

**George Schayer Sabino**

**ESTUDO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NERVOSA TRANSCUTÂNEA EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERALGESIA INDUZIDA PELA  
CARRAGENINA**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Fevereiro de 2007

**George Schayer Sabino**

**ESTUDO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NERVOSA TRANSCUTÂNEA EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERALGESIA INDUZIDA PELA  
CARRAGENINA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos Antônio de Resende

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Janetti Nogueira de Francischi

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Fevereiro de 2007

## **AGRADECIMENTOS**

Nada mais justo que o início de uma dissertação se faça com os agradecimentos. Toda conclusão é decorrente de um árduo processo de trabalho. Esse trabalho de desenvolvimento e suas batalhas nos esmagariam se não tivéssemos mãos fortes a quem recorrer.

É a essas mãos, as quais sempre buscamos para pedir ajuda, que nos dirigimos, agora, para agradecer. Sem elas, percorrer esse caminho não teria sido possível.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, O qual sempre senti presente e atendeu todas as minhas súplicas. Peço que sempre oriente meus caminhos.

Agradeço à minha família: Pai, Mãe, Hugo, Ricardo, Vó, que me deram o suporte necessário para poder prosseguir, pois sem ela nada seria possível. Agradeço o carinho e a compreensão. Muito obrigado

Ao prof. Dr. Marcos, que me conduziu para o caminho da ciência. Esse trabalho é, sem dúvida, seu, meu amigo. Foi um privilegio ter você e a Janetti como orientadores. À prof. Dra. Janetti, que com sua visão crítica e apurada sempre nos apoiou, muito obrigado por tudo.

A todos os professores que, mesmo não diretamente ligados à tese de dissertação de mestrado, me ajudaram a entender melhor o mundo, contribuindo para minha formação pessoal e acadêmica.

Aos amigos, aos quais os sentimentos não podem ser expressos em palavras, e que me deram a alegria para prosseguir.

Aos colegas do laboratório do ICB, aos funcionários do biotério, ao Webster, obrigado pelo apoio e convivência. À Marilaine e todos os funcionários do DFTO, sempre solícitos a ajudarem.

Às colegas Cláudia, Heloísa e Cristiane pelo auxílio nos experimentos.

À Cecília por todo seu apoio e ternura.

Aos animais que, sem muita opção, foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais por ter permitido a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

## Resumo

A estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) é um recurso utilizado na clínica de Fisioterapia para promover analgesia em condições agudas e crônicas. O objetivo desse estudo foi investigar o mecanismo de ação da TENS de alta (AF:130Hz) e de baixa (BF:10Hz) frequência em modelo de inflamação produzido pela injeção de carragenina na pata do rato (CG; 250µg). Após administração da CG, TENS de AF e BF foram aplicadas sobre a pata do rato por 20 minutos e a hiperalgesia foi medida pelo método de Randall-Selitto (1957) modificado. TENS de AF e BF inibiram em 100% a hiperalgesia da carragenina. O pré-tratamento dos animais com naltrexona por via intraplantar (Nx; 50 µg), reverteu o efeito antinociceptivo da TENS de BF, mas não alterou o efeito da AF. Aplicação da TENS AF e BF na pata contra-lateral, também reverteu a hiperalgesia da pata inflamada, sendo que a TENS BF apresentou um efeito antinociceptivo mais duradouro quando comparada a TENS de AF. Nossos dados demonstraram que a TENS de AF e BF induziram antinocicepção quando aplicada do lado contra-lateral e que a antinocicepção provocada pela TENS de BF é em parte devido à liberação local de opióides endógenos. Esses resultados fornecem com novos dados para o nosso entendimento a respeito do mecanismo de ação da TENS.

## Abstract

Transcutaneous electric nerve stimulation (TENS) is a noninvasive treatment used in physiotherapy practice to promote analgesia in acute and chronic inflammatory conditions. The aim of the present study was to investigate the action mechanism of TENS at high (HF:130Hz) and low (LF:10Hz) frequencies in an inflammation model produced by the injection of carrageenan in rat paws (Cg; 250 $\mu$ g). Following carrageenan administration (zero time), either HF or LF TENS was applied to the inflamed paw of the rat for 20 minutes and hyperalgesia was assessed hourly using the modified Randall-Selitto method (1957). HF and LF TENS inhibited the carrageenan-induced hyperalgesia by 100%. However, LF TENS presented a longer- lasting analgesic effect than HF TENS. Pre-treatment of animals with intraplantar naltrexone (Nx; 50  $\mu$ g) reversed the analgesic effect of the LF TENS, but did not alter the effect of HF TENS. The application of HF and LF TENS in the contralateral paw reversed the hyperalgesia of the inflamed paw at the same extent as ipsilaterally. Our data demonstrate that HF and LF TENS induced antinociception when applied on the ipsi or contralateral inflamed side and that the antinociception provoked by LF TENS is partially due to the local release of endogenous opioids.

## Capítulo 1 – Introdução

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2006), a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada à lesão tecidual real ou potencial, ou descrita como tal. Os impulsos dolorosos são desencadeados por estímulos lesivos de natureza física ou química gerados nos terminais periféricos de filamentos nervosos conhecidos como nociceptores (do latim “nocere”, machucar) (FIELDS; LEVINE, 1984; COUTAUX et al., 2005; VALE, 2000). Os nociceptores distinguem-se de outros tipos de receptores mecânicos ou térmicos pelo seu elevado limiar de ativação uma vez que, normalmente, são acionados apenas por estímulos de intensidade nociva (RANG; DALE; RITTER, 1999). Depois de originados, os sinais dolorosos são transmitidos pelas fibras nociceptivas (GRUBB, 1998).

As fibras nervosas que transmitem as informações sensitivas são classificadas de acordo com sua espessura. As duas fibras de menor calibre, as fibras A $\delta$  e C, são fibras nociceptivas (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005). As fibras A $\delta$  são mielinizadas e conduzem as sensações dolorosas bem localizadas; as fibras C são desmielinizadas, apresentam menor velocidade de condução e são responsáveis por transmitir um sinal doloroso difuso (DELEO, 2006; PHILLIPS; CURRIER, 2004; VALE, 2000). As fibras C correspondem à maioria das fibras aferentes da pele e dos órgãos (COUTAUX et al., 2005).

As fibras nociceptivas dirigem-se ao corno dorsal da medula, o qual é dividido em lâminas numeradas por algarismos romanos, no sentido da mais superficial a mais profunda (FORREST et al., 2005; HOLDEN; JEONG; PHILLIPS; CURRIER, 2004; SCHAIBLE; RICHTER, 2004). Os ramos centrais dos neurônios primários estão presente em maior concentração nas lâminas I e V, onde irão estimular os neurônios secundários, situados nesta região (GRUBB, 1998; SLAVKIN, 1996). As transmissões sinápticas entre os ramos dos neurônios que estão no gânglio dorsal e os neurônios do corno dorsal da medula são mediadas pela liberação de vesículas com neuropeptídeos excitatórios, como a substância P, ou aminoácidos excitatórios, como o glutamato (DELEO, 2006; PHILLIPS; CURRIER, 2004). Os terminais axônicos das fibras nociceptivas podem conter em vesículas separadas ambos os mediadores (PHILLIPS; CURRIER, 2004).

Os axônios dos neurônios secundários cruzam para o lado oposto do corno dorsal da medula e, através dos tratos espinotalâmico, espinoreticular e espinomesencefálico, transmitem o sinal nociceptivo para as regiões superiores do sistema nervoso central, onde a informação é finalmente processada para produzir a percepção da dor (FIELDS; LEVINE, 1984; GRUBB, 1998; PHILLIPS; CURRIER, 2004; SCHAIBLE; RICHTER, 2004; SLAVKIN, 1996).

A dor, entretanto, é um fenômeno extremamente complexo (VALE, 2000), pois estímulos lesivos podem não causar dor (MELZACK; WALL, 1965; MELZACK, 1999), nem toda dor está associada a um estímulo lesivo (IASP, 2006; MELZACK,



1999; MELZACK, 2001) e, em alguns casos, um pequeno estímulo álgico pode provocar uma resposta dolorosa desproporcional (COUTAUX et al., 2005; IASP, 2006; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Segundo Melzack e Wall (1965) a dor percebida não está diretamente relacionada à lesão sofrida, pois pode ser modulada em seu trajeto ascendente. Isto explica fenômenos distintos, como um soldado com grandes feridas no campo de batalha não relatar dor, ou mesmo a ação analgésica de recursos físicos como a estimulação elétrica utilizada para a redução da dor na clínica de fisioterapia (JOHNSON, 2001; MELZAK, 1999; SLAVKIN, 1996; SLUKA; WALSH, 2003).

De acordo com a teoria de Melzack e Wall (1965) alguns neurônios teriam a capacidade de suprimir a transmissão do sinal doloroso no corno dorsal da medula, fechando assim um portão hipotético, e inibindo a passagem do impulso doloroso (teoria da comporta espinhal) (MELZACK; WALL, 1965). Os neurônios que fecham o portão incluem as fibras nervosas ascendentes de maior calibre, incitadas por estímulos cutâneos táteis indolores, e o sistema descendente inibitório da dor, constituído por fibras originárias de neurônios da substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo e do núcleo magno da raphe (MELZACK; WALL, 1965; MELZAK, 1999; SLAVKIN, 1996). Essas fibras estimulam as células da lâmina II do corno dorsal da medula (substância gelatinosa), que consistem, principalmente, de interneurônios inibitórios curtos, que se projetam para as lâminas I e V, regulando a transmissão da via nociceptiva (PHILLIPS; CURRIER, 2004; RANG; DALE; RITTER, 1999).

Como a comunicação entre um neurônio e outro, seja para a excitação ou para a inibição, se dá através da liberação de neurotransmissores, substâncias sintéticas que mimetizam as ações desses neurotransmissores podem ser utilizadas como estratégias farmacológicas para o controle da dor (FIELDS; LEVINE, 1984; RANG; DALE; RITTER, 1999; SLAVKIN, 1996).

A ativação do processo inibitório da dor de forma exógena pode ser obtida através do uso de agonistas opióides, como a morfina (DELEO, 2006). Os opióides promovem a analgesia através de diversos mecanismos, dentre eles a ativação das vias descendentes e a inibição da transmissão no corno dorsal (DELEO, 2006; PHILLIPS; CURRIER, 2004; RANG; DALE; RITTER, 1999). A ação medular da morfina pode ser explicada pela inibição da liberação de neurotransmissores, incluindo a substância P, das terminações nervosas pré-sinápticas de fibras do tipo C e pela redução da excitabilidade dos neurônios pós-sinápticos do corno dorsal, através da abertura dos canais para potássio (PHILLIPS; CURRIER, 2004; DELEO, 2006). A morfina é um potente analgésico, mas tem seu uso limitado devido a seus efeitos colaterais, como a depressão respiratória e a dependência (DELEO, 2006; RANG; DALE; RITTER, 1999; STEIN; SCHAFER; MACHELSKA, 2003).

Existem 3 tipos principais de receptores opióides  $\mu$  (mu)  $\kappa$  (kappa) e  $\delta$  (delta) que estão presentes no hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, corno dorsal da

medula e nos nervos aferentes periféricos (HAN, 2003; PHILLIPS; CURRIER, 2004; RANG; DALE; RITTER, 1999). Os receptores  $\mu$  são responsáveis pela maior parte da analgesia induzida por um opióide, mas os receptores  $\kappa$  e  $\delta$  também podem contribuir para a analgesia (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005; RANG; DALE; RITTER, 1999). Existem diferentes ligantes endógenos, os peptídeos opióides, como a dinorfina, leu-encefalina, met-encefalina e  $\beta$ -endorfina que apresentam uma especificidade entre os diversos tipos de receptores (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005). A dinorfina, entretanto, se liga aos receptores  $\kappa$  primariamente, e a endorfina apresenta maior seletividade pelos receptores  $\mu$  (PHILLIPS; CURRIER, 2004).

Os opióides também têm o potencial de promover a analgesia pela inibição das terminações nervosas das fibras nociceptivas na periferia (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005). Células do sistema imune, presentes no local da inflamação, parecem liberar opióides endógenos que ativam os receptores das fibras nervosas de menor calibre atenuando sua excitabilidade e resultando na antinocicepção (STEIN, et al. 1990). Alguns estudos têm verificado que a aplicação local de opióides produz analgesia e que essa analgesia pode apresentar resultados diferentes em relação aos efeitos colaterais de seu uso sistêmico (DELEO, 2006; KABLI; CAHILL, 2006; STEIN, 1995; STEIN; SCHAFER; MACHELSKA, 2003). Entretanto, não há um consenso sobre os efeitos após a liberação dos opióides na produção de um alívio da dor significativa clinicamente (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005; KALSO et al., 1997).

O tratamento da dor é também uma tarefa complexa devido aos diversos aspectos que podem influenciar as respostas algicas e a percepção da dor. Para uma melhor caracterização e detalhamento desse fenômeno e de seu manejo, a dor foi classificada em dois tipos principais: crônica e aguda (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; SLAVKIN, 1996; VALE, 2000).

Segundo Slavkin (1996), a dor crônica, aquela que perdura por semanas e não possui limites de tempo, é distinta e ainda mais complexa que a dor aguda. A dor crônica pode afetar o estado emocional das pessoas de forma mais persistente e dificultar a conduta do profissional de saúde (DAYKIN; RICHARDSON, 2004). Um exemplo de dor crônica muito encontrado em ambulatórios de fisioterapia é a lombalgia idiopática crônica (SIQUEIRA; FACCHINI; HALLAL, 2005).

Já a dor aguda tem curta duração, protege o tecido de novas lesões, geralmente está associada a uma causa específica e normalmente não produz reações psicológicas persistentes (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; SCOTT et al., 2004; SLAVKIN, 1996). São exemplos de dores agudas a dor pós-operatória devido ao trauma cirúrgico (SABINO; SOUZA; RESENDE, 2006; SLAVKIN, 1996); e a dor decorrente da aplicação de agentes flogogênicos, como a carragenina, em estudos laboratoriais (FRANCISCHI et al., 2002; NANTEL et al., 1999; POSADAS et al., 2004; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

Na inflamação aguda, um estímulo doloroso pode provocar uma resposta desproporcional à intensidade do estímulo recebido (COUTAUX et al., 2005; SCHAIBLE; RICHTER, 2004) e essa condição é denominada hiperalgesia (IASP, 2006). A hiperalgesia se deve à liberação de várias substâncias neuroativas que reduzem o limiar dos nociceptores (COUTAUX et al., 2005). Em modelos de experimento animal, é possível quantificar a hiperalgesia. (IASP, 2006; RANG; DALE; RITTER, 1999; SLUKA; WALSH, 2003). Nesses estudos, como não é possível averiguar a experiência dolorosa através da sensação relatada, a avaliação da dor é mensurada pelo comportamento do animal através de métodos específicos, nos quais se pode medir, por exemplo, a resposta de retirada da pata a uma pressão imposta (DELEO, 2006; MURRELL; JOHNSON, 2006; RESENDE et al., 2004).

Para se combater a resposta dolorosa, além do uso de fármacos, outras estratégias podem ser utilizadas (ALI, et al., 1981; BENEDETTI et al., 1998; FORSTER et al., 1994; RAKEL; FRANTZ, 2003; WANG et al., 1997). Um recurso não farmacológico, não invasivo, de baixo custo, seguro e com utilização bastante difundida na clínica de fisioterapia, é a estimulação elétrica nervosa transcutânea, popularizada a partir da nomenclatura inglesa TENS (APTA, 1997; JOHNSON, 2001; SLUKA; WALSH, 2003). A TENS consiste na aplicação de corrente elétrica na superfície da pele para o controle da dor (APTA, 1997; JOHNSON, 2001; VANCE et al., 2007).

Durante o século XVIII, o desenvolvimento de geradores elétricos permitiu a utilização da eletricidade na área da saúde (JOHNSON, 2001). No entanto, a TENS só foi completamente aceita após a publicação do estudo de Wall e Sweet (1967), fundamentado na teoria da comporta espinhal de Melzack e Wall (1965), o que permitiu um raciocínio fisiológico para os seus efeitos eletroanalgésicos (JOHNSON, 2001). Na época em que a teoria foi descrita, não foram sugeridos os neurotransmissores envolvidos na modulação da dor, pois ainda não eram compreendidos (SLUKA; WALSH, 2003). Existem atualmente mais detalhes sobre o mecanismo de ação da estimulação elétrica, incluindo o conhecimento sobre a presença de alguns desses neurotransmissores, tais como a  $\beta$ -endorfina e a dinorfina, bem como sobre os receptores envolvidos em sua ação analgésica como os receptores opióides  $\mu$  e  $\delta$ . (HAN, 2003; KALRA; URBAN; SLUKA, 2001; RESENDE et al., 2004; SLUKA et al. 1999). Entretanto, o mecanismo de ação analgésica da TENS ainda não está totalmente esclarecido (AINSWORTH et al., 2006; SLUKA; WALSH, 2003).

Ainda no início da utilização da TENS, após o desenvolvimento da tecnologia eletrônica, uma enorme variedade de aparelhos com características distintas começaram a surgir no mercado, o que favoreceu o aparecimento de uma literatura marcada por relatos desconexos (JOHNSON, 2001; SABINO; SOUZA; RESENDE, 2006), dessa forma, as melhores técnicas de aplicação da TENS não estão totalmente esclarecidas (BROSSEAU et al., 2002; SLUKA; WALSH, 2003). Os parâmetros de aplicação da TENS na clínica são normalmente combinados a

partir da experiência do profissional que a utiliza, isto é, por não possuir uma literatura consistente para se embasar, o profissional costuma determinar os parâmetros a serem utilizados em um novo caso a partir dos resultados prévios obtidos com seus pacientes, de forma empírica. (JETTE, 1986; ROBSON, 1996).

As frequências da TENS mais utilizadas no tratamento da dor aguda e crônica são a baixa frequência (menor que 10 Hz), a alta frequência (maior que 50 Hz) e o “burst” que é a modulação em trens de pulso de alta frequência (50 a 160 Hz), aplicada de forma espaçada (SLUKA; WALSH, 2003). O tempo de aplicação da TENS, em condições de inflamação aguda pode variar de 15 minutos até 72 horas de aplicação contínua (FORSTER et al., 1994; HARGREAVES; LANDER, 1989). O local de colocação dos eletrodos, apesar de estar diretamente relacionado à resposta da TENS, não é consensual e varia consideravelmente entre os estudos, sem apresentarem justificativas por suas escolhas (BROSSEAU et al., 2002; SLUKA; WALSH, 2003). De uma maneira geral, os eletrodos da TENS são colocados fechando o sítio doloroso ou sobre o campo receptivo somático relacionado com a dor (CHESTERTON, et al., 2002; FORSTER, et al., 1994; SLUKA; WALSH, 2003). Alguns autores sugerem que os eletrodos devem ser colocados no lado contra-lateral à lesão em situações nos quais o local da dor está muito sensível ao toque (JOHNSON, 2001), como em maceração, amputação ou neuropatias (AINSWORTH et al., 2006; SOMERS; CLEMENTE, 2006). Porém, assim como os demais parâmetros de aplicação da TENS, esse formato de utilização ainda carece de evidências para que possa ser empregado clinicamente de forma adequada (BROSSEAU et al., 2002).

Outros pontos de ajuste do aparelho podem estar relacionados à qualidade da analgesia promovida pela TENS, como por exemplo, a intensidade da corrente elétrica empregada (BJORDAL, 2003). A determinação da intensidade utilizada durante a aplicação da TENS depende da resposta do indivíduo (JOHNSON, 2001). No nível sensorial, a intensidade da corrente deve sempre respeitar a tolerância do indivíduo, obtida através do relato de percepção do estímulo aplicado. Ele deverá sentir “batimentos” leves, quando submetido à baixa frequência, ou um “formigamento” confortável, quando submetido à alta frequência (SLUKA; WALSH, 2003). No nível motor, entretanto, a intensidade da TENS deve ser aumentada até produzir uma contração muscular visível (SLUKA; WALSH, 2003).

Quando se deseja aperfeiçoar o uso clínico de um recurso não basta se basear em uma abordagem de tentativas e erros ou na intuição da melhor indicação, é necessário compreender o que acontece quando o recurso é utilizado, entender seus mecanismos de ação, para que, assim, ele possa ser empregado de forma racional e criteriosa, da melhor forma a ajudar o paciente (FINNERTY, 2002; SAHRMANN, 2002). Para isso são desenvolvidos modelos de experimentos laboratoriais utilizando animais (JOHNSON, 2006; KALRA; URBAN; SLUKA, 2001; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; MURRELL; SLUKA et al. 1999). O estudo em animais permite reduzir algumas dificuldades das pesquisas em humanos, como controlar a extensão e o tipo de lesão, reduzir a enorme variabilidade intersujeitos e minimizar o efeito placebo da resposta (SLUKA; WALSH, 2003).



O controle da extensão e do tipo de lesão, nesses modelos de experimento, pode ser obtido através da aplicação de substâncias padrões que induzem um processo inflamatório característico, como a carragenina (NANTEL et al., 1999; FRANCISCHI et al., 2002; POSADAS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2005; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído de algas marinhas (*Chondrus crispus*), que depois de injetada na pata do rato, produz uma reação inflamatória aguda (VINEGAR, 1987; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). O modelo da carragenina não acarreta efeitos sistêmicos e apresenta alto grau de reprodutibilidade (SLUKA; WALSH, 2003; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). Vários tipos de carragenina podem ser encontrados de acordo com o seu teor de sulfato e configuração estrutural. As formas puras são designadas pelas letras gregas:  $\kappa$ ,  $\lambda$  e  $\iota$ , sendo o tipo  $\lambda$  o mais eficiente como irritante, por ser mais rico em resíduos sulfatados (DI ROSA, 1972). A carragenina provoca o aumento da sensibilidade ao estímulo doloroso térmico ou mecânico (hiperalgesia) (NANTEL et al., 1999). A resposta inflamatória da carragenina foi detalhada por Vinegar em 1987. Ela é descrita como bifásica, sendo a fase inicial aos 20 minutos, sem alterações celulares perceptíveis no exame histológico, com edema resultante do aumento da pressão oncótica e da liberação de serotonina e prostaglandinas no meio; a seguir ocorre uma resposta fagocitária intensa, que caracteriza a segunda fase (VINEGAR, 1987). O pico de produção da cicloxigenase-2 se dá duas horas após a injeção de carragenina (NANTEL et al., 1999). Em estudos anteriores, foi demonstrado que a carragenina apresentou uma

resposta dose dependente com pico hiperalgésico na 3<sup>a</sup> hora após sua aplicação (FRANCISCHI et al., 2002; RESENDE et al., 2006; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

Com relação à influência da aplicação da TENS sobre a resposta hiperalgésica da carragenina, foi verificado em outro estudo que a alta e a baixa frequência da TENS, quando aplicadas na pata do rato, apresentam efeitos antinociceptivos diferentes, sendo que a antinocicepção induzida pela baixa frequência foi mais prolongada quando comparada com a alta frequência (RESENDE et al., 2004). Esses mesmos autores verificaram que apenas a antinocicepção da TENS de baixa frequência foi inibida pelo pré-tratamento com naltrexona sistêmica; e que é possível se observar em animais submetidos a tratamento crônico de morfina, o desenvolvimento de tolerância cruzada a TENS de baixa frequência (RESENDE et al. 2004, 2006).

Entretanto, ainda são necessários outros estudos sobre a TENS para entendermos melhor o seu mecanismo de ação analgésica, bem como a influência do local de colocação dos eletrodos sobre sua resposta analgésica. Dessa forma, o objetivo geral deste estudo foi verificar o efeito da TENS em modelo experimental de hiperalgésia induzida pela carragenina. Os objetivos específicos foram: avaliar o efeito antinociceptivo da baixa e da alta frequência da TENS aplicadas na pata inflamada do rato, avaliar o efeito antinociceptivo após pré-tratamento intraplantar com um antagonista opióide específico (naltrexona) e

verificar se a aplicação da TENS no lado contra-lateral é efetiva sobre a pata inflamada.

## Capítulo 2 – Material e Métodos

### Animais

Foram utilizadas ratas Holtzmann, com peso entre 160 e 180g, fornecidas pelo CEBIO (Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG). Os experimentos apresentaram grupos de 4 a 6 animais, perfazendo 70 animais utilizados em todo o trabalho. O protocolo experimental proposto neste projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (CETEA/UFMG) sob o nº 19/2003 (ANEXO 1).

### Ambientalização dos animais

Os animais foram mantidos em caixas plásticas (quatro a seis por gaiola) com forração de maravalha, na sala de experimento, com temperatura controlada (23 a 25°C), ciclo claro-escuro de 12 horas iniciando às 7 horas da manhã, com livre acesso à água e à ração, por dois a três dias antes da coleta dos dados. Durante este período, foi realizada a adaptação ao aparelho algosímetro, para que os animais se habituassem à manipulação imposta pelo pesquisador e aos procedimentos do experimento. Essa metodologia segue padrões pré-estabelecidos em estudos similares (RESENDE et al., 2004, 2006).

## Substâncias utilizadas

As substâncias utilizadas nesse estudo foram: carragenina (sigma®, E.U.A), naltrexona (Sigma®, E.U.A) e solução salina fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Carragenina ou naltrexona foram diluídas em salina estéril de forma que o volume injetado na pata fosse de 0,1 ml.

## Modelo de inflamação da carragenina na pata do rato

Foi utilizada carragenina, 250 µg, como agente flogogênico, na face plantar da pata posterior direita do rato. A pata contra-lateral (posterior esquerda) recebeu o mesmo volume de salina fisiológica estéril.

## Teste nociceptivo – Algesímetro

Para a medida da hiperalgesia, foi utilizado o teste de compressão da pata do rato, descrito originalmente por Randall e Selitto (1957). Essa técnica mede a hiperalgesia, fundamentada no princípio de que a inflamação aumenta a sensibilidade ao estímulo nociceptivo mecânico, e que essa sensibilidade aumentada pode ser modificada por recursos analgésicos. A resposta a estímulos

dolorosos mecânicos é utilizada em modelos experimentais de dor aguda há décadas, como uma forma de triagem da eficácia de agentes farmacológicos. (SLUKA; WALSH, 2003)

O aparelho utilizado foi o algesímetro da Ugo Basile® (Itália). Durante o teste, o animal foi cuidadosamente mantido na posição horizontal, com o dorso voltado para o aparelho. A pata sob teste foi colocada na parte compressora do aparelho que consiste de dois itens: uma plana, sob a qual se apóia a parte dorsal da pata do animal, e a outra cônica, a qual exerce a pressão sobre a superfície plantar da pata. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 31 g/s, após o acionamento de um pedal pelo experimentador, atingindo um máximo de 500g para evitar qualquer dano ao tecido. Observada a resposta hiperalgésica, caracterizada pela retirada da pata do aparelho pelo animal, registra-se o valor expresso na escala do algesímetro. Considerou-se hiperalgesia a diferença em gramas suportada pela pata direita (inflamada), em relação à pata esquerda (controle). Quanto maior a hiperalgesia, decorrente do processo inflamatório induzido na pata direita, menor a pressão necessária para provocar a retirada da pata do algesímetro, tornando, assim, maior o valor da diferença entre as patas. As medidas de hiperalgesia foram realizadas previamente à injeção da carragenina, no tempo 0 (zero hora), e após 1, 2, 3, 4 e 6 horas da administração da carragenina. Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo avaliador.

Aparelho de Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea (TENS)

Para induzir a antinocicepção, foi utilizado um aparelho TENS – Neurodin III/Ibramed®, disponível comercialmente. Este aparelho foi previamente calibrado e foram empregados os seguintes parâmetros de aplicação: baixa (BF: 10Hz) ou alta frequência (AF: 130 Hz), com duração do pulso fixada em 130  $\mu$ s. As diferentes frequências foram utilizadas em animais distintos para se evitar o aparecimento de resultados inesperados devido à aplicação prévia de uma ou outra forma de tratamento. A intensidade da estimulação foi considerada o limiar sensorial, imediatamente abaixo do nível motor (a intensidade foi aumentada até o nível motor e, em seguida, reduzida para o nível sensorial), conforme demonstrado por Sluka et al. (1998) e realizado em experimentos prévios (RESENDE et al., 2004, 2006). A determinação da intensidade foi realizada no início da aplicação da TENS em cada animal. A estimulação elétrica transcutânea foi mantida durante 20 minutos. Os parâmetros relativos à frequência, a duração do pulso, o tempo de aplicação e a determinação da intensidade escolhidos para este estudo experimental foram semelhantes aos utilizados na clínica fisioterapêutica (Johnson, 2001; Sluka e Walsh, 2003). Foram utilizados eletrodos com 1 cm<sup>2</sup> especialmente construídos para o experimentos, fixados através de fita adesiva na pata do animal. Não foi utilizado gel acoplador, sendo os eletrodos fixados diretamente à pele do animal.

## Procedimento experimental

### Verificação da ação da TENS sobre a hiperalgesia

Foram realizados experimentos utilizando a TENS de baixa ou alta frequência aplicada antes ao pico do processo inflamatório, às 2 horas e 30 minutos após a injeção de carragenina. Durante a aplicação da TENS os animais podiam mover-se livremente, em caixas especialmente construídas para experimentos animais (30x20 cm). A fim de evitar danos aos eletrodos pelos ratos foi utilizado um colar Elizabetano confeccionado em cartolina que foi mantido ao redor da cabeça desses animais durante a aplicação da TENS.

### Tratamento intraplantar com naltrexona

Para o estudo do mecanismo de ação analgésica das diferentes frequências da TENS foi administrada naltrexona, um antagonista opióide, por via intraplantar, 50 µg, às 2 horas de experimento, em animais tratados com a baixa ou alta frequência. A dose escolhida foi baseada no estudo de Rodrigues et al. (2005), que utilizou a Naloxona, uma substância que mais se aproxima da Naltrexona.

Esses autores demonstraram que a dose de 50 µg injetada do lado oposto, não apresentava efeito sobre a hiperalgesia da pata inflamada.

#### Aplicação da TENS na pata contra-lateral (não inflamada)

Para o estudo da influência do local de aplicação da TENS foram utilizados os parâmetros da TENS previamente testados alterando apenas o local de fixação do eletrodo, sendo esse colocado na pata esquerda, contra-lateral àquela injetada com o agente flogogênico.

#### Análise estatística

Foi realizada a análise descritiva da tendência central dos dados e da variância da amostra através da média das medidas nos tempos avaliados e do erro padrão dessas medidas nas diferentes intervenções.

Para comparação estatística das diferenças entre os grupos nos diversos tempos de medidas foram utilizadas a análise de variância (ANOVA) com correção post hoc pelo teste de Bonferroni. Foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ . O programa estatístico utilizado foi o SPSS (Statistical Package for Science Social), versão 13.0, instalado em ambiente Windows®.



## Capítulo 3 – Referências Bibliográficas

AINSWORTH, L. et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) reduces chronic hyperalgesia induced by muscle inflammation. **Pain.**, v. 120, p. 182-187, 2006.

ALI, J., YAFFE, C. S., SERRETTE, C., The effect of transcutaneous electric nerve stimulation on postoperative pain and pulmonary function. **Surgery.**, v. 89, p. 507-512, 1981.

APTA, American Physical Therapy Association, Guide to Physical Therapy Practice. **Phy. The.**, v. 77, p. 1171-1624, 1997

BENEDETTI, F. et al. Neurophysiologic assessment of nerve impairment in posterolateral and muscle-sparing thoracotomy. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 115, p. 841-847, 1998.

BJORDAL, J. M., Johnson, M., Ljunggreen, A. E., Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) can reduce postoperative analgesic consumption. A meta-analysis with assessment of optimal treatment parameters for postoperative pain **Eur. J. Pain.**, v. 7, p. 181–188, 2003.

BROSSEAU, L. et al. Efficacy of the transcutaneous electrical nerve stimulation for the treatment of chronic low back pain: a meta-analysis. **Spine**, v. 27, p. 596-603, 2002.

CHESTERTON, L.S. et al. Sensory stimulation (TENS): effects of parameter manipulation on mechanical pain thresholds in healthy human subjects. **Pain.**, v. 99, p. 253-262, 2002.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine.**, v. 72, p. 359-371, 2005.

DAYKIN, A.R.; RICHARDSON, B. Physiotherapists' pain beliefs and their influence on the management of patients with chronic low back pain. **Spine**, v. 29, p. 783-795, 2004.

DELEO, J.A. Basic science of pain. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 88, p. 58-62, 2006.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 24, p. 89-102, 1972.

FIELDS, H.L.; Levine, J.D. Pain-Mechanisms and management. **West. J. Med.**, v. 141, p. 347-357,1984.

FINNERTY, E.P Why the Basic Sciences? **J.I.A.M.S.E.**, v. 12, p. 4, 2002.

FORSTER, E. L. et al. Effect of TENS on pain, medications, and pulmonary function following coronary artery bypass graft surgery. **Chest**, v.106, p. 1343-1348, 1994.

FRANCISCHI, J.N. et al. Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 137, p. 837-844, 2002.

GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 81, p. 8-11, 1998.

HAN, J.S. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **Trends. Neurosci.**, v. 26, p. 17-22, 2003.

HARGREAVES, A.; Lander, J., Use of transcutaneous electrical nerve stimulation for postoperative pain. **Nurs. Res.**, v. 38, p. 159-161, 1989.

HOLDEN, J.E.; JEONG, Y.; FORREST, J.M. The endogenous opioid system and clinical pain management. **AACN Clin Issues**. v. 16, p. 291-301, 2005.

IASP International Association for the Study of Pain Web site. **Pain terminology**. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>>. Acesso em: 19 dez. 2006.

JETTE, D.U. Effect of different forms of transcutaneous electrical nerve stimulation on experimental pain. **Phys. Ther.**, v. 66, p. 187-193, 1986.

JOHNSON, M. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). In: KITCHEN, S. **Electrotherapy**, 11ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2001. p. 259-286.

KABLI, N.; CAHILL, C.M. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. **Pain.**, v. 127, p. 84-93,2007.

KALRA, A.; URBAN, M.O.; SLUKA, K.A. Blockade of opioid receptors in rostral ventral medulla prevents antihyperalgesia produced by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 298, p. 257-263, 2001.

KALSO E. et al. Pain relief from intra-articular morphine after knee surgery: a qualitative systematic review. **Pain.**, v. 71, p. 127-134, 1997.

LE BARS D, GOZARIU M, CADDEN SW. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, 53, p. 597-652, 2001.

MELZACK, R. From the gate to the neuromatrix. **Pain.**, v. Suppl 6, p. S121-6, 1999.

MELZACK, R. Pain and the neuromatrix in the brain. **J. Dent. Educ.**, v. 65, p.1378-82, 2001.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: new theory. **Science**, v. 150, p. 971-979, 1965.

MURRELL, J.C.; JOHNSON. C.B. Neurophysiological techniques to assess pain in animals. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v. 29, p. 325-335, 2006.

NANTEL, F. et al. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, 128, p. 853-859, 1999.

PHILLIPS, W.J.; CURRIER, B.L. Analgesic pharmacology: I. Neurophysiology. **J Am. Acad. Orthop. Surg.**, v. 12, p. 213-220, 2004.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p. 331-338; 2004.

RAKEL, B.; Frantz, R.; Effectiveness of transcutaneous electrical nerve stimulation on postoperative pain with movement. **J. Pain.**, v. 8, p. 455-464, 2003.

RANG, H. P. ; DALE, M. M. E RITTER, J. M. Fármacos analgésicos. In: RANG, H. P.; DALE, M. M. E RITTER, J. M. **Farmacologia**, Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 4<sup>a</sup> Ed., 1999, p. 485-506.

RESENDE, M.A. et al. Local transcutaneous electrical stimulation (TENS) effects in experimental inflammatory edema and pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 504, p. 217-222, 2004.

RESENDE, M.A. et al. Reduction of effect analgesic of low frequency transcutaneous electrical nerve stimulation in rats morphine-tolerants. **Rev. Br. Fisiot.**, v. 10, p. 291-296, 2006.

ROBINSON, A. J., Transcutaneous electrical nerve stimulation for control of pain in musculoskeletal. **J.O.S.T.**, v. 24, p. 208-226, 1996

RODRIGUES, A.R. et al. Participation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect of fentanyl in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 91-97, 2005.

SABINO, G.S.; DE SOUZA, M.V.S; RESENDE, .M.A. Estimulação elétrica nervosa transcutânea no pós-operatório de cirurgia torácica ou abdominal. **Fisiot. Mov.**, v. 19, p. 59-72, 2006.

SAHRMANN, S.A. Development of the movement system In: SAHRMANN, S.A. **Diagnosis and treatment of movement impairment syndromes**. St. Louis: Mosby, 2002. p. 1-9

SCHAIBLE, H.G., RICHTER, F. Pathophysiology of pain. Langenbecks **Arch. Surg.** v. 389, p. 237-243; 2004.

SCOTT, A. et al. What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? **Br. J. Sports Med.**, v. 38, p. 248-249, 2004.

SIQUEIRA, F.V.; FACCHINI, L.A.; HALLAL, P.C. Epidemiology of physiotherapy utilization among adults and elderly. **Rev. Saude Publica.**, v. 39, p. 663-668, 2005.

SLAVKIN, H.C. What we know about pain. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 127, p. 1536-1541, 1996.

SLUKA, K.A. et al. Spinal Blockade of opioid receptors prevents the analgesia produced by TENS in arthritic rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 289, p. 840-846, 1999.

SLUKA, K.A.; WALSH, D. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation: Basic Science Mechanisms and Clinical Effectiveness. **J. Pain.**, v. 4, p. 109-121, 2003.

SOMERS, D.L.; CLEMENTE, F.R. Transcutaneous electrical nerve stimulation for the management of neuropathic pain: the effects of frequency and electrode position on prevention of allodynia in a rat model of complex regional pain syndrome type II. **Phys. Ther.**, v. 85, p. 698-709, 2006.

STEIN, C. et al. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, p. 5935-5939, 1990.

STEIN, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 1685-1690, 1995.

STEIN, C. SCHAFFER M, MACHELSKA H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nat. Med.**, v. 9, p.1003-1008, 2003

VALE, F.M. Dor. Novos aspectos fisiopatológicos e conseqüentes estratégias farmacológicas. **R.F.M.L.**, v. 3, p. 291-304, 2000.

VANCE, C.G. et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation at both high and low frequencies reduces primary hyperalgesia in rats with joint inflammation in a time-dependent manner. **Phys. Ther.**, v. 87, p. 44-51, 2007.

VINEGAR, R. et al. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Fed Proc.**, v. 46, p. 118-126, 1987.

WALL, P.D.; SWEET, W.H. Temporary abolition of pain in man. **Science**, v. 155, p. 108-109, 1967.

WANG, B. et al., Effect of the intensity of transcutaneous acupoint electrical stimulation on the postoperative analgesic requirement. **Anesth. Analg.**, v. 85, p. 406-413, 1997.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carragenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p. 544-547, 1962

## Capítulo 4 – Artigo

### Release of endogenous Opioids Following Transcutaneous Electric Nerve Stimulation in an Experimental Model of Acute Inflammatory Pain

#### ABSTRACT

Transcutaneous electric nerve stimulation (TENS) is a noninvasive treatment used in Physiotherapy practice to promote analgesia in acute and chronic inflammatory conditions. The aim of the present study was to investigate the TENS mechanism of action using high (HF:130Hz) or low (LF:10Hz) frequencies in an inflammation model produced by acute injection of carrageenan in rat paws (Cg; 250µg). Following carrageenan administration (zero time), either HF or LF TENS was applied on the inflamed paw of rats for 20 minutes and hyperalgesia was assessed hourly using the modified Randall-Selitto method (1957). HF and LF TENS inhibited the carrageenan-induced hyperalgesia by 100%. Pre-treatment of animals with local intraplantar naltrexone (Nx; 50 µg) reversed the analgesic effect of the LF TENS, but did not alter the effect of HF TENS. The application of HF and LF TENS in the contralateral paw reversed the hyperalgesia of the inflamed paw at the same extent as ipsilaterally, i.e., in the inflamed paw. However, LF TENS presented a longer-lasting analgesic effect than HF TENS. Our data demonstrate that HF and LF TENS induced antinociception and that the antinociception provoked by LF TENS is partially due to the local release of endogenous opioids. **Perspective:** This study demonstrates that both LF and HF TENS produce antinociception acting through different pathways. This study also confirms the beneficial effect of TENS application in the contralateral side of an injured tissue.

## INTRODUCTION

Transcutaneous electric nerve stimulation (TENS) is a non-invasive form of treatment used to alleviate pain in different situations.<sup>15</sup> The use of TENS combined with other physiotherapeutic methods favors an increase in the patient's level of activity, reduces hospital permanence and improves the function of the affected region. However, despite being used for over 30 years, mechanisms involved in the analgesia induced by TENS is not as yet well defined and the literature on the subject remains controversial.<sup>34</sup> The first study demonstrating the effectiveness of TENS in controlling pain was carried out by Wall and Sweet<sup>40</sup> in 1967, based on the gate theory of pain previously described by Melzack and Wall<sup>19</sup> in 1965. This theory postulates that the activation of thick (pressure) nerve fibers inhibits the activation of the thin fibers that conduct nociceptive impulses coming from the periphery to the central nervous system (CNS), thereby reducing pain. Moreover, a descending system from higher centers of the CNS to the dorsal horn of the spinal cord could also contribute to the modulation of pain.<sup>20</sup> However, the neurotransmitters involved were not suggested at the time, as they were not known.<sup>34</sup> Currently, there are more details on TENS mechanisms of analgesia, including knowledge on the participation of cholinergic and serotonergic receptors to reduce hyperalgesia.<sup>22,23</sup>

Later studies verified that low (LF: <10 Hz) and high (HF: >100 Hz) frequency TENS reduce the nociceptive response (hyperalgesia) without altering the edema in the rat paw, and that depending upon the frequency used, this analgesic effect can be modified by the systemic administration of naltrexone,<sup>26</sup> a specific antagonist of opioid receptors. LF and HF TENS induce antinociception in the CNS, which is mediated by the opioid receptors  $\mu$  and  $\delta$ , respectively, suggesting that the different TENS frequencies provoke antinociception

through activation of specific cell receptors.<sup>17,32</sup> A number of studies have shown that LF TENS is less effective than HF TENS in reducing hyperalgesia in rats that are tolerant to morphine.<sup>27,33,39</sup>

Most of the studies have found that exogenous as well as endogenous opioids can act on peripheral nociceptors to reduce a local inflammation-induced hyperalgesia.<sup>3,8</sup> Although the presence of opioid receptors on the peripheral terminals of primary afferents has been shown, the mechanisms by which opioid agonists induce peripheral antinociception remain unclear.<sup>8,10,14,19,40</sup> However, antinociception induced by local administration of opioids may minimize the side effects of a systemic use<sup>17</sup> and also prevent tolerance to a specific opioid substance.<sup>39</sup>

Despite being directly related to the TENS response, the positioning of the electrodes varies considerably among the studies.<sup>35</sup> In general, TENS electrodes are placed around the site of the pain or over the somatic receptive field related to the evoked pain.<sup>2,41</sup> A number of authors suggest that the electrodes should be placed on the contra-lateral side of the lesion in situations where the site of the pain is sensitive to touch<sup>15</sup>, as in situations of neuropathic pain.<sup>35</sup>

In the present study we propose to investigate the mechanisms involved in the antinociceptive effect of TENS through the application of low and high frequency TENS either in the ipsi or contralateral side of inflamed rat paws. Moreover, participation of opioid receptors in antinociceptive effect of TENS was also investigated by treatment of rat paws with the opioid antagonist naltrexone.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Female Holtzman rats, weighing between 160 and 180g, from Bioterism Center (CEBIO, Institute of Biological Sciences of UFMG) were used in the present study. The experiments were carried out using 3 to 6 animals/group, totaling 87 animals (used) throughout the study. Experimental design was previously approved by the local Animal Ethics Committee (CETEA/UFMG n° 19/2003), and care and use of the animals conformed to national/international guidelines.

### **Acclimatization of the animals**

The animals were kept in the experimentation room in plastic boxes, lined with wood shavings, for two days prior to data collection at a controlled temperature (23 to 25°C) and 12-hour light-dark cycle, with free access to water and food. During this period, adaptation to the algometric device was carried out in order for the animals to become adapted to the handling imposed by experimental procedures.

### **Drugs**

The following substances were used in the present study: carrageenan (Carrageenan, Sigma®, USA), naltrexone (Naltrexone hydrochloride, Sigma®, Germany) and sterile saline solution (NaCl 0.9%). The carrageenan and naltrexone were diluted in the saline solution so that the volume injected was 0.1 ml/paw.

### **Carrageenan inflammation model in the paw of the rat**

Carrageenan, a sulphated polysaccharide extracted from algae, is a proinflammatory agent used in a number of studies to induce hyperalgesia and edema in rat paws.<sup>6,10,25</sup> In the present study, carrageenan was administered in the right hind paw of the rat in a subcutaneous dose of 250 µg diluted in 0.1 ml of saline solution (pH 7.2–7.4). Contralateral paws were injected with the same volume of saline as described in Francischi et al<sup>10</sup> and Resende et al.<sup>25</sup>

### **Measurement of hyperalgesia**

Assessment of hyperalgesia consisted of measurement of the threshold stimulus for reaction (escape or paw withdrawal) using a weight (maximum limit of 500g) applied to the pads of hind paws using an Ugo Basile apparatus; as described in Randall and Selitto<sup>24</sup> in 1957. The threshold for pain sensation was measured before (time 0) and 1, 2, 3, 4 and 6 h after the intraplantar injection of carrageenan. The response to painful mechanical stimulation has been used in experimental models of acute pain for decades as a kind of triage regarding the effectiveness of pharmacological agents.<sup>34</sup> The result of each animal was presented by the difference in pressure (in grams) between the measurements performed on the right hind paw (injected with carrageenan) and those performed on the left hind paw (injected with saline). Greater hyperalgesia stemming from the inflammatory process induced by the carrageenan in the right paw requires less pressure needed to provoke the removal of the paw from the algometer, thereby leading to a more negative value when comparing the inflamed and non-inflamed paws. All measurements were taken by the same experimenter.

### **Transcutaneous Electric Nerve Stimulation Device**

A transcutaneous electric nerve stimulation (TENS) device, a commercially available Neurodin III/Ibramed®, was used to induce antinociception. For calibration, the following parameters were employed: low (LF: 10 Hz) or high (HF: 130 Hz) frequency, with pulse duration set at 130  $\mu$ s. The intensity of electric stimulation was defined by the sensorial threshold, that is, that immediately below the motor level (intensity was increased to the motor level, then reduced to the sensorial level), as described by Sluka et al<sup>31</sup> and used in previous studies of this laboratory.<sup>26,27</sup> Electric stimulation was later applied to the peak inflammatory response induced by the carrageenan and maintained for 20 minutes. The parameters chosen for the study regarding frequency, pulse duration, application time and intensity are in accordance to those used in Physiotherapy practice.<sup>15,34</sup> Electrodes of 1 cm<sup>2</sup> were especially constructed for the experiments and attached to the plantar and dorsal surface of the right hind paw (or left, depending on the experimentation protocol) using an adhesive tape. To minimize damage to the electrodes by experimental animals, a paper lace was placed around the neck of control (sham) and test animals during TENS application, which however, allowed the animals to move freely in the cages. It had been observed previously that the neck lace did not influence control nociceptive responses to carrageenan injected in rat paws (unpublished observations).

### **Protocol**

The pro-inflammatory effect of the carrageenan was determined in previous studies in our laboratory, where the peak of the inflammatory response was observed to occur between the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> hour following carrageenan administration.<sup>10</sup> Thus, TENS was applied at 2h 30 min of carragenin administration. Responses to mechanical compression of the paw of

the animals subjected to either LF or HF TENS and injected with carrageenan were compared with the responses of animals that were injected with carrageenan. TENS was also administered under the same above experimental conditions on the contralateral to the inflamed paw and the nociceptive response was assessed as previously described.

In a second experiment, the intraplantar opioid antagonist naltrexone (Nx; 50  $\mu$ g in 0.1 ml) was administered ipsilaterally or contralaterally 2 hours after carrageenan to animals which received LF TENS, 30 min later.

### **Statistical analysis**

The main tendency of the data was carried out using the average values observed in each group. Analysis of variance (ANOVA) with post hoc correction by the Bonferroni test was used for the statistical comparison of the means at the different time-points and were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . To this end, SPSS (Statistical Package for Social Science), version 13.0, installed in the Windows® environment was used.

## **RESULTS**

### **Effect of low (LF) and high (HF) frequency TENS on carrageenan-induced hyperalgesia in the rat paws**

LF and HF TENS completely reversed the nociceptive response presented by the animals at the 3<sup>rd</sup> hour following carrageenan administration. Moreover, animals treated with LF TENS presented a longer lasting antinociceptive effect from 3<sup>rd</sup> to 4<sup>th</sup> of carrageenan administration than those treated with HF TENS (Fig.1).

### **Effect of low and high frequency TENS application in the contralateral paw**

The prolonged analgesic effect verified with LF TENS application, was also observed when LF TENS was applied in the contralateral paw, the paw without inflammation (Fig. 2). Similar results were observed when HF TENS was applied on the inflamed and the non-inflamed paw (Fig. 3).

### **Effect of naltrexone on antinociception induced by low and high frequency TENS**

To assess the possibility of the release of opioid substances at the inflammatory site, naltrexone was administered through an intraplantar dose of 50 µg/0.1ml and either LF or HF TENS was applied after 30 minutes. In relation to control animals injected with saline, previous treatment with naltrexone reversed the antinociceptive effect shown by LF-TENS treated animals (Fig. 4), whereas it did not affect that induced by HF-TENS (Fig. 5). Moreover, the same dose of naltrexone contralaterally to the inflamed TENS-treated paw did not affect the antinociceptive effect of the latter (Fig. 6). Naltrexone given ipsilaterally to LF TENS-treated inflamed paws reversed the antinociceptive effect of the latter, thus confirming previous results shown in Fig. 4.

## DISCUSSION

With regard to clinical intervention, much of the success of Physiotherapy relies on the suitability of the methods employed to treat patients.<sup>21</sup> Whatsoever, the literature on TENS is as yet rather controversial regarding its efficacy to relieve situations of acute pain.<sup>5</sup> It has been suggested that TENS uses distinct analgesic mechanisms, depending upon the frequency of the apparatus employed.<sup>26,27</sup> Most of the studies tend to vary TENS parameters,<sup>34</sup> hampering the identification of the exact conditions to influence the observed response.<sup>13</sup> Therefore in this study, we chose to vary the frequency of activation current, maintaining other TENS parameters constant.

Our results demonstrated a complete reversal of the nociceptive effect resulting from acute inflammation in rat paws by both low (10 Hz) and high (130 Hz) TENS frequencies. However, LF TENS promoted a longer lasting antinociceptive effect than that observed with HF TENS. Indeed, similar results were previously obtained in our<sup>26</sup> as well as in other laboratories, as reviewed by Sluka and Walsh.<sup>34</sup>

Experimental and clinical studies have demonstrated that locally administered opioids produce analgesic effects by interacting with peripheral opioid receptors<sup>8,37</sup> and that morphine exerts its peripheral antinociceptive effect by activating ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels.<sup>29</sup> To verify the participation of endogenous opioids release into the site of TENS-produced antinociception, naltrexone, a specific opioid antagonist, was administered into rat paws prior of LF and HF TENS. In fact, only the antinociceptive effect induced by LF-TENS was modified by local treatment of rat paws with naltrexone, clearly suggesting that LF and HF-TENS bring about an antinociceptive effect throughout different mechanisms of action. Moreover, these data provide evidence for a locally induced antinociceptive effect

by LF-TENS brought about an opioid component. As opposed to our results, some studies in the literature support the notion that both HF TENS and LF TENS result in the release of endogenous opioids.<sup>5,13</sup> LF TENS would produce antinociception through activation of  $\mu$  opioid receptors and HF TENS through activation of  $\delta$  opioid receptors in the spinal cord.<sup>32</sup> However, LF TENS was less effective than HF TENS at reducing nociception in morphine-tolerant rats.<sup>27</sup> As morphine is considered a predominant  $\mu$  opioid agonist, these results suggest that opioid receptors of the  $\mu$ -type are involved in analgesic mechanisms of LF TENS. Accordingly,  $\mu$ -opioid are more potent than  $\delta$ - or  $\kappa$ -agonists in inducing peripheral antinociceptive effects.<sup>37</sup> Taken together, our results suggest that the analgesic effect shown by LF TENS-treated animals might be predominantly mediated by  $\mu$ -opioid receptors. Another contribution of the present study was the demonstration of a local (peripheral) release of endogenous opioids by (LF) TENS, thus widening even more the contribution of the opioid system to the pain control.

In the next experiment, we sought to verify the importance of the localization of the TENS electrodes. Under conditions of acute pain, TENS electrodes are normally placed around the points of pain. However, in some clinical conditions, electrode placement in the injured place is not feasible. In such cases, the placement of the TENS electrodes is recommended on the same pathway that innervates the injured area or over the emergence of the nerves from the spinal cord responsible for the affected dermatome.<sup>15,34</sup> Surprisingly, we observed in the current study that LF and HF TENS were also effective in inducing antinociception when the electrodes were placed on the opposite side to the inflammation. These data are in agreement with other studies,<sup>1,35</sup> who showed LF or HF TENS applied to the gastrocnemius muscle contralateral to the site of inflammation also significantly

reduced antinociception. Therefore, we may assume that application of TENS on the contralateral side can modify the transmission of pain occurring in the inflamed side. As projections of the inhibitory descending system are bilateral, diffuse and connect both sides of the spinal cord,<sup>28</sup> we may suggest that this pathway is activated by TENS on larger (pressure) fibers located the contralateral side. Antinociception may have actually been evolved from spinal cord, as some studies have demonstrated that deep spinal afferents present bilateral projections in the dorsal horn of the cord.<sup>11,12</sup> However, a contribution of local cells such as skin keratinocytes releasing beta-endorphin<sup>14</sup> to the antinociceptive effect seen in animals whose inflamed paws were stimulated with LF TENS, cannot be ruled out. Especially if one considers the lack of effect presented by naltrexone administration on the contralateral side, as demonstrated in the present study. What inflammation induces in these local cells, however, deserves further investigation.

Taken together, these data suggest that under some special clinical conditions of acute pain such as it occurs in open injuries, extensive burns or neuropathic pain, application of TENS on the opposite side of the injury may reduce pain, thus offering a therapeutic alternative for pain-relief, with satisfactory results,<sup>36</sup> a goal aimed by both patients and clinicians.



## REFERENCES

1. Ainsworth L, Budelier K, Clinesmith M, Fiedler A, Landstrom R, Leeper BJ, Moeller LA, Mutch S, O'Dell K, Ross J, Radhakrishnan R, Sluka KA: Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) reduces chronic hyperalgesia induced by muscle inflammation. *Pain* 120:182-187, 2006
2. Barlas P, Lundeberg T: Transcutaneous electrical nerve stimulation and acupuncture, in McMahon SB, Koltzenburg M (eds): *Melzack and Wall's Textbook of Pain*. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, 2006, pp 583-590
3. Bentley GA, Newton SH, Starr J: Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. *Br J Pharmacol* 73:325-332, 1981
4. Bjordal JM, Johnson M, Ljunggreen AE: Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) can reduce postoperative analgesic consumption. A meta-analysis with assessment of optimal treatment parameters for postoperative pain. *Eur J Pain* 7:181-188, 2003
5. Chandran P, Sluka KA: Development of opioid tolerance with repeated transcutaneous electrical nerve stimulation administration. *Pain* 102:195-201, 2003
6. Di Rosa M: Biological properties of carrageenan. *J Pharm Pharmacol* 24: 89-102, 1972
7. Duarte IDG, dos Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH: Antinociception by direct antagonism of nociceptor sensitisation involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 217:225-227, 1992
8. Ferreira SH, Nakamura M: Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. *Prostaglandins* 18:191-200, 1979

9. Ferreira SH, Duarte IDG, Lorenzetti BB: The molecular mechanism of action of peripheral morphine antinociception: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* 201:121-122, 1991
10. Francischi JN, Chaves CT, Moura AC, Lima AS, Rocha OA, Ferreira-Alves DL, Bakhle YS: Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *Br J Pharmacol*.137(6):837-44, 2002
11. Furukawa M, Wada N, Tokuriki M, Miyata H: Spinal projections of cat primary afferent fibers innervating caudal facet joints. *J Vet Med Sci* 62:1005-1007, 2000
12. Gillette RG, Kramis RC, Roberts WJ: Spinal projections of cat primary afferent-fibers innervating lumbar facet joints and multifidus muscle. *Neurosci Lett* 157:67-71, 1993
13. Gopalkrishnan P, Sluka KA: Effect of varying frequency, intensity, and pulse duration of transcutaneous electrical nerve stimulation on primary hyperalgesia in inflamed rats. *Arch Phys Med Rehabil* 81:984-990, 2000
14. Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, Malan Jr. TP CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *PNAS* 102(8): 3093-3098, 2005
15. Johnson M: Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS), in Kitchen S (ed): *Electrotherapy Philadelphia*, 2001, pp 259-286
16. Kabli N, Cahill CM: Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. *Pain* 127(1-2):84-93, 2007
17. Kalra A, Urban MO, Sluka KA: Blockade of opioid receptors in rostral ventral medulla prevents antihyperalgesia produced by transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS). *J. Pharmacolog Exp Ther* 298:257-263, 2001

18. Levine JD, Taiwo YO: Involvement of the mu-opiate receptor in peripheral antinociception. *Neuroscience* 32: 571-575, 1989
19. Melzack R, Wall PD: Pain mechanisms: new theory. *Science* 150:971-979, 1965
20. Melzack R: From the gate to the neuromatrix. *Pain Suppl* 6:S121-6, 1999
21. Prentice WE: Therapeutic modalities in rehabilitation, in Prentice, WE (ed): *Rehabilitation Techniques in Sports Medicine*. St. Louis, 1998, pp 204-218
22. Radhakrishnan R, King EW, Dickman J, Richtsmeier C, Schardt N, Spurgin M, Sluka KA: Blockade of spinal 5HT receptor subtypes prevents low, but not high, frequency-induced antihyperalgesia in rats. *Pain* 105: 205-213, 2003a
23. Radhakrishnan R, Sluka KA: Spinal muscarinic receptors are activated during low or high frequency TENS-induced antihyperalgesia in rats. *Neuropharmacology* 45: 1111-1119, 2003
24. Randall LD, Selitto JJ: A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. *Arch Int Pharmacodyn* 113:233-249, 1957
25. Resende MA, Reis WGP, Pereira LSM, Ferreira W, Garcia MHLP, Santoro MM, et al.: Hyperalgesia and edema responses induced by rat peripheral blood mononuclear cells incubated with carrageenin. *Inflammation* 25:277-85, 2001
26. Resende MA, Sabino GG, Candido CR, Pereira LS, Francischi JN: Local transcutaneous electrical stimulation (TENS) effects in experimental inflammatory edema and pain. *Eur J Pharmacol* 504:217-222, 2004
27. Resende MA, Gonçalves HH, Sabino GS, Pereira LSM, Francischi JN: Reduction of the analgesic effect by low frequency transcutaneous electrical nerve stimulation in morphine –tolerants rats. *Rev Br Fisiot* 10:291-296, 2006

28. Robinson DA, Calejesan AA, Zhuo M: Long-lasting changes in rostral ventral medulla neuronal activity after inflammation. *J Pain* 3:292-300, 2002
29. Rodrigues ARA, Duarte IDG: The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Br J Pharmacol* 129:110-114, 2000
30. Rodrigues ARA, Castro MSA, Francischi JN, Perez AC, Duarte IDG: Participation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect of fentanyl in rats. *Braz J Med Biol Res* 38:91-97, 2005
31. Sluka KA, Bailey K, Bogush J, Olson R, Ricketts A: Treatment with either high or low frequency TENS reduces the secondary hyperalgesia observed after injection of kaolin and carrageenan into knee joint. *Pain* 77:97-102, 1998
32. Sluka KA, Deacon M, Stibal A, Strissel S, Terpstra A: Spinal blockade of opioid receptors prevents the antinociception produced by TENS in arthritic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 289:840-846, 1999
33. Sluka KA, Judge MA, McColley MM, Reveiz PM, Taylor BM: Low frequency TENS is less effective than high frequency TENS at reducing inflammation induced hyperalgesia in morphine-tolerant rats. *Eur J Pain* 4:185-93, 2000
34. Sluka KA, Walsh D: Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation: Basic Science Mechanisms and Clinical Effectiveness. *J Pain* 4:109-121, 2003
35. Somers DL, Clemente FR: Transcutaneous electrical nerve stimulation for the management of neuropathic pain: the effects of frequency and electrode position on prevention of allodynia in a rat model of complex regional pain syndrome type II. *Phys Ther* 86:698-709, 2006

36. Somers DL, Somers MF: Treatment of neuropathic pain in a patient with diabetic neuropathy using transcutaneous electrical nerve stimulation applied to the skin of the lumbar region. *Phys Ther* 79:767-775, 1999
37. Stein C, Hassan AHS, Przewlocki R, Gramsch C, Peter K, Herz A: Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87:5935-5939, 1990
38. Stein C, Hassan AHS, Lehrberger K, Giefing J, Yassouridis A: Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. *Lancet* 342:321-324, 1993
39. Stein C, Schafer M, Machelska H: Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 9:1003-1008, 2003
40. Wall PD, Sweet WH: Temporary abolition of pain in man. *Science* 155:108-109, 1967
41. Walsh D: TENS. Clinical applications and related theory. Edinburgh, UK, Churchill Livingstone, 1996

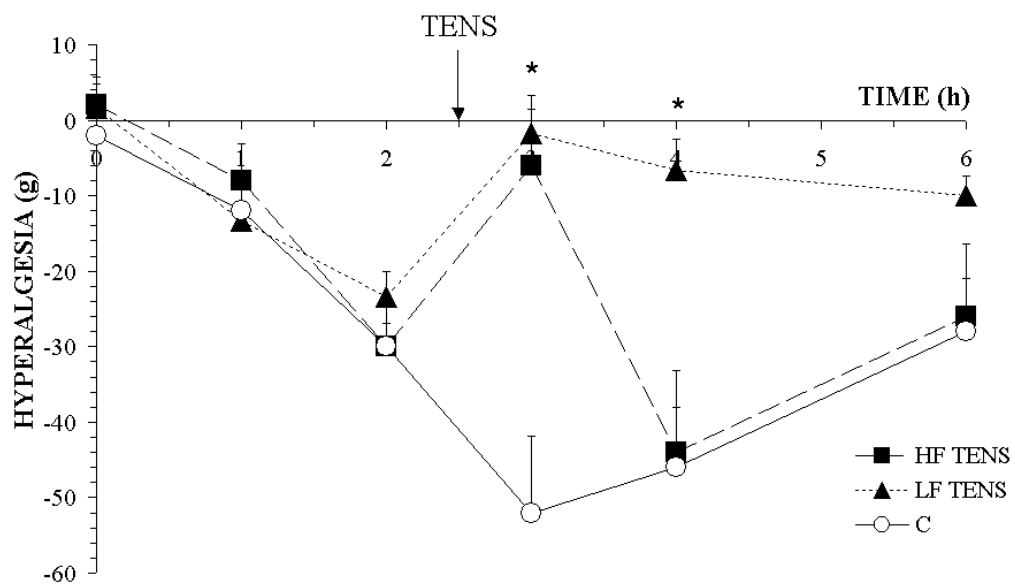


Figure 1

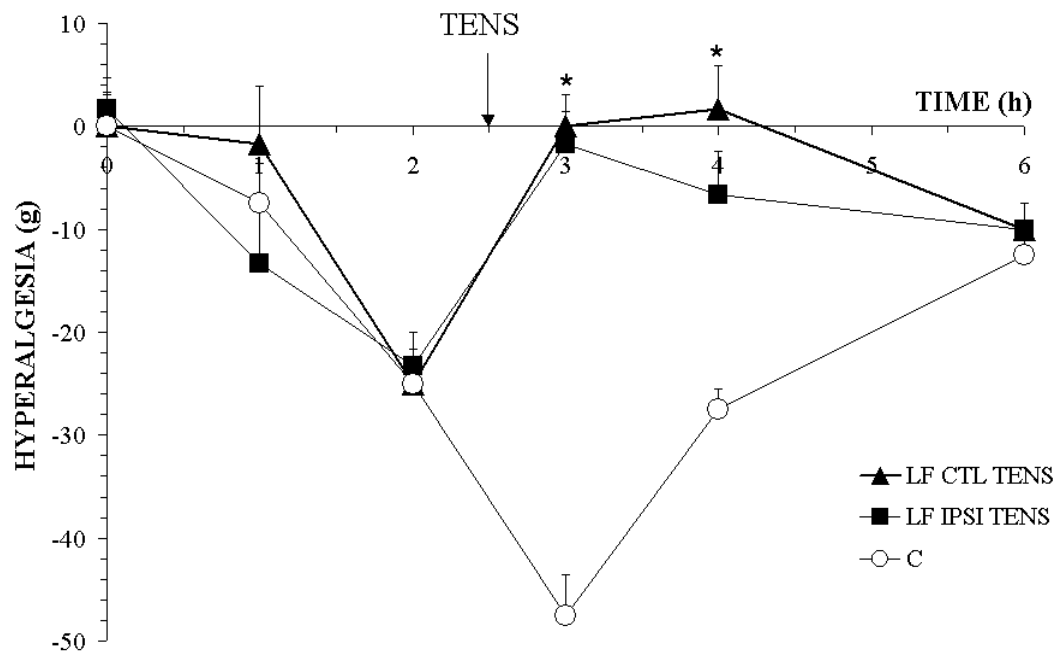


Figure 2

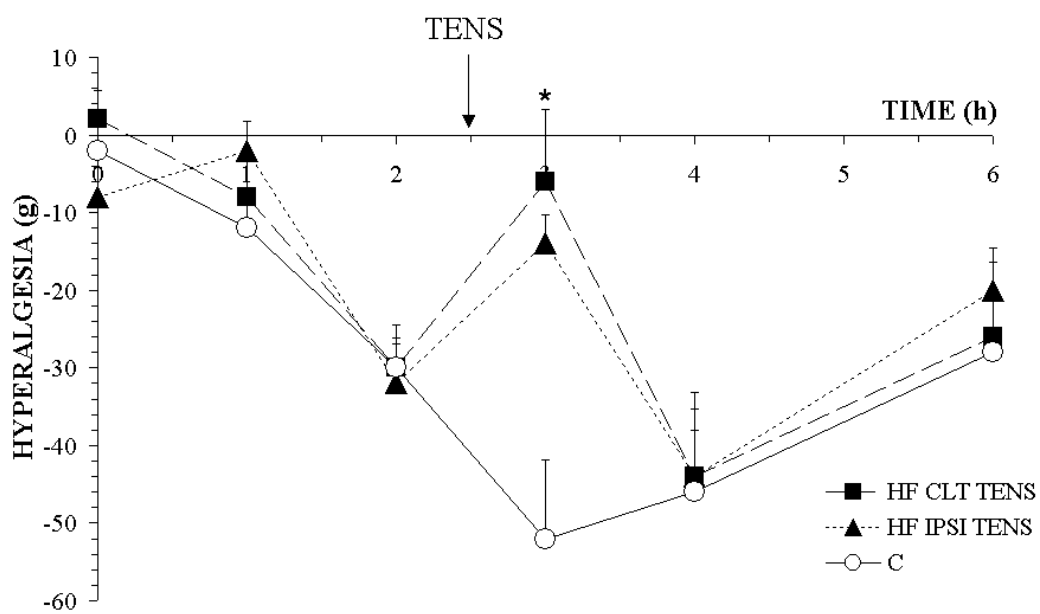


Figure 3



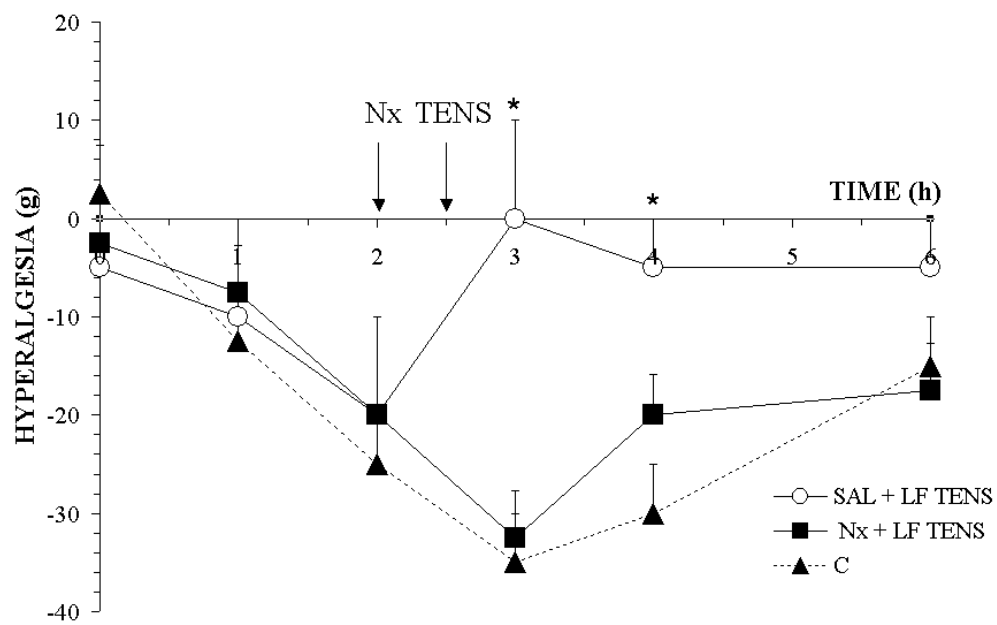


Figure 4

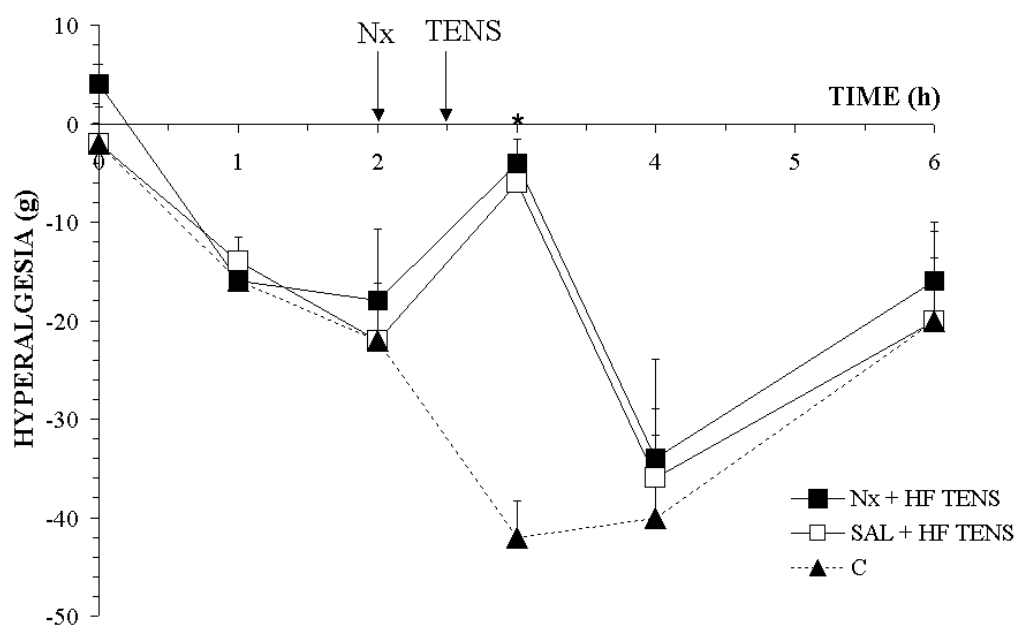


Figure 5

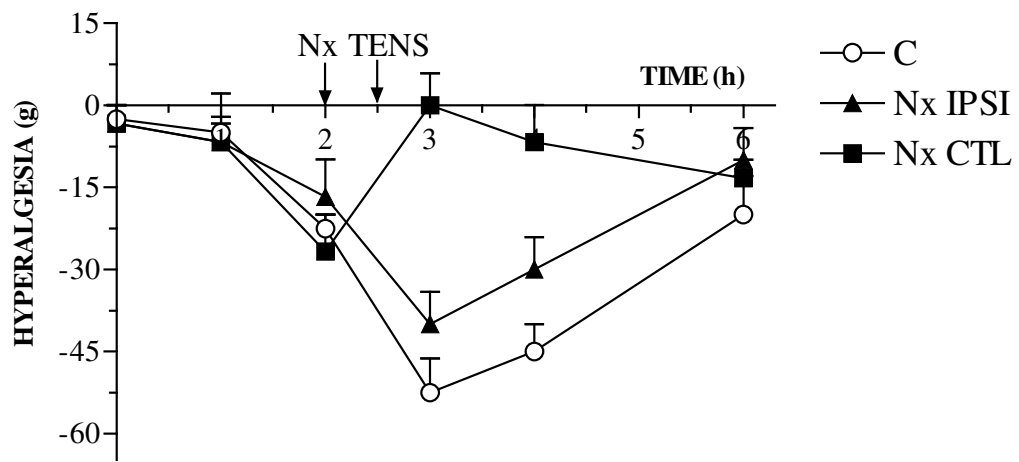


Figure 6

### Figure legends

**Figure 1 - Effect of low (L) and high (H) frequency TENS on carrageenan-induced hyperalgesia in the rat paws.** ■ HF TENS (130 Hz); ▲ LF TENS (10 Hz); ○C: Control group injected with carrageenan (250µg/0.1 ml) at zero time, without electric stimulation. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 6 animals/group \* indicates a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ).

**Figure 2 - Effect of low frequency (LF) TENS application in the paw contralateral (CLT) to the inflammation.** ▲CLT TENS: Application of LF TENS (10 Hz) on the contralateral paw to carrageenan injection (left); ■ IPSI TENS: Application of LF TENS (10 Hz) on the inflamed paw (right); ○C: Control group injected with carrageenan Cg 250 µg/0.1 ml (without electric stimulation). Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 6 animals/group. \* indicates a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ).

**Figure 3 - Effect of high frequency (HF) TENS application in the paw contralateral (CLT) to the inflammation.** ■ CLT TENS: Application of HF TENS (130 Hz) on the contralateral paw to carrageenan injection (left); ▲ IPSI TENS: Application of HF TENS (130 Hz) on the inflamed paw (right); ○C: Control group injected with carrageenan at zero time (Cg 250 µg/0.1 ml), without electric stimulation. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 6 animals/group. \* indicates a statistically significant difference ( $p < 0,05$ ).

**Figure 4 - Effect of naltrexone on antinociception induced by low frequency (LF) TENS.** Naltrexone was administered at a dose of 50µg/0.1 ml ipsilaterally, i.e., in the same paw which received TENS treatment. ○SAL + LF TENS: saline and LF TENS (10Hz); ■ Nx + LF TENS: Naltrexone (50 µg/0.1 ml) and LF TENS (10Hz); ▲C: Control group injected with carrageenan (250 µg/0.1 ml), without electric stimulation. Each point represents the mean ± SEM of 4 animals/group. \* indicates a statistically significant difference (p<0.05).

**Figure 5 - Effect of naltrexone on antinociception induced by high frequency (HF) TENS.** ■ Nx + HF TENS: Naltrexone (50 µg/0.1 ml) and HF TENS (130Hz); ○ SAL + HF TENS: saline and HF TENS (130Hz); ▲C: Control group injected with carrageenan (250 µg/0.1 ml), without electric stimulation. Each point represents the mean ± SEM of 5 animals/group. \* indicates a statistically significant difference (p<0.05).

**Figure 6 – Comparison between contralateral and ipsilateral naltrexone (CLT) administration on antinociception induced by low frequency (LF) TENS.** Naltrexone (50 µg/0.1 ml) was either administered ipsilaterally (▲) or contralaterally (■) to the inflamed paw, ½ h before administration of LF TENS. ▲C: Control group was injected intraplantarly with carrageenan (250 µg/0.1 ml) at zero time and treated 2 ½ later with LF TENS (10Hz). Each point represents the mean ± SEM of 3 animals/group. \* indicates a statistically significant difference (p<0.05).

## Capítulo 5 – Considerações Finais

Os resultados de nosso estudo indicam que a TENS de alta e baixa frequências apresentam diferentes respostas antinociceptivas e que a TENS de baixa frequência pode apresentar efeitos através de mecanismos nervosos centrais e periféricos. É provável que esses efeitos estejam relacionados à estimulação de receptores periféricos, à atuação de circuitos inibitórios espinhais e à influência de estruturas supra-espinhais.

O presente estudo também evidenciou que a TENS, independente da frequência utilizada (alta ou baixa frequência), pode produzir efeitos analgésicos mesmo quando aplicada no membro contra-lateral à região inflamada. Essa característica fornece subsídios para a utilização da TENS para o controle da dor em algumas condições clínicas em que o processo de alodinia dificulta a fixação e a retirada dos eletrodos, como no caso de queimaduras. Essa relação, entretanto, ainda deve ser estudada antes de sua recomendação clínica.

Esperamos que o nosso estudo tenha contribuído para aperfeiçoar o entendimento sobre a TENS e, também, que os resultados sirvam de estímulo para que novas pesquisas sejam desenvolvidas e possam colaborar, cada vez mais, para melhora da saúde das pessoas.

## Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética