. Para os níveis de GST, encontrou-se efeito de dor ( $F(2,29) = 5,983$ ;  $P = 0,0067$ ), efeito de ETCC ( $F(2,29) = 4,120$ ;  $P = 0,0266$ ) e uma interação dor  $\times$  ETCC ( $F(4,29) = 5,979$ ;  $P = 0,0012$ ).

Ademais, o grupo L indicou aumento dos níveis GST em comparação com os grupos C ( $P$  ajustado = 0,0021), CEoff ( $P$  ajustado = 0,0116), SL ( $P$  ajustado = 0,0010), SLEoff ( $P$  ajustado = 0,0013) e SL-tDCS ( $P$  ajustado = 0,0004). Após o tratamento com ETCC, houve diminuição dos níveis de GST no grupo L em relação aos grupo L-ETCC ( $P$  ajustado = 0,0002). Entre os grupos L-tDCS e LEoff ( $P$  ajustado = 0,38251) e entre os grupos LEoff e L ( $P$  ajustado = 0,0595 não analisou-se disparidades).

Sobre o GST, que tem relevante efeito na desintoxicação de compostos xenobióticos e proteção contra o EO (BABBITT, 2000), a ETCC diminuiu sua atividade no grupo L-ETCC ao se relacionar com o grupo L, já a comparação entre os grupos LEoff e L-tDCS, LEoff e L não apresentaram diferenças significativas entre si. Sendo assim, na medula espinhal, maior conteúdo de nitrito e menor de sulfidrilas totais podem estar relacionados a maior da atividade da GST. Então, houve a restauração dos níveis de nitrito, diminuição da atividade GST e aumento dos níveis de sulfidrilas totais. A DN tem maior expressão devido maior atividade de intermediários proteicos que regulam a resposta neuronal sensível exacerbada (COSTIGAN et al, 2009) e a produção desordenada de espécies reativas que implicam em diversas condições patológicas (FORMAN et al, 2015).

O teor de sulfidrilas totais aumentou no grupo L-tDCS mais do que nos grupos L e LEoff, que pode ser justificada pela degradação de intermediários responsáveis pela hiperexcitabilidade e hiperalgesia provocadas pela lesão.

#### 4. CONCLUSÕES

Pode-se entender melhor o processo de DN através da ETCC e seus resultados sobre o EO. Sendo que, na medula espinhal de ratos com ICC, a ETCC bimodal melhora a modulação da dor e do EO, por aumentar o limiar de dor e os níveis de sulfidrilas totais. Nesse mesmo local, apesar desse procedimento também diminuir os níveis de nitrito e a atividade de GST, resultados iguais foram obtidos na estimulação simulada, por isso devem ser avaliados. Por fim, a longo prazo, observa-se que uma lesão periférica altera o limiar de dor e biomarcadores a nível espinhal.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSENOV, M.Y., MARKESBERY, W.R., Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 302 (2–3) (2001) 141–145,
- ALI, S.F., LEBEL, C.P., BONDY, S.C., Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity, *Neurotoxicology* 13 (3) (1992) 637–648.
- AEBI, H., Catalase in vitro, **Methods Enzymol.** 105 (1984) 121–126.
- BABBITT, P.C., Reengineering the glutathione S-transferase scaffold: a rational design strategy pays off, **PNAS** 97 (19) (2000) 10298–10300
- BENNETT, G.J., XIE, Y.K., A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man, *Pain* 33 (1) (1988) 87–107

- COSTIGAN, M., SCHOLZ, WOOLF, C.J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage, *Annu. Rev. Neurosci.* 32 (2009) 1–32
- ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421
- FOROUZANFAR, F.; HOSSEINZADEH, H., KHORRAMI M.B. et al. Attenuating Effect of *Portulaca oleracea* Extract on Chronic Constriction Injury Induced Neuropathic Pain in Rats: An Evidence of Anti-oxidative and Antiinflammatory Effects, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 18 (4) (2019) 342–349
- FORMAN, H.J.; AUGUSTO O.; BRIGELIUS-FLOHE, R. et al., Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology, *Free Radic. Biol. Med.* 78 (2015) 233–235
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249 (22) (1974) 7130–7139.
- KHAN, A., KHAN, S. KHALID, B. et al. 7β-(3-Ethyl-cis-crotonoyloxy)-1α-(2-methylbutyryloxy)-3,14-dehydro-Z Notonipetranone Attenuates Neuropathic Pain by Suppressing Oxidative Stress, Inflammatory and Pro-Apoptotic Protein Expressions, *Molecules* 26 (1) (2021) 181,
- LOPES, B.C., MEDEIROS, L.F., STEIN, D.J. et al., tDCS and exercise improve anxiety-like behavior and locomotion in chronic pain rats via modulation of neurotrophins and inflammatory mediators, *Behav. Brain Res.* 404 (2021), 113173.
- MISRA, H.P., FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (10) (1972) 3170–3175.
- MERSKEY, H. (Ed.). (1986). Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy, Pain. Supplement, vol. 3, 1986, pp. S1-226.
- NETTO, C.A., SIEGFRIED, B., IZQUIERDO, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation, *Behav. Neural Biol.* 48 (2) (1987) 304–309.
- REZQ, S., ALSEMEH, A.E., D'ELIA, L. et al. Thymus algeriensis and Thymus fontanesii exert neuroprotective effect against chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020) 2055.
- STUEHR, D.J., NATHAN, C.F., Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells, *J. Exp. Med.* 169 (5) (1989) 1543–1555
- SANTOS, D.S., LOPES, B.C., MEDEIROS, L.F. et al, Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Induces Analgesia in Rats with Neuropathic Pain and Alcohol Abstinence, *Neurochem. Res.* 45 (11) (2020) 2653–2663,
- VIVANCOS, G.G., VERRI, W.A., CUNHA, T.M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37 (3) (2004) 391–399,
- ZHANG, G., LIU, N.; ZHU, C.; et al. Antinociceptive effect of isoorientin against neuropathic pain induced by the chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice, *Int. Immunopharmacol.* 75 (2019), 105753