

**Efeitos da tens sobre a atividade do nervo ciático de ratos
com uso de sertralina e suas implicações
cardiorespiratórias.**

Cíntia Helena Santuzzi

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro de Ciências da Saúde**

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Dezembro de 2009

**EFEITOS DA TENS SOBRE A ATIVIDADE DO NERVO
CIÁTICO DE RATOS COM USO DE SERTRALINA E SUAS
IMPLICAÇÕES CARDIORESPIRATÓRIAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

ORIENTADORA

Prof^a Dr^a Glaucia Rodrigues de Abreu (PPGCF/UFES/ES)

CO-ORIENTADOR

Prof^o Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto (PPGCF/UFES/ES)

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Dezembro de 2009

**EFEITOS DA TENS SOBRE A ATIVIDADE DO NERVO
CIÁTICO DE RATOS COM USO DE SERTRALINA E SUAS
IMPLICAÇÕES CARDIORESPIRATÓRIAS.**

Cíntia Helena Santuzzi

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em por:

Prof. Dra. Gláucia Rodrigues de Abreu
Orientador - UFES

Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto
UFES

Prof. Dr. João Luiz Coelho de Faria
FSV

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg
Coordenador do PPGCF



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

Santuzzi, Cíntia Helena, 1981

**EFEITOS DA TENS SOBRE A ATIVIDADE DO NERVO CIÁTICO DE RATOS COM
USO DE SERTRALINA E SUAS IMPLICAÇÕES CARDIORESPIRATÓRIAS.**

XIII, 75 p., 29,7 cm (UFES, M Sc., Ciências Fisiológicas, 2009).

Orientadora: Prof. Dra. Gláucia Rodrigues de Abreu.

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF

*Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã Lívia e ao meu marido, Erickson, por estarem sempre ao meu lado me apoiando em todos os momentos, e pela paciência, amor e carinho que têm por mim. **Amo vocês!***

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido o desenvolvimento deste trabalho e por se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

A minha orientadora, Prof. Dra. Gláucia Rodrigues de Abreu, por ter me dado a oportunidade de ser sua aluna de mestrado, e que durante este período conquistou toda a minha admiração não só pelo que representa para este Programa, como pela pessoa que é.

Ao Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto, pela valiosa contribuição para a realização deste trabalho, além de sua paciência e sabedoria em todos os momentos oportunos.

Ao grande amigo e incentivador Washington Luiz Gonçalves pela companhia, paciência e apoio durante todas as etapas até agora.

A todos os demais professores do PPGCF.

A todos os amigos que conquistei, em especial, Renata Tiradentes, Bruna, Walckiria Romero, Patrick Wander, Mariana Veronez, Andressa Lopes, Sônia Gouvea e Edineuza Aparecida pela amizade, apoio e carinho compartilhados durante todo esse tempo e pelos momentos de convívio dos quais sentirei saudades.

A todos os funcionários do PPGCF da UFES, em especial aos amigos Marildo, Maria e Net, por terem me auxiliado, de maneiras diferentes, para a realização deste trabalho.

A toda a minha família e amigos, por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso.

RESUMO

A analgesia induzida pela Estimulação Elétrica Transcutânea (TENS), ocorre por ativação de fibras táteis, porém, o mecanismo analgésico da TENS está relacionado ainda com liberação de peptídeos endógenos e monoaminas, incluindo a serotonina. Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi investigar os mecanismos analgésicos periféricos da TENS de alta e baixa frequência em ratos tratados com sertralina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina – ISRSs, e suas implicações nos parâmetros cardiorespiratórios e no limiar de excitação sensorial como fator integrante na resposta ao estímulo nocivo. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar machos (n= 48) com peso entre 250-300g, divididos em seis grupos. Os animais foram tratados com sertralina (3mg/Kg/dia por 7 dias consecutivos) ou Salina. Os ratos foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.v.), após indução por halotano, em seguida a veia e artéria femoral foram cateterizadas para administração do anestésico e registros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) respectivamente, além de serem submetidos à traqueostomia para registro de frequência respiratória (FR). Foi realizada uma incisão na face posterior da coxa para permitir o acesso à ramificação do nervo ciático, sua porção mais proximal foi seccionada totalmente a fim de permitir o registro da porção sensitiva do nervo, após, o nervo foi dissecado para registro de sua atividade (ANC). Após estabilização de todos os parâmetros, aplicou-se formalina na pata esquerda (50µl, 5%) associado com TENS alta (130Hz) ou baixa (10Hz) frequências por 20 minutos com intensidade sensorial (130-µs). Os dados foram coletados nos tempos: basal, 10, 20, 30 e 50 minutos após a injeção de formalina. Durante todo o experimento, a temperatura corporal do animal foi mantida em $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Os resultados são apresentados como média±E.P.M; $p < 0,05$. Os resultados demonstram uma significativa diminuição da ANC nos ratos que receberam a TENS tanto de alta quanto de baixa frequência, sendo que o tratamento com sertralina apresentou o mesmo padrão reduzido de resposta quando exposto a TENS, entretanto, quando exposto somente ao estímulo doloroso o tratamento com a sertralina apresentou efeito analgésico, em relação aos parâmetros cardiorrespiratórios o estímulo nocivo demonstrou um aumento da FC, PAM e FR, sendo que a TENS tanto de alta quanto de baixa frequência foi capaz de reverter essa elevação. Entretanto, o tratamento com sertralina demonstrou respostas cardiorrespiratórias peculiares em relação às diferentes modalidades de aplicação da TENS e ao estímulo algico. Portanto, podemos concluir que o efeito analgésico da TENS também está relacionado com a potencialização do sistema opióide endógeno periférico e parece que a sertralina não melhora o padrão de resposta da TENS, entretanto foi demonstrado que a sertralina isoladamente promoveu efeito analgésico. Quanto aos parâmetros cardiorrespiratórios, a TENS foi eficaz em reverter as respostas cardiorrespiratórias elevadas promovida pelo estímulo doloroso, demonstrando que a TENS apresenta-se como uma ferramenta analgésica capaz de reverter a resposta fisiopatológicas da dor. Todavia o tratamento crônico com a sertralina exerceu alterações nos parâmetros cardiorrespiratórios, possivelmente através da ativação de diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos em diferentes locais no cérebro.

Palavras Chave: TENS, Analgesia, Sertralina, Atividade do Nervo Ciático.

ABSTRACT

Analgesia induced by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS), occurs by activation of large-fibres; however, the mechanism of TENS analgesia is also related to the release of endogenous peptides and monoamines, including serotonin. Thus, this study aimed to investigate the mechanisms of high and low frequency TENS' peripheral analgesia in rats treated with sertraline, an selective serotonin reuptake inhibitors - SSRIs, and their implications in cardiorespiratory parameters and the threshold of sensory excitation as an integral factor in the response to noxious stimulation. Male Wistar rats (n=48) weighing 250-300g were divided into six groups. The animals were treated with sertraline (3 mg/kg for 7 consecutive days) or saline. For surgical procedures the rats were anesthetized with urethane (1.2 g/kg, iv) after induction by halothane, then the femoral vein and artery were catheterized for administration of anesthetic and records of mean blood pressure (BP) and heart rate (HR) respectively. Besides it, animals were submitted to tracheostomy to record respiratory frequency (RF). Incision was made in the posterior thigh to allow access to the branching of the sciatic nerve, the proximal portion was cut completely to allow the registration of the portion of the sensory nerve, after the nerve was dissected to record their activity (NCA). After stabilization of all parameters formalin was applied in the paw (50µl, 5%) associated with high-TENS (130Hz) or low -TENS (10Hz) for 20 minutes with sensory intensity (130-µs). Data were collected at times: baseline, 10, 20, 30 and 50 minutes after the injection of formalin. Throughout the experiment, the animal's body temperature was maintained at 37 ± 0.5 ° C. The results are presented as mean \pm SEM, $p < 0.05$. The results show a significant decrease in the NCA in rats that received TENS both high-and low-frequency, and treatment with sertraline showed the same pattern as TENS; however treatment with sertraline alone was also analgesic; Noxious stimulation showed an increase in HR, MAP and RF cardiorespiratory parameters and both high and low frequency TENS was able to reverse this elevation. Treatment with sertraline demonstrated unique answers for the different TENS' modalities of application and pain stimulus. Therefore, we conclude that the analgesic effect of TENS is also related to the activation or potentiation of peripheral endogenous opioid system and it appears that sertraline does not improve the response pattern of TENS, however sertraline alone promotes analgesic effect. As for cardiorespiratory parameters, TENS was effective in reversing the high cardiorespiratory responses promoted by the painful stimulus, demonstrating that TENS an analgesic tool capable of reversing the physiological response to pain. However, the chronic treatment with sertraline exerted changes in cardiorespiratory parameters, possibly through the activation of different subtypes of serotonin receptors in different locations in the brain.

Keywords: TENS, Analgesia, Sertraline, Sciatic Nerve Activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular do receptor opióide.....	21
Figura 2- Protocolo Experimental	37
Figura 3-- Registro Típico do protocolo experimental do Grupo FORM.	39
Figura 4- Determinação da ANC entre os grupos FORM, FORM+TENS-AF e FORM+TENS-BF.....	39
Figura 5- Determinação da ANC entre os grupos FORM+SER, FORM+TENS-AF+SER e FORM+TENS-BF+SER.....	40
Figura 6- Determinação da ANC entre os grupos FORM+SER e grupo FORM.	41
Figura 7 A- Determinação da PAM entre os grupos FORM, FORM+TENS-AF e FORM+TENS-BF	42
Figura 7 B- Determinação da PAM entre os grupos FORM+SER, FORM+TENS-AF+SER e FORM+TENS-BF+SER	43
Figura 8 A- Determinação da FC entre os grupos FORM, FORM+TENS-AF e FORM+TENS-BF.....	44
Figura 8 B- Determinação da FC entre os grupos FORM+SER, FORM+TENS-AF+SER e FORM+TENS-BF+SER	44
Figura 9 A- Determinação da FR entre os grupos FORM, FORM+TENS-AF e FORM+TENS-BF.....	45

Figura 9 B- Determinação da FC entre os grupos FORM+SER, FORM+TENS- AF+SER e FORM+TENS-BF+SER.....	46
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HIAA** – 5-hidroxiindolacético
- 5-HT** - serotonina
- 5-HTP** – 5-hidroxitriptofano
- ANC**- atividade do nervo ciático
- ATC** – antidepressivo tricíclico
- bpm** - batimentos por minuto
- cm** - centímetros
- EPM** - erro padrão da média
- FC** - frequência cardíaca
- FR** – frequência respiratória
- GABA** – Ácido-gama aminobutírico
- GRD** – Grupo respiratório dorsal
- GRV** – Grupo respiratório ventral
- Hz** – Hertz
- i.v.** - intravenosa
- ISRS** – inibidores seletivos da recaptação de serotonina
- kg**- quilograma
- mg** – miligrama
- mL** – mililitros
- mmHg** - milímetros de mercúrio
- Ms** – milissegundos
- NaCl** - cloreto de sódio
- NTS** - núcleo do trato solitário
- PAG** – Substância cinzenta periaquedutal
- PAM** - pressão arterial média
- PAP** - pressão arterial pulsátil
- RVLM** - bulbo ventrolateral rostral
- RVM** – Bulbo rostroventral
- SG** – Substância gelatinosa
- SNC** - sistema nervoso central

TENS – Estimulação elétrica transcutânea do nervo.

U.A.- unidade arbitrária

V – Voltz

δ - Delta

κ – Kappa

μ – mu

σ – Sigma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA DO NERVO – TENS.....	17
1.2 MODULAÇÃO ENDÓGENA DA DOR.....	19
1.3 IMPLICAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS DA DOR.....	25
1.4 PARTICIPAÇÃO DA SEROTONINA NO CONTROLE CARDIORRESPIRATÓRIO.....	26
1.5 MODELO EXPERIMENTAL ÁLGICO (FORMALINA).....	29
1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	32
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	32
3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	34
3.3.1 Anestesia	34
3.3.2 Cateterização	34
3.3.3 Traqueostomia	35
3.3.4 Exposição do nervo ciático	35
3.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	36
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37

4 RESULTADOS	38
4.1. EFEITOS DA FORMALINA E DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA DE ALTA E BAIXA FREQUÊNCIA NA ATIVIDADE DO NERVO CIÁTICO.....	38
4.2. EFEITOS DA FORMALINA E DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA DE ALTA E BAIXA FREQUÊNCIA NOS PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS.....	41
5 DISCUSSÃO	47
6 REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE A - Tabela 1: Valores da PAM do grupo FORM, FORM+SER, FORM+TENS-AF, FORM+TENS-AF+SER, FORM+TENS-BF e FORM+TENS-BF+SER antes e 10, 20, 30 e 50 minutos após aplicação de formalina com ou sem a TENS de alta e/ou baixa frequência. (n = 8 por grupo).....	66
APÊNDICE B - Tabela 2: Valores da FC do grupo FORM, FORM+SER, FORM+TENS-AF, FORM+TENS-AF+SER, FORM+TENS-BF e FORM+TENS-BF+SER antes e 10, 20, 30 e 50 minutos após aplicação de formalina com ou sem a TENS de alta e/ou baixa frequência. (n = 8 por grupo).....	67
APÊNDICE C - Tabela 3: Valores da FR do grupo FORM, FORM+SER, FORM+TENS-AF, FORM+TENS-AF+SER, FORM+TENS-BF e FORM+TENS-BF+SER antes e 10, 20, 30 e 50 minutos após aplicação de formalina com ou sem a TENS de alta e/ou baixa frequência. (n = 8 por grupo).....	68

APÊNDICE D - Tabela 4: Valores da ANR do grupo FORM, FORM+SER, FORM+TENS-AF, FORM+TENS-AF+SER, FORM+TENS-BF e FORM+TENS-BF+SER antes e 10, 20, 30 e 50 minutos após aplicação de formalina com ou sem a TENS de alta e/ou baixa frequência. (n = 8 por grupo).....69

APÊNDICE E - Figura 9: Registro típico mostrando o efeito de formalina sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos basal, 10,20,30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.....70

APÊNDICE F - Figura 10: Registro típico mostrando o efeito de formalina em ratos tratados com sertralina sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos Basal, 10,20,30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.....71

APÊNDICE G - Figura 11: Registro típico mostrando o efeito de formalina associada a TENS de alta frequência sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos Basal, 10,20,30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.....72

APÊNDICE H - Figura 12: Registro típico mostrando o efeito de formalina associada a TENS de alta frequência de ratos tratados com sertralina sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos Basal, 10, 20,30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.....73

APÊNDICE I - Figura 13: Registro típico mostrando o efeito de formalina associada a TENS de baixa frequência sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos Basal, 10,20,30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.....74

APÊNDICE J - Figura 14: Registro típico mostrando o efeito de formalina associada a TENS de baixa frequência em ratos tratados com sertralina sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos Basal, 10, 20,30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.....75

1. INTRODUÇÃO

1.1- Estimulação Elétrica Transcutânea do Nervo - TENS

A TENS -“*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation*” é definida pela “*American Physical Therapy Association*” como a aplicação de estímulos elétricos na superfície cutânea para controle algico, trata-se de um aparelho amplamente utilizado na prática clínica como terapia analgésica simples, não invasivo e de baixo custo, além disso, é classificada como uma corrente de baixa frequência quando comparada a outras correntes elétrica disponíveis para uso terapêutico (Eletrotherapy Stantandrs Committee, 2001; Sluka *et al.* 2003).

Segundo Orange (2003), a TENS é uma terapia segura que reduz ou elimina os sinais da dor, favorecendo ao indivíduo a execução de suas atividades com maior conforto. Sendo um estimulador sensitivo cutâneo, os impulsos da corrente são transmitidos através da pele (transdérmicos) com auxílio de gel a base de água para não haver interrupções do estímulo. Na medida que os impulsos atingem o nervo, obtém-se a regulação para o controle da dor.

A explicação neurofisiológica mais provável que ilustra a modulação da dor pela TENS se dá através da ativação da teoria das comportas, proposta por Melzack e Wall. Segundo essa teoria, há um bloqueio dos impulsos da dor na substância gelatinosa (laminas I e II no corno dorsal da medula espinal), o qual agiria como uma comporta que tem a capacidade de impedir que impulsos aferentes alcancem as células T (células que conduzem a sensação de dor para diversas partes do cérebro - cerebelo, tronco cerebral, tálamo e córtex). Sendo assim o portão (medula) regula o influxo de impulsos nociceptivos, mesmo antes de se criar uma consciência da dor. A variação na passagem dos potenciais de ação (nociceptivas) que o portão produz é determinada pela atividade das fibras de grosso calibre (A-alfa e A-beta). Quando há lesão tecidual, os estímulos nociceptivos são transmitidos por fibras finas (A-delta e C), que penetram nos cornos posteriores da medula, ativando células de transmissão presentes na substância gelatinosa (SG). A aplicação de um estímulo não doloroso através da ativação de fibras A (grossas) excita interneurônios que

libera encefalina na conexão pré-sináptica com célula T, inibindo a liberação de substância P e conseqüentemente inibindo a transmissão para as células dos influxos procedentes das fibras da dor, ao mesmo tempo, em que se projeta ascendentemente no tronco encefálico para as estimulações táteis. Sendo assim, as fibras grossas funcionam como mecanismo de inibição da dor. Elas provocam uma descarga intensa nas células da lâmina V (responsáveis pela percepção da dor) onde se segue um período de inibição (Fields *et al.* 1999; Sluka *et al.* 2003; Santuzzi *et al.* 2008).

Na prática clínica, a TENS é aplicada com pulsos de tensão regulares com amplitude variável de mais ou menos 85 V, freqüência de 2 a 200 Hz com duração de pulso de 20 a 90 ms, sendo utilizada tanto para controle de dor aguda, quanto de dor crônica. A freqüência de estimulação é usualmente definida como alta freqüência (> 50Hz), baixa freqüência (< 10Hz), ou burst (rajadas de estimulação de alta freqüência aplicado a uma freqüência muito menor). A intensidade de aplicação da corrente é um parâmetro subjetivo, depende da sensibilidade de cada paciente e deve obedecer ao limiar doloroso de cada indivíduo, sendo a intensidade gênero-termo-dependente (Santuzzi *et al.* 2008). Por ser um parâmetro subjetivo foi determinada a resposta como nível sensorial e nível motor, sendo caracterizado nível sensorial aquele em que não é observado contração muscular e nível motor imediatamente após observar contração muscular (Sluka *et al.* 2003; Lampl *et al.* 1998; Jensen *et al.* 1991).

Existem algumas modalidades diferentes de aplicação da TENS que são conhecidas como: TENS convencional que é atribuída para alívio de dor aguda e que corresponde uma aplicação de alta freqüência (50 a 130Hz) e pode ser definida como cadeia contínua, ininterrupta, de impulsos de alta freqüência grados com curta duração e baixa amplitude. Preconiza-se que essa forma de aplicação atue via ativação do mecanismo da comporta proposta por Melzack e Wall (1967). TENS acupuntura que trabalha com estimulação de baixa freqüência (1 a 10 Hz) e alta intensidade (contrações fortes), cujo mecanismo de ação produz analgesia mediado por opiáceos endógenos. TENS Burst ou “Trem de Pulso” que promove analgesia através de estimulação de trens de larga freqüência 970 a 1000 Hz, modulados a uma freqüência de 2 Hz (Katz *et al.* 1991; Jiang *et al.* 2001).

Adicionalmente, o mecanismo analgésico da TENS pode estar relacionado à ativação de neuromoduladores endógenos na medula espinhal. Além disso, estudos recentes têm mostrado que alta e baixa frequência de estimulação utilizam diferentes mecanismos de ação para produzir analgesia. Já que, várias pesquisas têm apresentado que a baixa frequência de TENS produz analgesia através da estimulação de receptores opióides na medula espinhal, ativação de receptores GABA_A que promove analgesia, pois a sua ativação diminui a atividade dos neurônios da coluna dorsal via substância cinzenta periaquidutal (PAG) (Radhakrishnan *et al.* 2003). Sabe-se também que a analgesia promovida pela baixa frequência de TENS está relacionada com ativação de receptores serotoninérgico espinhal, especificamente 5-HT_{2A} e 5-HT₃ além da ativação de receptores colinérgicos também na medula espinhal. Supraespinhalmente, a baixa frequência estimula receptores opióides μ (Sluka *et al.* 1998; Sluka *et al.* 2006; King *et al.* 2005; Maida *et al.* 2007; Sluka *et al.* 2007). Por outro lado, alguns autores já demonstraram que a baixa frequência de TENS reduz a produção de substância P nos gânglios da raiz dorsal e dessa forma, promovem analgesia pela inibição nociceptiva via nervos periféricos (fibra tipo C) (Tomoyuki *et al.* 2002).

Por outro lado, a analgesia produzida pela TENS de alta frequência ativa receptores opióides δ (reduzindo o aumento de glutamato e aspartato na medula espinhal) e receptores muscarínicos na coluna dorsal da medula espinhal, além da ativação de receptores opióides δ supra-espinhal (Sluka *et al.* 1998). Em adição, Raimundo *et al.* (2009) demonstraram em recente estudo que a aplicação da TENS de alta frequência promove um aumento significativo da serotonina plasmática.

1.2- Modulação Endógena da Dor

Como agente modulador da dor, os opióides endógenos são os principais representantes com grande expansão até os dias atuais. Embora de uso antigo, somente a partir de 1973 foram explicados os mecanismos de ação destes fármacos (opióides), quando foram reportadas as evidências bioquímicas da existência de receptores opióides no sistema nervoso central (Carvalho *et al.* 1998).

Atualmente, estão descritos os receptores opióides mu (μ), e seus subtipos μ_1 e μ_2), kappa (κ), sigma (σ), delta (δ) e epsilon (ϵ). Admite-se que o receptor μ_1 seja o

mediador das ações analgésicas supraespinhais e da liberação de prolactina. O receptor μ_2 é caracterizado pela depressão respiratória, liberação de hormônio do crescimento, queda da dopamina cerebral, euforia e dependência física dos opióides. O receptor Kappa (κ) é responsável pela analgesia medular, miose, sedação e inibição da liberação do hormônio antidiurético. O receptor sigma (σ) está associado com disforia, alucinações, estimulação respiratória e vasomotora e o receptor delta (δ) com a analgesia medular e queda da dopamina cerebral (Carvalho *et al.* 1998).

Estudos mais recentes de clonagem dos receptores opióides demonstraram que eles estão localizados na superfície das membranas celulares, assumindo uma configuração transmembrana formada por sete domínios ou alças hidrofóbicas de polipeptídeo em forma de α -hélice (Figura 1). Os domínios transmembrana encontram-se interligados por três alças hidrofóbicas intracelulares. Estes receptores estão acoplados a um nucleotídeo guanílico ligado a uma proteína reguladora (Proteína G) que medeia os efeitos celulares, incluindo inibição da adenililciclase, ativação dos canais de potássio e inibição dos canais de cálcio voltagem-dependentes. O receptor opióide, portanto, pertence à superfamília dos receptores de membrana acoplados à proteína G, juntamente com outros importantes receptores do sistema de modulação da dor, incluindo os receptores adrenérgicos, colinérgico muscarínico, serotoninérgico, dopaminérgico, natriurético atrial, da colecistocinina (Simon *et al.* 1991; Carvalho *et al.* 1997).

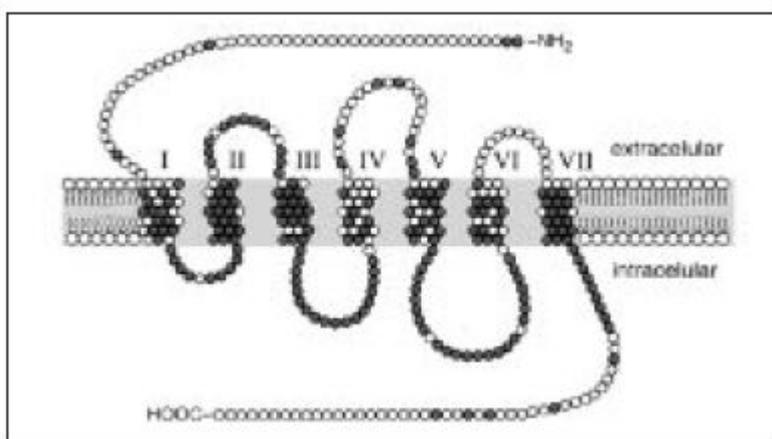


Figura 1: Estrutura molecular do receptor opióide e seqüência de aminoácidos dos receptores μ , κ e δ . demonstrando os sete domínios transmembrana (I-VII) e as alças intra e extracelulares (com permissão de Reisine T, Pasternak G - Opioid Analgesics and Antagonists, em: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB et al -

Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed, New York, McGraw-Hill, 1996; 521-555).

O sistema analgésico opióide endógeno periférico é pouco explorado, entretanto, sabe-se que na presença de agentes nocivos e inflamatórios ocorre acúmulo de leucócitos, cuja função analgésica está na liberação de opióides endógenos no local da lesão. Um outro mecanismo acionado na presença de dano tecidual e inflamação são relacionados com um *up-regulation* dos receptores opióides nos nervos aferentes primários. A presença dos opióides no local da lesão (periferia) pode ainda promover a ativação de receptores periféricos adrenérgicos (α_2) e de adenosina (A1) que por sua vez podem mediar a analgesia periférica (Smith *et al.* 2008).

Presume-se que o efeito analgésico dos opióides na dor inflamatória esteja relacionado com a ativação dos receptores μ , δ e κ uma vez que no processo de lesão celular são liberados importantes mediadores inflamatórios, entre os quais as prostaglandinas do grupo E (PGE2), que são responsáveis pela ativação da adenilciclase, via proteína G estimulatória (Gs), causando sensibilização do nociceptor. A ativação dos receptores μ interrompe este processo, pela ativação de uma proteína G inibitória (Gi) a qual previne a sensibilização do nociceptor. Acredita-se, ainda que os receptores δ e κ que medeiam a analgesia periférica estejam situados em neurônios simpáticos e impeçam a liberação de mediadores nócicos (Plevry *et al.* 1993; Carvalho *et al.* 1995).

Grande avanço tem ocorrido nos últimos anos na biologia molecular, na tentativa de elucidar os mecanismos de produção e destino dos receptores. Assim como os demais, os receptores opióides têm um ciclo que pode receber influência de diversos estímulos. A administração de um agonista opióide causa uma regulação decrescente do número de receptores opióides e altera o acoplamento à proteína G, a atividade da adenilciclase e a condutância ao potássio, enquanto que a administração crônica de um antagonista opióide resulta em regulação crescente, com aumento do número de receptores e elevação da potência de um agonista opióide. Os estudos dos mecanismos moleculares de regulação dos receptores opióides indicam que os opióides endógenos e aqueles aplicados exogenamente agem nos receptores opióides, influenciando a expressão de genes opióides através da formação dos fatores de transcrição. Inicialmente formam-se os fatores de transcrição imediatamente induzidos, como c-fos, CREB, c-jun, que se ligarão a

sítios específicos contendo seqüência particular de DNA na região promotora do gene alvo. Após a ativação transcricional do gene alvo, os conseqüentes efeitos a curto e longo prazo podem então se manifestar. Tais efeitos podem ocorrer na mesma célula com realimentação negativa ou em sítios distantes, onde a atividade neural é modulada pelas ações dos produtos finais da transcrição e subsequente translação do gene (Borssock, 1997; Hunt *et al.* 1987; Yasuda *et al.* 1993).

Esta observação é extremamente importante, uma vez que os estímulos nociceptivos podem estimular a memória da dor, alterando a plasticidade do sistema nervoso central e desencadeando a estimulação de fatores de transcrição capazes de estimular genes que influenciarão a produção de neuropeptídios e neurotransmissores capazes de modular a resposta nociceptiva (McQualy *et al.* 1992; Woolf *et al.* 1993).

Na modulação da dor, descobertas atuais mostram haver mecanismos inibitórios da transmissão do estímulo nociceptivo, não somente em segmentos medulares, como também em nível supraespinal, constituindo o sistema analgésico endógeno (via inibitória descendente de modulação da dor) (Carvalho *et al.* 1998). O sistema inibitório descendente da dor consiste de diversas conexões anatômicas centrais, iniciando pela substância cinzenta periaquedutal (PAG), que por sua vez, recebe aferências de muitos núcleos diencefálicos (núcleo parafascicular talâmico, núcleo prémamilar dorsal, zona incerta, núcleo dorsomedial e ventromedial do hipotálamo, núcleo arqueado) e do tronco encefálico. A PAG envia impulsos excitatórios para região do bulbo rostroventral (RVM), especialmente o núcleo magno da rafe (NMR) e o núcleo paragigantocelular, esses núcleos que por sua vez, enviam fibras serotoninérgicas, via funículo dorsolateral, que se projetam para o corno dorsal da medula nas lâmina I, II e IV, onde inibem seletivamente neurônios nociceptivos, incluindo interneurônios e neurônios dos tratos ascendentes (espinotalamococ), essa inibição promove uma resposta analgésica. Sendo assim, acredita-se que os opióides promovam seu efeito analgésico pela ativação dessa via. (Stamford *et al.* 1995).

Neste sentido, outra via inibitória analgésica comum está relacionada com grupos celulares noradrenérgicos localizados na ponte (lócus ceruleus e lócus subceruleus). Esses neurônios utilizam o neurotransmissor noradrenalina para ativação dos receptores espinais α -2 para produzir também, uma inibição dos neurônios nociceptivos da coluna dorsal (Yaksh *et al.* 1995).

Investigações experimentais também têm relacionado o sistema colinérgico central na modulação da dor. Sendo evidenciado uma elevada densidade de receptores colinérgicos muscarínicos no corno dorsal da medula espinal, notadamente na substância gelatinosa. Diversas condições são atualmente reconhecidas como capazes de aumentar a liberação de acetilcolina medular, destacando-se a dor, opióides sistêmicos e a aplicação intratecal de agonistas α_2 -adrenérgicos. A liberação de acetilcolina pela medula espinal produz antinocicepção e aumenta a atividade do sistema nervoso simpático. A administração intratecal de agonistas colinérgicos muscarínicos ou de inibidores da colinesterase (anticolinesterásicos) são capazes de promover antinocicepção em ratos, gatos, carneiros e também no homem, atribuindo-se um mecanismo muscarínico nesta ação analgésica (Song *et al.* 2008; Schechtmann *et al.* 2008).

O envolvimento da serotonina (5-HT) no sistema descendente de modulação da dor é reconhecido há muitos anos, no entanto, algumas observações experimentais reforçam a importância do sistema serotoninérgico central na modulação da dor, como, por exemplo, a p-clorofenilalanina (pCPA), que bloqueia a síntese da 5-HT, abole a analgesia induzida por estimulação, bem como lesões do núcleo da rafe, seja por meios eletrolíticos ou por aplicação da 5,6-dihidroxitriptamina, uma neurotoxina serotoninérgica. A estimulação elétrica do núcleo magno da rafe aumenta a liberação de 5-HT no corno dorsal da medula, efeito esse bloqueado pelo pré-tratamento com pCPA, do mesmo modo o estímulo nócico aumenta a produção do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), um metabólito da 5-HT (Song *et al.* 2009).

Paoli *et al.* (1980) foi o primeiro a relatar o controle da dor crônica por antidepressivos tricíclicos, demonstrando que havia uma melhora da depressão relativa, a qual está freqüentemente presente nos quadros de dores. Lopes-Ibor (1988) sugere também que vários estados dolorosos (quadro álgico) nada mais são do que depressões mascaradas. Johanson *et al.* (1979) afirmam existem evidências de um efeito analgésico dos antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamino oxidase (IMAO) e evidenciam que os antidepressivos como droga analgésica apresentam seus efeitos de modulação da dor nos primeiros três dias de uso.

O uso de antidepressivos tricíclicos (TCAs) na dor é bem documentado e inúmeras investigações experimentais e clínicas demonstram sua efetividade (Cunha *et al.* 2009; Kraychete *et al.* 2003), entretanto, recentemente os inibidores seletivos da

recaptação de serotonina (ISRS) vem sendo freqüentemente prescritos na prática clínica (Otsuka *et al.* 2001; Sawynok, 2001). Dessa forma, os antidepressivos ISRS surgiram como alternativa para os pacientes que não podem utilizar os tricíclicos devido à presença de alterações clínicas ou efeitos colaterais. Esses antidepressivos agem inibindo especificamente a recaptação de serotonina, entretanto, a aplicação clínica destes antidepressivos mais modernos no tratamento das síndromes dolorosas crônicas dependem ainda de estudos mais conclusivos. (Duman *et al.* 2004).

Os ISRS são estruturalmente distintos com marcadas diferenças no perfil farmacodinâmico e farmacocinético. A potência da inibição de captação da serotonina é variada, assim como a seletividade por noradrenalina e dopamina. Sertralina e paroxetina são os mais potentes inibidores de recaptação. A potência relativa da sertralina em inibir a recaptação de dopamina a diferencia farmacologicamente dos outros ISRSs, além disso a sertralina apresenta-se com sendo a mais seletiva para a inibição de serotonina (Owens *et al.* 2003).

Estudos têm mostrado que a analgesia promovida por antidepressivos ISRSs pode ser inibida pela aplicação de naloxano (um antagonista do receptor opióide), sugerindo um envolvimento dos mecanismos serotoninérgico (receptores serotoninérgicos, principalmente 5HT₃) com o sistema opióide endógeno tanto periférico como central. Estudos com antidepressivos tricíclicos demonstram também a interação com o sistema opióide endógeno, além de demonstrar sua interação com os receptores α_1 e α_2 , bem como com receptores colinérgicos e histamínicos tanto central como periféricamente levando a uma inibição desses sistemas contribuindo para o efeito analgésico dos antidepressivos (Sawynok, 2001). Quanto ao tratamento da dor, os métodos empregados no tratamento podem ser farmacológicos ou não farmacológicos. Para o tratamento farmacológico podem ser usadas drogas não esteróides, analgésicos opióides e analgésicos adjuvantes. Dentre as técnicas não farmacológicas podemos destacar a TENS como sendo uma ferramenta útil no controle da dor (Melzack & Wall, 1987; Potter *et al.* 1993; Silver *et al.* 1998; Thornton *et al.* 1998).

1.3 Implicações Cardiorrespiratórias da Dor

A dor é um fenômeno multidimensional que abrange estimulação física, mudanças autonômicas e da fisiologia sensorial. Possui uma diversidade de fatores etiológicos implicados, podendo ocorrer como resultado de uma doença crônica, de transtornos físicos e psicológicos ou ainda apresentar uma causa desconhecida (Melzack & wall, 1987). Quanto aos sinais e manifestações de dor as crianças, como os adultos, apresentam alterações fisiológicas (cardiovascular, respiratórias, imunológicas, hormonal e metabólica) e comportamentais frente a estímulo doloroso (Guinsburg *et al.* 1999). Entre as alterações fisiológicas podemos observar aumento da frequência cardíaca, aumento da frequência respiratória e aumento da pressão arterial (componente sistólico), variação da pressão intracraniana, diminuição da saturação de oxigênio, diminuição da troca gasosa com retenção de gás carbônicos, aumento da sudorese, rubor cutâneo, agitação e midríase. Essas reações são acompanhadas de reações endócrino-metabólicas de estresse, com liberação de hormônios como a catecolaminas, cortisol ou precursores e componentes imunológicos ligados ao processo inflamatório. (Haward *et al.* 1998; Wong *et al.* 1999).

A dor desencadeia uma série de respostas neuroendócrinas e cardiovasculares com o objetivo de preparar o organismo contra a agressão, em um tipo de resposta de “luta ou fuga” (Guinsburg *et al.* 1999). Assim, ocorre aumento do catabolismo e bloqueio do anabolismo no intuito de se mobilizar todas as reservas metabólicas para a produção de energia, por meio da secreção de hormônios contrareguladores como glucagon, hormônio de crescimento, catecolaminas e corticosteróides, além de elevação da resistência periférica à insulina. Essas alterações levam à hiperglicemia e a aumento dos níveis de ácido lático e corpos cetônicos, com conseqüente acidose metabólica e outras alterações hidroeletrolíticas. No que diz respeito ao metabolismo protéico, o balanço nitrogenado negativo, decorrente do bloqueio do anabolismo, impossibilita a incorporação adequada de proteínas aos tecidos, levando o paciente a um aumento no gasto calórico, podendo chegar até à desnutrição, na dependência da duração do estímulo nocivo e da dor decorrente deste estímulo. Paralelamente a essas alterações neuroendócrinas, há, também, alterações hemodinâmicas decorrentes da secreção aumentada de aminas simpatomiméticas, no objetivo de preservar a circulação em órgãos nobres, como coração e cérebro, em detrimento dos outros órgãos. Dessa forma, ocorre aumento da resistência vascular periférica, com conseqüente aumento da pós-carga e maior

trabalho cardíaco, levando a maior consumo de oxigênio pelo miocárdio (Haward *et al.* 1998; Guinsburg *et al.* 1999; Wong *et al.* 1999).

1.4- Participação da Serotonina no controle Cardiorrespiratório

A síntese de serotonina se inicia com o aminoácido essencial triptofano sendo hidroxilado pela triptofano hidroxilase e formando o 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que é então descarboxilado pelo aminoácido aromático descarboxilase, sintetizando assim, a serotonina (5-HT). Essa serotonina é estocada em vesículas que são liberadas na fenda sináptica no impulso nervoso. Depois de liberada a serotonina pode ativar um receptor serotoninérgico e/ou pode ser transportada de volta para um terminal pré-sináptico por transportadores específicos. A enzima monoamina oxidase realiza a metabolização da serotonina em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) que é então liberado na urina (Wong *et al.* 1995).

Os ISRS promovem a sua ação farmacológica primariamente inibindo o transportador responsável pela recaptção do neurotransmissor serotonina. Esse transportador é denominado transportador de serotonina ou bomba de recaptção de serotonina, e é responsável por retirar da fenda sináptica as moléculas de serotonina e retorná-las ao neurônio pré-sináptico. Essa bomba de recaptção possui uma proteína transportadora específica (carreador) que depende do íon sódio para se ligar ao neurotransmissor, e também necessita da energia fornecida pelo sistema enzimático sódio-potássio ATPase para transportar a serotonina de volta ao neurônio pré-sináptico, permitindo, dessa forma, o rearmazenamento para posterior reutilização desse neurotransmissor (Stahal, 2002).

Os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos localizam-se nos núcleos da rafe, que são estruturas localizadas na linha mediana do tronco cerebral, e que se estendem desde os núcleos interpedunculares até a decussação das pirâmides no tronco cerebral. Ocupam ao longo do tronco cerebral uma área que vai desde o bulbo até o mesencéfalo, passando pela ponte. Os núcleos da rafe estão organizados por dois grupos distintos: o rostral, constituído pelos núcleos linear, paramediano, dorsal, mediano e pontino, que estão situados no mesencéfalo e ponte, e o grupo caudal, constituído pelos núcleos magno, pálido e obscuro, situados no bulbo (Brodal, Taber e Walberg, 1960; Aghajanian, Wang e Baraban,

1978; Smits, Van Essen e Struyker-Biudier, 1978; Robinson, Austin e Gibbens, 1985; Minson *et al.* 1990). Os neurônios dos núcleos caudais da rafe projetam-se para núcleos e áreas da formação reticular e outros núcleos do tronco cerebral e intensamente para a medula espinhal, incluindo a coluna intermédio-lateral, fazendo sinapse, respectivamente com neurônios das lâminas I, II e V e com grupos de neurônios pré-ganglionares simpáticos (Dahlström & Fuxe, 1965; Fritschy *et al.* 1978; Amendt *et al.* 1979; Loewy *et al.* 1981, Loewy *et al.* 1982; Loewy & Neil, 1981; Holstege & Kuypers, 1982; Bacon, Zagon e Smith, 1990; Gilbey, Futuro Neto e Zhou., 1995; Antal *et al.* 1996; Li *et al.* 1996). A ligação dos núcleos bulbares da rafe com grupos de neurônios pré-ganglionares simpáticos da medula espinhal corroboram as pesquisas sobre a participação da serotonina na regulação autonômica (Lowey, 1981; Futuro-Neto & Coote, 1982a; Futuro-Neto & Coote, 1982b; Helke *et al.* 1997; Skinner *et al.* 1997).

Existem projeções serotonérgicas para todas as regiões do cérebro, e por isso a serotonina está envolvida em tantas funções. O sistema cardiovascular é provavelmente a primeira área que foi atribuída aos efeitos da serotonina. O que se sabe sobre o papel da serotonina no sistema cardiovascular é baseado no conhecimento de que existem sete tipos de receptores serotonérgicos (5-HT₁ a 5-HT₇) que são subdivididos em quatorze subtipos de receptores serotonérgicos. Dentro do grupo 5-HT₁ existem os subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}. Existem três subtipos do receptor 5-HT₂, o 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}, assim como dois tipos 5-HT₅, o 5-HT_{5A} e o 5-HT_{5B}. A maioria desses receptores está acoplada à proteína G, com exceção da classe dos receptores 5-HT₃, que são canais iônicos. Esses receptores podem ser encontrados em diversas regiões do sistema nervoso central e em tecidos periféricos (Ramage & Villalón, 2008; Bard *et al.* 1993).

Todos os receptores 5-hidroxitriptamina (5-HT; serotonina), exceto o subtipo 5-HT₆, apresentam envolvimento na regulação cardiovascular. Periféricamente, 5-HT está presente nas plaquetas, porém seu papel fisiológico na regulação do tônus vascular permanece incerta, ou melhor, controversa. Todavia, centralmente os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₃ e 5-HT₇ demonstram estar envolvidos na regulação fisiológica dos reflexos cardiovasculares, controlando mudanças no disparo parassimpático (via nervo vago) para o coração, além de influenciar a atividade do sistema nervoso simpático. Devido essa grande diversidade do sistema serotonérgico na regulação cardiovascular podemos observar sua atuação em eventos opostos, como por

exemplo, a exposição da serotonina centralmente via receptor 5-HT_{1A} pode causar redução da pressão arterial por inibição central, enquanto que a estimulação central de receptores 5-HT₂ promove elevação da pressão arterial (Philippu, 1988; Merahi, Orer e Laguzzi, 1992; Siegel *et al.* 1999).

A afinidade da serotonina pelos diferentes subtipos de receptores varia. A maior afinidade da serotonina é pelo receptor 5-HT₁ e a menor é pelo receptor 5-HT₃. Esta diferença na afinidade leva os neurônios a responderem diferentemente à liberação de serotonina, pois com baixa concentração de serotonina já é possível ativar os receptores 5-HT₁(Ramage & Villalón, 2008).

Estudos apontam divergências em relação a ação dos neurônios serotoninérgicos (5-HT) centrais em modular o sistema respiratório, permanecendo controverso em relação a sua influencia excitatória ou inibitória. Hodges *et al.* (2009) em um estudo recente demonstra que a função respiratória no período neonatal é criticamente dependente dos neurônios serotoninérgicos, os quais fornecem, nesse período, um importante *drive* excitatório via ativação do receptor 5-HT_{2A}. Outros estudos apresentam que a ativação central dos receptores 5-HT_{1A} causa redução da pressão arterial e da frequência cardíaca, além de uma tendência a aumentar a frequência respiratória, por outro lado, Pasquale *et al.* (2008) Demonstrou que a aplicação espinal do agonista do receptor 5-HT_{1B} apresentou uma depressão na atividade do nervo frênico em ratos neonatais.

1.5. Modelo Experimental Álgico (Formalina)

A indução de dor promovida pela formalina é um modelo animal de dor somática persistente bem estabelecido, e é considerado um modelo de dor inflamatória clínica e de sensibilização nervosa. Essa técnica consiste na injeção subcutânea de formalina na pata de ratos ou camundongos, promovendo uma irritação local através da estimulação dos nociceptores periféricos, a qual é conhecida como fase 1 (dor nociceptiva). Em seguida ocorre a liberação de uma variedade de compostos químicos através das células e dos tecidos danificados e irritados pela formalina. Essas substâncias incluem a bradicinina, histamina, prostaglandina, leucotrienos, acetilcolina, serotonina e substância P, cada uma origina-se de diferentes populações de células, mas todas atuam para reduzir o limiar de ativação dos

nociceptores e nervos, essa fase é conhecida como fase inflamatória (fase 2) que leva a sensibilização do nervo, nesse momento essa dor pode ser associada clinicamente com a dor de origem neuropática. Sendo assim, sabe-se que a aplicação de formalina possui uma característica de apresentar-se com uma resposta bifásica, sendo essa independente da concentração utilizada (0,5,1,1,5 e 2,5%) (Capone et al., 2004; Abbott *et al.* 1995; Kim *et al.* 2006).

1.6. Considerações Finais

A TENS apresenta-se como uma ferramenta útil no alívio de dores crônicas e agudas, entretanto o mecanismo de ação envolvido na promoção de analgesia permanece controverso. Para tanto, diante da relevância clínica da potencia analgésica da TENS o presente estudo busca evidenciar a ação analgésica periférica da TENS e sua interação com o sistema serotoninérgico na modulação da dor, além de avaliar as alterações cardiorrespiratórias apresentadas diante desses diferentes estímulos aplicados.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Investigar os mecanismos periféricos associados à analgesia da TENS de alta e baixa frequência, assim como o envolvimento do sistema serotoninérgico e repercussões cardiorrespiratórias.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar a Pressão Arterial, Frequência Cardíaca e Frequência Respiratória na presença de dor, durante aplicação da TENS de alta e baixa frequência de ratos tratados ou não com sertralina.
- Analisar a Atividade sensorial do nervo ciático na presença de dor, durante aplicação da TENS de alta e baixa frequência de ratos tratados ou não com Sertralina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A investigação foi conduzida de acordo com as normas estabelecidas pelo *Guide care and use of laboratory* e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), parecer nº 019/2009.

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados quarenta e oito ratos Wistar, em seis grupos (n=8 em cada grupo), com peso corporal entre 300 e 350 gramas, mantidos no Biotério de Pesquisa do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da UFES. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o guia de pesquisas biomédicas para utilização de animais laboratoriais, como declarado pela Federação da Sociedade Brasileira de Biologia Experimental. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura ambiente controlada a 22°C e iluminação artificial, sendo o fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, com alimentação e água *ad libitum*. Os parâmetros avaliados neste estudo foram atividade do nervo ciático (ANC), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR) de ratos anestesiados, com estímulo nociceptivo, antes da aplicação da TENS de alta e baixa frequências.

Os grupos foram divididos em: FORM, FORM+SER, FOR+TENS-AF, FORM+TENS –AF+SER, FOR+TENS –BF e FOR+TENS-BF+SER.

Após a estabilização hemodinâmica do animal, em todos os grupos experimentais foi administrado uma solução de paraformaldeído (5 %) num volume de 50 µl injetada subcutaneamente na superfície plantar da pata trazeira esquerda por meio de uma agulha de anestesia odontológica (30G), com o intuito de promover dor nociceptiva (Rokugo et al., 2002). Após a injeção foram avaliados os parâmetros pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e atividade do nervo ciático (ANC) nos tempos basal, 10, 20, 30 e 50 minutos. Os grupos FORM, FORM+TENS-AF e FOR+TENS-BF foram tratados com NaCl a 0,9% PA diluído em água destilada, usado como controle, por um período de sete dias consecutivos antes de iniciar o protocolo experimental, já os grupos FOR+SER, FOR+TENS-AF+SER e FOR+TENS-BF+SER foram tratados com sertralina na dose de 3

mg/kg/dia *i.p.*, diluída em salina, sonicada e injetada diariamente por via intraperitoneal (*i.p.*) por um período de sete dias consecutivos em um volume de 0,3 ml. Os grupos FOR+TENS-AF, FOR+TENS-AF+SER, FOR+TENS-BF e FOR+TENS-BF+SER receberam ainda uma terapêutica analgésica conhecida como estimulação elétrica transcutânea do nervo – TENS. Para tanto foi utilizado um equipamento disponível comercialmente Neurodin III/ bramed[®], esse equipamento foi previamente calibrado e os parâmetros utilizados na pesquisa foram os seguintes: para baixa (BF: 10 Hz) e alta frequência (AF: 130 Hz), com duração de pulso fixa em 130 μ s (Sabino et al., 2008). A intensidade foi definida pelo limiar sensorial, ou seja, imediatamente antes de visualizar contrações musculares como definido por Sluka et al. 2003. A TENS foi administrada de forma associada à injeção de formalina e mantida ligada por 20 minutos como recomendado e utilizado na clínica. Foram confeccionados eletrodos especificamente para o tamanho do rato (com diâmetro de 0,5cm) e fixados com adesivo sobre a articulação do joelho esquerdo, sendo um medial e outro lateral, antes do início do experimento, a fim de evitar possíveis alterações no registro da ANC.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

1. Grupo FORM – Formalina (s.c) – 0,05 ml à 5%;
2. Grupo FORM + SER – sertralina (*i.p.*, 3mg/Kg/dia – por 7 dias) + Formalina (0,05 ml);
3. Grupo FORM + TENS-AF - formalina (5%) + TENS (130 Hz);
- 4 Grupo FORM +TENS-AF + SER - formalina (5%) + TENS (130 Hz) + sertralina (*i.p.*, 3mg/Kg/dia – por 7 dias);
5. Grupo FOR + TENS-BF - formalina (5%) + TENS (10 Hz);
6. Grupo FOR + TENS-BF + SER - formalina (5%) + TENS (10 Hz) + sertralina (*i.p.*, 3mg/Kg/dia – por 7 dias);

3.3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.3.1. Anestesia

Os animais foram anestesiados com halotano para a indução anestésica por inalação. Esses animais eram então fixados em decúbito dorsal a uma mesa

cirúrgica e mantidos sob anestesia por inalação com uma máscara feita com auxílio de um bquer revestido internamente com algodão embebido no anestésico inalatório. Esse procedimento foi realizado para que fosse possível a cateterização da veia femoral, e posteriormente, era administrado o anestésico geral (uretana) lentamente por via intravenosa (*i.v.*) até atingir a dose de 1,2 g kg *I.V.* A escolha do anestésico se deve ao fato de esse não promover significativa depressão dos reflexos cardiovasculares e respiratórios do animal, mantendo um plano anestésico estável por um longo período (MAGGI e MELI, 1986).

3.3.2 Cateterização

Os animais foram fixados em decúbito dorsal a uma tábua cirúrgica de madeira. Uma pequena incisão cutânea de aproximadamente 1 cm foi feita na linha mediana ventral da região inguinal esquerda, próximo à virilha do animal, com a finalidade de expor a artéria femoral direita, então, a artéria femoral foi canulada utilizando-se um cateter de polietileno PE-50 preenchido com salina-heparina (100:1/UI) acoplado a uma seringa de 1 mL. Este procedimento cirúrgico foi realizado com finalidade de registrar a pressão pulsátil (PAP) e média (PAM) do animal, através da conexão da cânula inserida na artéria femoral a um transdutor de pressão (Viggo-Spectramed, P23XL) que por sua vez estava conectado a um amplificador (Pressure Processor, Gould 20-4615) e registrado em um polígrafo (Gould RS 3400) previamente calibrado. Através da canulação da artéria femoral também foi possível registrar a frequência cardíaca (FC) por meio de um freqüencímetro (Biotach, Gould 13-64615), previamente calibrado, a partir da onda de pulso da pressão arterial. Os registros da PAP, PAM, e FC foram digitalizados (Biopac MP100) e armazenados no disco rígido de um computador.

3.3.3. Traqueostomia

Para a colocação da cânula traqueal foi feita uma incisão de aproximadamente 3 cm na linha mediana ventral da região cervical, com exposição e afastamento dos músculos esterno hióideo e esterno tireóideo, para a visualização da traquéia. A incisão cirúrgica foi feita entre os anéis traqueais cartilagosos e em seguida,

inserido o tubo de polietileno com 2 mm de diâmetro interno e 6 cm de comprimento, interiorizando aproximadamente 1 cm na traquéia. Este procedimento cirúrgico foi realizado para facilitar a respiração espontânea do animal durante a realização do experimento, e com finalidade de registrar a frequência respiratória do animal. O registro do volume respiratório foi realizado conectando-se a cânula traqueal a um pneumotacógrafo ligado a um transdutor de baixa pressão (Validyne DP45) e a um amplificador (Carrier Amplifier, Gould 20-4615).

3.3.4. Exposição do nervo ciático

Para acessar o nervo ciático e permitir sua manipulação o animal foi posicionado em decúbito ventral e o nervo ciático ramo descendente da pata esquerda foi exposta através de uma incisão cutânea longitudinal retilínea de 1,5 a 2 cm de comprimento na face posterior da coxa (região pélvica). O espaço entre os músculos foi dissecado e os componentes do nervo ciático identificados. Para que houvesse somente registro da porção sensitiva do nervo foi realizado uma secção transversa total do coto proximal do ciático.

Para o registro da atividade nervosa, o nervo foi dissecado sob amplificação por microscópio (M900, DF Vasconcelos[®], São Paulo, Brasil) para seleção do nervo ciático e posterior acomodação em eletrodos de prata para registro da atividade nervosa. Com a finalidade de evitar lesão, lubrificar e manter a integridade do nervo foi utilizado óleo mineral sobre a incisão. Após esse procedimento, os potenciais de ação extracelulares basais foram registrados em um amplificador (NL 104, Neurolog[®], Digitimer, Welwyn Garden, UK). Os sinais foram filtrados (NL 126, Neurolog[®], Digitimer, Welwyn Garden, UK) e conectados a um amplificador de áudio (NL 120, Neurolog[®], Digitimer, Welwyn Garden, UK) e ligados a um osciloscópio (Tektronix 2205, General Electric[®], New Jersey, USA). Posteriormente, foram processados em um discriminador de potenciais de ação Spike trigger (NL 200, Neurolog[®], Digitimer, Welwyn Garden, UK) e em um integrador de pulso (NL 601, Neurolog[®], Digitimer, Welwyn Garden, UK), sendo simultaneamente digitalizados pelo software Acqknowledge for Windows (Biopac System[®], Santa Barbara, California, USA), para posterior análise.

3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Após canulações, traqueostomia, exposição do nervo ciático e acoplamento para registros hemodinâmicos, todos os aparelhos foram calibrados. Posteriormente esperava-se a estabilização hemodinâmica do animal e registravam-se os valores basais da PAM, FC, FR e ANC, em seguida foi administrado formalina na pata trazeira esquerda e simultaneamente a TENS de alta, baixa frequência somente para os grupos que recebiam essa terapêutica. Os registros foram avaliados nos seguintes tempos: basal e 10, 20, 30 e 50 minutos após formalina ou após formalina + TENS (Fig 1). Durante todo o experimento, a temperatura corporal do animal foi mantida em $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por meio de uma manta térmica (Harvard-Homeothermic Blanket Control Unit), com o sensor (par termoeletrico) posicionado no reto do animal. Ao final de cada experimento, foram conferidas as calibrações nos aparelhos a fim de garantir resultados fidedignos, além disso, o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.

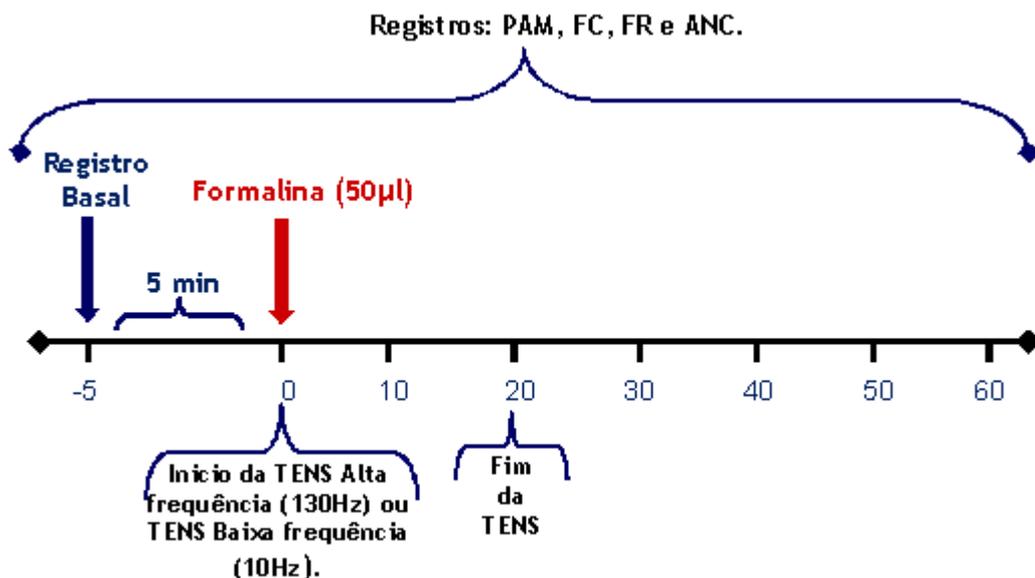


Figura 2. Protocolo de registro dos parâmetros estudados (PAM, FC, FR e ANC) em ratos anestesiados, durante aplicação de Formalina isoladamente ou aplicação de formalina associado à TENS de alta e baixa frequência. Basal = registros iniciais; Formalina = momento da injeção de formalina e os seguintes tempos que foram coletados os dados (10, 20, 30 e 50 minutos).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por software estatístico (Graph-Pad® Prism4), no qual se utilizou análise de variância (ANOVA) duas vias, seguido do teste *post-hoc* de Fisher para múltiplas comparações. Os valores foram expressos como média \pm EPM e as diferenças fixadas em $p < 0,05$.

Para análise estatística dos dados referentes à ANC, os valores foram transformados em porcentagem, uma vez que não seria possível a comparação dos dados brutos já que eles são expressos em unidades arbitrárias. Para tanto admitiu-se os valores basais (antes da administração da droga) como 100%.

3 RESULTADOS

4.1. EFEITOS DA FORMALINA E DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA DE ALTA E BAIXA FREQUÊNCIA NA ATIVIDADE DO NERVO CIÁTICO

A figura 3 mostra um registro típico do grupo FORM, apresentando o efeito de formalina sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos basal, 10, 20, 30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.

Conforme demonstrado na Figura 4, a ANC diminuiu significativamente na TENS de alta frequência (FORM+TENS-AF) em todos os tempos avaliados quando comparada ao grupo FOR (28,2±8,5; 11,6±6,2; 40,6±11; 50,8±14 vs. - 29,6±6,08; - 22,2±7; -25±6,4; -29±7,2; P<0,01, respectivamente). a mesma redução na ANC foi observado com a TENS de baixa frequência (FOR+TENS-BF) quando comparado ao grupo FORM (28,2±8,5; 11,6±6,2; 40,6±11; 50,8±14 vs. - 23±5,4; -21,7±6,4; - 29±6,1; -31±5,9; P<0,01, respectivamente).

Quando os animais foram tratados com sertralina (3mg/kg/dia) e submetidos ao protocolo de formalina e TENS de alta e baixa frequência, observamos o mesmo padrão reduzido de reposta da ANC no grupo FOR+TENS-AF+SER comparado com o grupo FORM (- 24,7±6,7; -26,2±6,7; -25,6±8; -33±7,4 vs. 30,1±7,9; 16±8,3; 20,6±7; 20,1±7,2, P<0,01, respectivamente) e no grupo FOR+TENS-BF+SER quando comparado com o grupo FOR+SER (- 15,5±4,5; -23,7±6,2; -24±5,1; -31±6, vs. 30,1±7,9; 16±8,3; 20,6±7; 20,1±7,2, P<0,01, respectivamente) (Figura 5).

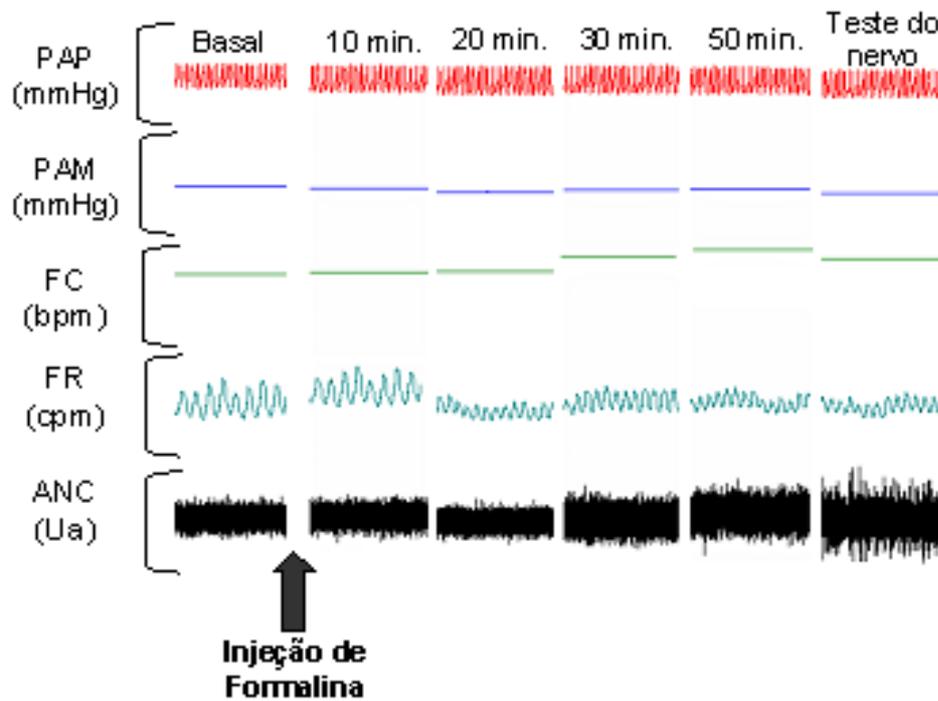


Fig. 3: Registro típico do grupo FORM, mostrando o efeito da aplicação da Formalina sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático.

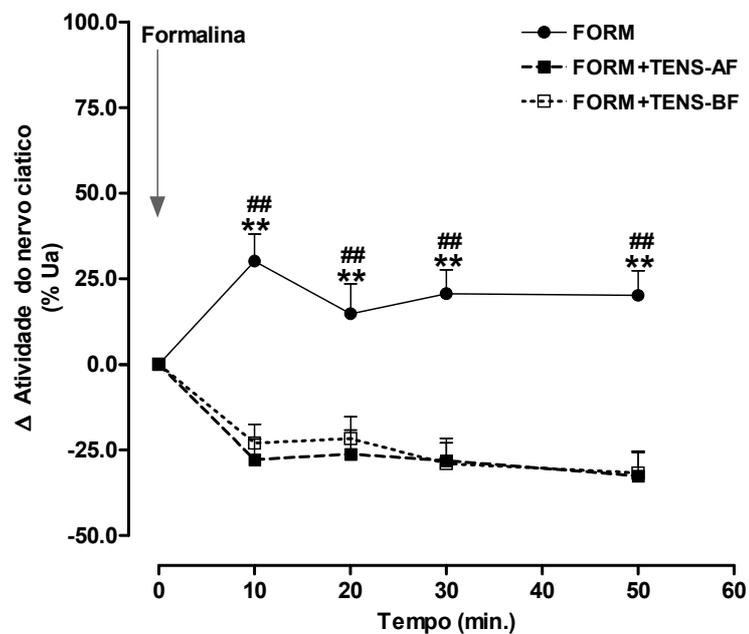


Figura 4. Determinação da ANC nos grupos FORM, grupo FORM+TENS-AF e grupo FORM+TENS-BR nos tempos de 0 e 10, 20, 30 e 50 minutos. ANOVA, seguido de Fisher como *post-hoc* * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (quando FORM vs. FORM+TENS-AF), # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ (quando FORM vs. FORM+TENS-BF) (n=8 por grupo).

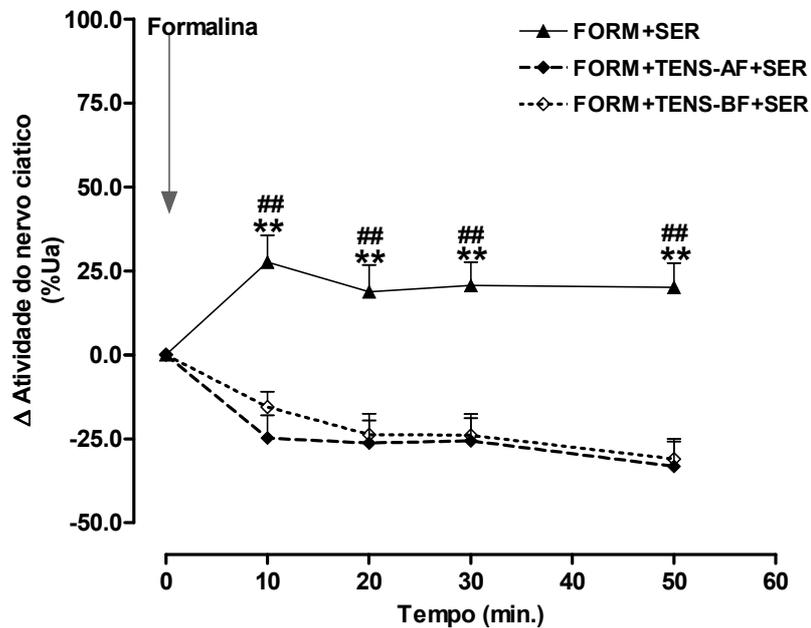


FIGURA 5. Determinação da ANC nos grupos FORM+SER, grupo FOR+TENS-AF+SER e grupo FORM+TENS-BF+SER nos tempos de 0 e 10, 20, 30 e 50 minutos. ANOVA, seguido de Fisher como *post-hoc* * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (quando FORM+SER vs. FORM+TENS-AF+SER), # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ (quando FORM+SER vs. FORM+TENS-BF+SER) (n=8 por grupo).

Ao avaliarmos a Figura 6, podemos observar a comparação entre as médias da ANC entre os grupos FORM vs o grupo FOR+SER. A ANC apresentou valores mais altos no grupo FOR quando comparado com o grupo FORM+SER no tempo de 50 minutos após a aplicação do estímulo nocivo - Formalina ($50,8 \pm 14$; vs. $20,1 \pm 7,2$, $p < 0,01$, respectivamente).

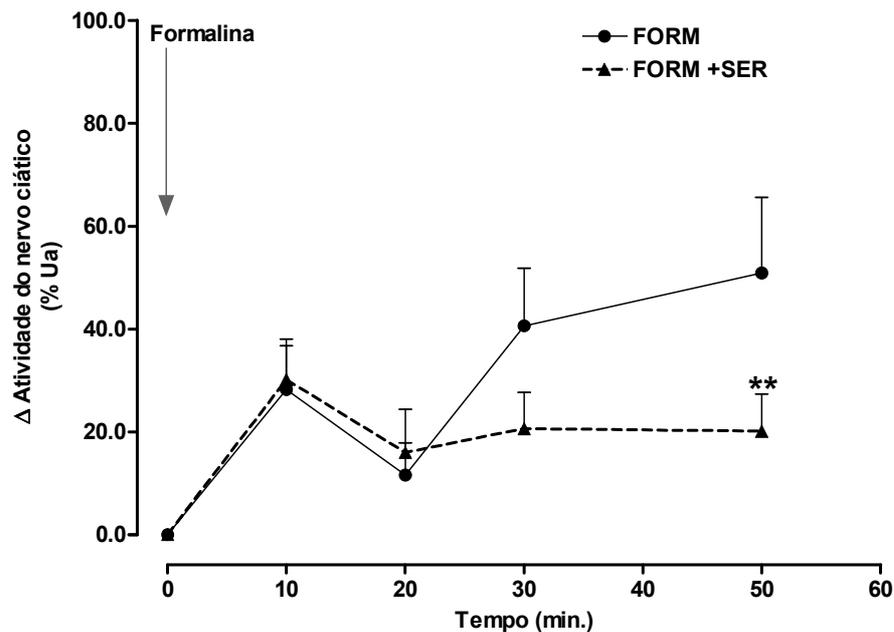


Figura 6. Determinação da ANC nos grupos FORM +SER e grupo FORM nos tempos de 0 e 10, 20, 30 e 50 minutos. ANOVA, seguido de Fisher como *post-hoc* * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (quando FORM+SER vs. FORM) (n=8 por grupo).

4.2. EFEITOS DA FORMALINA E DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA DE ALTA E BAIXA FREQUÊNCIA NOS PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS.

Conforme demonstrado na Figura 7A, podemos observar um aumento da pressão arterial média no grupo FORM no tempo de 30 minutos após injeção de formalina quando comparado com o grupo FOR+TENS-AF nesse mesmo tempo ($1,3 \pm 3,3$ vs. $-4,2 \pm 2,3$, $p < 0,05$ respectivamente).

Quando os animais foram tratados com Sertralina (3mg/Kg/dia) e submetidos ao protocolo de formalina e TENS de alta e baixa frequência (Fig. 7B), podemos observar um aumento da pressão arterial média no grupo FOR+TENS-AF+SER no tempo de 10 e 20 minutos após formalina + TENS quando comparado com o grupo FORM+SER ($2,1 \pm 0,8$; $2,25 \pm 1,6$ vs. $-3,3 \pm 1,7$; $-3,5 \pm 2,7$, $p < 0,05$, respectivamente), ainda podemos observar um aumento estatisticamente significativo da PAM entre o grupo FORM+TENS-AF+SER nos tempos de 30 e 50 minutos após injeção de formalina e pós término da TENS com o grupo FORM+TENS-BF+SER ($1,5 \pm 1,8$; $1,6 \pm 2,2$ vs. $-5,3 \pm 2,5$; $-6,5 \pm 2,7$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

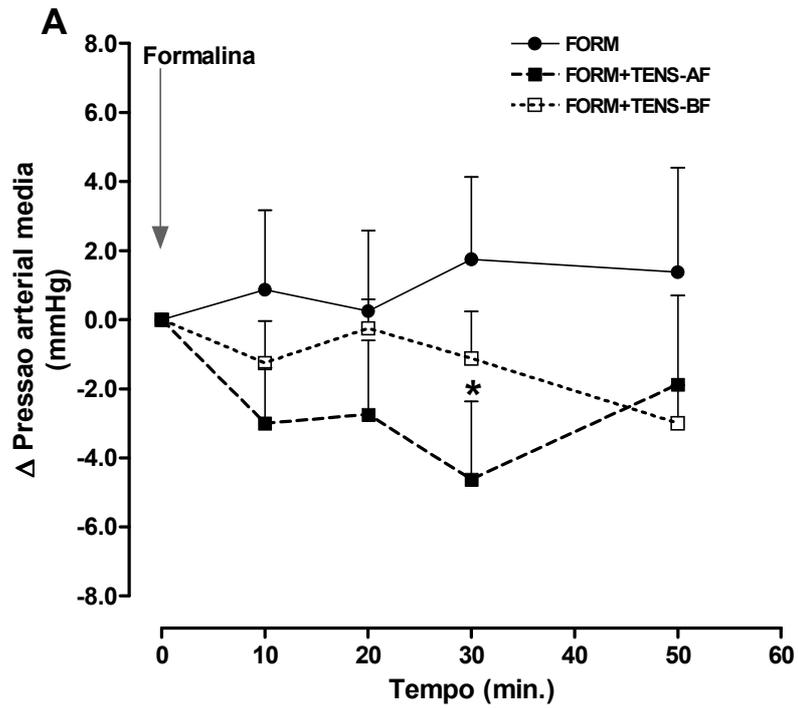


FIG. 7: A: Determinação da PAM nos grupos FORM, grupo FOR+TENS-AF e grupo FOR+TENS-BF nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 50 minutos. ANOVA, seguido de Fisher como *post-hoc* * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (quando FORM vs. FORM+TENS-AF) ($n=8$ por grupo).

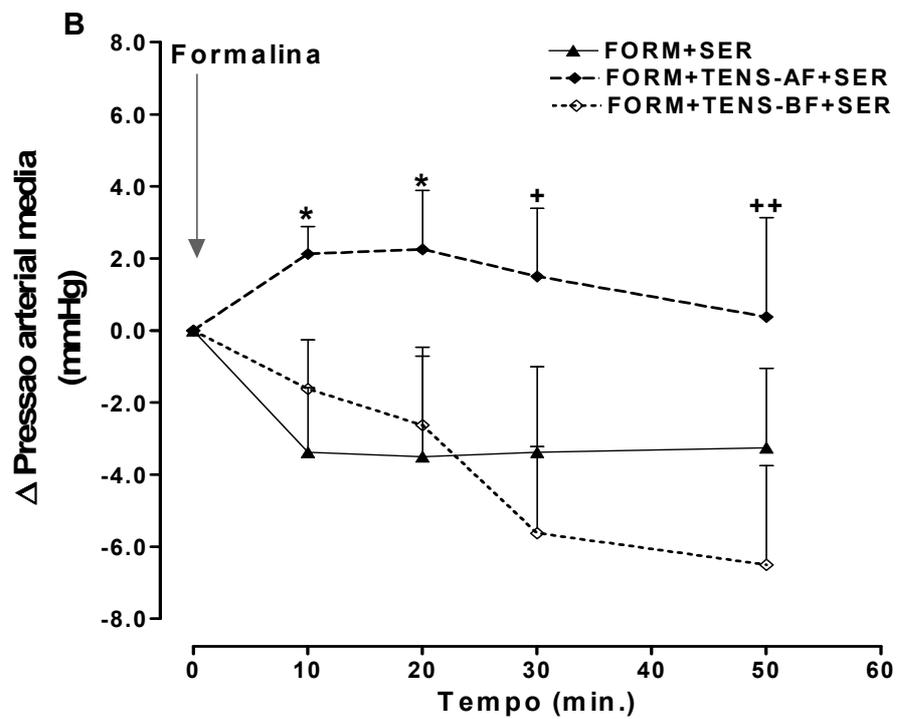


FIG. 7: B: Determinação da PAM nos grupos FORM+SER, grupo FOR+TENS-AF+SER e grupo FOR+TENS-BF+SER nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 50 minutos. ANOVA, seguido de Fisher como *post-hoc* * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (quando FORM+SER vs. FORM+TENS-AF+SER), + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ (quando FOR+TENS-AF+SER vs. FOR+TENS-BF+SER) (n=8 por grupo).

Conforme demonstrado na Figura 8A, observamos uma taquicardia no grupo FORM no tempo de 30 minutos após formalina quando comparado com o grupo FOR+TENS-AF. ($16,3 \pm 6,5$ vs. $5,8 \pm 4,7$, $p < 0,05$, respectivamente).

Quando os animais foram tratados com Sertralina (3mg/Kg/dia) e submetidos ao protocolo de formalina e TENS de alta e baixa frequência (Fig. 8 B), não observamos alterações entre os diferentes grupos durante todo o período do protocolo experimental.

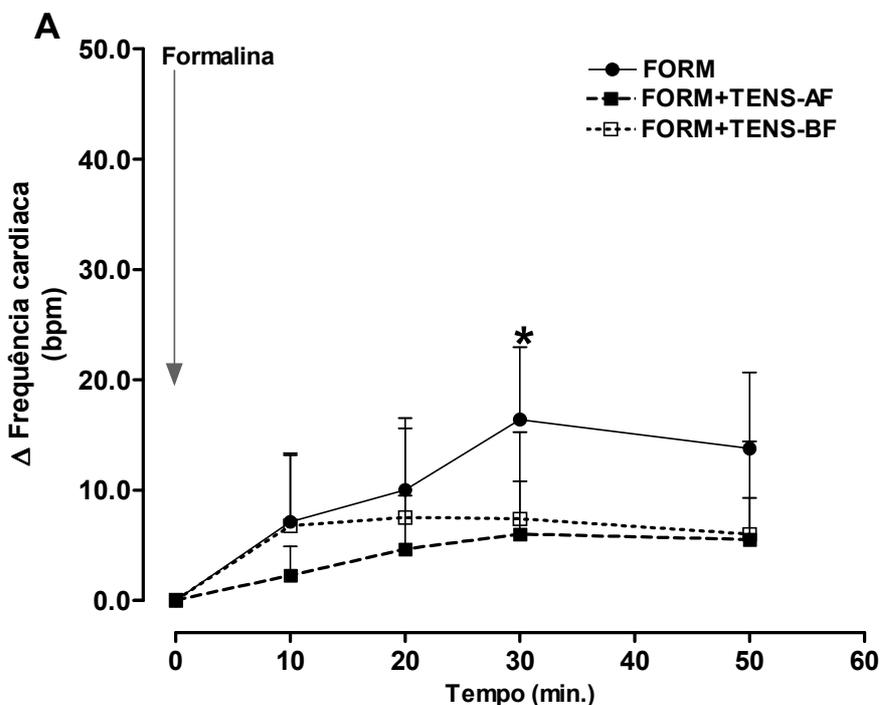


FIG. 8: A: Determinação da FC nos grupos FORM, grupo FOR+TENS-AF e grupo FOR+TENS-BF nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 50 minutos. ANOVA, seguido de Fisher como *post-hoc* * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (quando FORM vs. FORM+TENS-AF) (n=8 por grupo).

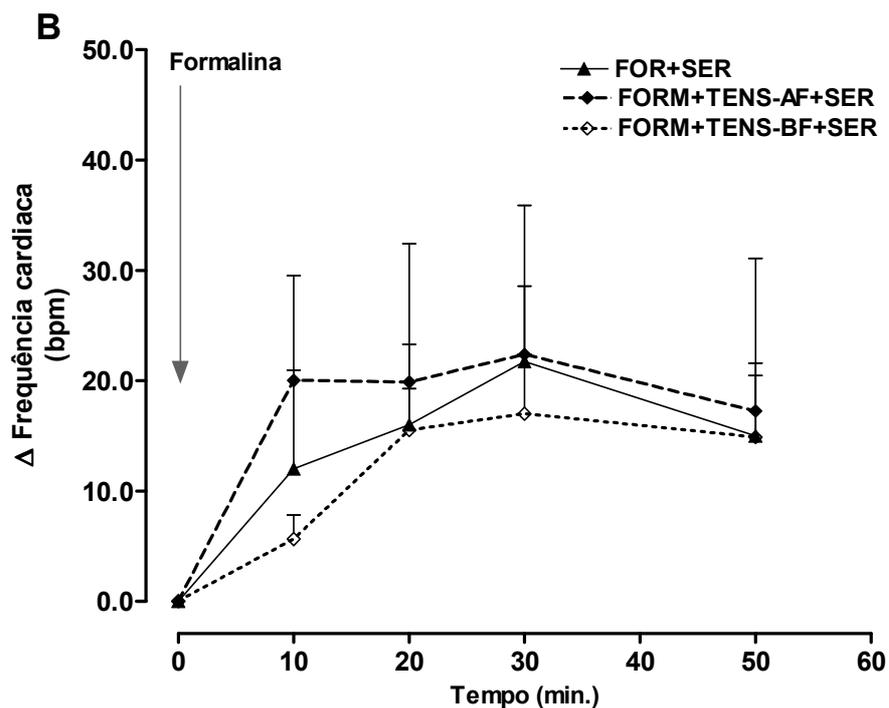


FIG. 8: B: Determinação da FC entre os grupos FOR+SER, grupo FOR+TENS-AF+SER e grupo FOR+TENS-BF+SER nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 50 minutos. (n=8 por grupo).

Conforme demonstrado na Figura 9 A, observamos um aumento da frequência respiratória no grupo FORM no tempo de 20 minutos após injeção de formalina quando comparados com os grupos FORM+TENS-BF ($4,5 \pm 4$ vs. $-5,5 \pm 2,5$, $p < 0,05$, respectivamente) e também o grupo FORM+TENS-AF ($7,5 \pm 5$ vs. $-6,4 \pm 2,4$, $p < 0,05$, respectivamente).

Quando os animais foram tratados com Sertralina (3mg/Kg/dia) e submetidos ao protocolo de formalina e TENS de alta e baixa frequência (Fig. 9 B), observamos um aumento da FR nos tempos de 10 e 20 minutos após formalina + TENS no grupo FORM+TENS-BF+SER quando comparado ao grupo FOR+SER ($7,6 \pm 5,03$; $3,3 \pm 2,9$ vs. $-7,5 \pm 2$ e $-12,7 \pm 4,7$, $p < 0,01$, respectivamente). Além disso, o grupo FORM+TENS-AF+SER também apresentou um aumento da FR comparando com o grupo FORM+SER nos tempos de 10 e 20 minutos após injeção de formalina ($4,5 \pm 5,2$, $0 \pm 4,8$ vs. $-7,5 \pm 2,1$ $-12,7 \pm 4,7$, $p < 0,05$, respectivamente).

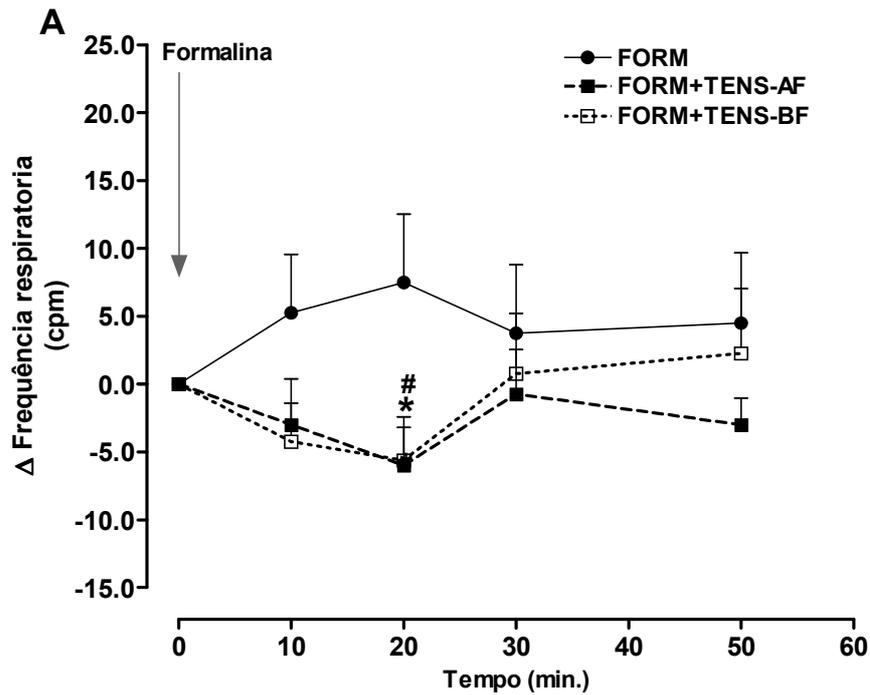


FIG. 9: A: Determinação da FR nos grupos FORM, grupo FOR+TENS-AF e grupo FOR+TENS-BF nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 50 minutos. ANOVA, seguido de Fisher como *post-hoc* * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (quando FORM vs. FORM+TENS-AF) (n=8 por grupo).

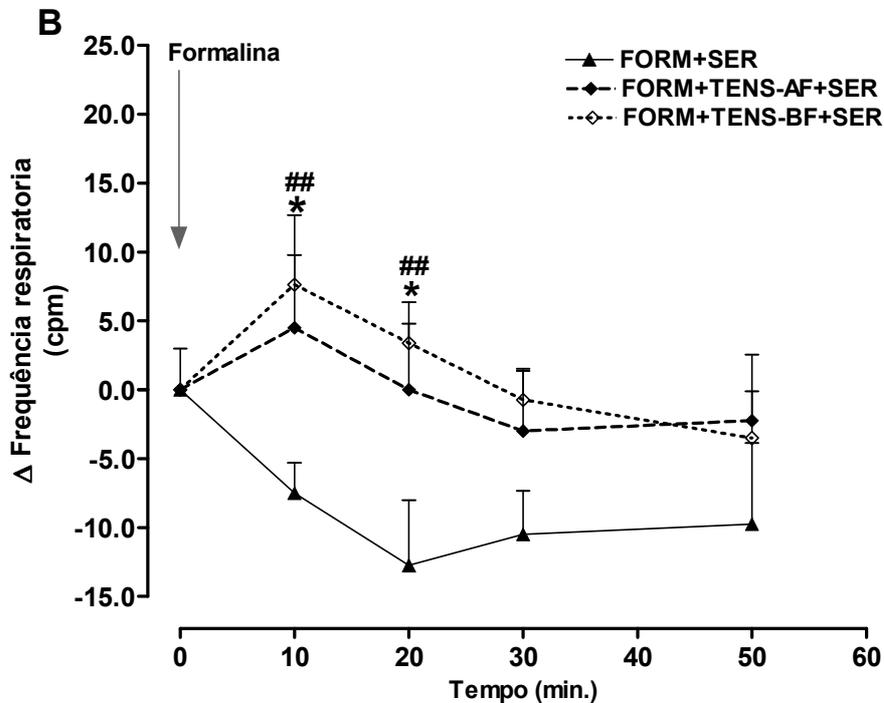


FIG. 9: B: Determinação da FR nos grupos FOR+SER, grupo FOR+TENS-AF+SER e grupo FOR+TENS-BF+SER nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 50 minutos. ANOVA, seguido de Fisher como *post-hoc* * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (quando FORM+SER vs. FORM+TENS-AF+SER), # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ (quando FORM+SER vs. FORM+TENS-BF+SER) (n=8 por grupo).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou os efeitos periféricos da TENS de alta e baixa frequência e sua interação com a serotonina endógena na promoção de analgesia, assim como, suas repercussões cardiorrespiratórias. Os dados obtidos nesse trabalho mostraram que a TENS foi capaz de atenuar significativamente a atividade sensorial de ratos em presença de estímulo doloroso. Entretanto, o tratamento com ISRS (sertralina), não foi capaz de potencializar a analgesia quando associado à TENS. Por outro lado, quando o animal foi exposto somente ao estímulo álgico (formalina) o tratamento crônico com a sertralina demonstrou sua propriedade analgésica por meio de uma significativa redução da ANC.

Esses achados apontam um componente periférico importante no mecanismo analgésico da TENS, haja vista, a diminuição da atividade sensorial do nervo ciático após aplicação da TENS. O qual, conseqüentemente, reduziu a entrada do estímulo nociceptivo na medula espinal, promovendo significativa analgesia. Esse efeito pode ser explicado pela ativação do sistema analgésico opióide endógeno periférico que, quando na presença de lesão tecidual, promove liberação local de opióides endógenos através dos leucócitos, além da *up-regulation* dos receptores opióides nos nervos aferentes primários (Smith *et al.* 2008). King *et al.* (2005) demonstraram que a TENS ativa receptores adrenérgicos (α -2) periféricamente, o qual promove modulação do processo de analgesia periférica na presença de opióides (Smith, 2008). Além disso, Almay *et al.* (1985) & Hughes *et al.* (1984) demonstraram que a TENS promove aumento da concentração de opióides no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no plasma. Essas evidências sugerem os possíveis mecanismos de ação local de atuação da TENS em potencializar os mecanismos endógenos de analgesia periférica.

O tratamento com Sertralina parece não potencializar o efeito analgésico da TENS através da diminuição da ANC, entretanto, especulamos que essas respostas estejam diretamente relacionadas com uma saturação do efeito analgésico periférico já promovido pela TENS. Todavia, a Sertralina isoladamente apresentou um efeito analgésico importante pela diminuição da ANC no 50º minuto após aplicação do estímulo nocivo (formalina). Duman *et al.* (2004) demonstraram que a paroxetina (outro ISRS) apresentou um potencial analgésico, e que o mecanismo analgésico dessa droga, está relacionado com a interação entre o sistema serotoninérgico e o

sistema opióide endógeno no alívio da dor. Demonstram ainda que a analgesia parece ser mediada via ativação do subtipo de receptores serotoninérgicos 5-HT₃, tanto periféricamente quanto centralmente. Sabe-se também que a serotonina periféricamente atua como sinalizador da dor, entretanto, estudos mais recentes demonstram que as estimulações de diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos estão relacionadas tanto com ativação do sinal da dor, quanto com antinocicepção mediado pelo sistema serotoninérgico periférico (Sommer, 2004). Nakajima *et al.* (2009) demonstrou que os receptores 5-HT_{2A} assim como o 5-HT_{2C} estão envolvidos com a ativação do sinal da dor durante a inflamação periférica aguda, entretanto, Kesim *et al.* (2005) demonstraram que o receptor 5-HT₃ está relacionado com analgesia periférica e Jeong *et al.* (2004) relataram o envolvimento dos receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ e 5-HT₄ com a modulação da dor em nível central, na promoção da analgesia. Portanto, a resposta analgésica parece depender diretamente do tipo de receptor ativado.

Quanto aos parâmetros cardiorrespiratórios o estímulo nocivo demonstrou significativo aumento da frequência cardíaca (FC), da pressão arterial média (PAM) e da frequência respiratória (FR). Sendo que a TENS tanto de alta, quanto de baixa frequência promoveu uma reversão dos parâmetros cardiorrespiratórios. Além disso, a sertralina demonstrou respostas peculiares em relação as diferentes modalidades de aplicação da TENS e ao estímulo algíco (formalina).

A elevação da PAM e da FC apresentada no tempo de 30 minutos no grupo que recebeu somente o estímulo nocivo (formalina) corrobora a literatura que correlaciona o estímulo doloroso como um ativador do sistema nervoso simpático em resposta a um alerta, situação de estresse, apresentando alterações fisiológica como um sinal e/ou manifestação da dor (Guinsburg *et al.* 1999; Setz *et al.* 2001), de uma forma interessante a TENS de alta frequência foi capaz de evitar a elevação tanto da PAM quanto da FC e a TENS de baixa frequência apresenta uma tendência a essa resposta, demonstrando a capacidade analgésica da TENS revertendo um padrão de resposta à dor.

Tanto o aumento da FC como da PAM no grupo que recebeu o estímulo algíco foram significantes no tempo de 30 minutos após aplicação de formalina. Resultados que corroboram com o momento de efeito máximo da formalina (de 20 a 30 minutos pós-aplicação) (Abbott *et al.* 1995; Kim *et al.* 2006). Sendo assim, fica demonstrado que

o estímulo doloroso aplicado foi capaz de promover manifestações cardiovasculares em resposta à dor.

Ao associarmos a Sertralina com as diferentes modalidades de aplicação da TENS observamos respostas distintas da PAM. Houve uma significativa redução no grupo FORM+SER e no grupo FORM+TENS-BF+SER, enquanto que o grupo FORM+TENS-AF+SER observamos uma elevação da PAM. Sugerimos que a redução da PAM observada nos grupos acima citados possam ser atribuída ao efeito analgésico do tratamento com antidepressivo (ISRS), além da conhecida ação moduladora da serotonina sobre o sistema cardiovascular. Estudos atuais têm demonstrado que a serotonina atua no núcleo do trato solitário (NTS) sobre a regulação do sistema cardiovascular e que micro-injeções no NTS em baixas doses de 5-HT mostraram produzir respostas depressoras significantes (hipotensão e bradicardia), enquanto que altas doses provocaram o efeito oposto (hipertensão e taquicardia). Entretanto, o efeito hipotensivo parece estar relacionado com ativação seletiva dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂, enquanto que os efeitos hipertensivos estão relacionados com ativação dos receptores 5-HT₃ (Wolf *et al.* 1981; Laguzzi *et al.* 1984; Itoh e Bunag, 1991; Merahi *et al.* 1992). Por outro lado, Raimundo *et al.* (2009) demonstraram recentemente que a TENS de alta frequência foi capaz de aumentar a concentração plasmática de serotonina, dessa forma, inferimos que a alta frequência de TENS estaria promovendo um aumento marcante de serotonina plasmática, a qual poderia estar relacionada com a elevação da PAM na presença do estímulo de alta frequência apresentada em nossos resultados.

Outras evidências apontam diferentes atuações do sistema serotoninérgico em modular o sistema cardiovascular, segundo Ramage *et al.* (2001) existem áreas nos cérebros de ratos, nas quais a ativação de receptores 5-HT_{1A} tem demonstrado provocar um aumento na PAM, que são a rafe obscuro e a área pré-óptica, mas não em nível do núcleo paraventricular, enquanto as quedas na pressão sanguínea podem ser provocadas pela rafe dorsal, rafe magno e pálido e RVLM. Dreteler *et al.* (1991) demonstraram que microinjeções de agonistas do receptor 5-HT_{1A} na rafe obscuro de ratos anestesiados provocaram um aumento dose-dependente na pressão sanguínea, porém sem alterações na FC, o que poderia explicar o significativo aumento da PAM quando o animal foi exposto à alta frequência de estimulação da TENS, a qual promove aumento sistêmico de 5-HT (Anderson, *et al.* 1992; Raimundo, *et al.* 2009).

Em relação à respiração, nesse estudo demonstrou-se uma elevação da FR ao expor o animal a um estímulo nociceptivo. Esse padrão de resposta está diretamente relacionado com ativação do sistema de alerta, devido à exposição a uma situação de stress (Abbott *et al.* 1995; Setz *et al.* 2001). Entretanto, observamos que a TENS tanto de alta, quanto de baixa frequência foi capaz de reverter o padrão de resposta obtido anteriormente. Resultado atribuído à propriedade analgésica da TENS em reduzir as respostas fisiopatológicas à dor. Podemos ainda, associar a diminuição da FR promovida pela TENS ao efeito dos opióides, uma vez que a TENS é capaz de promover elevação dos níveis sistêmicos de vários opióides (Almay *et al.* 1985; Hughes *et al.* 1984). O sistema opioide endógeno modula muitas funções fisiológicas no organismo como dor, controle respiratório, resposta ao stress, apetite e termorregulação. Além disso, atualmente está bem estabelecido às diversas localizações dos receptores opióides, presentes de forma abundante nos centros que controlam a respiração, que incluem tronco cerebral e também centros superiores como insula, tálamo e córtex do cíngulo, além do corpo carotídeo, vago. E na periferia localizados principalmente nos tecidos epiteliais, submucosos e tecido muscular. Essa vasta distribuição dos receptores opioides permite uma poderosa regulação do sistema respiratório pelo sistema opioide endógeno justificando uma marcante depressão respiratória quando exposto a altos níveis dessas substâncias (Pattinson, 2008; Setz *et al.* 2001).

O tratamento crônico com a sertralina também promove uma mudança na resposta da FR nas diferentes modalidades de aplicação da TENS e quando expostos à dor. A exposição do animal a uma situação de stress (dor por formalina) associado ao tratamento crônico com sertralina demonstra um efeito contrario ao observado anteriormente quando animal não estava sob efeito do antidepressivo, ou seja, promove uma redução da FR frente ao estímulo nocivo. Mueller *et al.* (1982) reportaram em sua revisão a influencia da serotonina em modular o controle respiratório e descrevem que a inibição da síntese de 5-HT resulta em um marcante aumento da FR, do volume-minuto e resposta ao CO₂, apresentando dessa forma um efeito depressor do sistema serotoninérgico no controle respiratório.

A relação do sistema serotoninérgico com a regulação respiratória já está bem estabelecida, pois, sabe-se que os neurônios serotoninérgicos são vastamente encontrados no tronco cerebral, núcleo da rafe no mesencéfalo, ponte e medula e algumas projeções são enviadas para áreas relacionadas com a respiração como: o

grupo respiratório ventral (GRV), grupo respiratório dorsal (GRD) e o núcleo motor frênico. Três subtipos de receptores já foram identificados nas estruturas do tronco encefálico relacionados com mecanismos de controle respiratório são eles: 5-HT₁, 5-HT₄ e 5-HT₇. Entretanto a ativação serotoninérgica na resposta à FR apresenta controvérsias. Hji *et al.* (2000) relata que precursores da 5-HT promovem uma depressão respiratória quando administrados por via intravenosa, enquanto que a via intracerebroventricular promove resposta oposta (taquipneia). Dessa forma subtipos específicos de receptores serotoninérgicos no tronco cerebral tem sido indentificados com estimuladores ou inibidores da atividade respiratória.

Em nosso estudo, a estimulação elétrica tanto de alta, quanto de baixa frequência nos animais tratados com sertralina demonstraram uma taquipneia em relação ao grupo que não recebeu a TENS. Essa resposta de aumento da FR pode está relacionada com ativação de diferentes tipos de receptores serotoninérgicos do tronco encefálico promovendo essa resposta contraria aos animais que não foram tratados com a sertralina (Hodges *et al.* 2009; Curran *et al.* 2009). Corroborando os nossos achados, Sahibzada *et al.* 2006 demonstraram que estudos neurofisiológicos com ligantes específicos da serotonina foram capazes de reverter à depressão respiratória induzida por opióides em ratos anestesiados. Além disso, Wang *et al.* 2007 sugeriu em seu trabalho que ativação dos receptores 5-HT, particularmente 5-HT_{4α} poderia ser um instrumento útil para uma abordagem terapêutica na prevenção da depressão cardiorrespiratória promovida pelos opióides. Sendo assim, parece que os efeitos da sertralina e a provável liberação de serotonina sistêmica pela estimulação elétrica foram capazes de evitar a bradpneia, ou seja, a sobrecarga sistêmica de serotonina parece inibir o efeito depressor da FR que anteriormente foi atribuída ao efeito dos opióides na regulação respiratória (Raimundo *et al.* 2009).

Estudo recente relata uma situação interessante em relação à regulação respiratória e estados algícos, apresenta que a respiração profunda e lenta pode controlar analgesia promovendo alívio de dor (Chalaye *et al.* 2009). Essa relação se explica porque a modulação da FR e da dor compartilham as mesmas vias neurofisiológicas o que promove grandes influencias entre ambas. Sendo assim, fica ilustrada a importante influencia observada nesse estudo do parâmetro de frequência respiratória em relação ao diferentes estímulos aplicados durante o protocolo experimental (formalina, TENS e Sertralina).

Portanto, nesse estudo destaca-se a capacidade periférica da TENS de promover analgesia, e demonstra o efeito analgésico da sertralina, que também se reproduz periféricamente, além de evidenciar alterações importantes dos parâmetros cardiorrespiratórios através da terapia analgésica TENS. Estudos neurofisiológicos futuros utilizando métodos mais específicos para dosagens de serotonina podem suportar nossos achados e elucidar os mecanismos fisiológicos da analgesia promovida pela TENS.

6 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, FV; FRANKLIN, KBJ; WESTBROOK, RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of pain response in rats. **Pain**. 60: 91-102, 1995.

AGHAJANIAN, G. K.; WANG, R. Y.; BARABAN, J. Serotonergic and nonserotonergic neurons of the dorsal raphe: Reciprocal changes in firing induced by peripheral nerve stimulation. **Brain Research**. 153:169-175, 1978.

ALMAY, BG; JOHANSSO, F; VON KNORRING, L; SAKURADA, T; TERENIUS, L. Long-term high frequency transcutaneous electrical nerve stimulation (hi-TENS) in chronic pain. Clinical response and effects on CSF-endorphins, monoamine metabolites, substance P-like immunoreactivity (SPLI) and pain measure. **J Psychosom Res**. 29: 247-257, 1985.

AMENDT, K.; CZACHURSKI, J.; DEMBOWSKY, K.; SELLER, H. Bulbospinal projections to the intermediolateral cell column: a neuroanatomical study. **Journal of Autonomic Nervous System**. 1: 103-1017, 1979.

ANDERSON, I. K.; MARTIN, G. R.; RAMAGE, A. G. Central administration of 5-HT activates 5-HT_{1A} receptors to cause sympathoexcitation and 5-HT₂/5-HT_{1C} receptors to release vasopressin in anaesthetized rats. **British Journal of Pharmacology**. 107: 1020-1028, 1992.

ANTAL, M.; PETKO, M.; POLGAR, E.; HEIZMANN, C. V.; STORMMATHISEN, J. Direct evidence of an extensive GABAergic innervations of the spinal dorsal horn by fibers descending from the rostral ventromedial medulla. **Neuroscience**. 73:509-518, 1996.

BACON, S. J.; ZAGON, A.; SMITH, A. D. Electron microscopy evidence of monosynaptic pathways between cells in the caudal raphe nuclei and sympathetic preganglionic neurons in the rat spinal cord. **Experimental Brain Research**. 79:589-602, 1990.

BARD, J. A.; ZGOMBICK, J.; ADHAM, N.; VAYSSE, P.; BRANCHEK, T. A.; WEINSHANK, R. L. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylyl cyclase. **The Journal of Biological Chemistry**. 268:23422-23426, 1993.

BORSOOK, D. Opioids and neurotrophic effects. **Curr.Opin. Anesthesiol.** 7:352-357, 1997.

BRODAL, A.; TABER, E.; WALBERG, F. The raphe nuclei of the brainstem in the cat. Efferent connections. **Journal of Comparative Neurology**. 114:239-259, 1960.

CAPONE, F; ALOISI, AM. Refinement of pain evaluation techniques - The Formalin test. **Ann Ist. Supere Sanità**. 40(2): 223-229, 2004.

CARVALHO, WA. Fisiopatologia da Dor e Mecanismos de Analgesia, Salvador, Universidade Federal da Bahia. 73, 1995.

CARVALHO, WA; CARVALHO, RDS; MEDRADO, VC. Biologia Molecular dos Receptores Farmacológicos e seus Sistemas Efetores de Interesse em Anestesiologia. **Rev Bras Anesthesiol**. 47: 152-167, 1997.

CARVALHO, WA; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de Transmissão e Modulação da dor. Atualização Terapêutica. **Revista brasileira de**

CHALAYE, P; GOFFAUX, P; LAFRENAYE, S; MARCHAND, S. Respiratory effects on Experimental Heat Pain and Cardiac Activity. **Pain Medicine**. 2009.

CUNHA, RJ; BARRUCAND, L; VERÇOSA, N. Estudo das alterações eletrocardiográficas com o uso de antidepressivos tricíclicos em pacientes com dor crônica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. 59(1):46-55, 2009.

CURRAN, AK; LEITER, JC. Baroreceptor-mediated inhibition of respiration after peripheral and central administration of a 5-HT_{1A} receptor agonist in neonatal piglets. **Exp Physiol**. 92: 757-767, 2009.

DAHLSTRÖM, A. & FUXE, K. Evidence for the existence of monomine neurons in the central nervous system. **Acta Physiologica**. 64:1-7, 1965.

DRETELER, G. H.; WOUTERS, W.; SAXENA, P. R.; RAMAGE, A. G. Pressor effects following microinjection of 5-HT_{1A} receptor agonists into the raphe obscurus of the anesthetized rat. **British Journal of Pharmacology**. 102: 317-322, 1991.

DUMAN, EN; KESIM, M; KADIOGLU, M; YARIS, E; KALYONCU, NI; ERCIYES, N. Possible involvement of opioidergic and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. **Journal of Pharmacological Sciences**. 94: 161-165, 2004.

ELECTROTHERAPY STANDARDS COMMITTEE: ELECTROTHERAPEUTIC TERMINOLOGY IN PHYSICAL THERAPY (REPORT). Section on clinical electrophysiology and American Physical Therapy Association, Alexandria, VA, 2001.

FIELDS, HL; BASBAUM, AL. Central nervous system mechanisms of pain modulation. **Text-book of pain**, chap 12. New York, NY, 1999, pp 243-257.

FRISTSCHY, J. M.; LYONS, W. E.; MOLLIVER, M. E.; GRZANNA, R. Neurotoxic effects of p-choroamphetamine on the serotonergic innervations of the trigeminal motor nucleus: retrograde transport study. **Brain Research**. 473: 261-270, 1978.

FUTURO NETO, H. A.; COOTE, J. H. Changes in sympathetic activity to heart and blood vessels during desynchronized sleep. **Brain Research**. 252: 259-268, 1982a.

FUTURO NETO, H. A.; COOTE, J. H. Desynchronized sleep-like pattern of sympathetic activity elicited by electrical stimulation of sites in the brainstem. **Brain Research**. 252: 269-276, 1982b.

GILBEY, M. P.; FUTURO NETO, H. A.; ZHOU, S. Y. Respiratory-related discharge patterns of caudal raphe neurons projecting to the upper thoracic spinal cord in the rat. **Journal of Autonomic Nervous System**. 50: 263-273, 1995.

GUINSBURG, R; PRADO, FC; RAMOS, J; VALLE, JR. Atualização terapêutica: manual prático de diagnóstico e tratamento. *Acta Médica*. 19: 1094-1096,1999.

HAJI, A; TAKEDA, R; OKAZAKI, M. Neuropharmacology of control of respiratory and pattern in mature mammals. **Pharmacology & Therapeutics**. 86: 277-304, 2000.

HARDMAN, JG; LIMBIRD, LE; MOLINOFF, PB. Goodman & Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9th Ed, New York, McGraw-Hill, 521-555, 1996.

HELKE, C. J.; CAPUANO, S.; TRAN, N.; ZHUO, H. Immunocytochemical studies of the 5-HT_{1A} receptor in ventral medullary neurons that project to the intermediolateral cell column and contain serotonin or tyrosine hydroxylase immunoreactivity. **The Journal of Comparative Neurology**. 379: 261-270, 1997.

HODGES, MR; WEHNER, M; AUNGST, J; SMITH, JC; RICHERSON, GB. Transgenic mice lacking serotonin neurons have severe apnea and high mortality during development. **J. Neurosci**. 29 (33): 10341-10349, 2009.

HOLSTEGE, J. G.& KUYPERS, H. G. J. M. The anatomy of the brain stem

HOWARD, VA; THEERBER, FW. The interpretation of infant pain: physiological

HUGHES, GS; LICHSTEIN, PR; WHITLOCK, D; HARKER, C. Response of plasma beta-endorphins to transcutaneous electrical nerve stimulation in healthy subjects.

Phys Ther. 64: 1062-1066, 1984.

HUNT, SP; PINI, A; EUAN, G. Induction of c-fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature**, 328:632-634, 1987.

ITHO, H; BUNAG, RD. Cardiovascular and sympathetic effects of injectin serotonin into the nucleus tractus solitarius in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 256: 1147-1153, 1991.

JENSEN H, ZESLER R, CHRISTENSEN T. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TNS) for painful osteoarthritis of the knee. **Int J Rehabil Res.** 1991;14(4):356-8.

JEONG, CY; CHOI, JI; YOON, MH. Roles of serotonin receptor subtypes for the antinociception of 5-HT in the spinal cord of rats. **European Journal of Pharmacology.** 502: 205-211, 2004.

JIANG , YX; WANG, Y; LIU, HX. Comparison between therapeutic effects of transcutaneous electrical nerve stimulation with the frequency of 2 Hz and 100 Hz on Chronic inflammatory pain in rats. **Neuroscience Research Institute** 21 (12): 923-925, 2001.

JOHANSON, DC; CORRUCINI, R; MCHENRY, H; WHITE, TD. Morphological affinities of Pan paniscus. **Science.** 204: 1341-1343, 1979.

JOHANSSON, F; VON KNORRING, L. A double-blind controlled study of a serotonin uptake inhibitor (Zimelidine) Versus placebo in chronic pain patients. **Pain.**7: 69-78, 1979.

KATZ J, MELZACK R. Auricular transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) reduces phantom limb pain. **J Pain Symptom Manage.** 1991;6(2):73-83.

KESIM, M; DUMAN, EN; KADIOGLU, M; YARIS, E; KALYONCU, NI; ERCIYES, N. The Different Roles of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on antinociceptive effect of paroxetine in chemical stimuli in mice. **Journal of Pharmacol. Science.** 97: 61-66, 2005.

KIM, JH; GWAK, YS; LEE, I; SOHN, IC; KIM, MS; CHOI, DO; BAEK, DB; PARK, BR. Antinociceptive effects of heterotopic electroacupuncture in Formalin-induced pain. **The American Journal of Chinese Medicine**. 34 (4): 567-574, 2006.

KING, EW; AUDETTE, K; ATHMAN, GA; NGUYEN, HOZ; SLUKA, KA; FAIRBANKS, CA. Transcutaneous electrical nerve stimulation activates peripherally located alpha-2A adrenergic receptors. **Pain**. 115: 364-373, 2005.

KOBLING, D. D. Urethane: help or hindrance? **International Anesthesia Research Society**. 94:241-242, 2002.

KRAYCHETE, D; SAKATA, RK; KHAN, P; CARVALHO, MG; GUSMÃO, A; CARVALHO, EM. Eficácia dos antidepressivos para dor crônica. **Revista Brasileira de Medicina**. 60(5):283-288, 2003.

LAGUZZI, R; REIS, DJ; TAMMAN, W. Modulation of Cardiovascular and electrocortical activity through serotonergic mechanisms in the nucleus tractus solitarius of the rats. **Brain Res**. 304: 321-328, 1984.

LAMPL C, KRECZI T, KLINGLER D. Transcutaneous electrical nerve stimulation in treatment of chronic pain: predictive factors and evaluation of the methods. **Clin J Pain**. 1998;14(2):134-42.

LI, Y. Q.; WANG, Z. M.; ZHENG, H. X.; SHI, J. W. Central origins of substance P-like immunoreactive fibers and terminals in the spinal trigeminal caudal subnucleus in the rat. **Brain Research**. 719: 219-224, 1996.

LOEWY, A. D. & NEIL, J. J. The role of descending monoamine systems in central control of blood pressure. **Federation Proceedings**. 40: 2778 -2785, 1981.

LOEWY, A. D. Descending pathways to the sympathetic preganglionic neurons. **Brain Research**. 57: 267-277, 1982.

LOEWY, A. D. Raphe pallidus and raphe obscurus projections to the intermediolateral cell column in the rat. **Brain Research**. 222: 129 -133, 1981.

LOPES-IBOR JJ. The involmente of serotonin in psychiatric disordes and behaviour. **Br. J. Psychiatric Suppl**. 3: 26-39, 1988.

Lopez, Ibor JJ. Masked depressions. **British Journal of psychiatry**. 120: 245-257, 1972.

MA, YT; SLUKA, KA. Reduction in inflammation-induced sensibilization of dorsal horn neurons by transcutaneous electrical nerve stimulation in anesthetized rats. **Exp Brain Res**. 137: 94-102,2001.

MAGGI, C.A. & MELI, A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: cardiovascular system . *Experientia*. 42:292-297, 1986.

MCQUALY, HJ. Preemptive analgesia. **Br J Anaesth**, 69:1-3, 1992.

MELZACK, R; WALL, PD. O desafio da dor. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1987.

MERAHI, N; ORER, HS; LAGUZZI, R. Baroreceptor reflex inhibition induced by stimulation of 5-HT₃ receptor in the nucleus of tractus solitarius of the rat. **Neuroscience**. 46: 91-100, 1992.

MINSON, J.; CHALMERS, J.; DROLET, G.; KAPOOR, V.; LLEWELLYN-SMITH, I.; MILLS, E.; MORRIS, M.; PILOWSKY, P. Central serotonergic mechanisms in cardiovascular regulation. **Cardiovascular Drugs Therapie**. 4:27-32, 1990.

MUELLER, RA; LUNDBERG, DBA; BREESE, GR; HEDNER, J; HEDNER, T; JONASON, J. **The Neuropharmacology of Respiratory Control**. The Americam Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. 34 (3): 255- 285, 1982.

NAKAJIMA, K; OBATA, H; ITO, N; GOTO, F; SAITO, S. The niciceptive mechanism of 5- hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. **European Journal of Pain**. 13: 441-447, 2009.

ORANGE, FA; AMORIM, MMR; LIMA, L. Uso da Eletroestimulação Transcutânea para alívio de dor durante o trabalho de parto em uma maternidade-escola: ensaio clínico controlado. **Revista Brasileira de Ginecologia e obstetrícia**. 25(1): 45-52,2003.

OTSUKA, N; KIUCHI, Y; YOKOGAWA, F; MASUDA, Y; OGUCHI, K; HOSOYAMADA, A. Antinociceptive efficacy of antidepressants: assessment of five antidepressants and four monoamine receptors in rats. **Journal of Anesthesia**. 15: 154-158, 2001.

OWENS, MJ; NEMEROFF,CB. Neuropharmacology of Paroxetine. **Psychopharmacology Bulletin**. 37: 8-18, 2003.

PAOLI, F; DACOURT, G; COSSA, P. Note Préliminaire sur l'action de l'imipramine dans les états douloureux. **Revue Neurologique**. 102: 503-504, 1980.

PASQUALE MONTAGNA. The primary headaches: genetics, epigenetics and a behavioural genetic model. **The Journal of Headache and Pain**.9: 57-69, 2008.

PATTINSON, KTS. Opioids and the control of respiration. **British Journal of Anaesthesia**. 100 (6): 747-758, 2008.

PLEUVRY, BJ. Opioid receptors and their relevance to anaesthesia. **Br J Anaesth**, 71:119-126, 1993.

PORTER, P; RAMAMURTHY, S; ROGER, JN. Decision making in pain management. **Pharmacology**. 175-185, 1993.

RADHAKRISHNAN, R; KING, EW; DICKMAN, JK; HEROLD, CA; JOHNSTON, NF; SPURGIN, ML; SLUKA KA. Spinal 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors mediate low, but not high, frequency TENS-induced antihyperalgesia in rats. **Pain**. 105: 205-213,2003.

RAIMUNDO, AKS; SOUZA, LA; SILVEIRA, RF; CERQUEIRA, MCD; RODRIGUES, J; DINI, PD. Dosagem de serotonina sistêmica após aplicação da eletroestimulação nervosa transcutânea (TENS). **Fisiotr Mov**. 22(3): 365-374, 2009.

RAMAGE, A. G. Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors. **Brain Research Bulletin**. 56: 425-439, 2001.

RAMAGE, A. G. Serotonin. **Brain Research Bulletin**. No prelo 2008.

RAMAGE, AG; VILLALÓN, CM. 5- Hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. **Trends in Pharmacological Sciences**. 26: 472-481, 2008.

ROBINSON, S. E.; AUSTIN, M. J. F.; GIBBENS, D. M. The role of serotonergic neurons in dorsal raphe, median raphe and anterior hypothalamic pressor mechanisms. **Neuropharmacology**. 24:51-58, 1985.

ROKUGO, T; TAKEUCHI, T; ITO, H. A Histochemical Study of Substance P in the rat Spinal Cord: Effect of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation. **J Nippon Med Sch**. 69 (5): 428-433,2002.

SABINO, GS; SANTOS, CMF; FRANCISCHI, JN, RESENDE, MA. Release of Endogenous Opioids Followin Transcutaneous Eletrical Nerve Stimulation in an Experimental Model of Acute Inflammatory Pain. **The Journal of Pain**. 9(2): 157-163, 2008.

SAHIBZADA, N; FERREIRA, M; WASSERMAN, AM; TAVEIRA DA SILVA,AM; GILLIS, RA. Reversal of Morphine-induced apnea in the anesthetized rat by drugs that activate 5-hydroxytryptamine (1A) receptors. **J Pharmacol Exp Ther**. 292: 704-713, 2000.

SANTUZZI, CH; GONÇALVES, WLS; ROCHA, SS; CASTRO, MEC; GOUVEA, AS; ABREU, GR. Efeitos da crioterapia, estimulação elétrica transcutânea e da sua associação na atividade elétrica do nervo femoral em ratos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**. 12 (6): 441-446, 2008.

SAWYNOK, J; ESSER, MJ; REID, AR. Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. **Psychopharmacology of Pain**. 26:21-29, 2001.

SCHECHTMANN, G; SONG, Z; ULTENIUS, C; MEYERSON, BA; LINDEROTH, B. Cholinergic mechanisms involved in the pain relieving effect of spinal cord stimulation in a model of neuropathy. **pain**. 139 (1): 136-145, 2008.

SETZ, VG; PEREIRA, MLG; PETERLINI, MAS; HARADA, MJCS; PEREIRA, SR. Avaliação e Intervenção para o alívio da dor na criança hospitalizada. **Acta Paulista de Enfermagem**. 14(2): 55-65, 2001.

SILVER, JE; CAMPBELL, JN; KANNER, R. Procedimentos neuroestimulatórios e neuroablativos. Segredo em Clínica de dor: respostas necessárias ao dia a dia em rounds, na clínica, em exames orais e escritos. Porto Alegre: Artmed, 270-274, 1998.

SIMON, EJ. Opioid peptides and their receptors, em: Estafanous FG - **Opioids in Anesthesia II**, Boston, Butterworth-Heinemann, 20-32, 1991.

SKINNER, K.; FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; MASON, P. GABA-immunoreactive boutons contact identified off an on cells in the nucleus raphe magnus. **The Journal of Comparative Neurology**. 378: 196-204, 1997.

SLUKA KA, WALSH D. Transcutaneous electrical nerve stimulation: basic science mechanisms and clinical effectiveness. **J Pain**. 2003; 4(3):109-21.

SLUKA, KA; DEACON, M; STIBAL, A; STRISSEL, S; TERPSTRA, A. Spinal blockade of opioid receptors prevents the analgesia produced by TENS in arthritic

rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 289 (2): 840-846, 1998.

SMITH, HS. Peripherally-Acting Opioids. **Pain Physician**. 11: 121-132, 2008.

SMITS, J. F. M.; VAN ESSEN, H.; STRUYKER-BIUDIER, H. A. J. Serotonin-mediated cardiovascular responses to electrical stimulation of the raphe nuclei in the rat. **Life Sciences**. 23:173-173, 1978.

SOMMER, C. Serotonin in Pain an Analgesia: Actions in the Periphery. **Molecular Neurobiology**. 30: 117-125, 2004.

SONG, Z; ULTENIUS, C; MEYERSON, BA; LINDEROTH, B. muscarinic receptor activation potentiates the effect of spinal cord stimulation on pain-related behavior in rats with mononeuropathy. **neurosci lette**. 436 (1): 7-12, 2008.

SONG, Z; ULTENIUS, C; MEYERSON, BA; LINDEROTH, B. Pain relief by spinal cord stimulation involves serotonergic mechanisms: An experimental study in a rat model of mononeuropathy. **Pain**. 14: 1-8,2009.

STAHAL, SM. Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações clínicas. 2. ed. São Paulo: Ed. Medsi, 2002.

STAMFORD, JA. Descending control of pain. **Br J Anaesth**. 75:217-227, 1995

THORTON, D; KANNER, R. Constructos psicológicos e suas abordagens terapêuticas. . **Segredo em Clínica de dor**: respostas necessária ao dia a dia em rounds, na clínica, em exames orais e escritos. Porto Alegre: Artmed, 275-285, 1998.

TOMOYUKI, R; TOSHITSUGU, T; HIROMOTO, I. A Histochemical Study of Substance P in the Rat Spinal Cord: Effect of Transcutaneous Eletrical Nerve Stimulation. **J Nippon Med Sch**. 69: 428-433, 2002.

WALL, PD; SWEET, WH. Temporary abolition of pain in maim. **Science**. 155: 108-109, 1967.

WANG, X; DERGACHEVA, O; KAMENDI, H; GORINI, C; MENDELOWITZ, D. 5-Hydroxytryptamine 1A/7 and 4 α Receptors Differentially Prevent Opioid-Induced Inhibition for Brain Stem Cardiorespiratory Function. **Hypertension**. 50: 368-376, 2007.

WOLF, WA; KUHN, DM; LORENBURG, W. Blood pressure response to local application of serotonergic agents in the nucleus tractus solitari. **Eur. J. Pharmacol.** 69: 291-299, 1981.

WONG, D.T.; BYMASTER, F.P.; ENGLEMAN, E.A. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. **Life Sciences**. 57:411-441, 1995.

WONG, DL; WHALY, LF. Cuidados de enfermagem centrado na família com a criança hospitalizada . **Enfermagem Pediátrica: elementos essenciais A intervenção efetiva**. 5^o Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 542-598,1999.

WOOLF, CJ; CHONG, M. Preemptive analgesia treating post- operative pain by preventing the establishment of central sensitization. **Anesth Analg**. 77:362-379, 1993.

YAKSH, TL; DIRKSEN, R; HARTY, GL. Antinociceptive effects of intra-theccally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat. **Eur J Pharmacol**. 117:81-88, 1995.

YASUDA, K; RAYNOR, K; KONG, H. Cloning and functional comparison of k and d receptors from mouse brain. **Proc Nat Acad Sci**, 90:6736-6740, 1993.

APÊNDICE A - Tabela 1: valores da PAM do grupo FORM, FORM+SER, FORM+TENS-AF, FORM+TENS-AF+SER, FORM+TENS-BF e FORM+TENS-BF+SER antes e 10, 20, 30 e 50 minutos após aplicação de formalina com ou sem a TENS de alta e/ou baixa frequência. (n = 8 por grupo).

Grupos	n	Basal	10 min	20 min	30 min	50 min
FORM	8	89,62 ± 0,63	90 ± 2	89,8 ± 1,7	91 ± 2,1	91 ± 2,08
FORM+SER	8	94,3 ± 0,9	91 ± 3,0	90,8 ± 3,7	91 ± 3,5	89,6 ± 3,02
FORM+TENS-AF	8	91,5 ± 2,1	88,8 ± 1,6	87,66 ± 0,8	87,3 ± 0,8	87,2 ± 0,7
FORM+TENS-AF+SER	8	95 ± 1,3	97,1 ± 1,5	96,8 ± 1,6	96,5 ± 1,6	96,6 ± 1,9
FORM+TENS-BF	8	92,8 ± 1,2	92,2 ± 1,4	92,5 ± 1,7	91,7 ± 1,8	89,8 ± 1,8
FORM+TENS-BF+SER	8	98 ± 2,3	95,6 ± 5,9	94,7 ± 2,3	92,6 ± 2,1	91,5 ± 2,6

Valores expressos como Média ± E.P.M.

APÊNDICE B - Tabela 2: valores da FC do grupo FORM, FORM+SER, FORM+TENS-AF, FORM+TENS-AF+SER, FORM+TENS-BF e FORM+TENS-BF+SER antes e 10, 20, 30 e 50 minutos após aplicação de formalina com ou sem a TENS de alta e/ou baixa frequência. (n = 8 por grupo).

Grupos	n	Basal	10 min	20 min	30 min	50 min
FORM	8	374,6 ± 3,5	380,8 ± 10,7	384,6 ± 9,6	391 ± 8,6	388,3 ± 8,2
FORM+SER	8	393,5 ± 3,6	405,5 ± 8,3	409,5 ± 6,8	415,2 ± 7,3	408,5 ± 9
FORM+TENS-AF	8	392,8 ± 15,8	394,3 ± 15,1	400 ± 13,1	398,7 ± 14,02	398,1 ± 13,7
FORM+TENS-AF+SER	8	381,1 ± 15,2	400,2 ± 11,9	402,6 ± 12,2	403,5 ± 12,3	398,3 ± 13
FORM+TENS-BF	8	391,6 ± 9,3	402 ± 7,9	401 ± 3,7	399 ± 3,5	397 4,3
FORM+TENS-BF+SER	8	409,3 ± 9,4	417,2 ± 8,6	427,1 ± 8,4	426,3 ± 8,8	425,5 ± 9,6

Valores expressos como Média ± E.P.M.

APÊNDICE C - Tabela 3: valores da FR do grupo FORM, FORM+SER, FORM+TENS-AF, FORM+TENS-AF+SER, FORM+TENS-BF e FORM+TENS-BF+SER antes e 10, 20, 30 e 50 minutos após aplicação de formalina com ou sem a TENS de alta e/ou baixa frequência. (n = 8 por grupo).

Grupos	n	Basal	10 min	20 min	30 min	50 min
FORM	8	129,7 ± 3,3	135 ± 9,7	137,2 ± 9,3	133,5 ± 9,3	134,2 ± 10,5
FORM+SER	8	136,5 ± 3,6	129 ± 9,6	123,7 ± 7	126 ± 8	123,7 ± 7,5
FORM+TENS-AF	8	143,3 ± 11	140,6 ± 10,9	140,6 ± 10,1	139,3 ± 9,4	140 ± 11,5
FORM+TENS-AF+SER	8	135 ± 4,9	141 ± 7,5	136,5 ± 6,5	132 ± 6,2	132,7 ± 5,3
FORM+TENS-BF	8	129 ± 12	121 ± 9,9	122 ± 10,4	129 ± 11,5	132 ± 11,6
FORM+TENS-BF+SER	8	114 ± 7,5	121,6 ± 8,1	114 ± 6,8	113,2 ± 5,9	110,5 ± 7,5

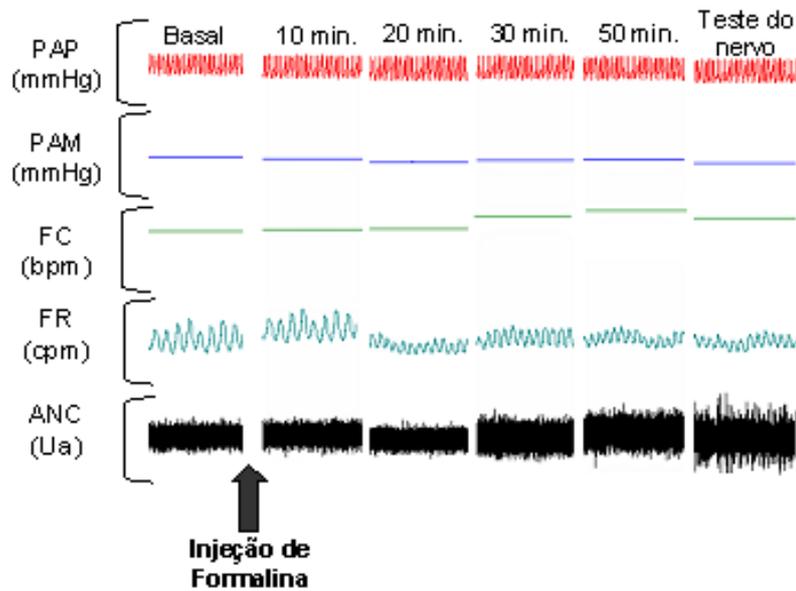
Valores expressos como Média ± E.P.M.

APÊNDICE D - tabela 4: valores da ANC do grupo FORM, FORM+SER, FORM+TENS-AF, FORM+TENS-AF+SER, FORM+TENS-BF e FORM+TENS-BF+SER antes e 10, 20, 30 e 50 minutos após aplicação de formalina com ou sem a tens de alta e/ou baixa frequência. (n = 8 por grupo).

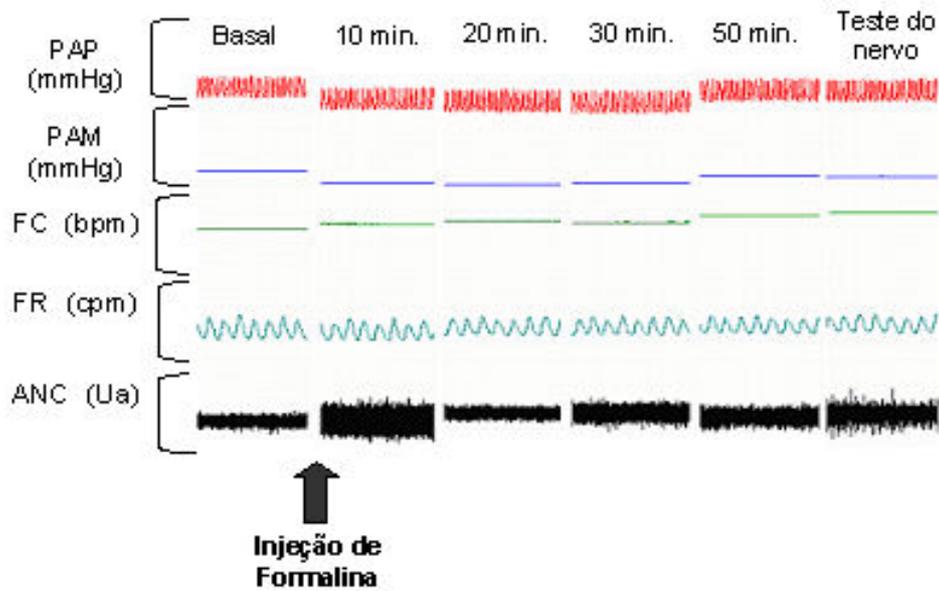
Grupos	n	Basal	10 min	20 min	30 min	50 min
FORM	8	100	128,2 ± 8,5	11,6 ± 6,2	140,6 ± 11,1	150,5 ± 14,7
FORM+SER	8	100	130,1 ± 7,9	116 ± 8,3	120,6 ± 7	120,1 ± 7,2
FORM+TENS-AF	8	100	70,33 ± 6,08	77,7 ± 7	75 ± 6,4	70,3 ± 7,2
FORM+TENS-AF+SER	8	100	75,2 ± 6,7	73,7 ± 6,7	74,3 ± 8	66,75 ± 7,4
FORM+TENS-BF	8	100	77,2 ± 5,3	78,2 ± 6,4	71 ± 6,1	68,2 ± 5,98
FORM+TENS-BF+SER	8	100	84,5 ± 4,5	76,2 ± 6,2	76 ± 5,1	69 ± 6,02

Valores expressos como Média ± E.P.M.

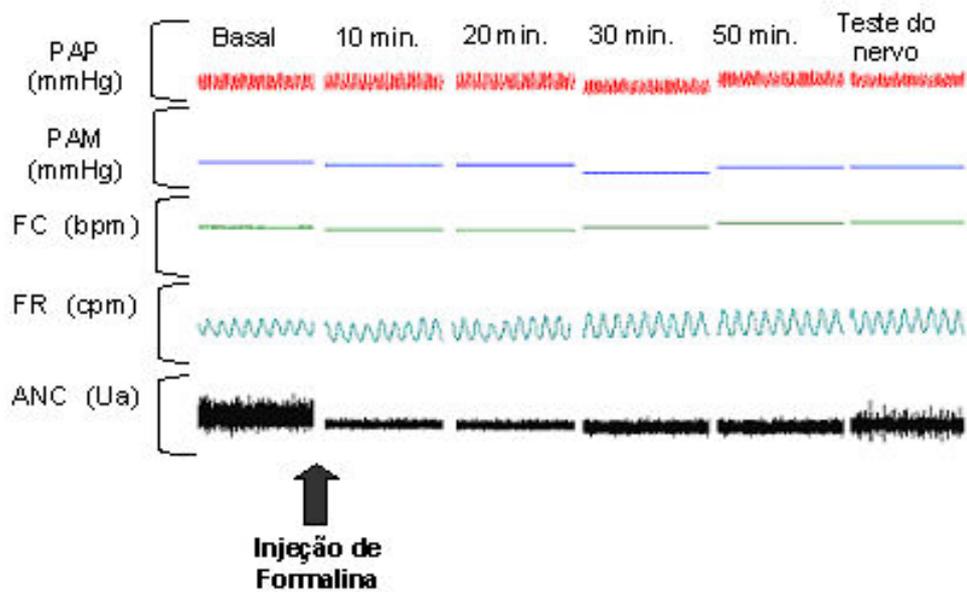
APÊNDICE E - Figura 9: Registro típico mostrando o efeito de formalina sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos basal, 10, 20,30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.



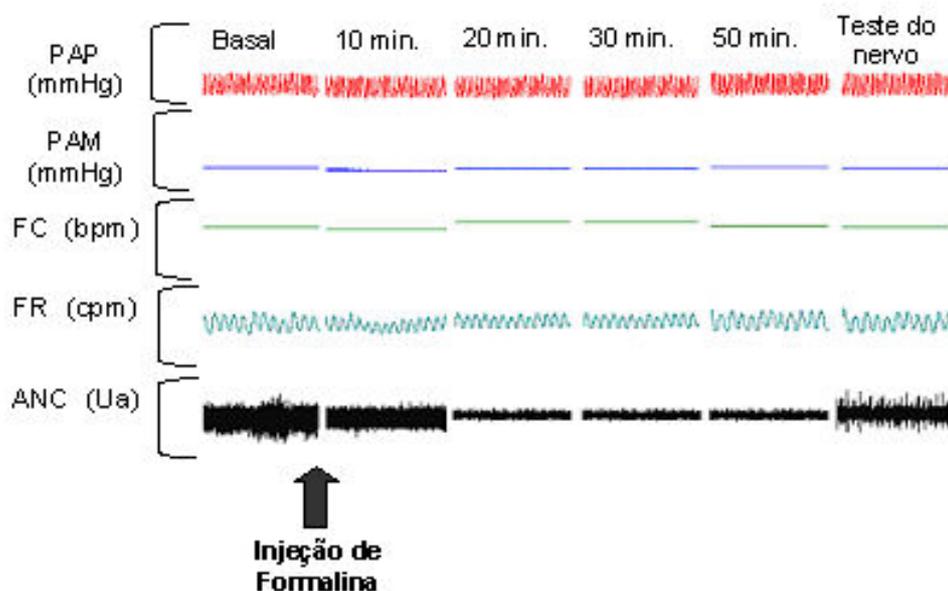
APÊNDICE F - Figura 10: Registro típico mostrando o efeito de formalina em ratos tratados com sertralina sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos Basal, 10, 20,30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.



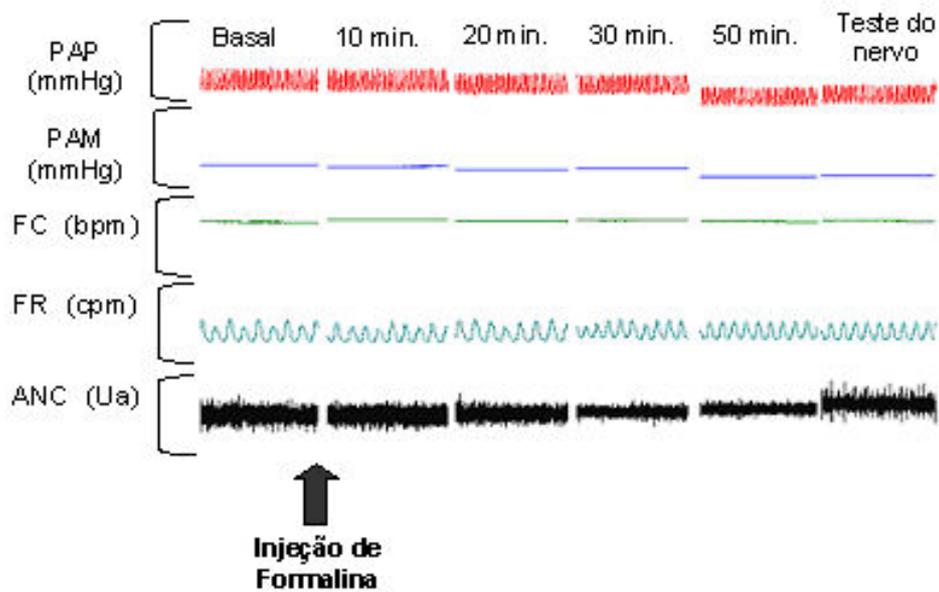
APÊNDICE G - Figura 11: Registro típico mostrando o efeito de formalina associada a TENS de alta frequência sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos Basal, 10, 20,30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.



APÊNDICE H - Figura 12: Registro típico mostrando o efeito de formalina associada a TENS de alta frequência de ratos tratados com sertralina sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos Basal, 10, 20, 30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.



APÊNDICE I - Figura 13: Registro típico mostrando o efeito de formalina associada a TENS de baixa frequência sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos Basal, 10, 20,30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.



APÊNDICE J - Figura 14: Registro típico mostrando o efeito de formalina associada a TENS de baixa frequência em ratos tratados com sertralina sobre os parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca, frequência respiratória e atividade do nervo ciático nos tempos Basal, 10, 20, 30 e 50 minutos após injeção de formalina, ao final do experimento o nervo foi testado a fim de verificar e demonstrar sua perfeita atividade.

