

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**  
**MESTRADO EM FISIOTERAPIA**



**CAMILA CAROLINNE SILVA DE ALMEIDA**

**LIBERAÇÃO DE OCITOCINA E EFEITO DA ESTIMULAÇÃO POR CORRENTE  
CONTÍNUA NA DURA-MÁTER CEREBRAL DE RATOS *WISTAR* - UM ESTUDO *IN*  
*VITRO***

**RECIFE**

**2017**

**CAMILA CAROLINNE SILVA DE ALMEIDA**

**LIBERAÇÃO DE OCITOCINA E EFEITO DA ESTIMULAÇÃO POR CORRENTE  
CONTÍNUA NA DURA-MÁTER CEREBRAL DE RATOS *WISTAR* - UM ESTUDO *IN*  
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de mestre.

**Linha de Pesquisa:** Instrumentação e intervenção fisioterapêutica.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniella Araújo de Oliveira

**Co-orientadores:** Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Eduardo José Nepomuceno Montenegro e Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Marcelo Moraes Valença

**RECIFE**

**2017**

Catálogo na fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- A4471 Almeida, Camila Carolinne Silva de.  
Liberação de ocitocina e efeito da estimulação por corrente contínua na dura-máter cerebral de ratos *wistar* - um estudo *in vitro* / Camila Carolinne Silva de Almeida. – 2017.  
103 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.
- Orientadora: Daniella Araújo de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. Recife, 2017.
- Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Estimulação elétrica. 2. Ocitocina. 3. Analgesia. 4. Sistema nervoso central. 5. Ratos. I. Oliveira, Daniella Araújo de (Orientadora). II. Título.
- 616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-151)

**“LIBERAÇÃO DE OCITOCINA E EFEITO DA ESTIMULAÇÃO POR CORRENTE CONTÍNUA NA DURA-MÁTER CEREBRAL DE RATOS *WISTAR* - UM ESTUDO *IN VITRO*”**

**CAMILA CAROLINNE SILVA DE ALMEIDA**

**APROVADA EM: 27/04/2017**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. DANIELLA ARAÚJO DE OLIVEIRA**

**COORDENADORES: PROF. DR. EDUARDO JOSÉ NEPOMUCENO  
MONTENEGRO**

**PROF. DR. MARCELO MORAES VALENÇA**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. SILVIA REGINA ARRUDA DE MORAES – ANATOMIA/ CB/ UFPE**

---

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANGÉLICA DA SILVA TENÓRIO – FISIOTERAPIA/ CCS/ UFPE**

---

**PROF. DR. JOAQUIM JOSÉ DE SOUZA COSTA NETO – NEUROPSIQUIATRIA/ CCS/ UFPE**

**Visto e permitida à impressão**

---

**Coordenadora do PPGFISIOTERAPIA/DEFISIO/UFPE**

## **Agradecimentos**

Ao Senhor, Deus por guiar meus passos e permitir essa conquista em minha vida.

Aos meus pais, Iracema Almeida e Gilberto Almeida pelo apoio incondicional, pela educação, amor e principalmente, por acreditarem nos meus sonhos sempre.

Ao meu amigo e companheiro, Laerte Fernandes, por toda paciência, atenção, carinho, pelas palavras ditas e até mesmo pelo silêncio quando necessário.

À minha irmã Bruna Almeida e ao meu cunhado Diego Messias pelo apoio e pelas palavras de incentivo.

A todos os meus familiares, pela oração, torcida e vibração a cada nova conquista.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniella Araújo de Oliveira e aos meus co-orientadores Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Eduardo José Nepomuceno Montenegro e Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Marcelo Moraes Valença por todos os ensinamentos partilhados, suporte e orientações. A contribuição de cada um de vocês foi essencial para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Às queridas doutorandas, Amanda Araújo, Emanuela Paz Rosas e Islane Martins, pessoas que se tornaram imprescindíveis para execução do projeto. Obrigada por todo empenho, disponibilidade e comprometimento com a pesquisa.

A todos os componentes do Laboratório do Controle Motor- LACOM (Departamento de Fisioterapia da UFPE) pelo apoio e incentivo. Em especial às minhas amigas, Débora Wanderley, Manuella Moraes e Thaís Maia, pela ajuda, parceria, por toda alegria e bom humor que tornaram minha caminhada mais leve e divertida.

À veterinária Adriana Ferreira Cruz, responsável técnica pelo Biotério de roedores do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE e a todos os demais funcionários que me acolheram tão bem.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Lopes de Souza, por abrir as portas do seu laboratório de Neuroplasticidade de Comportamento (Departamento de Anatomia do CCB/ UFPE) para a execução de minha pesquisa e às doutorandas Isabeli Lins, Juliett Araújo, Larissa Almeida por me receberem tão bem no laboratório e por não medirem esforços para o cumprimento do cronograma da pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas, por toda disponibilidade e atenção a mim concedidos. À querida Sylvania Tavares da Silva, pelo apoio na execução do projeto.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. José Antunes Rodrigues que tornou seu laboratório de Neuroendocrinologia (Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de

Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo) uma extensão de minha pesquisa, contribuindo tão gentilmente com as análises desse projeto e a toda a sua equipe.

Às professoras Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro, Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa, Anna Myrna Jaguaribe de Lima e Dayane Aparecida Gomes pelas contribuições valiosas na correção deste trabalho.

A todos os meus colegas de turma do mestrado, por todo aprendizado, todos os momentos compartilhados e alegria que tornaram essa conquista especial.

À Niège Melo e a Rafael Braz, da secretaria da Pós-Graduação de Fisioterapia por todo carinho, atenção e paciência a mim ofertados.

À Pró-Reitoria Para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ) pelo apoio financeiro.

## Resumo

Os efeitos da estimulação por corrente contínua *in vitro* sobre a secreção de peptídeos envolvidos na fisiopatogenia e na modulação da dor da migrânea tem sido investigados. A liberação de substâncias vasoativas, pela dura-máter cerebral, explica, em parte, o processo de inflamação neurogênica responsável pela manutenção da fase dolorosa, durante uma crise de migrânea. Em contrapartida, a liberação de ocitocina pelos neurônios do gânglio trigeminal parece ter um efeito protetor na sintomatologia dolorosa dessa doença. No entanto, até onde é de nosso conhecimento, não há evidência da liberação de ocitocina pela dura-máter. Desse modo, especula-se a presença de ocitocina na dura-máter cerebral, assim como, possíveis os efeitos da estimulação *in vitro* dessa meninge, por corrente contínua, sobre a liberação desse hormônio. Portanto, o objetivo desse estudo é avaliar a liberação de ocitocina pela dura-máter cerebral e o efeito da estimulação por corrente contínua, *in vitro*, sobre a liberação de ocitocina pela dura-máter cerebral de ratos *Wistar*. Trata-se de um estudo experimental *in vitro* (Processo nº CEUA 0006/2015), envolvendo 25 ratos *Wistar* machos, com idade entre 82 a 103 dias ( $93 \pm 5$ ) e peso variando de 256 a 381 gramas ( $318 \pm 30$  gramas). Inicialmente, os animais foram eutanasiados por decapitação e tiveram o tecido epitelial, muscular e a mandíbula removidos. Em seguida, foi realizado um corte sagital no crânio, o encéfalo foi extraído cuidadosamente, permanecendo a dura-máter cerebral intacta e ligada a cada hemisfério. O total de 50 hemisférios provenientes destes animais foi distribuído em quatro grupos experimentais: controle ( $n=16$ ), *sham* ( $n=17$ ), estimulação anódica ( $n=9$ ) e estimulação catódica ( $n=8$ ). Nos grupos estimulados padronizou-se a realização da estimulação por corrente contínua na dura-máter do hemisfério direito e no grupo *sham*, para a colocação dos eletrodos foi utilizado o hemisfério oposto do mesmo animal, entretanto, não houve passagem da corrente elétrica. No grupo controle, não foi realizada nenhuma intervenção. Os parâmetros elétricos da corrente utilizados foram: intensidade- 0,5mA; densidade-  $333 \mu\text{mA}/\text{cm}^2$ ; duração- 10 minutos. Todo experimento foi composto por cinco etapas: Pré-incubação; Incubação 1; Estimulação por corrente contínua; Incubação 2; Estimulação química com KCl (56mM). Foi observada liberação de ocitocina pela dura-máter, com resultado significativo após estimulação com KCl ( $p<0,05$ ; teste de Wilcoxon). A liberação de ocitocina pela dura-máter dos hemisférios não diferiram entre os grupos controle, *sham*, estimulação anódica e catódica ( $p=0,36$ ; teste de Kruskal-Wallis). Não foi observada diferença na liberação de ocitocina entre o hemisfério esquerdo e direito nos grupos: [(controle:  $p=0,15$ ; estimulação anódica:  $p=0,46$ ; estimulação catódica:  $p=0,46$ ); teste de Wilcoxon]. Em nosso estudo, foi demonstrada liberação de ocitocina pela dura-máter cerebral. Entretanto, não houve liberação significativa de ocitocina, pela dura-máter cerebral de ratos *Wistar*, após estimulação por corrente contínua *in vitro*.

**Palavras-chave:** Estimulação elétrica. Ocitocina. Analgesia. Sistema nervoso central. Ratos.

## Abstract

The effects of in vitro stimulation by direct current on the secretion of peptides involved in the pathophysiology and pain modulation of migraine have been investigated. The release of vasoactive substances by the cerebral dura mater explains in part, the process of neurogenic inflammation responsible for maintaining the pain phase during a migraine attack. In contrast, a release of oxytocin by the trigeminal ganglion neurons appears to have a protective effect on the painful symptomatology of this disease. However, to the best of our knowledge, there is no evidence of oxytocin release by the dura mater. Thus, it is speculated the presence of oxytocin in the cerebral dura mater, as well as, possible influences of the in vitro stimulation of this meninge, by direct current, on the release of this hormone. Therefore, the objective of this study is to evaluate the release of oxytocin by the cerebral dura mater and the effect of in vitro direct stimulation on the release of oxytocin by cerebral dura mater of Wistar rats. This is an in vitro experimental study (Process nº CEUA 0006/2015), involving 25 male Wistar rats, aged between 82 to 103 days ( $93 \pm 5$  dias) and weight ranging from 256 to 381grams ( $318 \pm 30$  grams). Initially, the animals were euthanized by decapitation and had epithelial, muscle and jaw tissue removed. Then a sagittal cut was made in the skull, the encephali was carefully extracted, the cerebral dura mater remained intact and attached to each hemispheres. The total of 50 hemispheres from these animals was distributed in four experimental groups: control (n=16), sham (n=17), anodic stimulation (n=9) and cathodic (n=8). In the stimulated groups standardized the stimulation by direct current in the dura mater of the right hemispheres and in the sham group, for the placement of the electrodes was used the opposite hemispheres of the same animal, however, there was no passage of electric current. In the control group, no intervention was performed. The electrical parameters of the current used were: intensity-0.5mA; density- $333 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; duration-10 minutes. Each experiment was composed of five steps: Pre-incubation; Incubation 1; Stimulation by direct current; Incubation 2; Chemical stimulation with KCl (56mM). Release of oxytocin by the dura mater was observed, with significant result after stimulation with KCl ( $p < 0.05$ ; Wilcoxon test). The release of oxytocin by the hemispherical dura mater did not differ between the control, sham, anodic and cathodic stimulation ( $p = 0.36$ , Kruskal-Wallis test) groups. There was no difference in oxytocin release between the left and right hemispheres in the groups: [(control:  $p = 0.15$ ; anodic stimulation:  $p = 0.46$ ; cathodic stimulation;  $p = 0.46$ ); Wilcoxon's test]. In our study, release of oxytocin by the cerebral dura mater was demonstrated. However, there was no significant release of oxytocin from the cerebral dura mater of Wistar rats after in vitro direct current stimulation.

**Key Words:** Electric stimulation. Oxytocin. Analgesia. Central nervous system. Rats.

## Lista de figuras

### Dissertação

|                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1</b> – Estrutura molecular da ocitocina.....                                                                        | <b>24</b> |
| <b>Figura 2A</b> – Imagem ilustrativa da vista dorsal do crânio de rato <i>Wistar</i> .....                                    | <b>36</b> |
| <b>Figura 2B</b> – Imagem real da vista dorsal do crânio do rato <i>Wistar</i> .....                                           | <b>36</b> |
| <b>Figura 2C</b> – Incisão ao longo da sutura sagital do crânio: HE (hemisfério esquerdo); HD (hemisfério direito).....        | <b>36</b> |
| <b>Figura 3</b> – Fluxograma da formação dos grupos experimentais.....                                                         | <b>37</b> |
| <b>Figura 4A</b> – Equipamento Bio-System/ EMC-01 Microcontrolado.....                                                         | <b>38</b> |
| <b>Figura 4B</b> – Corte sagital do crânio do rato: ONA (osso nasal); DME (dura-máter esquerda); DMD (dura-máter direita)..... | <b>38</b> |
| <b>Figura 4C</b> – Polaridade do eletrodo no grupo de estimulação por corrente contínua anódica.....                           | <b>38</b> |
| <b>Figura 4D</b> – Polaridade do eletrodo no grupo de estimulação por corrente contínua catódica.....                          | <b>38</b> |
| <b>Figura 4E</b> – Grupo controle.....                                                                                         | <b>38</b> |
| <b>Figura 5</b> – Fluxograma das etapas da experimentação <i>in vitro</i> .....                                                | <b>39</b> |

### Artigo original

|                                                                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figure 1</b> – Release of oxytocin by hemispheral dura mater by the control group (n=16) over time.....                                | <b>63</b> |
| <b>Figure 2</b> – Basal release oxytocin and in response to stimulation with KCl (56mM) for 30 minutes by the hemispheral dura mater..... | <b>64</b> |
| <b>Figure 3</b> – Release of oxytocin by cerebral dura mater in the groups studied.....                                                   | <b>66</b> |

### Revisão sistemática

|                                                                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1</b> – Fluxograma da seleção dos artigos de acordo com Preferred Reported Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA)..... | <b>79</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

## Lista de quadros e tabelas

### Artigo original

|                                                                                                                                                                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Table 1</b> – Oxytocin of release by the dura mater of the rat hemisected skull in the control group, in the sham group and in the groups stimulated by the anodic or cathodic direct current for 10 minutes in pg/7mL..... | <b>65</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

### Revisão sistemática

|                                                                                                                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1</b> – Avaliação da qualidade do biotério pelos itens destacados por Hooijmans <i>et al.</i> , 2010.....                                                                                      | <b>80</b> |
| <b>Quadro 1</b> – Avaliação do risco de viés dos estudos incluídos, de acordo com os critérios de Hooijmans <i>et al.</i> , 2014.....                                                                    | <b>81</b> |
| <b>Quadro 2</b> – Características dos estudos selecionados, dispostos por ordem cronológica de publicação.....                                                                                           | <b>82</b> |
| <b>Quadro 3</b> – Protocolos da ETCC via epicraniana utilizados nos artigos selecionados, dispostos por ordem cronológica de publicação.....                                                             | <b>83</b> |
| <b>Quadro 4</b> – Resultados encontrados nos protocolos da ETCC via epicraniana utilizados nos artigos selecionados sobre o fluxo sanguíneo cerebral, dispostos por ordem cronológica de publicação..... | <b>85</b> |

### Artigo de revisão

|                                                                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Quadro 1</b> – Estudos que avaliaram a imunorreatividade da ocitocina e sua relação com a dor em modelos animais, por ordem de publicação..... | <b>97</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

### **Lista de abreviaturas e siglas**

Ach – Acetilcolina

AMPA – 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)propanoic acid

ANP – Peptídeo natriurético atrial

Asn – Asparagina

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

Cys – Cisteína

DMD – Dura-máter direita

DME – Dura-máter esquerda

EEG – Eletroencefalograma

ETCC – Estimulação transcraniana por corrente contínua

GABA – Ácido  $\gamma$ -amino-butírico

Gln – Glutamina

Gly – Glicina

HD – Hemisfério direito

HE – Hemisfério esquerdo

I – Iodo

Ile – Isoleucina

KRBG – Krebs Ringer Bicarbonato Glicose

Leu – Leucina

LTP – Long-term potentiation

MAP – Proteína quinase ativada por mitógenos

ON – Óxido nítrico

ONA – Osso nasal

Pro – Prolina

RNAm – RNA mensageiro

SNC – Sistema nervoso central

SP – Substância P

NMDA – N-metil D-aspartato

NA – Noradrenalina

NKA – Neurocinina A

NPY – Neuropeptídeo Y

Tyr – Tirosina

VIP – Peptídeo intestinal vasoativo

## Lista de símbolos

$A/m^2$  – Ampère por metro quadrado

$CaCl_2$  – Cloreto de cálcio

$Ca^{2+}$  – Cálcio

g – Grama

$K^+$  – Potássio

KCl – Cloreto de Potássio

$KH_2PO_4$  – Fosfato de Potássio

mA – Miliampères

$mA/cm^2$  – Miliampères por centímetro quadrado

$MgSO_4$  – Sulfato de magnésio

mL – Milímetros

$Na^+$  – Sódio

$NaHCO_3$  – Bicarbonato de sódio

$NH_2$  – Amina

pg – Picograma

uL- Microlitros

$\mu A$  – Microampères

## Sumário

|          |                                                                                              |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Apresentação.....</b>                                                                     | <b>14</b> |
| <b>2</b> | <b>Introdução.....</b>                                                                       | <b>15</b> |
| <b>3</b> | <b>Referencial teórico .....</b>                                                             | <b>17</b> |
| 3.1      | Uso da corrente elétrica como recurso terapêutico - breve histórico.....                     | 17        |
| 3.2      | Corrente elétrica e neuromodulação .....                                                     | 19        |
| 3.2.1    | <i>Estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) .....</i>                          | <i>19</i> |
| 3.2.2    | <i>Aplicação da estimulação transcraniana por corrente contínua na prática clínica .....</i> | <i>21</i> |
| 3.2.3    | <i>Modelos experimentais de estimulação por corrente contínua de baixa intensidade .....</i> | <i>22</i> |
| 3.3      | Ocitocina .....                                                                              | 24        |
| 3.3.1    | <i>Estrutura química e síntese.....</i>                                                      | <i>24</i> |
| 3.3.2    | <i>Receptores de ocitocina .....</i>                                                         | <i>25</i> |
| 3.3.3    | <i>Ações periféricas da ocitocina .....</i>                                                  | <i>26</i> |
| 3.3.4    | <i>Imunorreatividade e ações da ocitocina no sistema nervoso central .....</i>               | <i>27</i> |
| 3.3.5    | <i>Mecanismo de ação da ocitocina na modulação da dor .....</i>                              | <i>28</i> |
| 3.3.6    | <i>Ocitocina e sua relação com a migrânea .....</i>                                          | <i>29</i> |
| 3.4      | Migrânea .....                                                                               | 30        |
| 3.4.1    | <i>Definição .....</i>                                                                       | <i>30</i> |
| 3.4.2    | <i>Fisiopatogenia da Migrânea .....</i>                                                      | <i>31</i> |
| 3.4.3    | <i>Dura-máter e sua relação com a fisiopatogenia da migrânea .....</i>                       | <i>32</i> |
| <b>4</b> | <b>Hipóteses .....</b>                                                                       | <b>34</b> |
| <b>5</b> | <b>Objetivos .....</b>                                                                       | <b>34</b> |
| 5.1      | Objetivo geral .....                                                                         | 34        |
| 5.2      | Objetivos específicos.....                                                                   | 34        |
| <b>6</b> | <b>Métodos.....</b>                                                                          | <b>34</b> |
| 6.1      | Desenho do estudo .....                                                                      | 34        |
| 6.2      | Local do estudo .....                                                                        | 34        |
| 6.3      | Período da coleta de dados.....                                                              | 35        |
| 6.4      | Amostra .....                                                                                | 35        |
| 6.5      | Definição e operacionalização das variáveis.....                                             | 35        |
| 6.5.1    | <i>Variável dependente .....</i>                                                             | <i>35</i> |
| 6.5.2    | <i>Variáveis independentes .....</i>                                                         | <i>35</i> |

|          |                                                                                                                                                                                                         |            |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.6      | Protocolo experimental.....                                                                                                                                                                             | 35         |
| 6.6.1    | <i>Formação dos grupos experimentais</i> .....                                                                                                                                                          | 36         |
| 6.6.2    | <i>Avaliação da liberação de ocitocina</i> .....                                                                                                                                                        | 37         |
| 6.6.3    | <i>Estimulação por corrente contínua</i> .....                                                                                                                                                          | 37         |
| 6.7      | Experimentação <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                                    | 39         |
| 6.8      | Análise da concentração de ocitocina .....                                                                                                                                                              | 40         |
| 6.9      | Análise estatística .....                                                                                                                                                                               | 40         |
| 6.10     | Aspectos éticos .....                                                                                                                                                                                   | 40         |
| 6.11     | Conflitos de interesse .....                                                                                                                                                                            | 40         |
| <b>7</b> | <b>Resultados</b> .....                                                                                                                                                                                 | <b>41</b>  |
| <b>8</b> | <b>Considerações finais e perspectivas</b> .....                                                                                                                                                        | <b>41</b>  |
|          | <b>Referências</b> .....                                                                                                                                                                                | <b>43</b>  |
|          | <b>Apêndice A- Evidence of oxytocin release and effect of direct current stimulation on cerebral dura mater of Wistar rats- An in vitro study. ....</b>                                                 | <b>53</b>  |
|          | <b>Apêndice B- Parâmetros elétricos da estimulação transcraniana por corrente contínua efetivos para alterações do fluxo sanguíneo cerebral de animais experimentais: uma revisão sistemática .....</b> | <b>67</b>  |
|          | <b>Apêndice C- Evidências sobre a imunorreatividade da ocitocina e sua relação com a dor em modelos de experimentação animal: Uma revisão.</b>                                                          | <b>87</b>  |
|          | <b>Anexo A- Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais ....</b>                                                                                                                                   | <b>102</b> |

## 1 Apresentação

Esta dissertação está vinculada ao grupo de pesquisa Neurofisioterapia clínica e experimental, com linha de pesquisa cefaleia do Laboratório de Aprendizagem e Controle Motor (LACOM), sob a responsabilidade de Prof<sup>a</sup> Dra. Daniella Araújo de Oliveira. As investigações do grupo envolvem projetos com humanos e com modelos animais e têm como objetivo compreender como os mecanismos centrais e periféricos envolvidos na origem da cefaleia para melhor atuação da fisioterapia na prevenção, no desenvolvimento de protocolos de tratamento e na promoção da qualidade de vida dessa população.

Esse estudo enquadra-se na linha de pesquisa “Instrumentação e Intervenção Fisioterapêutica” do Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu*, nível mestrado em Fisioterapia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Teve como proposta avaliar a liberação de ocitocina e o efeito da estimulação por corrente contínua, *in vitro*, sobre a liberação desse hormônio pela dura-máter cerebral de ratos *Wistar*.

Como fruto desta proposta foi elaborado o artigo original intitulado “Evidence of oxytocin release and effect of direct current stimulation on cerebral dura mater of Wistar rats- An in vitro study”, que será submetido ao periódico *Brain Structure and Function*, uma revisão sistemática intitulada “Parâmetros elétricos da estimulação transcraniana por corrente contínua efetivos para alterações do fluxo sanguíneo cerebral de animais experimentais: uma revisão sistemática”, que será submetida ao periódico *European Journal of Neuroscience* e um artigo de revisão de literatura intitulado “Evidência da imunorreatividade à ocitocina e sua relação com a dor em modelos de experimentação animal: Uma revisão”, submetido ao periódico *Headache Medicine*.

Atendendo às normas vigentes do Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco para elaboração da dissertação, os resultados obtidos são apresentados em forma de artigo original.

## 2 Introdução

A aplicação da corrente elétrica para fins terapêuticos é uma prática antiga (MCWHIRTER; CARSON; STONE, 2015). Entretanto, a partir do século XVII, com o desenvolvimento tecnológico, tornou-se comum a utilização da corrente elétrica na prática clínica e, seus efeitos nos tecidos e órgãos de seres vivos passaram a ser mais investigados.

Nesse contexto, surge a estimulação transcraniana por corrente contínua como ferramenta segura, de uso simples, de baixo custo e que tem demonstrado resultados positivos na modulação da atividade cerebral (NITSCHKE *et al.*, 2008; WILLIAMS; IMAMURA; FREGNI, 2009).

No campo experimental, a década de 60 trouxe a descoberta de que correntes contínuas de baixa intensidade eram capazes de promover alterações da excitabilidade neural em ratos, com efeitos que se estendiam por horas após o término da estimulação (BINDMAN; LIPPOLD; REDFEARN, 1964). Ademais, foi constatado um aumento da atividade neuronal de células do trato piramidal de gatos estimulados por corrente contínua anódica e um efeito inverso nos animais estimulados com corrente contínua catódica (PURPURA; MCMURTRY, 1965), tornando evidente, os efeitos polares desta corrente.

Os mecanismos pelos quais a estimulação com corrente contínua de baixa intensidade produz efeitos biológicos ainda não estão totalmente elucidados. Entretanto, estudos sugerem que mudanças no fluxo sanguíneo cerebral, dependentes da polaridade da corrente, estejam estritamente relacionadas a essas alterações de excitabilidade (WACHTER *et al.*, 2011; MIELKE *et al.*, 2013).

Alterações de excitabilidade cortical frequentemente têm sido observadas no córtex de pacientes com migrânea. (SINIATCHKIN *et al.*, 2012; VIGANÒ *et al.*, 2013). Nesse sentido, a utilização da corrente contínua de baixa intensidade tem sido preconizada na prática clínica e os resultados obtidos sugerem sua utilização como tratamento profilático eficaz, apresentando redução significativa da duração, frequência e intensidade da dor em migranosos (ANTAL *et al.*, 2011; VIGANÒ *et al.*, 2013). Contudo, apesar desses resultados promissores a utilização da estimulação anódica (VIGANÒ *et al.*, 2013) e da estimulação catódica (ANTAL *et al.*, 2011) nos estudos evidenciam a falta de padronização da polaridade e dos parâmetros elétricos ideais da corrente para esses pacientes.

Estudos definem a migrânea como uma desordem neurovascular e apontam para o envolvimento da dura-máter na sua fisiopatogenia (BOLAY *et al.*, 2002; MARTINS, 2009). Sabe-se que a dura-máter cerebral é ricamente innervada por fibras do nervo trigêmeo e nervos sensoriais cervicais superiores, além de apresentar substância P (SP), neurocinina A (NKA), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), pertencentes ao sistema aferente sensorial (LV; WU; LI, 2014).

Nesse contexto, propõe-se que durante uma crise de migrânea, a ativação de neurônios primários sensoriais no núcleo caudal do trigêmeo promova liberação de peptídeos vasoativos, tais como, SP, CGRP e o óxido nítrico (NO) nas terminações nervosas periféricas, localizadas dentro das meninges, causando dilatação local dos vasos, degranulação dos mastócitos perivasculares e consequente liberação de histamina dessas células, extravasamento de proteínas do plasma, contribuindo para a inflamação neurogênica na dura-máter, sendo este último, o mecanismo responsável pela manutenção da fase dolorosa (BRAIN; GRANT, 2004; ZHANG *et al.*, 2007).

Recentemente, tem-se demonstrado que neurônios do gânglio trigeminal também expressam receptores de ocitocina e que sua ativação pela ocitocina é capaz de bloquear a liberação de CGRP. Nesse sentido, especula-se uma possível atuação protetora da ocitocina em pacientes com migrânea (TZABAZIS, A. *et al.*, 2016).

O papel da ocitocina na modulação endógena da dor é bem estabelecido na literatura. Evidências de estudos experimentais demonstram a presença de ocitocina em estruturas do sistema nervoso central, relacionadas ao controle nociceptivo (MILLAN *et al.*, 1984; MARTÍNEZ-LORENZANA *et al.*, 2008; CONDÉS-LARA *et al.*, 2009).

Mecanismo direto de ação deste hormônio na medula espinal sobre os neurônios de segunda ordem ou mecanismo indireto através dos receptores GABA tem sido propostos (BRETON; POISBEAU; DARBON, 2009; CONDÉS-LARA *et al.*, 2009). Ademais, sugere-se a capacidade da ocitocina em atingir terminais sensoriais centrais e promover, consequentemente, redução na liberação de neurotransmissores (HOBÓ; HAYASHIDA; EISENACH, 2012).

Entretanto, até onde é de nosso conhecimento, nenhuma evidência da liberação de ocitocina pela dura-máter foi apresentada. Além disso, até o momento,

os estudos se propuseram a investigar os efeitos da corrente contínua de baixa intensidade sobre o córtex cerebral.

Desse modo, nosso estudo tem como objetivo avaliar a liberação de ocitocina pela dura-máter cerebral e o efeito da estimulação por corrente contínua, *in vitro*, sobre a liberação de ocitocina pela dura-máter cerebral de ratos *Wistar*.

### 3 Referencial teórico

#### 3.1 Uso da corrente elétrica como recurso terapêutico - breve histórico

Os primeiros relatos da utilização da corrente elétrica para o tratamento de cefaleia, nevralgia, entre outras doenças foram retratados na Grécia e Roma, por meio da aplicação das descargas produzidas pelo peixe elétrico. Por volta de 43-48 d.C., Scribonius Largus, médico romano, relatou a utilização das descargas produzidas pelo peixe-elétrico torpedo ou *Tremelga*, originário do mar Mediterrâneo, para tratamento da dor (UTZ *et al.*, 2010).

O século XVIII foi marcado pela intensificação das pesquisas nesse campo e por relevantes descobertas. O médico italiano Luigi Galvani, considerado um dos pesquisadores pioneiros no campo da eletrofisiologia, teve seu achado mais notório no início de 1780, com a descoberta da “eletricidade animal”. Ao dissecar a pata de uma rã deixando-a com os nervos que controlam os movimentos do membro exposto, Galvani observou que ao tocar um nervo com um bisturi os músculos do sapo se contraíam, gerando movimento. Após vários experimentos ele percebeu que outros metais, como por exemplo, cobre e zinco, também eram capazes de gerar estas contrações. Diante dos resultados obtidos, Luigi Galvani concluiu que o tecido dos animais possuía alguma forma de eletricidade intrínseca que era ativada pela junção do nervo ao músculo por meio de um material condutor (GOLDENSOHN; PORTER; SCHWARTZKROIN, 1977; PARENT, 2004).

Em 1800, Alessandro Volta (1745-1827) inventou a pilha elétrica e pela primeira vez foi gerada a corrente contínua que ficou conhecida como corrente galvânica em homenagem a Luigi Galvani. O físico Giovanni Aldini utilizou a corrente contínua em diversos experimentos com animais (aves, cordeiros, bezerros), mas ganhou reconhecimento no meio científico em 1802, ao realizar a primeira estimulação elétrica cerebral em humanos. Em um dos seus principais experimentos

Aldini aplicou estímulo elétrico nas meninges e na superfície cortical de dois prisioneiros recém-decapitados, e observou que a estimulação cortical do hemisfério cerebral esquerdo provocou contrações dos músculos faciais da hemiface direita. Esses achados levaram o físico a concluir que a superfície cortical era eletricamente excitável (PARENT, 2004).

Dois anos depois (1804), Aldini destacou-se novamente por relatar sucesso no tratamento hospitalar de pacientes que sofriam de melancolia com a aplicação transcraniana da corrente galvânica, tornando-se assim, pioneiro na utilização da terapia eletroconvulsiva (GOLDENSOHN; PORTER; SCHWARTZKROIN, 1977).

A partir da década de 30, a estimulação direta cerebral recebeu grande atenção, inicialmente com a eletroconvulsoterapia na Itália, por Cerletti e Bini (ENDLERS, 1988) e posteriormente com a estimulação cerebral invasiva e estimulação cerebral por corrente contínua (DELGADO, 1964).

No campo experimental a década de 60 trouxe a descoberta de que correntes contínuas de baixa intensidade eram capazes de promover alterações da excitabilidade neural em ratos, com efeitos que se estendiam por horas após o término da estimulação (BINDMAN; LIPPOLD; REDFEARN, 1964). Em 1964, foram constatadas que as alterações da atividade neuronal em células do trato piramidal de gatos eram dependentes da polaridade da corrente contínua aplicada, desse modo, foram observados um aumento e uma diminuição da atividade neuronal espontânea após a aplicação de corrente contínua anódica e catódica, respectivamente (PURPURA; MCMURTRY, 1965).

No entanto, também foi a partir desta mesma década que as pesquisas na área da farmacologia ganharam maior visibilidade e conseqüentemente, fizeram com que a utilização dessas terapias em humanos caísse no esquecimento até o final do século XX, quando as técnicas de estimulação cerebral tornaram-se novamente alvo de investigações (PRIORI, 2003).

Na atualidade, os avanços tecnológicos trouxeram uma sofisticação da estimulação elétrica cerebral tornando-a uma ferramenta de grande precisão e versatilidade, tanto na área experimental quanto na clínica. Técnicas de estimulação profunda realizadas por meio de pequenos equipamentos implantáveis no corpo, conhecidos como marcapassos cerebrais, que estimulam regularmente regiões cerebrais inibidoras da dor, inibidoras de rigidez muscular tem beneficiado pacientes

que sofrem de dor crônica refratária, mal de Parkinson, por exemplo (OVADIA; BOTTINI, 2015).

Além disso, a utilização de novas técnicas de estimulação cerebral não-invasivas, especialmente a estimulação magnética e a estimulação por corrente contínua também vem ganhando destaque na comunidade científica por representarem possíveis avanços na modulação de circuitos cerebrais (WILLIAMS; IMAMURA; FREGNI, 2009).

### 3.2 Corrente elétrica e neuromodulação

Dentre a variedade de métodos de estimulação cerebral que vem sendo desenvolvida com os avanços tecnológicos, a utilização da corrente contínua de baixa intensidade tem recebido destaque, sendo aplicada tanto na prática clínica, quanto nos modelos experimentais (GIORDANO *et al.*, 2017).

#### 3.2.1 Estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC)

É considerada uma técnica de estimulação cerebral não invasiva, pois aplica micro corrente sobre a calota craniana através de eletrodos superficiais (GIORDANO *et al.*, 2017). Apresenta-se como um método bem tolerado, pois não gera percepções auditivas, nem somatossensoriais para além do minuto inicial da aplicação (NITSCHKE; PAULUS, 2000).

Para a formação dessa corrente de baixa intensidade é fundamental que o eletroestimulador apresente quatro componentes: 1- um amperímetro, para mensurar a intensidade da corrente elétrica; 2- um potenciômetro, que permite ajustar a amplitude da corrente; 3- baterias, para produzirem a corrente elétrica contínua com intensidade máxima de corrente de 2 miliampères (mA); 4- dois eletrodos, um com polaridade anódica e outro com polaridade catódica para aplicação na superfície do escalpo (FIQUER *et al.*, 2007).

Os efeitos produzidos pela ETCC são variáveis e dependentes da polaridade da corrente, área estimulada, duração, intensidade e densidade da corrente, bem como de sua amplitude (NITSCHKE; PAULUS, 2000; NITSCHKE *et al.*, 2008; LIEBETANZ *et al.*, 2009). Todos esses fatores dificultam a melhor compreensão dos

mecanismos de ação, assim como, a padronização de protocolos terapêuticos (ROCHE; GEIGER; BUSSEL, 2015).

Ainda não há um consenso sobre a forma de ação dessa corrente na modulação da excitabilidade cortical. Entretanto, alterações na membrana neuronal, plasticidade de redes cerebrais e glutamatérgica são aceitos como possíveis meios de ação (GIORDANO *et al.*, 2017).

Sabe-se que a ETCC modula a excitabilidade no córtex motor primário, induzindo um aumento na excitabilidade cortical após a aplicação da estimulação anódica, sendo esta atribuída a hipopolarização da membrana neuronal e a uma diminuição da excitabilidade cortical após a estimulação catódica decorrente da hiperpolarização da membrana neuronal, tanto em animais (KIM *et al.*, 2010) quanto em seres humanos (NITSCHKE; PAULUS, 2000). Entretanto, constata-se que a modulação dos neurônios em todo o córtex não ocorre de forma homogênea (ROCHE; GEIGER; BUSSEL, 2015).

Foi demonstrado que o bloqueio de canais de sódio dependentes de tensão anulou os efeitos do aumento da excitabilidade promovida pela estimulação anódica. Esse achado reforça a participação das alterações no potencial das membranas neuronais na excitabilidade cortical (NITSCHKE *et al.*, 2003).

A ETCC também é capaz de promover efeitos de longa duração pós-estimulação e que frequentemente estão associados ao aumento ou enfraquecimento da atividade do receptor N-metil D-aspartato (NMDA), de acordo com a polaridade da estimulação (GIORDANO *et al.*, 2017). O receptor NMDA é um dos tipos de receptores que compõem o sistema glutamatérgico.

O sistema glutamatérgico envolve uma série de receptores que são ativados pelo aminoácido glutamato, considerado o maior neurotransmissor excitatório do SNC. Os receptores NMDA controlam a condutância de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e em especial do  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana neuronal (BRESSAN; PILOWSKYB, 2003). Esses receptores são essenciais para a plasticidade neuronal, incluindo os mecanismos de “long-term potentiation” (LTP), que promove aumento da neurotransmissão sináptica, sinaptogênese e excitotoxicidade (GIORDANO *et al.*, 2017).

A mudança no fluxo sanguíneo cerebral da região cortical e subcortical também é considerada como outro possível mecanismo de ação da ETCC para modificar a função cerebral (LANG *et al.*, 2005). Sugere-se que as mudanças

induzidas pela estimulação por corrente contínua no fluxo sanguíneo cerebral sejam produzidas pelo acoplamento neurovascular (BECKER JUNIOR *et al.*, 2009).

O acoplamento neurovascular refere-se à capacidade de regulação do fluxo sanguíneo cerebral local, a partir da atuação conjunta de vasos sanguíneos, glia e neurônios. Desse modo, acredita-se que a estimulação elétrica ou química, promove a liberação de neurotransmissores de áreas subcorticais, tais como, núcleo basal e tálamo que agem sobre os outros componentes da unidade neurovascular e assim provocam aumentos ou diminuições no fluxo sanguíneo cortical cerebral regional (BECKER JUNIOR *et al.*, 2009).

### *3.2.2 Aplicação da estimulação transcraniana por corrente contínua na prática clínica*

Na prática clínica, a ETCC vem sendo utilizada com resultados promissores no tratamento de doenças neuropsiquiátricas e distúrbios neurológicos incluindo depressão, ansiedade e dor crônica (FREGNI; FREEDMAN; PASCUAL-LEONE, 2007; NITSCHKE *et al.*, 2009).

Em indivíduos com migrânea, por exemplo, a eficácia clínica da ETCC o tratamento da cefaleia primária (migrânea sem aura; cefaleia do tipo tensional episódica; cefaleia do tipo tensional crônica) e secundária (cefaleia pós- traumática crônica- relacionada a um traumatismo craniano leve) foi avaliada em um estudo retrospectivo envolvendo um total de 134 indivíduos do sexo masculino e feminino, sendo destes 90 adultos e 44 adolescentes (PINCHUK *et al.*, 2013).

A intensidade da corrente aplicada variou de 60 a 90  $\mu\text{A}$  para os adolescentes e de 100 a 150  $\mu\text{A}$  para os adultos, durante 30-45 minutos e a densidade de corrente utilizada variou de 0.001-0.024mA/cm<sup>2</sup>. Foi considerado desfecho primário do estudo para a eficácia do tratamento uma diminuição do número de dias com sinais e sintomas da cefaleia por mês superior a 50%, em comparação com a linha de base antes do tratamento; desfechos secundários incluíram a intensidade, duração das crises, assim como, a quantidade de analgésicos utilizados, depressão e parâmetros da escala de ansiedade (PINCHUK *et al.*, 2013).

Os resultados do estudo demonstraram eficácia clínica da estimulação transcraniana por corrente contínua comparável a de drogas farmacológicas

modernas apresentando, entretanto, a vantagem da ausência de efeitos colaterais negativos (PINCHUK *et al.*, 2013).

### 3.2.3 Modelos experimentais de estimulação por corrente contínua de baixa intensidade

A aplicação da corrente contínua de baixa intensidade em estudos experimentais pode ser classificada de acordo com o método utilizado para colocação do eletrodo em: 1) estimulação transcraniana; 2) estimulação cortical direta *in vivo* e 3) modelos *in vitro* (JACKSON *et al.*, 2016).

#### 1- Estimulação transcraniana

Na estimulação transcraniana em estudos animais o eletrodo é posicionado de modo superficial ao crânio, por meio de adaptações que promovem a fixação dos eletrodos no crânio do animal a fim de impedir sua movimentação (LIEBETANZ *et al.*, 2009; MIELKE *et al.*, 2013; LEFFA *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2016).

Uma das vantagens desse tipo de estimulação refere-se à preservação dos cérebros dos animais aos efeitos eletroquímicos produzidos pela corrente contínua. Por se tratar de um método não invasivo de aplicação dos eletrodos, a avaliação dos efeitos produzidos pela corrente contínua é quantificada por meio de testes comportamentais, registros não invasivos (eletroencefalograma, EEG), ou análise histológica após eutanásia do animal (JACKSON *et al.*, 2016).

Nesse contexto, podemos citar um estudo realizado com objetivo de estabelecer limites de segurança para a aplicação da ETCC em ratos da linhagem *Wistar*. Nos resultados observou-se que a aplicação da ETCC com densidade de corrente menor do que  $142,9 \text{ A/m}^2$  e por um período inferior a 10 minutos não geraram lesões teciduais no cérebro dos animais. Em contrapartida, as análises histológicas do tecido cerebral demonstraram presença de lesões cerebrais nas sessões de ETCC com durações superiores a 10 minutos, apesar da densidade de corrente permanecer a mesma (LIEBETANZ *et al.*, 2009). Além disso, constatou-se que a aplicação da ETCC com densidades de corrente crescentes ( $142,9$  a  $285,7 \text{ A/m}^2$ ) promoveram um aumento linear das lesões nos tecidos cerebrais dos animais (LIEBETANZ *et al.*, 2009).

## 2- Estimulação cortical direta *in vivo*

É caracterizada pela aplicação direta do eletrodo na superfície cortical (BINDMAN; LIPPOLD; REDFEARN, 1964). Essa forma invasiva de aplicação da corrente contínua permite a inserção de eletrodos de registro com maior facilidade, assim como, a realização de uma avaliação geral dos efeitos da corrente sobre a função cerebral (JACKSON *et al.*, 2016).

Um aspecto negativo deste método de estimulação está relacionada a possíveis mudanças eletroquímicas produzidas pela aplicação direta dos eletrodos na região cortical. Essas mudanças podem ser consideradas um fator confundidor dos resultados, dificultando, desse modo, a interpretação dos resultados obtidos (JACKSON *et al.*, 2016). Acrescido a isso, observa-se um risco aumentado no desenvolvimento de lesões eletroquímicas nesse modelo de estimulação (LOW; REED, 2001).

## 3- Modelos *in vitro*

A realização da estimulação por corrente contínua em estudos experimentais *in vitro* também é descrita na literatura (DIMITRIADOU *et al.*, 1991; EBERSBERGER *et al.*, 1999). Esse modelo experimental apresenta algumas vantagens quando comparadas aos modelos citados anteriormente. Trata-se de um desenho de estudo que permite um maior controle dos parâmetros elétricos sendo, portanto, ideal para melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares (PELLETIER; CICCHETTI, 2015).

Ao se trabalhar com tecidos isolados, o modelo experimental *in vitro*, permite a investigação das suas propriedades eletrofisiológicas e torna possível o controle da direção do fluxo de corrente e monitoramento dos efeitos ao longo do experimento (MINIUSSI; PAULUS; ROSSINI, 2012; JACKSON *et al.*, 2016).

Desse modo, tem se tornado comum à utilização de secções de cérebro de roedores (BIKSON *et al.*, 2004), para avaliação minuciosa de regiões específicas do cérebro por meio de uma variedade de técnicas eletrofisiológicas, farmacológicas, moleculares e de imagem (JACKSON *et al.*, 2016).

Apesar das vantagens citadas, vale ressaltar que os resultados obtidos de tecidos isolados por estudos *in vitro* devem ser interpretados com cuidado, pois nem sempre irão refletir as respostas dos tecidos quando estes se encontram integrados

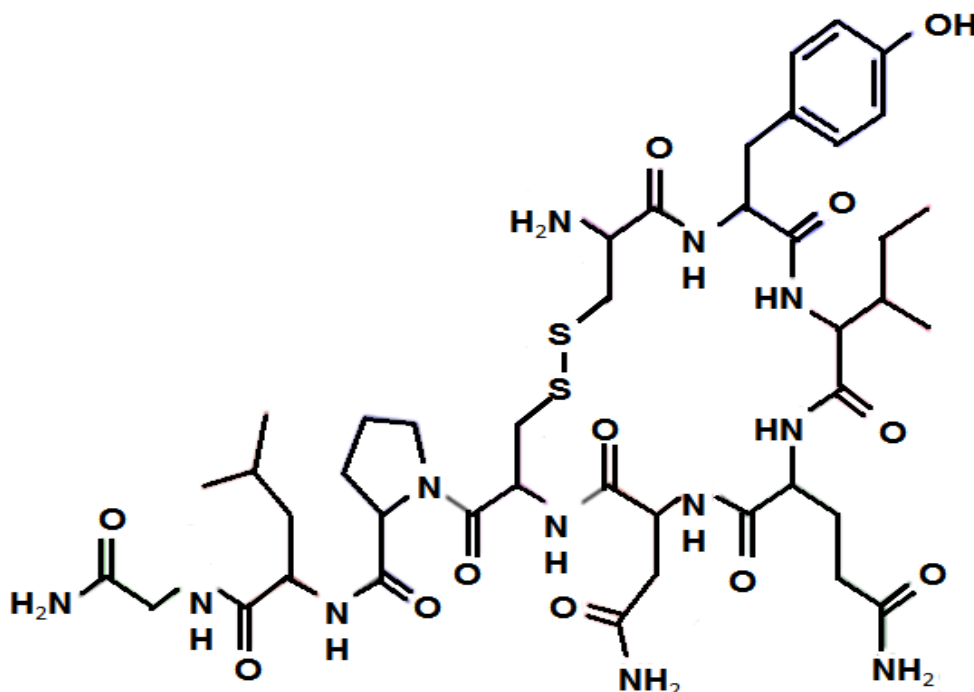
as demais estruturas do sistema nervoso. Desse modo, faz-se necessário, sempre que possível, a confirmação dos resultados em modelos *in vivo* (PELLETIER; CICCHETTI, 2015).

### 3.3 Ocitocina

#### 3.3.1 Estrutura química e síntese

A ocitocina é um hormônio formado por nove aminoácidos, cujo nome sistemático é cisteína-tirosina-isoleucina-glutamina-asparagina-cisteína-prolina-leucina-glicina-amina (Cys - Tyr - Ile - Gln - Asn - Cys - Pro - Leu - Gly - NH<sub>2</sub>). Apresenta fórmula C<sub>43</sub>H<sub>66</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub> e massa molecular 1007,19 g.mol<sup>-1</sup>.

Ademais, na sua molécula pode-se observar a ligação dissulfeto (-S-S-) entre os resíduos de cisteína, fundamental para exercer os seus efeitos biológicos, além das inúmeras ligações peptídicas (BARBERIS; MOUILLAC; DURROUX, 1998; GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001) (Figura 1).



**Figura 1:** Estrutura molecular da ocitocina. Fonte: Adaptado de (GABELLO *et al.*, 2010).

O hipotálamo tem um papel crucial na regulação da função hipofisária e apresenta núcleos neurosecretores nas suas porções anterior e medial. A porção anterior do hipotálamo é formada pelos núcleos supraóptico e paraventricular e apresentam neurônios magnocelulares (GOODIN; NESS; ROBBINS, 2015).

A síntese do hormônio ocitocina pelos neurônios magnocelulares dos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo, ocorre sob a forma de pró-hormônio (pró-ocitofisina) (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005) e posteriormente, é armazenado na hipófise posterior. Embora a maioria desse hormônio seja transportado e liberado pela hipófise posterior na corrente sanguínea, apresentando uma vida média na circulação sistêmica entre 5-10 minutos, quantidades significativas são transportadas ao longo de axônios ou dendritos e liberadas em diferentes partes do SNC (GOODIN; NESS; ROBBINS, 2015; ABBASNEZHAD; KHAZDAIR; KIANMEHR, 2016).

Desse modo, a ocitocina age como um neurotransmissor e como um hormônio parácrino para regulação de múltiplas funções do sistema nervoso central e fisiológicas do sistema nervoso periférico (MORRIS; DOMINO; DOMINO, 2010; GOODIN; NESS; ROBBINS, 2015).

### 3.3.2 Receptores de ocitocina

O receptor de ocitocina faz parte da superfamília das proteínas G e é pertencente ao tipo rodopsina classe I (SHOJO; KANEKO, 2000). O gene ligado a este receptor contém três íntrons e quatro éxons e localiza-se em uma cópia simples no cromossomo 3p25.

O receptor de ocitocina está distribuído amplamente no sistema nervoso central (córtex, gânglios basais, sistema límbico, tálamo, hipotálamo, tronco cerebral) (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001) e no sistema nervoso periférico (GAO; YU, 2004). A ativação deste receptor ocorre mediante a ligação da ocitocina à sua superfície e provocando ativação de várias vias de sinalização intracelulares e desencadeando os inúmeros efeitos do hormônio (VRACHNIS *et al.*, 2011).

Os receptores de ocitocina estão associados tanto a proteína G tipo Gq/11 quanto as proteínas Gi. A via Gq/ fosfolipase C/ 1,4,5 – trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) é a

principal via, que medeia o sinal deste receptor após a ligação da ocitocina (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

A ativação de Gq e Gi, estimulam a hidrólise de PI através da ativação da fosfolipase C gerando, conseqüentemente, 1,4,5- trifosfato de inositol ( $IP_3$ ), que mobiliza cálcio do retículo sarcoplasmático e 2,3- diacilglicerol (DAG), a partir da clivagem de 4,5- bifosfato de fosfatodilinositol ( $PIP_2$ ), que ativa a proteína quinase C, resultando na fosforilação de várias proteínas alvo responsáveis por parte de seus efeitos (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

Os receptores associados à proteína Gi apresentam caráter inibitório. Atuam promovendo a inibição da enzima adenilato ciclase (AC), e conseqüentemente, uma redução dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), abertura de canais de  $K^+$  e o fechamento de canais de  $Ca^{2+}$  (REVERSI *et al.*, 2005).

A ocitocina promove um aumento rápido na concentração de  $Ca^{2+}$  no citoplasma, estimula a proteína quinase ativada por mitógenos (MAP) e estimula a síntese de prostaglandinas. Ademais, o aumento na ligação de cálcio à calmodulina leva à ativação de uma quinase primeiramente responsável pela fosforilação de miosina de cadeia leve, a qual regula a contratilidade miometrial (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

### 3.3.3 Ações periféricas da ocitocina

As ações periféricas da ocitocina já estão bem descritas na literatura. Sabe-se que durante a gestação o útero apresenta um aumento gradativo na densidade de receptores de ocitocina no miométrio mediada pelo RNAm, promovendo conseqüentemente, aumento acentuado da sensibilidade à ocitocina. Os níveis elevados deste hormônio garantem a indução a contrações uterinas fortes e adequadas para o parto normal e para prevenção de hemorragias pós- parto (ALOTAIBI, 2017) e também tem função essencial na lactação, sendo responsável pela ejeção do leite (MORRIS; DOMINO; DOMINO, 2010; BRIFFAUD *et al.*, 2015).

Além disso, sabe-se que a ocitocina apresenta funções de regulação do sistema cardiovascular. Dentre as ações cardiovasculares da ocitocina estão: redução da pressão arterial, efeitos inotrópicos e cronotrópicos negativos, neuromodulação parassimpática, vasodilatação, atividade anti-inflamatória, atividade

antioxidante e efeitos metabólicos (GUTKOWSKA; JANKOWSKI; ANTUNES-RODRIGUES, 2014).

Estudos experimentais demonstraram que a infusão periférica do hormônio induziu a vasodilatação, diminuição das contrações do miocárdio (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001), a redução da pressão arterial média e aumento da liberação do peptídeo natriurético atrial (ANP), cuja ação natriurética promove a regulação do volume dos líquidos corporais (FAVARETTO *et al.*, 1997).

#### 3.3.4 *Imunorreatividade e ações da ocitocina no sistema nervoso central*

No sistema nervoso central foi demonstrada a presença de projeções de neurônios magnocelulares ocitocinérgicos, a partir do núcleo paraventricular do hipotálamo para o cérebro. A análise imunohistoquímica do cérebro e medula espinal de ratos e de humanos demonstrou um padrão de distribuição das fibras ocitocinérgicas similar, sugerindo que as vias sejam semelhantes e que as fibras sejam originárias dos neurônios magnocelulares do hipotálamo (SOFRONIEW, 1980).

Em ratos, observou-se um predomínio de fibras contendo ocitocina nos núcleos dos nervos cranianos, situados na substância cinzenta do bulbo (parte medial do núcleo do trato solitário, núcleo dorsal do vago), na substância negra do mesencéfalo, nas lâminas I, III e X e núcleo intermédio medial da medula espinal (SOFRONIEW, 1980).

A análise imunohistoquímica da medula espinal de ratos e macacos também demonstrou presença do ocitocina na substância branca, mais precisamente nas fibras do funículo lateral, e no centro da substância cinzenta, assim como, nas demais estruturas que a compõem- corno anterior e posterior em todos os níveis; e coluna intermédialateral nos níveis torácico, lombar e sacral. Em macacos também foram detectadas imunorreatividade a esse hormônio na pia-máter e aracnóide (SWANSON; MCKELLAR, 1979).

Em humanos, a análise do tronco cerebral e segmentos cervicais superiores da medula espinal demonstraram a presença de fibras contendo ocitocina, no núcleo do trato solitário, núcleo motor dorsal do vago, núcleo comissural e no núcleo

reticular lateral e nas lâminas I, III e X do segmento cervical da medula espinal (SOFRONIEW, 1980).

No sistema nervoso central, este neurohormônio desempenha funções importantes relacionadas ao comportamento sexual (CARTER, 1998), resposta ao estresse (GIBBS, 1984), ação ansiolítica em ratos (BALE *et al.*, 2001) e em humanos (HEINRICHS *et al.*, 2003). Além disso, acredita-se que esse hormônio atue como modulador endógeno da dor (TZABAZIS, A. *et al.*, 2016).

Sugere-se que o potencial da ocitocina em modular a experiência da dor seja decorrente de seu envolvimento nos processos psicológicos e fisiológicos, centrais e periféricos, sendo assim, considerado promessa como um agente terapêutico (TRACY *et al.*, 2015).

### 3.3.5 Mecanismo de ação da ocitocina na modulação da dor

Conforme constatado, diversas evidências apontam para o envolvimento da ocitocina em mecanismos analgésicos. A explicação mais aceita é que esses efeitos sejam decorrentes da ligação do núcleo paraventricular do hipotálamo e da medula espinal por meio de projeções de neurônios ocitocinérgicos. Entretanto, os mecanismos de ação não estão totalmente definidos (CONDÉS-LARA *et al.*, 2003).

A avaliação dos efeitos da ocitocina sobre a transmissão sináptica excitatória glutamatérgica em neurônios do corno dorsal da medula espinal cultivados de ratos neonatais demonstrou que uma parte das projeções desses neurônios facilitou a entrada sináptica excitatória para interneurônios inibitórios promovendo efeitos sobre a transmissão sináptica glutamatérgica, via mecanismo pré-sináptico mediado pelo receptor AMPA (JO *et al.*, 1998).

Ademais, é sugerido que as ações excitatórias da ocitocina sobre os neurônios espinais contendo ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA) produzem analgesia. Os estudos eletrofisiológicos e comportamentais de neurônios do corno dorsal sugerem que a ocitocina inibe a neurotransmissão sensorial entre aferências primárias e neurônios do corno dorsal, por meio do intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  modulando, consequentemente, a liberação de glutamato por meio da inibição pós-sináptica direta de neurônios e do aumento na liberação de GABA de interneurônios espinais (HOB0; HAYASHIDA; EISENACH, 2012).

Corroborando com as pesquisas anteriores, viu-se que a aplicação de ocitocina em célula da medula espinal promoveu um bloqueio dos efeitos do glutamato na célula (CONDÉS-LARA *et al.*, 2003). Esses resultados sugerem um interessante mecanismo de ação inibitório da ocitocina sobre o glutamato.

Sabe-se que o glutamato é considerado um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e que está envolvido na sinalização da transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinal promovendo amplificação e prolongamento das respostas dos neurônios locais (D'MELLO; DICKENSON, 2008). Além disso, sabe-se que o conjunto glutamato--N-metil-daspartato-- óxido nítrico (Glut -NMDA -NO) faz parte de via metabólica envolvida no processo da dor. Desse modo, também são sugeridas ações da ocitocina sobre os receptores NMDA (CONDÉS-LARA *et al.*, 2006).

Outro possível mecanismo de ação da ocitocina sugerido para o controle nociceptivo na medula espinal é através da atuação da ocitocina sobre as fibras A-delta e C (CONDÉS-LARA *et al.*, 2006). Foi observado que tanto a aplicação direta de ocitocina na medula espinal (CONDÉS-LARA; MAIE; DICKENSON, 2005) quanto à estimulação do núcleo paraventricular do hipotálamo (CONDÉS-LARA *et al.*, 2009) podem suprimir a entrada de informações periféricas das fibras aferentes A-delta e C, completando um circuito envolvido na analgesia endógena. Fica evidente que a supressão produzida pela estimulação do núcleo paraventricular do hipotálamo utiliza a ocitocina como um neuromodulador (CONDÉS-LARA *et al.*, 2006).

Apesar das evidências apresentadas, não pode ser descartada a possibilidade de envolvimento de outros mediadores relacionados ao processo de analgesia, assim como, a participação de outras estruturas do sistema nervoso central (CONDÉS-LARA; MAIE; DICKENSON, 2005; CONDÉS-LARA *et al.*, 2006).

### 3.3.6 Ocitocina e sua relação com a migrânea

Relato de dois casos de pacientes com migrânea aguda que apresentaram alívio dos sinais e sintomas pela administração de ocitocina intravenosa foi descrita (PHILLIPS *et al.*, 2006). O primeiro interessante caso relato de uma mulher com 37 anos de idade, grávida, com migrânea com aura, associada à presença de fotofobia, fonofobia, náusea e que, contrariamente ao esperado durante a gestação

apresentou um aumento da frequência das crises de migrânea. Imediatamente após a expulsão da placenta, foi administrada 20 unidades de ocitocina em 300 mL da solução Ringer Lactato por 10 minutos e observou-se até o final da perfusão, o alívio completo da dor de cabeça até a sua alta hospitalar, totalizando três dias (PHILLIPS *et al.*, 2006).

O segundo relato de uma criança do sexo masculino, com dez anos de idade, que apresentou dor de cabeça aguda com duração de oito horas e características típicas da migrânea, com presença de fotofobia, vômito e intensidade da dor variando de 8 a 10. Nele, foi realizada a administração intravenosa de 10 unidades de ocitocina em 500 mL de solução salina ao longo de 30 minutos e observou-se após vinte minutos do início da infusão a redução da intensidade da dor e desaparecimento dos sintomas incluindo, náusea (PHILLIPS *et al.*, 2006).

Ademais, sugere-se que a administração intranasal de ocitocina é eficaz no tratamento da dor de cabeça, podendo ser considerada uma droga potencial no alívio da dor (WANG *et al.*, 2013). O bloqueio da liberação de CGRP pela ativação de receptores de ocitocina nos neurônios trigeminais é uma possível explicação para tal efeito (TZABAZIS, A. *et al.*, 2016). No entanto, muitas perguntas ainda precisam ser esclarecidas em futuros estudos sobre a ocitocina e sua relação com a migrânea (KWONG; CHAN, 2016).

### 3.4 Migrânea

#### 3.4.1 Definição

De acordo com os critérios diagnósticos estabelecidos pela *International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version)*, a migrânea, popularmente, conhecida como enxaqueca, é considerada uma cefaleia primária, pois surge sem etiologia demonstrável por exames clínicos ou laboratoriais usuais e apresenta o sintoma como principal queixa que caracteriza a doença (THE INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF HEADACHE DISORDERS., 2013).

A migrânea é caracterizada tipicamente por dor pulsátil, unilateral, com intensidade variando de moderada a grave, duração de 4 a 72 horas, que se agrava com atividade física e pode estar associada à náusea e/ou fotofobia e fonofobia. As duas formas clínicas mais comuns de migrânea são a migrânea sem aura e a com

aura (THE INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF HEADACHE DISORDERS., 2013). A aura corresponde a sintomas visuais, os quais podem surgir imediatamente antes ou no início da crise da migrânea, caracterizada por flashes luminosos, comprometimento no campo visual ou imagens brilhantes (ICHD, 2013).

No ranking da Organização Mundial de Saúde, a migrânea é considerada a 3ª doença mais prevalente no mundo (VOS *et al.*, 2012) e levando-se em consideração apenas a incapacidade gerada durante a crise ela é considerada a sétima maior entre as causas específicas de incapacidade a nível mundial (STEINER; STOVNER; BIRBECK, 2013). Acomete mais mulheres do que homens, podendo iniciar na infância ou adolescência e acompanhar o paciente por toda a vida (AKYOL *et al.*, 2007).

#### 3.4.2 Fisiopatogenia da Migrânea

Apesar da alta prevalência, a etiopatogenia da migrânea permanece mal compreendida. A depressão alastrante cortical, a ativação do sistema trigeminovascular, inflamação neurogênica, vasodilatação induzida por peptídeos vasoativos, tais como, óxido nítrico e CGRP, além da predisposição genética são aceitos como mecanismos possivelmente envolvidos na fisiopatogenia (VINCENT, 1998).

Estudos têm definido a migrânea como uma desordem neurovascular, de modo que, a atuação conjunta dos componentes neural e vascular esteja relacionada à sua fisiopatogenia (BOLAY *et al.*, 2002; MARTINS, 2009). Sugere-se que a ativação do sistema trigeminovascular por meio da sensibilização do núcleo caudal do trigêmeo, por estímulos sensoriais nociceptivos possa desempenhar um importante papel no desencadeamento das dores de cabeça.

O sistema trigeminovascular é formado pelo nervo trigêmio, pelos neurônios que inervam vasculatura craniana e a dura-máter e pelos núcleos trigeminais espinais no tronco cerebral. Seus corpos celulares encontram-se localizados no gânglio trigeminal e apresentam fibras periféricas que fazem conexão sináptica com outras estruturas cranianas, relacionadas à transmissão da dor, principalmente (WALKER; HAY, 2013).

Esse sistema apresenta fibras simpáticas, parassimpáticas e sensitivas. As fibras simpáticas se originam no gânglio cervical superior e contêm, além da noradrenalina (NA), o neuropeptídeo Y (NPY). As fibras parassimpáticas, originadas no gânglio esfenopalatino, por sua vez, contêm principalmente a acetilcolina (ACh), e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), ambos com função vasodilatadora. As fibras sensitivas trigeminais amielínicas do tipo C, formada a partir do gânglio de Gasser, apresentam diversos neurotransmissores e neuromoduladores incluindo a SP, o CGRP, além de outras taquicininas, como NKA (CICIARELLI, 2005).

Além disso, acredita-se que a vasodilatação induzida por peptídeos vasoativos, tais como a SP e CGRP apresente relação direta com a inflamação neurogênica (CICIARELLI, 2005). A SP é um peptídeo que provoca vasodilatação mais modesta e relativamente mais curta, podendo atuar como neuromodulador do tono vascular, promovendo aumento da permeabilidade vascular. O CGRP por sua vez, é composto por 37 aminoácidos e expresso principalmente nas fibras nervosas A $\delta$  e C que têm ampla inervação por todo o corpo e que transmitem informações nociceptivas para o sistema nervoso central (MAGGI, 1995; BRAIN; GRANT, 2004; HARGREAVES, 2007). No SNC esse peptídeo encontra-se presente em neurônios do gânglio trigeminal (ZHANG *et al.*, 2007), assim como, em mastócitos da dura-máter e nos maiores vasos sanguíneos cerebrais, merecendo destaque por sua potente ação vasodilatadora (STRASSMAN *et al.*, 2004; PETERSEN *et al.*, 2005).

Outro mecanismo citado como possível mecanismo fisiopatológico da migrânea é a inflamação neurogênica. Refere-se a uma resposta inflamatória mediada neuralmente nas meninges pela liberação dos peptídeos vasoativos citados anteriormente (CGRP, SP, VPI), após a ativação do sistema trigeminovascular (BUTURE *et al.*, 2016). É caracterizado por vasodilatação, extravasamento de proteínas plasmáticas dos vasos sanguíneos e degranulação dos mastócitos e tem sido considerado o mecanismo responsável pela manutenção da fase dolorosa a patogênese da migrânea (BRAIN; GRANT, 2004; ZHANG *et al.*, 2007; LV; WU; LI, 2014).

### 3.4.3 Dura-máter e sua relação com a fisiopatogenia da migrânea

Anatomicamente o sistema nervoso central é envolvido por três membranas conjuntivas denominadas meninges: a dura-máter, a aracnóide e a pia-máter. No embrião a aracnóide e a pia-máter constituem um folheto único denominado leptomeninge e a dura-máter equivale a paquimeninge (MACHADO, 2000).

A dura-máter apresenta derivação do mesênquima, folheto embrionário que circunda o tubo neural. Trata-se da meninge mais superficial, espessa e resistente, constituída por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, contendo nervos e vasos. Cabe ressaltar que, a dura-máter que envolve o encéfalo apresenta características distintas da dura-máter espinal. A dura-máter cerebral é formada por dois folhetos, um externo e outro interno. O folheto externo liga-se intimamente aos ossos do crânio e comporta-se como perióstio, entretanto, diferentemente do perióstio de outras áreas, na dura-máter ele não apresenta capacidade osteogênica. A dura-máter espinal é formada apenas pelo folheto interno (MACHADO, 2000).

A dura-máter cerebral apresenta ampla vascularização, sendo a artéria meníngea média, ramo da artéria maxilar a principal artéria que a irriga. Diferentemente das outras meninges ela é ricamente innervada por fibras do nervo trigêmeo e nervos sensoriais cervicais superiores que contêm os peptídeos vasoativos tais como, SP e CGRP (MAYBERG; ZERVAS; MOSKOWITZ, 1984; SAITO; GREENBERG; MOSKOWITZ, 1987). Como o encéfalo não possui terminações nervosas sensitivas, toda ou quase toda a sensibilidade intracraniana se localiza na dura-máter (MACHADO, 2000).

Desse modo, acredita-se que a ativação dos nociceptores de fibras sensoriais meníngeas desempenhe papel importante no desenvolvimento das dores da migrânea (WAEBER; MOSKOWITZ, 2005; LV; WU; LI, 2014). Sabe-se que as fibras nervosas meníngeas pertencentes ao sistema aferente sensorial apresentam imureatividade para SP, NKA, CGRP (LV; WU; LI, 2014) e que quando ativadas promovem a liberação destes neuropeptídeos e induzem, consequentemente, a ativação e degranulação de mastócitos da dura-máter (OTTOSSON; EDVINSSON, 1997; ROZNIECKI *et al.*, 1999). Esse processo resulta na liberação local de moléculas inflamatórias, principalmente a histamina, desencadeando a inflamação neurogênica, mecanismo considerado responsável pela manutenção da fase dolorosa a patogênese da migrânea (BRAIN; GRANT, 2004; ZHANG *et al.*, 2007; LV; WU; LI, 2014).

## 4 Hipóteses

- Há liberação de ocitocina pela dura-máter cerebral de ratos *Wistar*;
- A estimulação por corrente contínua anódica *in vitro* promoverá um aumento na liberação de ocitocina e a estimulação por corrente contínua catódica *in vitro* terá efeitos contrários sobre a liberação de ocitocina da dura-máter de ratos *Wistar*.

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivo geral

Avaliar a liberação de ocitocina pela dura-máter cerebral e o efeito da estimulação por corrente contínua, *in vitro*, sobre a liberação de ocitocina pela dura-máter cerebral de ratos *Wistar*.

### 5.2 Objetivos específicos

- Analisar os níveis de ocitocina basal;
- Analisar os níveis de ocitocina após a estimulação por corrente contínua anódica;
- Analisar os níveis de ocitocina após a estimulação por corrente contínua catódica.

## 6 Métodos

### 6.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*.

### 6.2 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Biotério de experimentação do Núcleo de Cirurgia Experimental e no Laboratório de Neuroplasticidade de Comportamento da

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), localizado na Cidade Universitária, em Recife, Pernambuco.

### 6.3 Período da coleta de dados

Os dados para a pesquisa foram coletados no período de abril/2016 a outubro/2016.

### 6.4 Amostra

Foram utilizados 25 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, linhagem *Wistar* provenientes de ratas originárias da colônia do Biotério de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, com idade variando de 82 a 103 dias ( $93 \pm 5$  dias) e peso variando de 256 a 381 gramas ( $318 \pm 30$  gramas).

Os animais foram mantidos no Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco, agrupados em gaiolas plásticas coletivas (máximo de 3 animais/ gaiola), com temperatura controlada a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , expostos a um ciclo de claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à alimentação (ração para roedores- Labina) e água mineral até atingirem a idade adequada para a realização dos experimentos.

### 6.5 Definição e operacionalização das variáveis

#### 6.5.1 Variável dependente

-Variação dos níveis do ocitocina

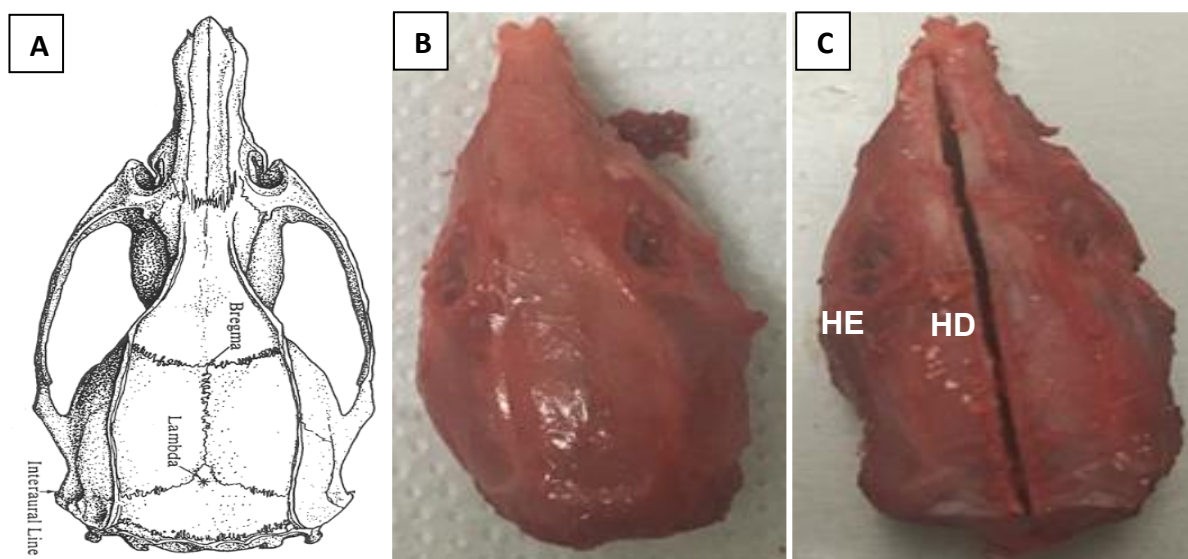
#### 6.5.2 Variáveis independentes

- De interesse
  - Estimulação por corrente contínua *in vitro*
- De controle
  - Sexo, idade e peso dos animais

### 6.6 Protocolo experimental

Inicialmente, os ratos foram eutanasiados por decapitação e tiveram o tecido epitelial, muscular e a mandíbula removidos. Em seguida, foi realizada uma incisão

sagital no crânio, o todo o encéfalo foi removido cuidadosamente, a dura-máter permaneceu intacta e ligada a cada hemicrânio (GUPTA *et al.*, 2010), conforme demonstrado na Figura 2.

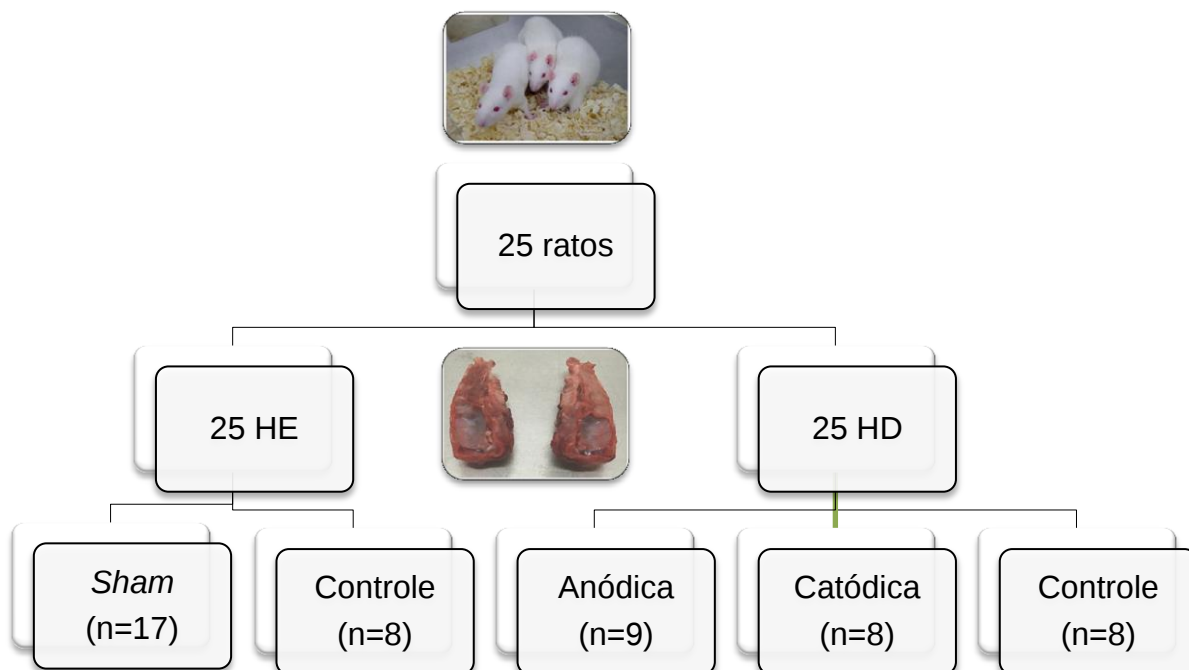


**Figura 2:** (A) Imagem ilustrativa da vista dorsal do crânio de rato *Wistar*- Adaptado de (TATLISUMAK; FISHER, 2006); (B) Imagem real da vista dorsal do crânio do rato *Wistar*; (C) Incisão ao longo da sutura sagital do crânio: HE (hemisfério esquerdo); HD (hemisfério direito).

Fonte: acervo da pesquisa

#### 6.6.1 Formação dos grupos experimentais

Os 25 ratos, com seus respectivos hemicrânios (N=50), foram distribuídos em quatro grupos experimentais: controle (n=16), *sham* (n=17), estimulação por corrente contínua anódica (n=9) e estimulação por corrente contínua catódica (n=8). Na Figura 3 observamos o fluxograma da formação dos grupos experimentais.



**Figura 3:** Fluxograma da formação dos grupos experimentais.

Conforme observado na figura acima, para os grupos de estimulação por corrente contínua anódica e estimulação por corrente contínua catódica padronizou-se a dura-máter do hemisfério direito como sempre estimulada e a dura-máter do hemisfério esquerdo do mesmo animal como *sham*.

#### 6.6.2 Avaliação da liberação de ocitocina

A Etapa 2 da experimentação *in vitro*, foi realizada para avaliação da liberação de ocitocina pela dura-máter cerebral, conforme, demonstrado no Fluxograma das etapas da experimentação *in vitro* (Figura 5).

#### 6.6.3 Estimulação por corrente contínua

Os parâmetros utilizados na aplicação da corrente contínua foram intensidade constante de 0,5mA, densidade da corrente de  $333\mu\text{A}/\text{cm}^2$  e duração de 10 minutos (Equipamento Bio-System/ EMC-01 Microcontrolado). Esses parâmetros foram definidos com base nos limites de segurança estabelecido para este tipo de estimulação em cérebros de ratos, os quais demonstraram que uma densidade de

corrente inferior a  $142,9 \text{ A/m}^2$  e o tempo de aplicação da estimulação inferior a 10 minutos não provocaram lesões cerebrais (LIEBETANZ *et al.*, 2009).

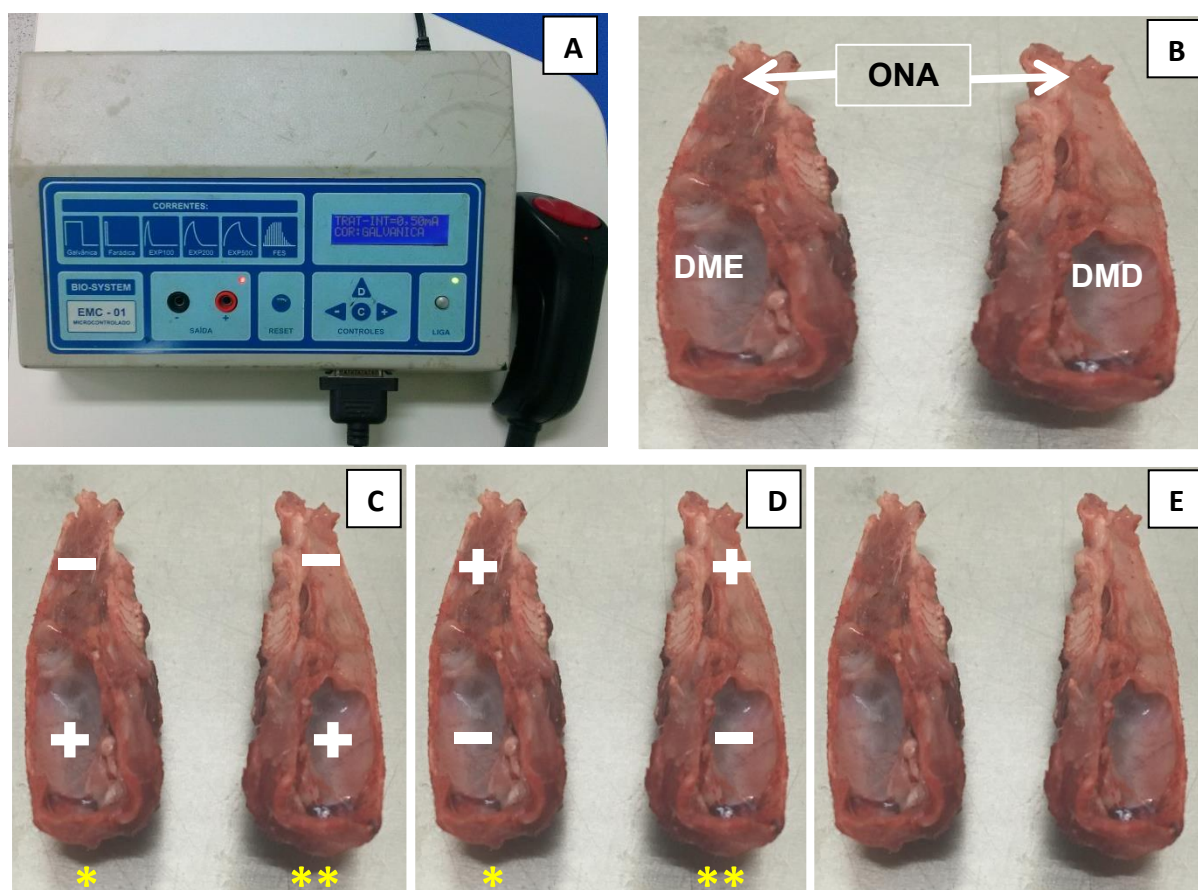
Foram utilizados eletrodos de borracha ( $1,5 \text{ cm}^2$ ) com posicionamento descrito a seguir e ilustrados na Figura 3.

**Controle--** não foi realizada nenhuma estimulação;

**Sham--** os eletrodos foram posicionados em cima da dura-máter e em cima do osso nasal, entretanto, não houve passagem da corrente contínua;

**Estimulação por corrente contínua anódica--** ânodo (polo positivo) posicionado em cima da dura-máter e o cátodo (polo negativo) posicionado em cima do osso nasal;

**Estimulação por corrente contínua catódica--** o eletrodo cátodo (polo negativo) posicionado em cima da dura-máter e o ânodo (polo positivo) posicionado em cima do osso nasal.



**Figura 4:** (A) Equipamento Bio-System/ EMC-01 Microcontrolado; (B) Corte sagital do crânio do rato: ONA (osso nasal); DME (dura-máter esquerda); DMD (dura-máter direita); (C) Polaridade do eletrodo no grupo estimulação por corrente contínua anódica; (D) Polaridade do eletrodo no grupo estimulação corrente contínua catódica; (E) Grupo controle.

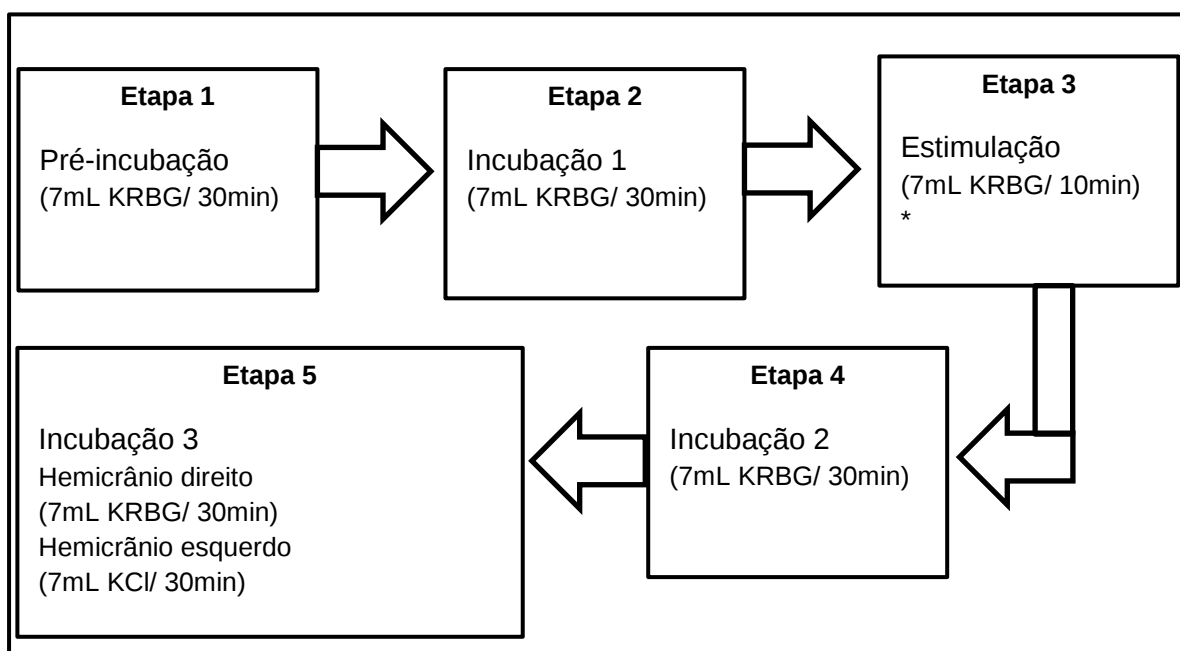
\* Lado sham; \*\* Lado estimulado.

Fonte: acervo da pesquisa

## 6.7 Experimentação *in vitro*

Durante toda realização do experimento os hemicrânios contendo a dura-máter foram colocados em recipientes separados, mantidos em banho-maria em uma temperatura de  $37 \pm 1^\circ \text{C}$ , simulando a temperatura corpórea e numa mesa agitadora (Marca TECNAL- TE 1400) com ajuste de 30rpm. Ao longo do experimento foram utilizados os seguintes meios de incubação: Krebs-Ringer Bicarbonato Glicose (KRBG) com 1% de glicose (154 mM NaCl, 771 mM KCl, 775 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 770 mM  $\text{MgSO}_4$ , 146 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 549 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4) - com finalidade de nutrir e manter viável o tecido; Cloreto de Potássio KCl 56 mM - objetivando testar a capacidade de resposta do tecido ao estímulo despolarizante na última incubação.

As cinco etapas que compõem o experimento estão representadas a seguir:



**Figura 5:** Fluxograma das etapas da experimentação *in vitro*. KRBG (Krebs-Ringer Bicarbonato Glicose); KCl (Cloreto de Potássio)

As amostras foram coletadas com uma pipeta, sem tocar na dura-máter ao término de cada uma das cinco etapas e armazenadas a  $-20^\circ \text{C}$ , para análise da concentração de ocitocina.

#### 6.8 Análise da concentração de ocitocina

A dosagem do hormônio foi realizada pelo método de radioimunoensaio no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo. As amostras de ocitocina que estavam armazenadas a -20°C foram ressuspensas em 250 µl de tampão OT (tampão TRIS 0,05 M com albumina humana 0,25%), sendo que, 100 µl do ressuspensão foi utilizado para o ensaio, em duplicata.

Para o radioimunoensaio foram utilizados anticorpos de coelho antiOT e peptídeos marcados com <sup>125</sup>I. O primeiro anticorpo foi gerado no coelho e o segundo anticorpo, em cabra. A sensibilidade do ensaio variou de 1,8 a 542pg (*Auto Gama Counting System* cobra II da *Instrument Company Packard*, U.S.A).

#### 6.9 Análise estatística

O banco de dados foi digitado na planilha eletrônica do programa *Microsoft Excel*, versão 2010 e posteriormente, exportado para o programa *GraphPad Prism*, versão 5.03, para análise dos dados. Para análise da distribuição da amostra utilizamos o teste de normalidade Shapiro-Wilk. O teste de Kruskal- Wallis foi utilizado para análise da liberação de ocitocina entre os grupos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparação da liberação de ocitocina pela dura-máter dos hemisférios direito e esquerdo nos grupos e para avaliação da liberação basal de ocitocina pela dura-máter dos hemisférios e após a estimulação com KCl. Os resultados estão expressos em média±erro padrão da média (M±EPM), sendo o nível de significância utilizado de 5% (p<0,05).

#### 6.10 Aspectos éticos

O presente estudo foi conduzido após submissão e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco- Processo nº CEUA 0006/2015 (Anexo 1). A manipulação e os cuidados com os animais seguiram as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/ Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/ COBEA).

#### 6.11 Conflitos de interesse

Declaro não haver qualquer conflito de interesse da proposta apresentada.

## 7 Resultados

A pesquisa resultou em um artigo original, uma revisão sistemática e um artigo original. Os títulos dos trabalhos são descritos abaixo e os artigos completos encontram-se nos Apêndices A, B e C. São eles:

- Artigo 1: “Evidence of oxytocin release and effect of direct current stimulation on cerebral dura mater of Wistar rats- An in vitro study (Apêndice A)
- Artigo 2: Parâmetros elétricos da estimulação transcraniana por corrente contínua efetivos para alterações do fluxo sanguíneo cerebral de animais experimentais: uma revisão sistemática (Apêndice B)
- Artigo 3: Evidências sobre a imunorreatividade da ocitocina e sua relação com a dor em modelos de experimentação animal: Uma revisão (Apêndice C)

## 8 Considerações finais e perspectivas

Consideramos nosso estudo pioneiro na investigação da liberação de ocitocina e do efeito da estimulação por corrente contínua na dura-máter cerebral de ratos *Wistar*.

Nossos resultados evidenciaram a liberação *in vitro* de ocitocina pela dura-máter cerebral de ratos *Wistar*, apresentando inclusive, valores significativos de liberação após a estimulação química com KCl. Entretanto, a estimulação por corrente contínua *in vitro* não foi eficaz para promover liberação significativa de ocitocina da dura-máter cerebral de ratos nos grupos estudados com os parâmetros elétricos instituídos em nossa pesquisa.

Apesar da definição dos parâmetros elétricos aplicados em nosso estudo seguirem os limites de segurança para estimulação por corrente contínua em ratos, determinados em estudo prévio, sabe-se que os efeitos produzidos por esta corrente são variáveis e dependentes dos parâmetros dificultando a padronização dos protocolos utilizados na literatura. Desta forma, esse fator, acrescido a utilização do modelo experimental *in vitro* podem justificar esses achados.

É inegável a importância da realização do estudo *in vitro* para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação da corrente contínua sobre estruturas cerebrais, neurônios e peptídeos vasoativos relacionados à fisiopatogenia da migrânea. No entanto, as respostas apresentadas pelos tecidos, nesse modelo experimental referem-se a ambientes isolados, de modo que, os resultados obtidos nem sempre irão refletir as mesmas respostas quando estes se encontram integrados aos demais sistemas.

Desse modo, consideramos imprescindível o desenvolvimento de pesquisas com objetivo de promover a padronização dos parâmetros elétricos da corrente contínua nos modelos experimentais, bem como a aplicação destes protocolos em estudos com animais *in vivo*.

### Referências

- ABBASNEZHAD, A.; KHAZDAIR, M. R.; KIANMEHR, M. The role of nitric oxide on the oxytocin induce analgesia in mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 19, n. 3, p. 238–244, 2016.
- AKYOL, A. *et al.* Epidemiology and clinical characteristics of migraine among school children in the Menderes region. **Cephalalgia**, v. 27, n. 7, p. 181–187, 2007.
- ALOTAIBI, M. F. The response of rat and human uterus to oxytocin from different gestational stages in vitro. **General Physiology and Biophysics**, v. 36, n. 1, p. 75–82, 2017.
- ANTAL, A. *et al.* Cathodal transcranial direct current stimulation of the visual cortex in the prophylactic treatment of migraine. **Cephalalgia: An International Journal of Headache**, v. 31, n. 7, p. 820–8, 2011.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. *et al.* Controle neuroendócrino da homeostase dos fluídos corporais. In: **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 81–115.
- BALE, T. L. *et al.* CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior. **The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 7, p. 2546–52, 2001.
- BARBERIS, C.; MOUILLAC, B.; DURROUX, T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. **Journal of Endocrinology**, v. 156, n. 2, p. 223–229, 1998.
- BECKER JUNIOR, V. *et al.* Neurovascular coupling and functional neuroimaging in epilepsy. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 15, n. 1, p. 30–36, 2009.
- BIKSON, M. *et al.* Effects of uniform extracellular DC electric fields on excitability in rat hippocampal slices in vitro. **The Journal of Physiology**, v. 557, n. 1, p. 175–190, 2004.
- 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. **The Journal of Physiology**, v. 172, p. 369–82, 1964.

BOLAY, H. *et al.* Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. **Nature Medicine**, v. 8, n. 2, p. 136–142, 2002.

BRAIN, S. D.; GRANT, A. D. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 903–934, 2004.

BRESSAN, R. A.; PILOWSKYB, L. S. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. 3, p. 177–183, 2003.

BRETON, J. D.; POISBEAU, P.; DARBON, P. Antinociceptive action of oxytocin involves inhibition of potassium channel currents in lamina II neurons of the rat spinal cord. **Molecular pain**, v. 5, p. 63, 2009.

BRIFFAUD, V. *et al.* Excitation of tuberoinfundibular dopamine neurons by oxytocin: crosstalk in the control of lactation. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 10, p. 4229–4237, 2015.

BUTURE, A. *et al.* Current understanding on pain mechanism in migraine and cluster headache. **Anesthesiology and Pain Medicine**, v. 6, n. 3, p. e35190, 2016.

CARTER, C. S. Neuroendocrine perspectives on social attachment and love. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, n. 8, p. 779–818, nov. 1998.

CICIARELLI, M. C. The neurobiology of migraine. **Migrâneas Cefaléias**, v. 8, n. 4, p. 107–113, 2005.

CONDÉS-LARA, M. *et al.* Actions of oxytocin and interactions with glutamate on spontaneous and evoked dorsal spinal cord neuronal activities. **Brain Research**, v. 976, n. 1, p. 75–81, 2003.

CONDÉS-LARA, M. *et al.* Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. **Brain Research**, v. 1081, n. 1, p. 126–137, 2006.

CONDÉS-LARA, M. *et al.* Paraventricular hypothalamic oxytocinergic cells

responding to noxious stimulation and projecting to the spinal dorsal horn represent a homeostatic analgesic mechanism. **European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 6, p. 1056–1063, 2009.

CONDÉS-LARA, M.; MAIE, I. A. S.; DICKENSON, A. H. Oxytocin actions on afferent evoked spinal cord neuronal activities in neuropathic but not in normal rats. **Brain Research**, v. 1045, n. 1–2, p. 124–133, 2005.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.

DELGADO, J. M. Free behavior and brain stimulation. **International Review of Neurobiology**, v. 6, p. 349–449, 1964.

DIMITRIADOU, V. *et al.* Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. **Neuroscience**, v. 44, n. 1, p. 97–112, 1991.

EBERSBERGER, A. *et al.* Release of substance P, calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 from rat dura mater encephali following electrical and chemical stimulation in vitro. **Neuroscience**, v. 89, n. 3, p. 901–907, 1999.

ENDLERS, N. S. The origins of electroconvulsive therapy. **Convulsive Therapy**, v. 4, n. 1, p. 5–23, 1988.

FAVARETTO, A. L. V *et al.* Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. **Peptides**, v. 18, n. 9, p. 1377–1381, 1997.

FREGNI, F.; FREEDMAN, S.; PASCUAL-LEONE, A. Recent advances in the treatment of chronic pain with non-invasive brain stimulation techniques. **The Lancet Neurology**, v. 6, n. 2, p. 188–191, 2007.

GABELLO, M. *et al.* Omeprazole induces gastric transmucosal permeability to the peptide bradykinin. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 9, p. 1097–1103, 2010.

GAO, L.; YU, L. C. Involvement of opioid receptors in the oxytocin-induced

antinociception in the central nervous system of rats. **Regulatory Peptides**, v. 120, n. 1–3, p. 53–58, 2004.

GIBBS, D. M. Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress. **Life Sciences**, v. 35, n. 5, p. 487–91, 1984.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 629–83, 2001.

GIORDANO, J. *et al.* Mechanisms and effects of transcranial direct current stimulation. **Dose-response: An International Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–22, 2017.

GOLDENSOHN, E.S.; PORTER, R.J.; SCHWARTZKROIN, P. A. The American Epilepsy Society: an historic perspective on 50 years of advances in research. **Epilepsia**, v. 38, n. 1, p. 124–50, 1977.

GOODIN, B. R.; NESS, T. J.; ROBBINS, M. T. Oxytocin - a multifunctional analgesic for chronic deep tissue pain. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 7, p. 906–13, 2015.

GUPTA, S. *et al.* Evidence for CGRP re-uptake in rat dura mater encephali. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 8, p. 1885–1898, 2010.

GUTKOWSKA, J.; JANKOWSKI, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. The role of oxytocin in cardiovascular regulation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 47, n. 3, p. 206–214, 2014.

HARGREAVES, R. New migraine and pain research. **Headache**, v. 47 Suppl 1, p. S26-43, 2007.

HEINRICHS, M. *et al.* Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 12, p. 1389–98, 2003.

HOBO, S.; HAYASHIDA, K.; EISENACH, J. C. Oxytocin inhibits the membrane depolarization-induced increase in intracellular calcium in capsaicin sensitive sensory neurons. **Anesthesia & Analgesia**, v. 114, n. 2, p. 442–449, 2012.

JACKSON, M. P. *et al.* Animal models of transcranial direct current stimulation: Methods and mechanisms. **Clinical Neurophysiology**, v. 127, n. 11, p. 3425–3454, 2016.

JO, Y. H. *et al.* Oxytocin modulates glutamatergic synaptic transmission between cultured neonatal spinal cord dorsal horn neurons. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 2377–86, 1998.

KIM, S. J. *et al.* Functional and histologic changes after repeated transcranial direct current stimulation in rat stroke model. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, n. 10, p. 1499–1505, 2010.

KWONG, K. K.; CHAN, S.-T. Oxytocin, a missing link of the gut-brain axis between probiotics and chronic migraine? **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 5, p. 623–624, 2016.

LANG, N. *et al.* How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 495–504, 2005.

LEFFA, D. T. *et al.* Transcranial direct current stimulation improves short-term memory in an animal model of attention-deficit/ hyperactivity disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 368–77, 2016.

LIEBETANZ, D. *et al.* Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. **Clinical Neurophysiology**, v. 120, n. 6, p. 1161–1167, 2009.

LOW, J.; REED, A. Corrente direta terapêutica. In: **Eletroterapia Explicada: Princípios e prática**. 3<sup>o</sup> ed. Barueri- SP: Manole Ltda, 2001. p. 33–56.

LV, X.; WU, Z.; LI, Y. Innervation of the cerebral dura mater. **The Neuroradiology Journal**, v. 27, p. 293–298, 2014.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 2<sup>a</sup> ed. SÃO PAULO: [s.n.].

MAGGI, C. A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Progress in Neurobiology**, v. 45, n. 1, p. 1–98, jan. 1995.

MARTÍNEZ-LORENZANA, G. *et al.* PVN electrical stimulation prolongs withdrawal latencies and releases oxytocin in cerebrospinal fluid, plasma, and spinal cord tissue in intact and neuropathic rats. **Pain**, v. 140, n. 2, p. 265–273, 2008.

MARTINS, I. P. Migraine. **Acta medica portuguesa**, v. 22, n. 5, p. 589–598, 2009.

MAYBERG, M. R.; ZERVAS, N. T.; MOSKOWITZ, M. A. Trigeminal projections to supratentorial pial and dural blood vessels in cats demonstrated by horseradish peroxidase histochemistry. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 223, n. 1, p. 46–56, 1984.

MCWHIRTER, L.; CARSON, A.; STONE, J. The body electric: a long view of electrical therapy for functional neurological disorders. **Brain**, v. 138, n. Pt 4, p. 1113–1120, 2015.

MIELKE, D. *et al.* Cathodal transcranial direct current stimulation induces regional, long-lasting reductions of cortical blood flow in rats. **Neurological Research**, v. 35, n. 10, p. 1029–37, 2013.

MILLAN, M. J. *et al.* Vasopressin and oxytocin in the rat spinal cord: analysis of their role in the control of nociception. **Brain research**, v. 309, n. 2, p. 384–8, 1984.

MINIUSSI, C.; PAULUS, W.; ROSSINI, P. M. Cellular and network effects of transcranial direct current stimulation. In: **Transcranial Brain Stimulation**. United States of America: Frontiers in Neuroscience, 2012. p. 55–91.

MOREIRA, S. F. DA S. *et al.* Transcranial direct current stimulation (tDCS) neuromodulatory effects on mechanical hyperalgesia and cortical BDNF levels in ovariectomized rats. **Life Sciences**, v. 145, p. 233–9, 2016.

MORRIS, M. S.; DOMINO, E. F.; DOMINO, S. E. Opioid modulation of oxytocin release. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 50, n. 10, p. 1112–1117, 2010.

NITSCHKE, M. A. *et al.* Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. **Clinical Neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, v. 114, n. 4, p. 600–4, 2003.

NITSCHKE, M. A. *et al.* Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. **Brain Stimulation**, v. 1, n. 3, p. 206–23, 2008.

NITSCHKE, M. A. *et al.* Treatment of depression with transcranial direct current stimulation (tDCS): a review. **Experimental Neurology**, v. 219, n. 1, p. 14–19, 2009.

NITSCHKE, M. A.; PAULUS, W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. **The Journal of Physiology**, v. 527.3, p. 633–9, 2000.

OTTOSSON, A.; EDVINSSON, L. Release of histamine from dural mast cells by substance P and calcitonin gene-related peptide. **Cephalalgia: An International Journal of Headache**, v. 17, n. 3, p. 166–74, 1997.

OVADIA, D.; BOTTINI, G. Neuroethical implications of deep brain stimulation in degenerative disorders. **Current Opinion in Neurology**, v. 28, n. 6, p. 598–603, 2015.

PARENT, A. Giovanni Aldini: From animal electricity to human brain stimulation. **The Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 31, n. 4, p. 576–584, 2004.

PELLETIER, S. J.; CICHETTI, F. Cellular and molecular mechanisms of action of transcranial direct current stimulation: evidence from In Vitro and In Vivo models. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 2, p. 1–13, 2015.

PETERSEN, K. A. *et al.* Presence and function of the calcitonin gene-related peptide receptor on rat pial arteries investigated in vitro and in vivo. **Cephalalgia**, v. 25, n. 6, p. 424–432, 2005.

PHILLIPS, W. *et al.* Relief of acute migraine headache with intravenous oxytocin. **Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy**, v. 20, n. 3, p. 25–28, 2006.

PINCHUK, D. *et al.* Clinical effectiveness of primary and secondary headache treatment by transcranial direct current stimulation. **Frontiers in Neurology**, v. 4, p. 1–7, 2013.

PRIORI, A. Brain polarization in humans: a reappraisal of an old tool for prolonged non-invasive modulation of brain excitability. **Clinical Neurophysiology**, v. 114, n. 4,

p. 589–595, 2003.

PURPURA, D. P.; MCMURTRY, J. G. Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. **Journal of Neurophysiology**, v. 28, p. 166–185, 1965.

REVERSI, A. *et al.* The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a “biased agonist” mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 16311–8, 2005.

ROCHE, N.; GEIGER, M.; BUSSEL, B. Mechanisms underlying transcranial direct current stimulation in rehabilitation. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 58, n. 4, p. 214–219, 2015.

ROZNIECKI, J. J. *et al.* Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo. **Brain Research**, v. 849, n. 1–2, p. 1–15, 1999.

SAITO, K.; GREENBERG, S.; MOSKOWITZ, M. A. Trigeminal origin of beta-preprotachykinin products in feline pial blood vessels. **Neuroscience Letters**, v. 76, n. 1, p. 69–73, 1987.

SHOJO, H.; KANEKO, Y. Characterization and expression of oxytocin and the oxytocin receptor. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 71, p. 552–558, 2000.

SINIATCHKIN, M. *et al.* Abnormal changes of synaptic excitability in migraine with aura. **Cerebral Cortex**, v. 22, n. 10, p. 2207–16, 2012.

SOFRONIEW, M. V. Projections from vasopressin, oxytocin, neurophysin neurons to neural targets in the rat and human. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 28, n. 5, p. 475–478, 1980.

STEINER, T. J.; STOVNER, L. J.; BIRBECK, G. L. Migraine: the seventh disabler. **The Journal of Headache and Pain**, v. 14, p. 1, 2013.

STRASSMAN, A. M. *et al.* Axon diameters and intradural trajectories of the dural innervation in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 473, n. 3, p. 364–76, 2004.

SWANSON, L. W.; MCKELLAR, S. The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 188, n. 1, p. 87–106, 1979.

TATLISUMAK, T.; FISHER, M. **Handbook of experimental neurology: methods and techniques in animal research**. [s.l.] Cambridge University Press, 2006.

THE INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF HEADACHE DISORDERS. HEADACHE CLASSIFICATION COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY. **Cephalalgia**, v. 33, n. 9, p. 629–808, 2013.

TRACY, L. M. *et al.* Oxytocin and the modulation of pain experience: Implications for chronic pain management. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 53–67, 2015.

TZABAZIS, A. *et al.* Oxytocin receptor: Expression in the trigeminal nociceptive system and potential role in the treatment of headache disorders. **Cephalalgia**, v. 36, n. 10, p. 943–950, 2016.

UTZ, K. S. *et al.* Electrified minds: transcranial direct current stimulation (tDCS) and galvanic vestibular stimulation (GVS) as methods of non-invasive brain stimulation in neuropsychology--a review of current data and future implications. **Neuropsychologia**, v. 48, n. 10, p. 2789–810, 2010.

VIGANÒ, A. *et al.* Transcranial direct current stimulation (tDCS) of the visual cortex: a proof-of-concept study based on interictal electrophysiological abnormalities in migraine. **The Journal of Headache and Pain**, v. 14, p. 23, 2013.

VINCENT, M. B. Fisiopatologia da enxaqueca. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 56, n. 4, p. 841–851, 1998.

VOS, T. *et al.* Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: A systematic analysis for the global burden of disease study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2163–2196, 2012.

VRACHNIS, N. *et al.* The oxytocin-oxytocin receptor system and its antagonists as tocolytic agents. **International Journal of Endocrinology**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

WACHTER, D. *et al.* Transcranial direct current stimulation induces polarity-specific changes of cortical blood perfusion in the rat. **Experimental Neurology**, v. 227, n. 2, p. 322–7, 2011.

WAEBER, C.; MOSKOWITZ, M. A. Migraine as an inflammatory disorder. **Neurology**, v. 64, n. 10 Suppl 2, p. S9-15, 2005.

WALKER, C. S.; HAY, D. L. CGRP in the trigeminovascular system: a role for CGRP, adrenomedullin and amylin receptors? **British Journal of Pharmacology**, v. 170, n. 7, p. 1293–1307, 2013.

WANG, Y.-L. *et al.* The interaction between the oxytocin and pain modulation in headache patients. **Neuropeptides**, v. 47, n. 2, p. 93–97, 2013.

WILLIAMS, J. A.; IMAMURA, M.; FREGNI, F. Updates on the use of non-invasive brain stimulation in physical and rehabilitation medicine. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 41, n. 5, p. 305–311, 2009.

ZHANG, X.-C. *et al.* Sensitization and activation of intracranial meningeal nociceptors by mast cell mediators. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 2, p. 806–812, 2007.

## Apêndice A

Evidence of oxytocin release and effect of direct current stimulation on cerebral dura mater of Wistar rats- An in vitro study. *Artigo original a ser submetido ao periódico Brain Structure and Function*

### **Evidence of oxytocin release and effect of direct current stimulation on cerebral dura mater of Wistar rats- An in vitro study.**

Camila Carolinne Silva de Almeida<sup>1</sup>, Marcelo Moraes Valença<sup>2</sup>, Eduardo José Nepomuceno Montenegro<sup>1</sup>, José Antunes Rodrigues<sup>3</sup>, Sandra Lopes de Souza<sup>2</sup>, Daniella Araújo de Oliveira<sup>1,2</sup>

1. Department of Physical Therapy, Federal University of Pernambuco-Recife, PE, Brazil.
2. Postgraduate Program in Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Federal University of Pernambuco-Recife, PE, Brazil
3. Departament of Physiology, University of São Paulo- Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Mailing address:

Daniella Araújo de Oliveira

E-mail: sabinodaniellaufpe@gmail.com

Department of Physical Therapy, Federal University of Pernambuco (UFPE)

Av. Jorn. Anibal Fernandes, s / n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil, 50740-560.

Phone: +55 (81) 2126-8937 / Fax: + 55 (81) 2126-8491

## Abstract

**Context:** The effects of in vitro stimulation by direct current on the secretion of peptides involved in the pathophysiology and pain modulation of migraine have been investigated. The release of vasoactive substances by the dura mater explains in part, the process of neurogenic inflammation responsible for the maintaining the pain in the migraine. In contrast, it is suggested that the release of oxytocin by trigeminal ganglion neurons promotes analgesia; however, in relation to dura mater no evidence has been presented. **Objective:** To evaluate the release of oxytocin and the effect of in vitro stimulation by direct current on the cerebral dura mater of Wistar rats. **Methods:** An in vitro study (Process n° CEUA 0006/2015), carried out with the dura mater adhered to 50 hemispheres, from 25 male Wistar rats, distributed in groups: control (n=16), sham (n=17), anodic stimulation (n=9), cathodic stimulation (n=8). The electrical parameters of the direct current were: intensity (0.5mA); density ( $333\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ); duration (10 minutes). Release of oxytocin with KCl (56mM) was also tested. The radioimmunoassay method was performed for analysis of oxytocin release. **Results:** Release of oxytocin by the dura mater was demonstrated, with a significant result after KCl ( $p<0.05$ ). The release of oxytocin by the hemisphere dura mater did not differ between the control, sham, anodic stimulation and cathodic stimulation groups ( $p=0.36$ , Kruskal-Wallis test). There was no difference in oxytocin release between the left and right hemispheres in the groups: [(control:  $p=0.15$ , anodic stimulation:  $p=0.46$ , cathodic stimulation:  $p=0.46$ ); Wilcoxon test]. **Conclusion:** In our study, the release of oxytocin from the cerebral dura mater was evidenced, however, in vitro stimulation by direct current was not effective in the release of oxytocin from the cerebral dura mater of Wistar rats.

Key words: Electric stimulation; migraine disorders; oxytocin

## *Introduction*

From the seventeenth century, with the development of technology, the application of low intensity direct current as a neuromodulatory technique diffused<sup>1-3</sup>, in patients with migraine, whose excitability changes are observed<sup>4,5</sup> and have shown promising results<sup>5,6</sup>. The mechanisms by which this current produces changes in cortical excitability are not fully elucidated. Thus, for a better understanding of its effects on the cellular mechanisms, release of neurotransmitters and modulation of inflammatory processes<sup>7,8</sup>, the realization of direct current stimulation in vitro is essential.

Although the etiopathogenesis of migraine remains uncertain, it is known that there is involvement of neural, vascular and meningeal components<sup>9,10</sup>. It is proposed that during the crisis, primary sensory neurons in the caudal trigeminal nucleus release vasoactive peptides such as substance P (SP), peptide related to the calcitonin gene (CGRP) and nitric oxide in the peripheral nerve endings, located within the meninges, causing local vasodilation, extravasation of plasma proteins and contributes to neurogenic inflammation in the dura mater, the latter being the mechanism responsible for maintaining the pain phase<sup>11,12</sup>.

Recently, trigeminal ganglion neurons have also been shown to express oxytocin receptors that, when activated, block the release of CGRP, acting on the modulation of migraine pain<sup>13</sup>. It is known that the dura mater nerve fibers release SP and CGRP<sup>14</sup>, however, to the best of our knowledge, in relation to oxytocin, no evidence has been presented. In addition, investigations of the effects of direct current were restricted to the cerebral cortex. Thus, the aim of the study is to investigate the release of oxytocin and the effect of in vitro direct current stimulation in cerebral dura mater of Wistar rats.

## *Methods*

This is an in vitro experimental study with the approval of the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Pernambuco (UFPE) (Process No. CEUA 0006/2015). Twenty-five male *Rattus Novergicus Albinus* Wistar rats from three broiler breeds originating from the breeding colony of the Department of Nutrition of the UFPE, with mean age of  $93 \pm 5$  days and mean weight of  $318 \pm 30$  grams, were used. The animals were kept in the Laboratory of Experimental Surgery Nucleus of UFPE, grouped in collective plastic cages (maximum of three animals/ cage), with controlled temperature at  $22 \pm 2$  ° C, exposed to a light dark cycle of 12 Hours, with free access to food (rodent ration- Labina) and mineral water until they reach the appropriate age for the experiments. The manipulation and care

with the animals followed the recommendations of the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals/ Brazilian College of Animal Experimentation (SBCAL/ COBEA).

Initially, rats were euthanized by decapitation and had epithelial tissue, mandible and muscle tissue removed. An incision was then made along the midline of the skull, the all encephali was carefully removed and the dura mater remained intact and attached to each hemicrania<sup>15</sup>. The total of 50 hemicrania from the 25 rats were distributed in four experimental groups: control (n=16), sham (n=17), anodic direct current stimulation (n=9) and cathodic direct current stimulation (n=8).

#### *Stimulation by direct current*

Continuous current stimulation was performed with constant intensity of 0.5mA, density of  $333\mu\text{A}/\text{cm}^2$  and duration of 10 minutes (Bio-System/ EMC-01 Microcontrolled Equipment). These parameters were defined based on the safety limits established for this type of stimulation in rat brains, which demonstrated that a current density lower than  $142.9\text{A}/\text{m}^2$  and the time of application of the stimulation of less than 10 minutes did not provoke brain lesions<sup>16</sup>. The rubber electrodes ( $1.5\text{cm}^2$ ) were positioned as follows: anodic - anode on top of the dura and cathode on top of the nasal bone; Cathodic - the same references were used, however, the polarity of the current was inverted; Control - no stimulation was performed. In the sham group the electrodes were positioned at the same reference points, however, there was no current flow. For the groups of anodic direct current stimulation and cathodic direct current stimulation the dura mater of the right hemicrania as always stimulated and the dura mater of the left hemicrania of the same animal as sham were standardized.

#### *In vitro experimentation*

The hemicrania were placed in separate containers on a shaker table (Marca TECNOTTE 1400) with a setting of 30rpm and kept in a water bath at a temperature of  $37^\circ\text{C}$ , mimicking the body temperature. The incubation media used were: Krebs-Ringer Bicarbonate Glucose (KRBG) with 1% glucose (in mM): 154 NaCl, 771 KCl, 775  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 770  $\text{MgSO}_4$ , 146  $\text{NaHCO}_3$ , 549  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4 - With the goal of nourishing and maintaining the fabric viable; Potassium Chloride: 56mM KCl - at the end of each experiment to test tissue responsiveness to a depolarizing stimulus.

The experiment consisted of the five steps described below: Step 1- Pre-incubation with KRBG in each hemicrania; Step 2- Incubation with KRBG in each hemicrania; Step 3-

Addition of KRBG in each hemicrania, followed by the corresponding stimulation for the groups of anodic direct current stimulation and cathodic direct current stimulation; Step 4- Incubation with KRBG in each hemicrania; Step 5- Incubation with KRBG in the right hemicrania and with KCl in the left hemicrania.

A volume of 7mL KRBG or KCl was used at each step. Each incubation lasted 30 minutes, except for step 3, which lasted 10 minutes. Samples were collected with a pipette without touching the dura mater at the end of each of the five steps and after the procedure were stored at -20 ° C for further analysis.

#### *Oxytocin concentration analysis*

The hormone dosage was performed by the radioimmunoassay method in the Laboratory of Neuroendocrinology of the Department of Physiology of the Medical School of Ribeirão Preto - University of São Paulo. Oxytocin samples that were stored at -20 ° C were resuspended in 250 µl of OT buffer (0.05 M TRIS buffer with 0.25% human albumin), and 100 µl of the resuspended was used for the assay in duplicate. For the radioimmunoassay anti-OT rabbit antibodies and <sup>125</sup>I-labeled peptides were used. The sensitivity of the assay ranged from 1.8 to 542pg in 7mL of the solution (Auto Gamma Counting System snake II from Instrument Company Packard, U.S.A)

#### *Data processing and statistical analysis*

The database was entered in the spreadsheet of the Microsoft Excel program, version 2010 and later exported to the program GraphPad Prism, version 5.03, for data analysis. To verify the distribution of the sample, the Shapiro-Wilk normality test was used. The Kruskal-Wallis test was used to analyze oxytocin release by dura mater between groups. The Wilcoxon test was used to compare the release of oxytocin by dura mater of the right and left hemicrania in the groups and comparison the basal release of oxytocin release by the dura mater and after stimulation with KCl. The results are expressed as mean ± standard error of mean (M ± SEM) and the accepted significance level of 5% (p <0.05).

#### *Results*

The release of oxytocin by the dura mater by the control group over time was demonstrated in Figure 1. Figure 2 shows the comparison of the basal release of oxytocin and

after ten minutes of stimulation with KCl. In it, a significant difference is observed only for oxytocin release after stimulation with KCl ( $p < 0.05$ ).

No significant differences were observed in the release of oxytocin by the hemispheres of the dura mater in the control, sham, anodic and cathodic direct current stimulation groups (Table 1). The comparison of oxytocin release by right and left hemispheres in each group also did not reveal significant differences, as observed in Figure 3.

### *Discussion*

In this study, we demonstrated the release of oxytocin by the cerebral dura-mater, this release being significant after stimulation with KCl when compared to the basal release. However, it was observed that the use of anodic and cathodic direct current stimulation was not effective in the significant release of oxytocin by the cerebral dura mater.

By considering the involvement of the dura mater in the etiopathogeny of migraine, our study presents an innovative character for evaluating the presence of oxytocin, as well as the effects of in vitro continuous stimulation on the release of this hormone in the rat dura mater.

The cerebral dura mater is widely innervated by afferent nerve fibers, most of which originate from the ipsilateral trigeminal ganglion and from sympathetic fibers originating mostly from the superior cervical ganglion<sup>14</sup>. Results of in vitro experimental investigations point to the presence of immunoreactivity of these nerve fibers to several neuropeptides, among them CGRP and substance P<sup>15,17,18</sup>. In addition, it is proposed that the release of these peptides promotes vasodilation and extravasation of local plasma, thus contributing to the process of neurogenic inflammation of the dura mater, which is considered to be one of the main mechanisms involved in maintaining the pain phase during crises of migraine<sup>11,12</sup>.

The identification of oxytocin receptors in trigeminal ganglion neurons was also observed. However, it is speculated that its activation promotes counteraction. Studies in humans suggest that oxytocin actions are related to the specific modulation of neural processes involved in the perception of pain<sup>13,19,20</sup>, including in individuals with migraine<sup>13</sup>. Thus, it is suggested that the activation of oxytocin receptors by oxytocin seems to block the release of CGRP and, consequently, reduce pain in migraineurs<sup>13</sup>. Also with regard to nociceptive control, experimental studies have demonstrated the ability of oxytocin to promote the blockade of glutamate effects through NMDA receptors in the spinal cord<sup>21,22</sup>.

Immunoreactivity to oxytocin was identified in nerve fibers of structures of the central nervous system, related to the nociceptive control, as in the cranial nerve nuclei located in the gray matter of the bulb, in the substantia nigra of the midbrain and in the laminae I, III and X and medial intermediate nucleus of the spinal cord of rats<sup>23-26</sup>. However, there were no records of the immunoreactivity of this hormone in the cerebral dura mater.

In our study, we were able to demonstrate significant release of oxytocin from the dura mater of the hemicrania stimulated with KCl. Thus, it is probable that the presence of oxytocin is due to the existence of projections of trigeminal ganglion neurons to dura mater and that its action in the blockade of CGRP release is not restricted only to the trigeminal ganglion as demonstrated in a previous study<sup>13</sup>, but that this mechanism of action also occurs in the cerebral dura mater.

Regarding the neuromodulatory effects produced by direct current stimulation, it is suggested that changes in cortical excitability are due to changes in the polarity of the neuronal membrane<sup>27,28</sup>, or that are associated with the actions of this current on the glutamatergic receptors N-methyl D- Aspartate (NMDA)<sup>29</sup>. However, in vitro experimental studies have also demonstrated the ability of electric fields to produce effects on cellular, vascular and vasoactive peptide components. In vitro electrical stimulation of the trigeminal ganglion is capable of promoting the release of CGRP, prostaglandin E2, for example<sup>8,17,30,31</sup>.

In our study, despite the finding of oxytocin presence in nerve fibers of rat cerebral dura mater, no significant differences were observed in the release of oxytocin from the tissue after direct current stimulation.

It is probable that the study design partially justifies these findings, because although the in vitro experimental models allow a better understanding of the mechanisms of action involved, the results obtained refer to the tissue in an isolated environment. Therefore, they will not always reflect the responses of the tissue when it is integrated with the other structures of the nervous system<sup>8</sup>, in the in vivo environment.

Moreover, it is known that the effects produced by the of low intensity direct current are variable and dependent on the intensity, density and duration of the direct current<sup>16,28,32</sup>. In this way, variations in the electrical parameters can promote different results. In addition, variations in the means of oxytocin release observed between the groups may be due to differences in the density of the neuronal fibers in the dura mater of the hemicrania of the animals.

Thus, it becomes imprescindible besides experimental studies with animals in vitro, establishing new electrical parameters, the development of these experimental studies with animals in vivo and in humans to determine the importance of findings in clinical practice.

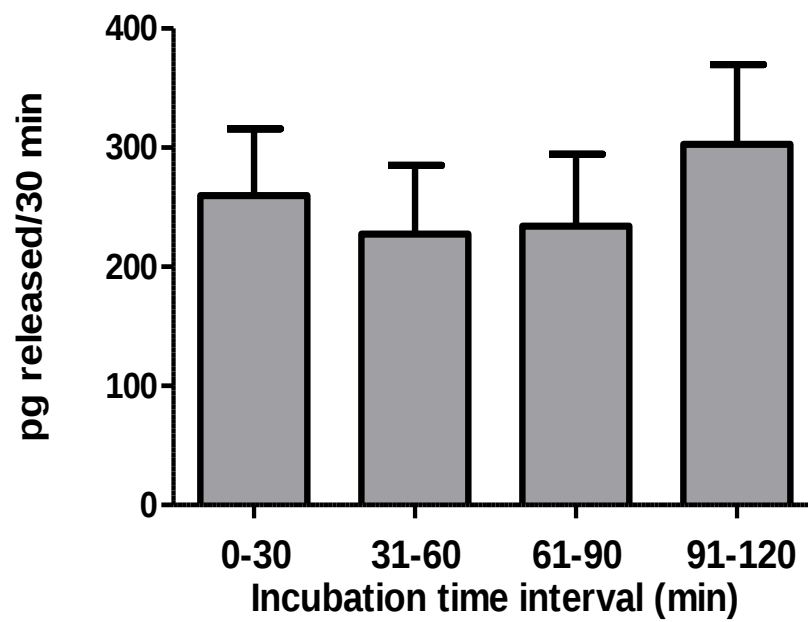
### *Conclusion*

In our study, we demonstrated the release of oxytocin by the cerebral dura mater. However, no effect of in vitro direct current stimulation on the release of oxytocin from the cerebral dura mater of Wistar rats was observed.

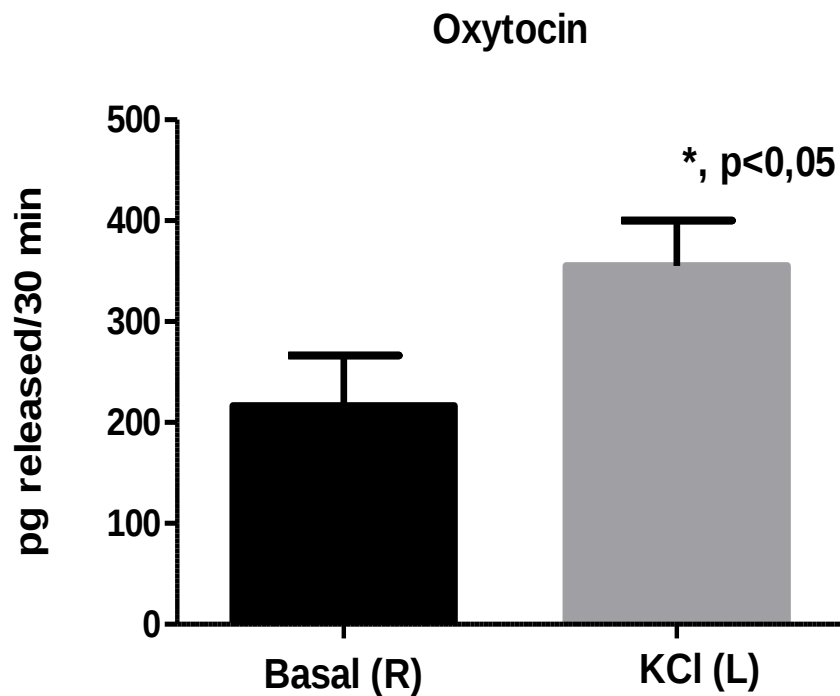
## References

1. McWhirter L, Carson A, Stone J. The body electric: a long view of electrical therapy for functional neurological disorders. *Brain*. 2015;138(Pt 4):1113–20.
2. Bindman LJ, Lippold OC, Redfearn JW. 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*. 1964;172:369–82.
3. Purpura DP, McMurtry JG. Intracellular activities and evoked potential changes during polarization of motor cortex. *J Neurophysiol*. 1965;28:166–85.
4. Siniatchkin M, Sendacki M, Moeller F, Wolff S, Jansen O, Siebner H, et al. Abnormal changes of synaptic excitability in migraine with aura. *Cereb Cortex*. 2012;22(10):2207–16.
5. Viganò A, D’Elia TS, Sava SL, Auvé M, De Pasqua V, Colosimo A, et al. Transcranial direct current stimulation (tDCS) of the visual cortex: a proof-of-concept study based on interictal electrophysiological abnormalities in migraine. *J Headache Pain*. 2013;14:23.
6. Antal A, Kriener N, Lang N, Boros K, Paulus W. Cathodal transcranial direct current stimulation of the visual cortex in the prophylactic treatment of migraine. *Cephalalgia*. 2011;31(7):820–8.
7. Woods AJ, Antal A, Bikson M, Boggio PS, Brunoni AR, Celnik P, et al. A technical guide to tDCS, and related non-invasive brain stimulation tools. *Clin Neurophysiol*. 2016;127(2):1031–48.
8. Pelletier SJ, Cicchetti F. Cellular and molecular mechanisms of action of transcranial direct current stimulation: evidence from In Vitro and In Vivo models. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015;18(2):1–13.
9. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med*. 2002;8(2):136–42.
10. Martins IP. Migraine. *Acta Med Port*. 2009;22(5):589–98.
11. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev*. 2004;84(3):903–34.
12. Zhang X-C, Strassman AM, Burstein R, Levy D. Sensitization and activation of intracranial meningeal nociceptors by mast cell mediators. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(2):806–12.
13. Tzabazis A, Mechanic J, Miller J, Klukinov M, Pascual C, Manering N, et al. Oxytocin receptor: Expression in the trigeminal nociceptive system and potential role in the treatment of headache disorders. *Cephalalgia*. 2016;36(10):943–50.
14. Lv X, Wu Z, Li Y. Innervation of the cerebral dura mater. *Neuroradiol J*. 2014;27:293–8.
15. Gupta S, Amrutkar DV, Mataji A, Salmasi H, Hay-Schmidt A, Sheykhzade M, et al. Evidence for CGRP re-uptake in rat dura mater encephali. *Br J Pharmacol*. 2010;161(8):1885–98.
16. Liebetanz D, Koch R, Mayenfels S, König F, Paulus W, Nitsche MA. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin Neurophysiol*. 2009;120(6):1161–7.
17. Ebersberger A, Aeverbeck B, Messlinger K, Reeh PW. Release of substance P, calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 from rat dura mater encephali following electrical and chemical stimulation in vitro. *Neuroscience*. 1999;89(3):901–7.
18. Artico M, Cavallotti C. Catecholaminergic and acetylcholine esterase containing nerves

- of cranial and spinal dura mater in humans and rodents. *Microsc Res Tech.* 2001;53(3):212–20.
19. Paloyelis Y, Krahé C, Maltezos S, Williams SC, Howard MA, Fotopoulou A. The analgesic effect of oxytocin in humans: a double-blind, placebo-controlled cross-over study using laser-evoked potentials. *J Neuroendocrinol.* 2016;28(4).
  20. Madrazo I, Franco-Bourland R, León-Meza V, Mena I. Intraventricular somatostatin-14, arginine vasopressin and oxytocin: analgesic effect in a patient with intractable cancer pain. *Appl Neurophysiol.* 1987;50:427–31.
  21. Jo YH, Stoeckel ME, Freund-Mercier MJ, Schlichter R. Oxytocin modulates glutamatergic synaptic transmission between cultured neonatal spinal cord dorsal horn neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1998;18(7):2377–86.
  22. Condés-Lara M, González NM, Martínez-Lorenzana G, Delgado OL, Freund-Mercier MJ. Actions of oxytocin and interactions with glutamate on spontaneous and evoked dorsal spinal cord neuronal activities. *Brain Res.* 2003;976(1):75–81.
  23. Bale TL, Davis AM, Auger AP, Dorsa DM, McCarthy MM. CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2001;21(7):2546–52.
  24. Juif P-E, Poisbeau P. Neurohormonal effects of oxytocin and vasopressin receptor agonists on spinal pain processing in male rats. *Pain.* 2013;154(8):1449–56.
  25. Gao L, Yu LC. Involvement of opioid receptors in the oxytocin-induced antinociception in the central nervous system of rats. *Regul Pept.* 2004;120(1–3):53–8.
  26. Sofroniew M V. Projections from vasopressin, oxytocin, neurophysin neurons to neural targets in the rat and human. *J Histochem Cytochemistry.* 1980;28(5):475–8.
  27. Kim SJ, Kim BK, Ko YJ, Bang MS, Kim MH, Han TR. Functional and histologic changes after repeated transcranial direct current stimulation in rat stroke model. *J Korean Med Sci.* 2010;25(10):1499–505.
  28. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol.* 2000;527.3:633–9.
  29. Utz KS, Dimova V, Oppenländer K, Kerkhoff G. Electrified minds: transcranial direct current stimulation (tDCS) and galvanic vestibular stimulation (GVS) as methods of non-invasive brain stimulation in neuropsychology--a review of current data and future implications. *Neuropsychologia.* 2010;48(10):2789–810.
  30. Buzzi MG, Carter WB, Shimizu T, Heath H, Moskowitz MA. Dihydroergotamine and sumatriptan attenuate levels of CGRP in plasma in rat superior sagittal sinus during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neuropharmacology.* 1991;30(11):1193–200.
  31. Kurosawa M, Messlinger K, Pawlak M, Schmidt RF. Increase of meningeal blood flow after electrical stimulation of rat dura mater encephali: mediation by calcitonin gene-related peptide. *Br J Pharmacol.* 1995;114(7):1397–402.
  32. Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul.* 2008;1(3):206–23.



**Figure 1.** Release of oxytocin by the hemiracria dura mater buy the control group (n =16) over time. Values are expressed as M±SEM.



**Figure 2. Basal release oxytocin and in response to stimulation with KCl (56mM) for 30 minutes by the hemicrania dura mater. For statistical analysis the nonparametric paired Wilcoxon signed-rank test was used.**

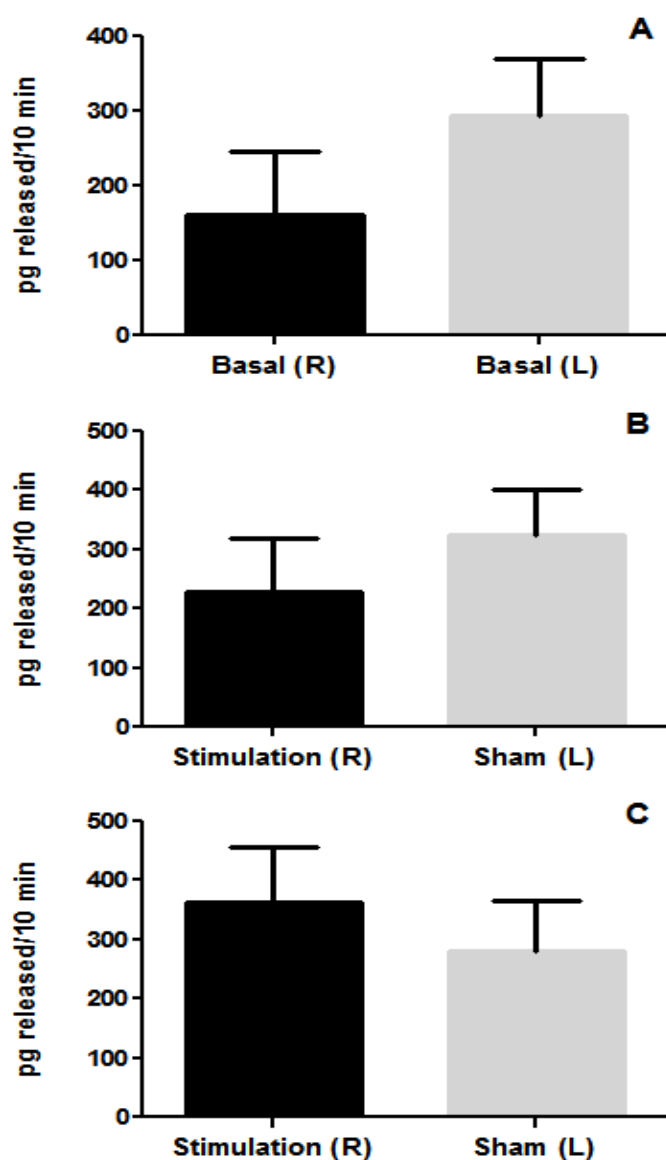
**R= right hemicrania; L= left hemicrania**

**Table 1.** Oxytocin of release by the dura mater of the rat hemisected skull in the control group, in the sham group and in the groups stimulated by anode or cathodic direct current for 10 minutes in pg/7mL

| <b>Groups</b>      |             |
|--------------------|-------------|
| Control (n=16)     | 196.6± 57.0 |
| <i>Sham</i> (n=17) | 303.7± 55.3 |
| Anodic (n=9)       | 228.5± 90.1 |
| Cathodic (n=7)     | 362.6± 92.0 |
| p*                 | 0.3628      |

Values are expressed as mean± standard error of mean.

\*Kruskal-Wallis test



**Figure 3. Release of oxytocin by cerebral dura mater in the groups studied:** in A, control group, comparison between R and L hemispheres; in B, anodic group, comparison between stimulated hemisphere (R) and *sham* (L); in C, cathodic group, comparison between stimulated hemisphere (R) and *sham* (L). For statistical analysis the nonparametric paired Wilcoxon signed-rank test was used.

R= right hemisphere; L= left hemisphere

## Apêndice B

Parâmetros elétricos da estimulação transcraniana por corrente contínua efetivos para alterações do fluxo sanguíneo cerebral de animais experimentais: uma revisão sistemática. *Revisão sistemática a ser submetida ao periódico European Journal of Neuroscience.*

### **Parâmetros elétricos da estimulação transcraniana por corrente contínua efetivos para alterações do fluxo sanguíneo cerebral de animais experimentais: uma revisão sistemática**

Camila Carolinne Silva de Almeida<sup>1</sup>, Emanuela Paz Rosas<sup>2</sup>, Eduardo José Nepomuceno Montenegro<sup>3</sup>, Marcelo Moraes Valença<sup>4</sup>, Daniella Araújo de Oliveira<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Mestranda em Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>2</sup> Doutoranda em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>3</sup> Doutor em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>4</sup> Doutor em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco

<sup>5</sup> Doutora em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco

Endereço para correspondência:

Daniella Araújo de Oliveira

E-mail: sabinodaniellaufpe@gmail.com

Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Av. Jorn. Anibal Fernandes, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, 50740-560.

Phone: + 55 (81) 2126-8937/ Fax: + 55 (81) 2126-8491

## RESUMO

**Objetivo:** Identificar os parâmetros da estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) mais eficazes para promover alterações sobre o fluxo sanguíneo cerebral de ratos. **Métodos:** Foram incluídos estudos experimentais que utilizaram a estimulação transcraniana por corrente contínua anódica e/ ou catódica comparando-as ou não a um grupo controle, ou a um grupo *sham*, em ratos. A busca foi realizada nas bases de dados CINAHAL, LILACS, MEDLINE/ PubMed, Scielo, Scopus e Web of Science. Foram utilizados os descritores do MeSH/ DeCS Transcranial direct current stimulation, Electric stimulation therapy, tDCS, Transcranial electrical stimulations, Cathodal stimulation tDCS, Anodal stimulation tDCS e rats. Os parâmetros elétricos e fluxo sanguíneo cerebral foram considerados como desfechos primários e a avaliação de alterações histológicas cerebrais como desfecho secundário. **Resultados:** Três artigos foram incluídos na revisão sistemática. De acordo, com os critérios da ferramenta SYRCLE, todos os artigos foram classificados como alto risco de viés. Os instrumentos de avaliação e os parâmetros elétricos aplicados foram heterogêneos, entretanto, viu-se que a estimulação anódica promoveu um aumento do fluxo cerebral sanguíneo e a estimulação catódica efeito contrário. Dois estudos realizaram avaliação histológica cerebral e destacaram a presença de necrose tecidual em apenas um animal de cada estudo. **Conclusão:** Diante da diversidade dos protocolos da ETCC, não foi possível determinar os parâmetros elétricos eficazes na promoção de alterações do fluxo sanguíneo cerebral em ratos. Devido ao alto risco de viés nos artigos incluídos, as evidências disponíveis sobre a eficácia da ETCC são insuficientes e inconclusivas.

**Descritores:** Transcranial direct current stimulation; tDCS; rats.

## **Introdução**

A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC), trata-se de uma técnica neuromodulatória de baixo custo, capaz de promover alteração da excitabilidade cortical e facilitar a neuroplasticidade<sup>1,2</sup>. Alterações no potencial de repouso da membrana, decorrentes da ação ETCC sobre os canais de sódio e cálcio, bem como alterações sobre os receptores N-metil D-aspartato (NMDA) tem sido os mecanismos de ação propostos para essa modulação<sup>3,4</sup>. Entretanto, sugere-se que essa técnica também promova modificações no fluxo sanguíneo cerebral da região cortical e subcortical<sup>5</sup>.

Presumindo-se que a aplicação de ETCC pode levar a mudanças relevantes no fluxo sanguíneo cerebral (FSC), esta técnica pode ser de importância terapêutica nas diversas condições que afetam a vasculatura cerebral, tais como, acidente vascular cerebral agudo e migrânea<sup>6</sup>. Desse modo, por apresentar seus mecanismos de ação pouco compreendidos esta técnica vem sendo bastante explorada em pesquisas experimentais<sup>4,7</sup>.

Os efeitos neuromodulatórios da ETCC dependem essencialmente dos parâmetros elétricos (polaridade, intensidade, densidade, amplitude, duração e tamanho e posicionamento dos eletrodos), assim como das características anatômicas individuais (espessura do crânio, por exemplo)<sup>1,8-10</sup> tornando difícil a padronização dos protocolos entre os estudos. Desse modo, a revisão sistemática teve como objetivo identificar os parâmetros elétricos da estimulação transcraniana por corrente contínua, mais eficazes para promover alterações do fluxo sanguíneo cerebral de ratos.

## **Métodos**

### *Seleção dos estudos*

A revisão sistemática foi desenvolvida a partir de uma seleção prévia de estudos, seguindo os critérios de inclusão: revisões sistemáticas ou estudos experimentais com animais que utilizaram a estimulação transcraniana por corrente contínua anódica e/ou catódica, comparando-as ou não a um grupo controle sem

intervenção e/ou a um grupo *sham*, em ratos de ambos os sexos. Foram excluídos estudos realizados em seres humanos, *in vitro* e estudos que utilizaram outras técnicas de estimulação como, eletroacupuntura, estimulação do nervo trigêmio/vago, estimulação do nervo periférico, estimulação magnética transcraniana, estimulação elétrica da medula espinal e estimulação elétrica nervosa transcutânea.

Os desfechos primários verificados foram: parâmetros elétricos (intensidade, tamanho e posicionamento dos eletrodos, tempo e frequência da estimulação) e fluxo sanguíneo cerebral. A avaliação da presença de alterações histológicas cerebrais provocadas pela ETCC foi considerada como desfecho secundário.

#### *Fontes de dados e pesquisas*

A pesquisa dos artigos foi realizada em revistas indexadas nas bases de dados CINAHAL, LILACS, MEDLINE/PubMed, Scielo, Scopus e Web of Science. Os descritores utilizados seguiram a descrição de termos do MeSH e DeCS: Transcranial direct current stimulation, Electric stimulation therapy, tDCS, Transcranial electrical stimulations, Cathodal stimulation tDCS, Anodal stimulation tDCS e rats. As combinações dos termos entre tais palavras foram realizadas utilizando o operador booleano AND, sem restrição linguística ou de ano de publicação. A pesquisa foi realizada entre dezembro de 2015 e janeiro de 2016.

#### *Extração de dados e avaliação da qualidade*

Inicialmente, dois revisores independentes (Almeida, CCS e Rosas, EP) avaliaram os títulos e os resumos identificados pela busca eletrônica para a seleção dos estudos enquadrados dentro dos critérios de elegibilidade.

A avaliação da qualidade metodológica e do risco de viés dos estudos foi realizada pelos dois revisores (Almeida, CCS e Rosas, EP) de forma independente, utilizando-se critérios específicos que interferem na validade interna dos estudos experimentais, de acordo com os seguintes pontos destacados por Hooijmans *et al.*, 2010: alojamento, iluminação, temperatura, água/dieta, randomização dos grupos e aspectos éticos<sup>11</sup>. Acrescido a isso, para avaliação do risco de viés dos estudos,

utilizamos a ferramenta SYRCLE disponibilizada pela SYRCLE at Central Animal Laboratory<sup>12</sup>.

Finalizado o processo de coleta dos dados, avaliou-se a viabilidade da construção de uma metanálise, entretanto, não foi possível devido às diferenças metodológicas dos estudos.

## Resultados

Inicialmente foram encontrados 165 artigos na base de dados CINAHAL, 827 artigos na LILACS, 57 na MEDLINE/PubMed, 0 artigo no Scielo, 978 artigos na Scopus e 242 artigos na base de dados Web of Science, totalizando 2269 artigos.

Dos 2269 artigos encontrados inicialmente pela busca eletrônica nas bases de dados, 2254 foram excluídos após a análise dos títulos por não atenderem aos critérios de elegibilidade. Dos 15 artigos selecionados, nove foram eliminados por duplicidade. A leitura do resumo foi realizada nos seis artigos restantes<sup>7,13-17</sup>, e três deles foram removidos. Um artigo foi removido por se tratar de uma revisão de literatura<sup>13</sup> e os outros dois por não se tratarem da técnica ETCC<sup>16,17</sup>. Todos os três artigos restantes foram incluídos após a leitura na íntegra de cada um deles<sup>7,14,15</sup> (Figura 1).

A Tabela 1 apresenta a avaliação da validade interna dos artigos referentes à qualidade dos biotérios de acordo com os itens destacados por Hooijmans *et al.*, 2010. Nela podemos observar que dos três artigos incluídos, dois artigos apresentaram informações de 100% dos itens<sup>7,15</sup> e um apresentou informação de apenas 20% do itens, relacionada aos aspectos éticos do estudo<sup>14</sup>.

De acordo, com a ferramenta SYRCLE, os três estudos incluídos preencheram os critérios para serem classificados como sendo de alto risco de viés<sup>7,14,15</sup> (Tabela 2). Nenhum dos estudos apresentou informações referentes a sequência de alocação, randomização dos animais, bem como, o mascaramento durante a execução da intervenção, avaliação dos resultados e análise estatística dos dados.

As características dos artigos estão dispostas na Tabela 2 por ordem cronológica de publicação. Nela podemos constatar que todos os estudos utilizaram ratos machos da espécie Sprague-Dawley e realizaram anestesia dos animais com

isoflurano antes da aplicação da ETCC. Quanto à polaridade aplicada observa-se que um estudo realizou ETCC anódica e ETCC catódica<sup>7</sup>, um estudo realizou apenas ETCC catódica<sup>15</sup> e um estudo realizou apenas a ETCC anódica<sup>14</sup>.

Os protocolos de ETCC dos três artigos estão resumidos na Tabela 3. Em dois dos artigos incluídos é possível observar semelhanças apenas nos pontos de referência para aplicação do eletrodo e na duração da estimulação<sup>7,15</sup>. Os demais parâmetros de estimulação, tais como, intensidade, frequência da corrente e o tamanho do eletrodo ativo variaram em todos os artigos<sup>7,14,15</sup>.

A Tabela 4 traz uma síntese dos principais achados dos estudos sobre as alterações do fluxo sanguíneo cerebral assim como das análises histológicas do tecido cerebral após a estimulação transcraniana por corrente contínua. Os três estudos apresentaram instrumentos distintos de avaliação do fluxo sanguíneo cerebral: fluxometria por laser doppler<sup>7</sup>; *laser doppler imaging*<sup>15</sup>; espectroscopia de infravermelho próximo<sup>14</sup>. Apesar disso, as alterações produzidas no fluxo sanguíneo cerebral pela ETCC foram semelhantes.

Analizando os efeitos da polaridade da corrente utilizada sobre as alterações do fluxo sanguíneo cerebral, constata-se que nos dois estudos que utilizaram a ETCC anódica<sup>7,14</sup> foi observado aumento significativo do fluxo sanguíneo cerebral e nos dois estudos que utilizaram ETCC catódica<sup>7,15</sup> uma redução significativa do fluxo sanguíneo cerebral.

Com relação à duração dos efeitos da ETCC, um estudo concluiu que, as intensidades mais altas (50 e 100  $\mu\text{A}$ ) da ETCC anódica promoveram um aumento do fluxo sanguíneo cerebral durante até 30 minutos após o término da estimulação e que a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral decorrente da ETCC catódica também foi igualmente dependente da intensidade da corrente aplicada. Desse modo, a intensidade de 100  $\mu\text{A}$  reduziu aproximadamente 25% do fluxo sanguíneo cerebral, persistindo por pelo menos 30 minutos. Nas intensidades de 25 e 50  $\mu\text{A}$  o fluxo sanguíneo cerebral restabeleceu seus níveis basais dentro de 30 minutos<sup>7</sup>.

O segundo estudo observou uma redução de até 50% do fluxo sanguíneo cerebral e duração dos efeitos se estendendo por até 90 minutos após a ETCC catódica

(intensidade= 600  $\mu$ A; área total do eletrodo ativo= 10,5mm<sup>2</sup>)<sup>15</sup>. Por fim, a avaliação da ETCC anódica no terceiro estudo demonstrou aumento do fluxo sanguíneo cerebral durante todo o tempo de estimulação (intensidade= 200  $\mu$ A; duração= 10 minutos) e uma redução logo após o término da ETCC<sup>14</sup>.

Dois dos estudos realizaram análises histológicas do tecido cerebral<sup>7,15</sup> e encontraram sinais de degeneração axonal, indicando presença de necrose em apenas um animal de cada estudo.

## Discussão

Apesar dos resultados dos estudos incluídos nesta revisão sistemática demonstrarem a capacidade da ETCC promover alterações no fluxo sanguíneo cerebral de ratos, a heterogeneidade dos protocolos dos estudos impossibilitou a determinação dos parâmetros ideais. Além disso, o alto risco de viés dos estudos pode comprometer a análise final desses resultados com relação a real eficácia desta técnica.

A avaliação da validade interna dos artigos pelos itens destacados por Hooijmans *et al.*, 2010, demonstram que dois estudos obtiveram pontuação máxima e um trouxe informações referentes apenas aos aspectos éticos. A validade e a confiabilidade de tais estudos são maximizadas quando materiais, animais e métodos são seguros e reproduzíveis. As condições do alojamento, iluminação, temperatura, água/ dieta influenciam diretamente nas respostas dos animais. Assim, conhecer as características das variáveis que influenciam a qualidade de vida dos animais é determinante para obtenção de resultados confiáveis e defensáveis do ponto de vista ético<sup>18</sup>.

Acrescido a isso, identificamos pela ferramenta CYRCLE o alto risco de viés dos estudos. Apenas um dos estudos utilizou um delineamento do tipo cross-over que apresenta com vantagem permitir que cada animal incluído no estudo seja seu próprio controle<sup>19</sup>. Entretanto, os demais estudos não tiveram grupo controle para comparação dos resultados. Sabe-se que a ausência de um grupo controle torna difícil distinguir se os efeitos ocorreriam ou não sem a utilização da ETCC<sup>20</sup>.

Nenhum dos estudos referiu realização de randomização, ferramenta importante que minimiza o viés de seleção e, desse modo, evita interferência direta no resultado do tratamento<sup>21,22</sup>. Quanto ao controle relativo do mascaramento do avaliador com relação a aplicação da técnica e posterior, análise dos dados, nada foi mencionado pelos estudos. Sabe-se que o mascaramento constitui-se em uma importante ferramenta para o desenho de estudo experimental, tendo como objetivo principal minimizar o viés de aferição e de avaliação dos desfechos, evitando uma interferência direta do pesquisador no resultado do tratamento<sup>21,22</sup>.

Os instrumentos utilizados para avaliação do fluxo sanguíneo cerebral dos animais foram diferentes. Os métodos de Fluxometria por Laser Doppler e Imagem Laser Doppler fornecem uma avaliação quantitativa e direta do fluxo sanguíneo<sup>23</sup>, entretanto, na Espectroscopia de Infravermelho Próximo o fluxo sanguíneo cerebral é obtido pela medida indireta das variações das concentrações absolutas de hemoglobina (Hb) e oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>)<sup>24</sup>.

Ademais, os protocolos experimentais dos estudos incluídos nesta revisão revelam a ausência de padronização dos parâmetros elétricos para obtenção de alteração imediata no fluxo sanguíneo cerebral. A intensidade da corrente aplicada variou de 25 a 700  $\mu$ A e a duração da estimulação entre 10 e 15 minutos. O posicionamento e tamanho do eletrodo de referência foram homogêneos entre os estudos, entretanto, o mesmo não pode ser dito em relação ao eletrodo ativo que apresentaram uma variação de área de contato de 3,5 a 14 mm<sup>2</sup>. Essas divergências também podem ser vistas em estudos envolvendo humanos que demonstram que os efeitos produzidos pela ETCC sobre o córtex cerebral são variáveis e dependentes da polaridade da corrente, área estimulada, duração, intensidade e densidade<sup>1,25,26</sup>.

Entretanto, cabe ressaltar que apesar dessas diferenças nos instrumentos de avaliação e nos protocolos de estimulação, os resultados apresentados sobre o fluxo sanguíneo cerebral foram semelhantes. Constatou-se que a estimulação anódica promoveu um aumento do fluxo cerebral sanguíneo dos animais, ao passo que a estimulação catódica apresentou efeitos contrários. Esses achados corroboram resultados da avaliação dessa corrente sobre alterações no fluxo sanguíneo cerebral de

14 indivíduos saudáveis, no qual, foi observado que a estimulação anódica induziu o aumento (17,1%) no fluxo sanguíneo cerebral e a estimulação catódica induziu a uma diminuição significativa em relação à linha de base (-6,5%)<sup>27</sup>.

Assim sendo, constatação de que a ETCC é capaz de promover modificações no fluxo sanguíneo cerebral tem atraído o interesse de sua utilização na prática clínica. Sabe-se que diversas condições que afetam a vasculatura cerebral podem gerar danos cumulativos e, conseqüentemente, a deterioração da função cerebral<sup>6</sup> e que, o aumento do fluxo sanguíneo local, e conseguinte aumento no aporte de glicose e oxigênio podem promover melhora desta função cerebral<sup>28</sup>.

Entretanto, para promover uma expansão da aplicabilidade terapêutica desta técnica, faz-se necessário superar os desafios relacionados à determinação dos parâmetros de estimulação.

## **Conclusão**

A presente revisão sistemática foi inconclusiva na determinação dos parâmetros elétricos da ETCC eficazes para promover alterações sobre alterações do fluxo sanguíneo cerebral de ratos devido a grande heterogeneidade nos protocolos utilizados. Com base nos dados observados, pode-se concluir que há alto risco de viés nos estudos disponíveis. Assim, sugere-se que novos estudos experimentais com intuito de estabelecer um protocolo-padrão para ETCC sejam projetados com maior rigor metodológico e poder de amostragem, utilizando controle da ocultação da alocação, mascaramento e randomização. Além disso, os protocolos devem ser detalhados e reprodutíveis.

## Referências

1. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol*. 2000;527.3:633–9.
2. Nitsche MA, Paulus W. Transcranial direct current stimulation--update 2011. *Restor Neurol Neurosci*. 2011;29(6):463–92.
3. Stagg CJ NM. Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *Neuroscientist*. 2011;17:37–53.
4. Kim SJ, Kim BK, Ko YJ, Bang MS, Kim MH, Han TR. Functional and histologic changes after repeated transcranial direct current stimulation in rat stroke model. *J Korean Med Sci*. 2010;25(10):1499–505.
5. Lang N, Siebner HR, Ward NS, Lee L, Nitsche MA, Paulus W, et al. How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? *Eur J Neurosci*. 2005;22(2):495–504.
6. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, Decarli C, Greenberg SM, Iadecola C, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2011;42(9):2672–713.
7. Wachter D, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Taghizadeh-Waghefi A, Nitsche MA, Kutschenko A, et al. Transcranial direct current stimulation induces polarity-specific changes of cortical blood perfusion in the rat. *Exp Neurol*. 2011;227(2):322–7.
8. Garnett EO, Malyutina S, Datta A, den Ouden D-B. On the use of the terms anodal and cathodal in high-definition transcranial direct current stimulation: A technical note. *Neuromodulation Technol Neural Interface*. 2015;18(8):705–13.
9. Liebetanz D, Koch R, Mayenfels S, König F, Paulus W, Nitsche MA. Safety limits of cathodal transcranial direct current stimulation in rats. *Clin Neurophysiol*. 2009;120(6):1161–7.
10. Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul*. 2008;1(3):206–23.
11. Hooijmans CR, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M. A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the three Rs, and to make systematic reviews more feasible. *ATLA Altern to Lab Anim*. 2010;38(2):167–82.
12. Hooijmans CR, Rovers MM, Vries RBM De, Leenaars M, Ritskes-hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res*

Methodol. 2014;14(1):1–9.

13. Dutta A. Bidirectional interactions between neuronal and hemodynamic responses to transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges for brain-state dependent tDCS. *Front Syst Neurosci*. 2015;9:1–7.
14. Han CH, Song H, Kang YG, Kim BM, Im CH. Hemodynamic responses in rat brain during transcranial direct current stimulation: a functional near-infrared spectroscopy study. *Biomed Opt Express*. 2014;5(6):1812–21.
15. Mielke D, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Taghizadeh-Waghefi A, Nitsche M a, Rohde V, et al. Cathodal transcranial direct current stimulation induces regional, long-lasting reductions of cortical blood flow in rats. *Neurol Res*. 2013;35(10):1029–37.
16. Urban A, Mace E, Brunner C, Heidmann M, Rossier J, Montaldo G. Chronic assessment of cerebral hemodynamics during rat forepaw electrical stimulation using functional ultrasound imaging. *Neuroimage*. 2014;101:138–49.
17. Visocchi M. Neuromodulation of cerebral blood flow by spinal cord electrical stimulation: the role of the Italian school and state of art. *J Neurosurg Sci*. 2008;52(2):41–7.
18. Deguchi BGF, Tamioso PR, Molento CFM. Percepção de equipes laboratoriais quanto a questões de bem-estar animal. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2016;68(1):48–56.
19. Ding H, Hu GL, Zheng XY, Chen Q, Threapleton DE, Zhou ZH. The method quality of cross-over studies involved in Cochrane Systematic Reviews. *PLoS One*. 2015;10(4):1–8.
20. Pithon MM. Importance of the control group in scientific research. *Dental Press J Orthod*. 2013;18(6):13–4.
21. Leal C, Bezerra A, Lemos A. A efetividade do laser de HeNe 632,8 nm no reestabelecimento da integridade dos tecidos cutâneos em animais experimentais: revisão sistemática. *Fisioter e Pesqui*. 2012;19(3):290–6.
22. Montori VM, Guyatt GH. Intention-to-treat principle. *CMAJ*. 2001;165(10):1339–41.
23. Corrêa MJU, Perazzio SF, Andrade LEC, Kayser C. Laser doppler imaging para quantificação do fluxo sanguíneo de polpa digital em condições basais e após estímulo frio em pacientes com esclerose sistêmica. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(2):128–40.
24. Lima A, Bakker J. Espectroscopia no infravermelho próximo para a monitorização da perfusão tecidual. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(3):341–51.

25. Woods AJ, Antal A, Bikson M, Boggio PS, Brunoni AR, Celnik P, et al. A technical guide to tDCS, and related non-invasive brain stimulation tools. *Clin Neurophysiol.* 2016;127(2):1031–48.
26. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol.* 2000 Sep 15;527.3:633–9.
27. Zheng X, Alsop DCD, Schlaug G. Effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on human regional cerebral blood flow. *Neuroimage.* 2011;58(1):617–32.
28. Pulgar VM. Direct electric stimulation to increase cerebrovascular function. *Front Syst Neurosci.* 2015;9:1–5.

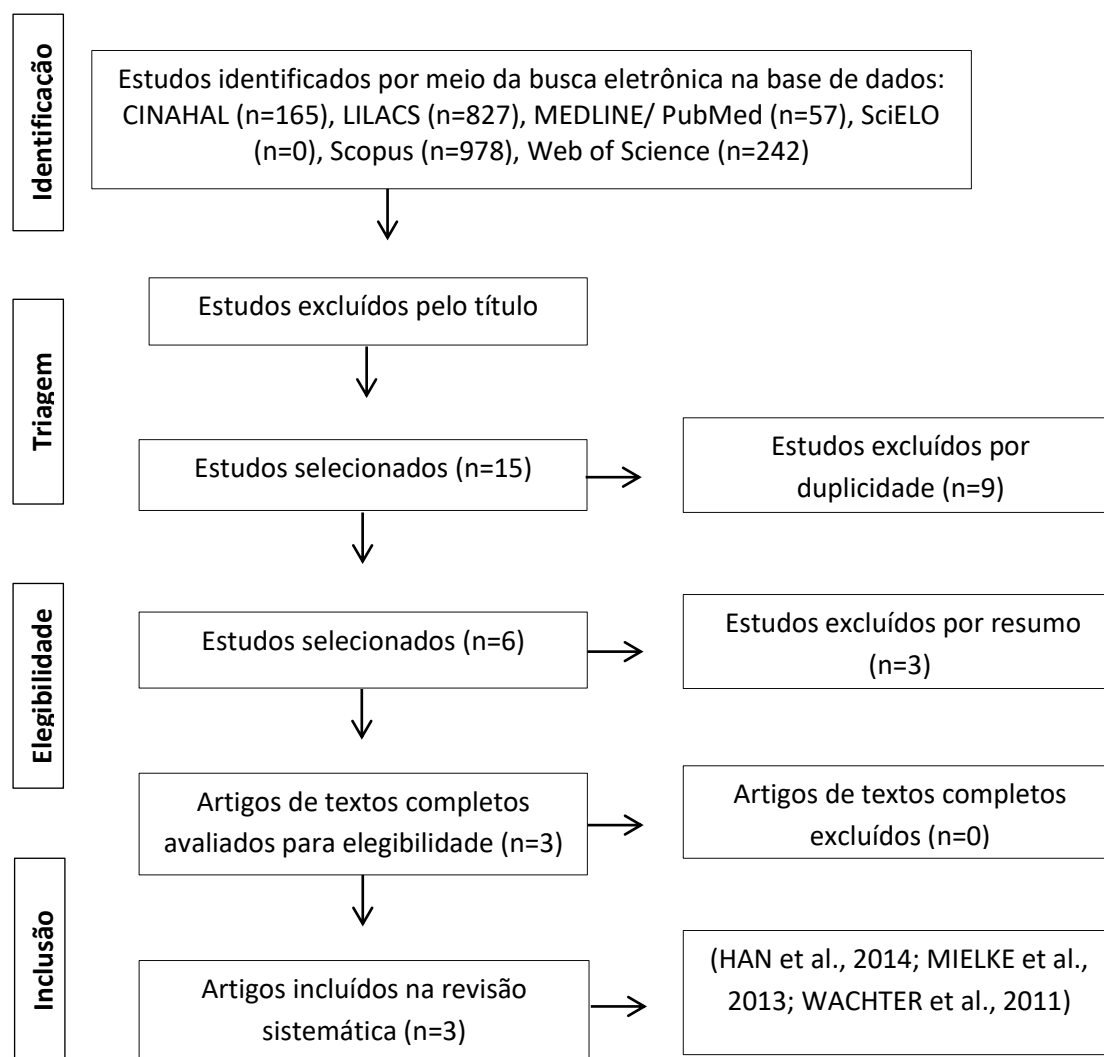


Figura 1. Fluxograma da seleção dos artigos de acordo com Preferred Reported Items for Systematic Review and Meta-Analyses (PRISMA)

**Tabela 1:** Avaliação da qualidade do biotério pelos itens destacados por Hooijmans *et al.*, 2010

| Autor/ ano            | Alojamento | Iluminação | Temperatura | Água/dieta | Aspectos éticos |
|-----------------------|------------|------------|-------------|------------|-----------------|
| WACHTER, et al., 2011 | +          | +          | +           | +          | +               |
| MIELKE et al., 2013   | +          | +          | +           | +          | +               |
| HAN et al, 2014       | -          | -          | -           | -          | +               |

(+) informação presente; (-) informação ausente.

**Quadro 1.** Avaliação do risco de viés dos estudos incluídos, de acordo com os critérios de Hooijmans *et al.*, 2014

| Questões                                                                                                                       | Estudos               |                     |                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|
|                                                                                                                                | WACHTER, et al., 2011 | MIELKE et al., 2013 | HAN et al, 2014 |
| 1) A sequência de alocação foi adequadamente gerada e aplicada?                                                                | não                   | não                 | não             |
| 2) Os grupos foram semelhantes na linha de base?                                                                               | sim                   | não                 | não             |
| 3) A alocação aos diferentes grupos foi adequadamente ocultada?                                                                | não                   | ?                   | não             |
| 4) Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento?                                                             | não                   | não                 | não             |
| 5) Houve cegamento dos cuidadores e/ou investigadores com relação a intervenção que cada animal recebeu durante o experimento? | não                   | não                 | não             |
| 6) Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação do resultado?                                                   | não                   | não                 | não             |
| 7) Houve cegamento do avaliador dos resultados?                                                                                | não                   | não                 | não             |
| 8) Os resultados incompletos foram adequadamente tratados?                                                                     | sim                   | sim                 | Sim             |
| 9) Os relatórios do estudo estão isentos de relatos seletivos de resultados?                                                   | sim                   | sim                 | sim             |
| 10) O estudo aparentemente estava livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés?                       | sim                   | sim                 | sim             |

sim = baixo risco de viés; não = alto risco de viés; ? = risco de viés incerto

**Quadro 2:** Características dos estudos selecionados, dispostos por ordem cronológica de publicação

| <b>Autor/ano</b>     | <b>Desenho do estudo</b> | <b>Espécie</b> | <b>Sexo</b> | <b>Peso médio (g)</b> | <b>Anestesia</b>                               | <b>Estimulação</b>  |
|----------------------|--------------------------|----------------|-------------|-----------------------|------------------------------------------------|---------------------|
| WACHTER et al., 2011 | Cross-over               | Sprague-Dawley | Macho       | 310                   | Isoflurano (1,0-1,5%; fluxo de 1,8-2,0 l/ min) | Anódica<br>Catódica |
| MIELKE et al., 2013  | Experimental             | Sprague-Dawley | Macho       | 290                   | Isoflurano (1,0-1,5%; fluxo de 1,8-2,0 l/ min) | Catódica            |
| HAN et al, 2014      | Experimental             | Sprague-Dawley | Macho       | 300-350               | Isoflurano                                     | Anódica             |

g (gramas); l/min (litros/minuto).

**Quadro 3:** Protocolos da ETCC via epicraniana utilizados nos artigos selecionados, dispostos por ordem cronológica de publicação

| Autor/ano            | Grupos (N)               | Intensidades    | Eletrodos          |                      |                                                               |                                                               | Duração                 | Frequência                                                  |                     |
|----------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------|
|                      |                          |                 | Tamanho            |                      | Localização                                                   |                                                               |                         |                                                             |                     |
|                      |                          |                 | EA                 | ER                   | EA                                                            | ER                                                            |                         |                                                             |                     |
| WACHTER et al., 2011 | Anódica (N= 8)           | 25 µA           | 3,5mm <sup>2</sup> | 10,5 cm <sup>2</sup> | 2 mm atrás da sutura coronal e 4 mm ao lado da sutura sagital | Região ventral do tórax                                       | 15 min                  | 6 sessões/ rato<br>(intervalo de 48 horas entre as sessões) |                     |
|                      | Catódica (N= 8)          | 50 µA<br>100 µA |                    |                      |                                                               |                                                               |                         |                                                             |                     |
|                      | Catódica (N= 21)<br>n(3) | 200 µA          |                    |                      |                                                               |                                                               |                         |                                                             | 3,5 mm <sup>2</sup> |
| MIELKE et al., 2013  | <b>E1 (n=9)</b>          | n(3)            | 400 µA             | 7,0 mm <sup>2</sup>  | 10,5 cm <sup>2</sup>                                          | 2 mm atrás da sutura coronal e 4 mm ao lado da sutura sagital | Região ventral do tórax | 15 min                                                      | 1 sessão/ rato      |
|                      |                          | n(3)            | 600 µA             | 10,5 mm <sup>2</sup> |                                                               |                                                               |                         |                                                             |                     |
|                      | <b>E2 (n=6)</b>          | n(3)            | 400 µA             | 10,5 mm <sup>2</sup> | 10,5 cm <sup>2</sup>                                          | 2 mm atrás da sutura coronal e 4 mm ao lado da sutura sagital | Região ventral do tórax | 15 min                                                      | 1 sessão/ rato      |
|                      |                          | n(3)            | 600 µA             | 10,5 mm <sup>2</sup> |                                                               |                                                               |                         |                                                             |                     |

|                 |                |      |             |                      |                      |                                                                                                |                         |        |                |
|-----------------|----------------|------|-------------|----------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------|----------------|
|                 | <b>E3</b>      | n(3) | 600 $\mu$ A | 14,0 mm <sup>2</sup> | 10,5 cm <sup>2</sup> | 2 mm atrás da sutura coronal e 4 mm ao lado da sutura sagital                                  | Região ventral do tórax | 15 min | 1 sessão/ rato |
|                 | <b>(n=6)</b>   | n(3) | 700 $\mu$ A | 14,0 mm <sup>2</sup> |                      |                                                                                                |                         |        |                |
| HAN et al, 2014 | Anódica (N=12) |      | 200 $\mu$ A | 3,5 mm <sup>2</sup>  |                      | Córtex direito (2 mm posteriores a partir do bregma e 5 mm laterais a partir do ponto mediano) | Região ventral do tórax | 10 min |                |

N (número total da amostra); n (número da amostra no grupo); EA (eletrodo ativo; ER (eletrodo de referência); E1 (experimento 1); E2 (experimento 2); E3 (experimento 3);  $\mu$ A (microampère); mm<sup>2</sup> (milímetro quadrado); cm<sup>2</sup> (centímetro quadrado); min (minuto).

**Quadro 4:** Resultados encontrados nos protocolos da ETCC via epicraniana utilizados nos artigos selecionados sobre o fluxo sanguíneo cerebral, dispostos por ordem cronológica de publicação

| Autor, ano           | Instrumentos de Avaliação     | ETCCA                    |           |                                                                                                                       | ETCCC                                         |           |                                                                                                                                                     |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                      |                               | Fluxo Sanguíneo Cerebral |           | Análise histológica                                                                                                   | Fluxo Sanguíneo Cerebral                      |           | Análise histológica                                                                                                                                 |
| WACHTER et al., 2011 | Fluxometria por Laser Doppler | 25 $\mu$ A               | Ø         | Lesão unilateral no córtex parieto occipital adjacente ao eletrodo- sinais de degeneração axonal, necrose em 1 animal | 25 $\mu$ A                                    | ↓ FSC     | Lesão unilateral no córtex da região parieto-occipital adjacente ao eletrodo- sinais de degeneração axonal, necrose em 1 animal                     |
|                      |                               | 50 $\mu$ A               | ↑ 18% FSC |                                                                                                                       | 50 $\mu$ A                                    | ↓ 25% FSC |                                                                                                                                                     |
|                      |                               | 100 $\mu$ A              | ↑ 25% FSC |                                                                                                                       | 100 $\mu$ A                                   | ↓ FSC     |                                                                                                                                                     |
| MIELKE et al., 2013  | Imagem Laser Doppler          | NA                       | NA        | NA                                                                                                                    | E1                                            | ↓ FSC     | Ausência de achados patológicos como gliose, edema, necrose ou hemorragia, com exceção de um animal que foi encontrada degeneração axonal, necrose. |
|                      |                               |                          |           |                                                                                                                       | * I=600 $\mu$ A;<br>TEA= 10,5 mm <sup>2</sup> |           |                                                                                                                                                     |
|                      |                               |                          |           |                                                                                                                       | E2                                            | Ø         |                                                                                                                                                     |
|                      |                               |                          |           |                                                                                                                       | - I=400 $\mu$ A;<br>TEA= 10,5 mm <sup>2</sup> |           |                                                                                                                                                     |
|                      |                               |                          |           |                                                                                                                       | E3                                            |           |                                                                                                                                                     |

|                    |                                                      |                                                                                                                |    |                                               |       |    |
|--------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-----------------------------------------------|-------|----|
|                    |                                                      |                                                                                                                |    | # I=700 $\mu$ A;<br>TEA= 14,0 mm <sup>2</sup> | ↓ FSC |    |
| HAN et al,<br>2014 | Espectroscopia de<br>Infravermelho<br>Próximo (NIRS) | <b>↑Oxi-Hb durante ETCC</b><br><b>↓Oxi-Hb após ETCC</b><br>*Essas mudanças podem<br>refletir alterações no FSC | NA |                                               | NA    | NA |

---

FSC (fluxo sanguíneo cerebral); NA (não avaliado); Ø Nenhuma redução significativa em relação aos demais grupos do experimento; \*Redução significativa desse grupo em relação aos demais grupos do experimento 1; # Redução significativa desse grupo em relação aos demais grupos do experimento.

## Apêndice C

Evidências sobre a imunorreatividade da ocitocina e sua relação com a dor em modelos de experimentação animal: Uma revisão. *Artigo submetido ao periódico Headache Medicine.*

### **Evidências sobre a imunorreatividade da ocitocina e sua relação com a dor em modelos de experimentação animal: Uma revisão**

Evidence of immunoreactivity to oxytocin and its relationship to pain in animal experimentation models: A review

Camila Carolinne Silva de Almeida<sup>1</sup>, Emanuela Paz Rosas<sup>2</sup>, Amanda Araújo da Silva<sup>3</sup>, Marcelo Moraes Valença<sup>3</sup>, Eduardo José Nepomuceno Montenegro<sup>1</sup>, Daniella Araújo de Oliveira<sup>1,3</sup>

1. Programa de Pós-graduação em Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco- Recife, PE, Brasil
2. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Pernambuco- Recife, PE, Brasil
3. Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco- Recife, PE, Brasil

Endereço para correspondência:

Daniella Araújo de Oliveira

E-mail: sabinodaniellaufpe@gmail.com

Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Av. Jorn. Anibal Fernandes, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil, 50740-560.

Phone: + 55 (81) 2126-8937/ Fax: + 55 (81) 2126-8491

## Resumo

A ocitocina é um hormônio sintetizado nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo, armazenado na hipófise posterior e liberado na corrente sanguínea e em diferentes partes do sistema nervoso. Estudos apontam seus efeitos analgésicos, tornando-o um possível agente terapêutico. Desse modo, o objetivo dessa revisão foi apresentar a evidência da expressão de imunorreatividade à ocitocina no sistema nervoso e sua contribuição na modulação endógena da dor em modelos de experimentação animal. Foi realizado levantamento na literatura, no período de fevereiro de 2017, nas bases de dados LILACS, MEDLINE/ PubMed, SciELO, utilizando os descritores do MeSH/ DeCS: ocitocina, dor e analgesia e seus equivalentes em inglês e o operador booleano AND. Não foi aplicada restrição de ano de publicação e nem de idioma durante a busca. Do total de 774 artigos identificados, seis foram selecionados após avaliação dos critérios de elegibilidade. Imunorreatividade à ocitocina foi identificada em estruturas do sistema nervoso central, relacionadas ao controle nociceptivo (bulbo, mesencéfalo, medula espinal) e no sistema nervoso entérico. Evidências dos diversos modelos experimentais de dor apresentados destacam a importância da ocitocina na modulação endógena da dor, entretanto, as formas de atuação desse hormônio nesses diferentes modelos são distintas. Sugere-se que a ocitocina promova um bloqueio das informações periféricas das fibras aferentes A-delta e C que fazem sinapse na medula espinal.

Palavras-chave: Ocitocina; Analgesia; Sistema nervoso central; Animais; Ratos

## Abstract

Oxytocin is a hormone synthesized in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus, stored in the neurohypophysis and released into the bloodstream and into different parts of the nervous system. Some studies point to its analgesic effects, making it become a possible therapeutic agent. This way, the objective of this review has been to present evidence of the expression of immunoreactivity to oxytocin in the nervous system and its contribution in the endogenous modulation of pain in experimental animal models. It has been performed a search in the literature, in the period of February 2017, in the databases LILACS, MEDLINE / PubMed, SciELO, using the descriptors of MeSH / DeCS: oxytocin, pain and analgesia and their equivalents in English and the Boolean operator AND. No year of publication or language restriction was applied during the search. From the 774 articles identified, six were selected after assessing the eligibility criteria. Immunoreactivity to oxytocin has been identified in structures of the central nervous system, related to the nociceptive control (bulb, mesencephalon, spinal cord) and the enteric nervous system. Evidences from the various experimental models of pain presented highlight the importance of oxytocin in the endogenous modulation of pain; however, the forms of action of this hormone in these different models are distinct. It is suggested that oxytocin promotes a blockade of the peripheral information of afferent A-delta and C fibers that synapse in the spinal cord.

Keywords: Oxytocin; Anesthesia and analgesia; Central nervous system; Animals; Rats

## Introdução

A ocitocina é um hormônio sintetizado nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo, armazenado na hipófise posterior e liberado em grande parte na corrente sanguínea atuando em vias periféricas e, além disso, sabe-se que quantidades significativas são transportadas ao longo de axônios ou dendritos e liberadas em diferentes partes do sistema nervoso central<sup>1-3</sup>.

No sistema nervoso periférico, a ocitocina exerce função primordial durante o parto<sup>4</sup> e na lactação<sup>5</sup>. Por outro lado, no sistema nervoso central, além de desempenhar funções importantes relacionadas ao comportamento sexual<sup>6</sup>, resposta ao estresse<sup>7</sup>, ação ansiolítica<sup>8,9</sup>, acredita-se que esse hormônio atue como modulador endógeno da dor<sup>10</sup>, tornando-o um possível agente terapêutico<sup>11</sup>.

Desse modo, por este hormônio apresentar funções distintas a depender dos seus locais de ação, torna-se imprescindível o conhecimento das estruturas anatômicas relacionadas à função antinociceptiva do sistema nervoso que apresentam imunorreatividade à ocitocina. O objetivo dessa revisão foi apresentar a evidência da expressão de imunorreatividade à ocitocina do sistema nervoso e sua contribuição na modulação endógena da dor em modelos de experimentação animal.

## Métodos

Foi realizado levantamento na literatura, no período de fevereiro de 2017, na base de dados LILACS, MEDLINE/ PubMed, SciELO. Para estratégia de busca foi utilizada a descrição de termos do MeSH e DeCS: ocitocina, dor e analgesia e seus equivalentes em inglês (oxytocin, pain, analgesia). As combinações dos termos entre tais palavras foram realizadas utilizando o operador booleano AND. Não foi aplicada restrição de ano de publicação e nem de idioma durante a busca. Foram excluídos estudos em humanos. A análise utilizada nesta revisão investigou os seguintes aspectos nos estudos: 1- Imunorreatividade à ocitocina nas estruturas do sistema nervoso central e

periférico; 2- contribuição da ocitocina na modulação endógena da dor nos modelos experimentais.

*Imunorreatividade à ocitocina nas estruturas do sistema nervoso central e periférico*

O hipotálamo tem um papel crucial na regulação da função hipofisária e apresenta núcleos neurosecretores nas suas porções anterior e medial. Na porção anterior do hipotálamo encontram-se os núcleos supraóptico e paraventricular, assim como, os neurônios magnocelulares. Dentre as funções do hipotálamo, merece destaque a produção de dois hormônios, a ocitocina e a arginina vasopressina<sup>2</sup>.

Os núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo são as estruturas anatômicas responsáveis pela síntese e a hipófise posterior é responsável pelo armazenamento e liberação da ocitocina. Sabe-se que a maioria da ocitocina é secretada na corrente sanguínea, entretanto, evidências demonstram sua liberação no sistema nervoso central, a partir, de projeções de neurônios magnocelulares ocitocinérgicos, provenientes do núcleo paraventricular do hipotálamo<sup>1,2,12</sup>.

Em ratos, observou-se um predomínio de fibras nervosas contendo ocitocina nos núcleos dos nervos cranianos, situados na substância cinzenta do bulbo (parte medial do núcleo do trato solitário, núcleo dorsal do vago) e na substância negra do mesencéfalo e nas lâminas I, III e X e núcleo intermédio medial da medula espinal. A comparação desses resultados em animais com análises de amostras obtidas em autópsias do segmento cervical superior da medula espinal de humanos constatou uma distribuição similar de fibras ocitocinérgicas, sugerindo que as vias sejam semelhantes e as fibras sejam originárias dos neurônios magnocelulares do hipotálamo<sup>13</sup>.

Também foi demonstrada presença de imunorreatividade à ocitocina na medula espinal de ratos e macacos. Anatomicamente, foi observada a presença do hormônio na substância branca, mais precisamente nas fibras do

funículo lateral, e no centro. Na substância cinzenta o hormônio foi detectado no centro, corno anterior e posterior de todos os segmentos da medula espinal, assim como, no corno lateral. Ademais, foram detectadas fibras contendo ocitocina na pia-máter e aracnóide dos macacos<sup>12</sup>.

Esses resultados sugerem a presença de uma via de inervação direta do núcleo paraventricular do hipotálamo para grupos específicos de neurônios pré-ganglionares simpáticos e parassimpáticos da medula espinal. Desse modo, propõe-se que a liberação de ocitocina pela hipófise posterior apresente efeito direto sobre o sistema nervoso autônomo e uma alta integração dos neurônios magnocelulares e o sistema nervoso autônomo ao nível do núcleo paraventricular do hipotálamo<sup>12</sup>.

Essas informações são reforçadas pela constatação de ocitocina imunorreativa no sistema nervoso autônomo. Foi demonstrada expressão de receptores de ocitocina em neurônios do sistema nervoso entérico de cobaias, assim como, uma ampla distribuição de ocitocina imunorreativa em neurônios ganglionares dos plexos mioentéricos e submucosos<sup>14</sup>.

#### *Contribuição da ocitocina na modulação endógena da dor nos modelos experimentais*

A confirmação da presença de ocitocina imunorreativa desde o núcleo paraventricular do hipotálamo até áreas cerebrais envolvidas na regulação da dor, como cornos dorsais e substância gelatinosa da medula espinal fortalece o possível papel modulador da dor deste hormônio<sup>15</sup>.

Nesse contexto, a investigação dos efeitos ocitocina imunorreativa em modelos experimentais de dor crônica<sup>15</sup>, dor neuropática<sup>16</sup>, hipersensibilidade visceral<sup>17,18</sup> e após estimulação sensorial<sup>19,20</sup> foram propostos. As informações desses estudos foram resumidas na Tabela 1.

Em ratos com destruição do núcleo paraventricular do hipotálamo e dor crônica, a análise do segmento lombar da medula espinal constatou diminuição

de ocitocina imunorreativa. Entretanto, os limiares nociceptivos avaliados pela latência do teste de retirada da cauda (*tail-flick test*) não foram modificados<sup>15</sup>.

No modelo experimental de dor neuropática, observou-se que a estimulação da porção anterior do núcleo paraventricular do hipotálamo promoveu aumento nas concentrações de ocitocina nas análises do líquido cefalorraquidiano, do plasma e do segmento lombar da medula espinal e os testes de von Frey, frio e testes térmicos plantares demonstraram analgesia. A estimulação da parte posterior do núcleo paraventricular do hipotálamo, no entanto, foi observado aumento da concentração de ocitocina apenas no líquido cefalorraquidiano, mas este aumento não promoveu analgesia<sup>16</sup>.

Desse modo, especula-se que a porção anterior do núcleo paraventricular do hipotálamo seja mais eficaz na resposta de supressão a dor e que a ocitocina promova um bloqueio da atividade de fibras primárias aferentes que fazem sinapse na medula espinal. Acrescido a isso, sugere-se que a secreção de ocitocina no líquido cefalorraquidiano não exerce influência sobre o controle nociceptivo por não conseguir atravessar a barreira hematoencefálica<sup>16</sup>.

O conhecimento da imunorreatividade a ocitocina em neurônios do sistema nervoso entérico<sup>14</sup> e da existência de uma via de comunicação bidirecional entre o intestino (sistema nervoso entérico, lúmen intestinal) e o SNC (incluindo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal)<sup>21</sup>, também induziram a investigações em modelos animais de hipersensibilidade visceral<sup>17,18</sup>.

Nesses modelos de hipersensibilidade visceral, foram observados aumentos significativos de receptores de ocitocina em neurônios<sup>18</sup> e em mastócitos nos tecidos do cólon<sup>17</sup>. O aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  em células HMC-1, RBL-2H3 e P815, responsáveis pela ativação de óxido nítrico neuronal e óxido nítrico endotelial promovido pela ocitocina, propõe que a antinocicepção na hipersensibilidade colônica exercida por esse hormônio seja decorrente da inibição da degranulação de mastócitos via caminho  $Ca^{2+}$ /óxido nítrico sintase<sup>17</sup>.

Elevações significativas de ocitocina no plasma e líquido cefalorraquidiano também foram observadas após a aplicação de estímulos sensoriais não nocivos (eletro acupuntura, estímulo térmico ou vibração)<sup>19</sup>, além disso, demonstrou-se que algumas células do núcleo paraventricular do hipotálamo responderam a estimulação antidrômica do corno dorsal lombar ipsilateral da medula espinal por meio de estímulos mecânico e térmico<sup>20</sup>.

Esses resultados sugerem que a estimulação promove ativação de neurônios da hipófise posterior com ocitocina e também reforçam participação de mecanismos ocitocinérgicos no controle da dor<sup>19</sup>. Nesse âmbito, a inibição da entrada de informações periféricas das fibras aferentes A-delta e C na medula espinal pela secreção de ocitocina após a aplicação de estímulos sensoriais é uma explicação plausível<sup>20</sup>.

#### Considerações finais

As evidências de estudos experimentais atestam que a imunorreatividade da ocitocina é observada em diversas estruturas do sistema nervoso central, relacionadas ao controle nociceptivo. Apesar dos estudos apresentarem diversos tipos de modelos experimentais de dor, os resultados obtidos apresentam concordância e enfatizam a importância da ocitocina para analgesia.

## Referências

1. Abbasnezhad A, Khazdair MR, Kianmehr M. The role of nitric oxide on the oxytocin induce analgesia in mice. *Iran J Basic Med Sci.* 2016;19(3):238–44.
2. Goodin BR, Ness TJ, Robbins MT. Oxytocin - a multifunctional analgesic for chronic deep tissue pain. *Curr Pharm Des.* 2015;21(7):906–13.
3. Morris MS, Domino EF, Domino SE. Opioid modulation of oxytocin release. *J Clin Pharmacol.* 2010;50(10):1112–7.
4. Alotaibi MF. The response of rat and human uterus to oxytocin from different gestational stages in vitro. *Gen Physiol Biophys.* 2017;36(1):75–82.
5. Briffaud V, Williams P, Courty J, Broberger C. Excitation of tuberoinfundibular dopamine neurons by oxytocin: crosstalk in the control of lactation. *J Neurosci.* 2015;35(10):4229–37.
6. Carter CS. Neuroendocrine perspectives on social attachment and love. *Psychoneuroendocrinology.* 1998;23(8):779–818.
7. Gibbs DM. Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different types of stress. *Life Sci.* 1984;35(5):487–91.
8. Heinrichs M, Baumgartner T, Kirschbaum C, Ehlert U. Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. *Biol Psychiatry.* 2003;54(12):1389–98.
9. Bale TL, Davis AM, Auger AP, Dorsa DM, McCarthy MM. CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2001;21(7):2546–52.
10. Tzabazis A, Mechanic J, Miller J, Klukinov M, Pascual C, Manering N, et al. Oxytocin receptor: Expression in the trigeminal nociceptive system and potential role in the treatment of headache disorders. *Cephalalgia.* 2016;36(10):943–50.
11. Tracy LM, Georgiou-Karistianis N, Gibson SJ, Giummarra MJ. Oxytocin and the modulation of pain experience: Implications for chronic pain management. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015;55:53–67.
12. Swanson LW, McKellar S. The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. *J Comp Neurol.* 1979;188(1):87–106.
13. Sofroniew M V. Projections from vasopressin, oxytocin, neurophysin neurons to neural targets in the rat and human. *J Histochem Cytochemistry.* 1980;28(5):475–8.

14. Yu Q, Ji R, Gao X, Fu J, Guo W, Song X, et al. Oxytocin is expressed by both intrinsic sensory and secretomotor neurons in the enteric nervous system of guinea pig. *Cell Tissue Res.* 2011;344(2):227–37.
15. Millan MJ, Schmauss C, Millan MH, Herz A. Vasopressin and oxytocin in the rat spinal cord: analysis of their role in the control of nociception. *Brain Res.* 1984;309(2):384–8.
16. Martínez-Lorezana G, Espinosa-López L, Carranza M, Aramburo C, Paz-Tres C, Rojas-Piloni G, et al. PVN electrical stimulation prolongs withdrawal latencies and releases oxytocin in cerebrospinal fluid, plasma, and spinal cord tissue in intact and neuropathic rats. *Pain.* 2008;140(2):265–73.
17. Gong L, Li J, Tang Y, Han T, Wei C, Yu X, et al. The antinociception of oxytocin on colonic hypersensitivity in rats was mediated by inhibition of mast cell degranulation via Ca(2+)-NOS pathway. *Sci Rep.* 2016;6:1–13.
18. de Araujo AD, Mobli M, Castro J, Harrington AM, Vetter I, Dekan Z, et al. Selenoether oxytocin analogues have analgesic properties in a mouse model of chronic abdominal pain. *Nat Commun.* 2014;5:1–12.
19. Uvnäs-Moberg K, Bruzelius G, Alster P, Lundeberg T. The antinociceptive effect of non-noxious sensory stimulation is mediated partly through oxytocinergic mechanisms. *Acta Physiol Scand.* 1993;149(2):199–204.
20. Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorezana G, Rodríguez-Jiménez J. Paraventricular hypothalamic oxytocinergic cells responding to noxious stimulation and projecting to the spinal dorsal horn represent a homeostatic analgesic mechanism. *Eur J Neurosci.* 2009;30(6):1056–63.
21. Philpott H, Gibson P, Thien F. Irritable bowel syndrome - An inflammatory disease involving mast cells. *Asia Pac Allergy.* 2011;1(1):36.

**Quadro 1:** Estudos que avaliaram a imunorreatividade da ocitocina e sua relação com a dor em modelos animais, por ano de publicação.

| <b>Estudos</b>             | <b>Animais</b>                              | <b>Objetivo</b>                                                                                                                                       | <b>Resultados</b>                                                                                                                                                                   | <b>Conclusão</b>                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (MILLAN et al., 1984)      | Ratos Sprague-Dawley (M)<br><br>(200 g)     | Avaliar imunorreatividade à ocitocina na medula espinal lombo-sacra de ratos com destruição do núcleo paraventricular do hipotálamo e com dor crônica | - Observou-se uma diminuição da imunorreatividade à ocitocina<br><br>- Limiares nociceptivos não foram modificados (a latência do teste de retirada da cauda permaneceu inalterada) | A imunorreatividade à ocitocina na medula espinal é derivada do núcleo paraventricular do hipotálamo<br><br>A ocitocina não desempenha um papel importante no controle nociceptivo na medula espinal |
| (UVNÃS-MOBERG t al., 1993) | Ratos Sprague-Dawley (M)<br><br>(270- 320g) | Investigar se estimulação sensorial não nociva (eletro acupuntura, estímulo térmico ou vibração) é capaz de promover aumento níveis de ocitocina no   | - Todos os modos de estimulação induziram elevações significativas dos níveis de ocitocina no plasma e/ ou no líquido cefalorraquidiano, 30 ou 90                                   | A elevação nos níveis do hormônio sugere que os neurônios contendo ocitocina da hipófise posterior e do cérebro foram                                                                                |

|                                   |                                    |                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                   |                                    | plasma e no líquido cefalorraquidiano e se os mecanismos ocitocinérgicos podem contribuir para o efeito antinociceptivo                                                                                 | minutos após o final da estimulação                                                                                                                                                                                                                                                                                             | ativados pelas estimulações                                                                                                                          |
|                                   |                                    |                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Os efeitos analgésicos induzidos por estimulação sensorial não nociva podem, em parte, ser mediada através da ativação de mecanismos ocitocinérgicos |
| (MARTÍNEZ-LORENZANA et al., 2008) | Ratos Wistar (M)<br><br>(280-310g) | Fornecer evidência sobre o a concentração de ocitocina no plasma, líquido cefalorraquidiano e na medula espinal do segmento lombar em animais dor neuropática (modelo experimental de ligadura ciática) | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Estimulação da parte anterior do núcleo paraventricular do hipotálamo aumentou a concentração de ocitocina no líquido cefalorraquidiano, plasma e medula espinal e produziu analgesia (teste de von Frey, frio e testes térmicos plantares)</li> <li>- Estimulação da parte</li> </ul> | Os resultados sugerem a participação de um sistema endógeno de analgesia mediado pela ocitocina                                                      |

posterior do núcleo  
paraventricular do  
hipotálamo aumentou a  
concentração de ocitocina  
apenas no líquido  
cefalorraquidiano

|                               |                                                       |                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (CONDÉS-LARA<br>et al., 2009) | Ratos Wistar<br>albinos (M); (n=64)<br><br>(280-310g) | Descrever as respostas das<br>células do núcleo<br>paraventricular do<br>hipotálamo à estimulação<br>somática nociva e identificar<br>presença de ocitocina nos<br>neurônios locais | <p>- As células do núcleo<br/>paraventricular do<br/>hipotálamo responderam<br/>tanto à estimulação<br/>mecânica quanto à térmica.</p> <p>- Algumas das células do<br/>núcleo paraventricular do<br/>hipotálamo foram<br/>identificadas por<br/>estimulação antidrômica no<br/>corno dorsal lombar<br/>ipsilateral da medula espinal</p> | <p>Sugere-se fortemente a<br/>participação do núcleo<br/>paraventricular do<br/>hipotálamo no processo de<br/>analgesia</p> <p>As células do núcleo<br/>paraventricular do<br/>hipotálamo ativadas por<br/>estímulos nocivos podem<br/>suprimir a entrada de<br/>informações periféricas das<br/>fibras aferentes A-delta e C,<br/>completando um circuito<br/>envolvido na analgesia</p> |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                          |             |                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                          |             |                                                                                                                                                                                        | - Foi identificada presença de ocitocina nas células do núcleo paraventricular do hipotálamo                                                                                                                                                                                         | endógena difusa                                                                                                                                                                            |
| (DE ARAUJO et al., 2014) | Camundongos | Analisar a expressão e função do receptor de ocitocina em neurônios colônicos de camundongos com hipersensibilidade visceral crônica e desenvolver análogos de ocitocina mais estáveis | <p>- A expressão e a função do receptor de ocitocina são significativamente aumentadas em neurônios colônicos de camundongos com hipersensibilidade visceral crônica</p> <p>- Os análogos de ocitocina são potentemente analgésicos neste modelo animal de dor abdominal crônica</p> | Os resultados indicam que análogos estáveis de ocitocina têm potencial significativo para o tratamento de dor abdominal crônica associada a condições como síndrome do intestino irritável |
| GONG et al.,             | Ratos (n=3) | Avaliar a expressão de receptores de ocitocina e                                                                                                                                       | - Receptores de ocitocina foram expressos em                                                                                                                                                                                                                                         | A ocitocina pode exercer antinocicepção na                                                                                                                                                 |

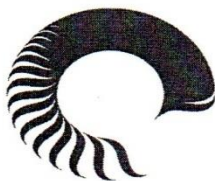
|      |                               |                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                   |
|------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2016 | 12 fragmentos do tecido cólon | investigar os efeitos da ocitocina sobre a hipersensibilidade visceral/dor e a degranulação de mastócitos | mastócitos do tecido cólon<br><br>- A ocitocina evocou um aumento intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ em células HMC-1, RBL-2H3 e P815, responsáveis pela ativação de óxido nítrico neuronal e óxido nítrico endotelial | hipersensibilidade colônica através da inibição da degranulação de mastócitos via caminho $\text{Ca}^{2+}$ /óxido nítrico síntase |
|------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

---

M (machos); g (peso em gramas); n(número da amostra)

## Anexo A

## APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br

Recife, 11 de abril de 2016.

Ofício nº 20/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.<sup>a</sup> Daniella Araújo de Oliveira**

Departamento de Fisioterapia

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº CEUA 0006/2015

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Dosagem do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina após a estimulação transciana por corrente contínua anódica e catódica na dura-máter de ratos Wistar.”**

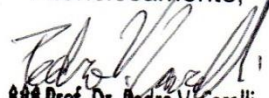
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem do animal: Biotério de criação do Departamento de Nutrição – CCS/UFPE; Animais: ratos Wistar; Idade: 70-90 dias; Sexo: machos; Peso: 270-290g; N° total de animais: 40.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Pedro V. Carelli  
Presidente da CEUA / CCB - UFPE  
UFPE SIAPE 1801584



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351  
Fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br

Recife, 22 de março de 2017.

Ofício nº 16/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Daniella Araújo de Oliveira**

Departamento de Fisioterapia

Centro de Ciências da Saúde

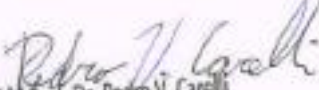
Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 0006/2015

Certificamos que a proposta intitulada **"Dosagem do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, ocitocina e vasopressina após a estimulação transcraniana por corrente contínua anódica e catódica na dura-máter de ratos wistar a."**, registrada com o nº 0006/2015 sob a responsabilidade de Prof.ª **Daniella Araújo de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/03/2017.

|                         |                                                                                         |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Finalidade              | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 07/03/2016 a 27/01/2017                                                                 |
| Espécie/linhagem/raça   | Ratos (Wistar)                                                                          |
| Nº de animais           | 40                                                                                      |
| Peso/Idade              | 270-290g 70-90 dias                                                                     |
| Sexo                    | Machos                                                                                  |
| Origem                  | Biotério do Detpa de Nutrição                                                           |

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Pedro V. Carelli  
Presidente da CEUA / CCB - UFPE  
SLAPE 1801584