ADRIANO CARDOZO FRANCIOSI

**INVESTIGAÇÃO DA NEUROPLASTICIDADE ASSOCIADA AO EFEITO
TERAPÊUTICO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA CORTICAL EM MODELOS
ANIMAIS DE SÍNDROMES DOLOROSAS COMPLEXAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**SÃO PAULO
2016**

ADRIANO CARDOZO FRANCIOSI

**Investigação da neuroplasticidade associada ao efeito terapêutico da
estimulação elétrica cortical em modelos animais de síndromes dolorosas
complexas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Camila Squarzoni Dale

Versão Original

**São Paulo
2016**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Franciosi, Adriano Cardozo

Investigação da neuroplasticidade associada ao
efeito terapêutico da estimulação elétrica cortical
em modelos animais de síndromes dolorosas complexas
/ Adriano Cardozo Franciosi; orientadora Camila
Squarzoni Dale. -- São Paulo, 2016.

77 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Dor. 2. Fibromialgia. 3. Estimulação do córtex
motor. 4. Neuroplasticidade. 5. Ratos. I. Dale,
Camila Squarzoni, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Adriano Cardozo Franciosi

Título da Tese: Investigação da neuroplasticidade associada ao efeito terapêutico da estimulação elétrica cortical em modelos animais de síndromes dolorosas complexas

Orientador(a): Profa. Dra. Camila Squarzoni Dale

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **081** nas fls. **130** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Camila Squarzoni Dale**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Investigação da neuroplasticidade associada ao efeito terapêutico da estimulação elétrica cortical em modelos animais de síndromes dolorosas complexas*" do qual participam o(s) aluno(s) **Adriano Cardozo Franciosi, Elaine Flâmia Toniolo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **06.07.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 10 de julho de 2012.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice- Coordenador -CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA- ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Celso e Ana Maria, por todo o apoio durante todos esses anos.

À minha esposa, Megue, por ter ficado ao meu lado sempre que precisei, e por estar compartilhando comigo a alegria de formar uma família, com a nossa Túia e a chegada do pequeno Cristóvão.

À minha orientadora, Camila Dale, pela paciência e dedicação neste longo caminho.

Aos “brothers” fundamentais, Elaine e Thiago, pela força incondicional.

Ao grande amigo Fábio, pelo companheirismo durante tanto tempo.

Aos amigos de longa data, Angelo, Pedro e André, que mesmo de longe, fazem a diferença.

À querida Fernanda Elpes, pela ajuda nas terapias e pela amizade.

Aos companheiros de laboratório ou que por lá passaram, João, Tábatha, Helô, Victória, Thiago, Eliza, Mariana, Beatriz, Laura, Regina, Paty, Eloá, Tatirlaine, e todos mais que minha memória tenha atrapalhado em recordar.

Aos professores Luiz Roberto Giorgetti de Britto, Jackson Cioni Bittencourt, Maria Luiza Morais Barreto de Chaves, Marucia Chacur, Claudimara Ferini Pacicco Lotfi, Elen Haruka Miyabara e Julio Cesar Batista Ferreira que em algum momento cederam o espaço ou equipamento para a realização de algum experimento.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado.

“Há momentos, porém, em que é preciso respirar fundo, seja qual for o metabolismo que se tenha.” (Douglas Adams, em O restaurante no fim do universo)

RESUMO

FRANCIOSI, A. C. **Investigação da neuroplasticidade associada ao efeito terapêutico da estimulação elétrica cortical em modelos animais de síndromes dolorosas complexas**. 2016. 77 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A dor crônica é o sintoma principal de algumas síndromes complexas caracterizadas pela ausência de lesão no tecido nervoso, sendo agrupadas sob a denominação de dor disfuncional. A Fibromialgia é uma integrante deste grupo com considerável prevalência na população, sendo caracterizada principalmente pela presença de dor crônica disseminada, alterações sensoriais como sensação de inchaço, formigamento e perda de sensibilidade, sintomas não-sensoriais, como fadiga, sono não reparador, rigidez articular, além de comorbidades psiquiátricas como ansiedade e depressão. Com a ausência de tratamento específico, grande parcela dos pacientes fibromiálgicos tornam-se refratários à terapêutica farmacológica adotada. Uma alternativa emergente para o tratamento de pacientes refratários é a estimulação do córtex motor (ECM). Esta abordagem, através de técnicas não-invasivas, tem obtido bons resultados no tratamento de pacientes fibromiálgicos. Embora os mecanismos envolvidos na analgesia induzida pela ECM sejam ainda pouco conhecidos, seu efeito provavelmente está vinculado à modulação da plasticidade sináptica em estruturas neurais que compõem a matriz da dor. Assim, o objetivo deste trabalho foi reproduzir um modelo de fibromialgia induzido pela depleção monoaminérgica, avaliar o efeito antinociceptivo da ECM neste modelo e os níveis de proteínas envolvidas na neuroplasticidade, em áreas cerebrais relacionadas à nocicepção (corno posterior da medula espinal, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e córtex cingulado anterior (ACC)). Ratos da linhagem Sprague-Dawley foram tratados sub-cronicamente com reserpina (2 mg/kg, s.c., 3 dias consecutivos) para induzir a depleção monoaminérgica e foram avaliados para alterações de sensibilidade mecânica. A estimulação foi aplicada na área representativa da pata posterior utilizando os seguintes parâmetros: 1 V, 210 μ s e 60 Hz, por 15 minutos. As proteínas BDNF e GDNF foram quantificados por ELISA, e CDNF, TNF- α , GFAP, OX-42, TrkB, AKT e ERK-1/2 através de western blot. A depleção monoaminérgica causou um aumento consistente da sensibilidade mecânica e a ECM foi capaz de restaurar a sensibilidade mecânica dos animais tratados com reserpina, tanto através da aplicação de uma única sessão, quanto com a aplicação de 5 sessões de estimulação. No corno posterior da medula espinal, BDNF diminuiu em função da depleção monoaminérgica, sendo seu níveis restaurados pela aplicação de ECM, que também causou aumento de BDNF no grupo Veículo. A fosforilação do receptor TrkB no corno posterior foi diminuído por múltiplas sessões de ECM concomitantes à depleção monoaminérgica. Na PAG, todas as alterações detectadas ocorreram no grupos tratados com Veículo, havendo aumento de GDNF após sessão única de ECM, e diminuição de GFAP e da fosforilação de AKT e ERK-1/2 em decorrência de múltiplas sessões de ECM. No ACC, a aplicação de múltiplas sessões de ECM diminuiu a fosforilação de AKT no grupo Veículo, enquanto a depleção monoaminérgica causou um aumento de GFAP, que permaneceu em níveis normais nos grupos que receberam ECM. E ainda no ACC, a aplicação de sessão única de ECM aumentou os níveis de BDNF, mas somente na presença de depleção monoaminérgica. Assim, o efeito antinociceptivo da ECM no modelo de fibromialgia

está associada com uma variedade de eventos neuroplásticos diferencialmente alterados nas estruturas envolvidas com a modulação da dor.

Palavras-chave: Dor. Fibromialgia. Estimulação do córtex motor. Neuroplasticidade. Ratos.

ABSTRACT

FRANCIOSI, A. C. **Investigation of neuroplasticity associated with the therapeutic effects of electrical cortical stimulation in animal models of complex painful syndromes.** 2016. 77 p. Ph.D thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Chronic pain is a major symptom of some complex syndromes characterized by absence of nervous tissue damage, being grouped under a denomination of dysfunctional pain. Fibromyalgia is a member of this group with considerable prevalence in the population, being characterized mainly by the presence of chronic widespread pain, sensory alterations as a sensation of swelling, tingling and numbness, non-sensorial symptoms such as fatigue, unrefreshing sleep, joint stiffness, and also, psychiatric comorbidities such as anxiety and depression. Without specific treatment, most fibromyalgic patients become refractory to the adopted pharmacological therapy. An emerging alternative for the treatment of refractory patients is the motor cortex stimulation (MCS). This approach, through non-invasive techniques, has obtained good results in such refractory fibromyalgic patients. Although the mechanisms involved in MCS-induced analgesia are still poorly understood, their effect is likely linked to the modulation of synaptic plasticity in neural structures composing the pain matrix. Thus, the objective of this study was to reproduce a model of fibromyalgia induced by monoaminergic depletion, evaluating the antinociceptive effect of MCS in this model, as well as, the levels of proteins involved in neuroplasticity in cerebral areas related to nociception (spinal cord dorsal horn, periaqueductal gray (PAG) and anterior cingulate cortex (ACC)). Sprague-Dawley rats were treated sub-chronically with reserpine (2 mg / kg, s.c., 3 consecutive days) to induce monoaminergic depletion and were assessed for mechanical sensitivity. The stimulation was applied in the representative area of the hind paw using the following parameters: 1 V, 210 μ s and 60 Hz, for 15 minutes. BDNF and GDNF proteins were quantified by ELISA, and CDNF, TNF- α , GFAP, OX-42, TrkB, AKT and ERK-1/2 by western blotting. The monoaminergic depletion caused a consistent increase in mechanical sensitivity and MCS was able to restore it in animals treated with reserpine, by the application of a single session, as by the application of 5 sessions of MCS. In the spinal cord dorsal horn, BDNF decreased by the monoaminergic depletion, and its levels were restored by MCS, which also caused an increase in BDNF in the Vehicle group. Phosphorylation of the TrkB receptor in the dorsal horn was decreased by multiple session MCS concomitant with monoaminergic depletion. In PAG, all changes were detected in Vehicle-treated groups, being a GDNF increase after single session MCS, and a decrease in GFAP and phosphorylation of AKT and ERK-1/2 by multiple session MCS. In the ACC, multiple session MCS decreased AKT phosphorylation in Vehicle group, while the monoaminergic depletion caused an increase in GFAP, which remained at normal levels in the groups receiving MCS. In addition, in the ACC, a single session of MCS increased BDNF levels, but only in the presence of monoaminergic depletion. Thus, the antinociceptive effect of MCS in the fibromyalgia model is associated with a variety of differentially altered neuroplastic events in structures involved in pain modulation.

Keywords: Pain. Fibromyalgia. Motor cortex stimulation. Neuroplasticity. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental e linha do tempo.	31
Figura 2 – Decurso temporal do limiar de sensibilidade mecânica cutânea avaliado com monofilamentos de von Frey em ratos tratados com reserpina ou veículo.	32
Figura 3 – Efeito da aplicação de uma única sessão de estimulação elétrica do córtex motor (ECM) sobre a sensibilidade mecânica de ratos submetidos à depleção monoaminérgica (Reserpina) e Veículo.	34
Figura 4 – Efeito da aplicação de múltiplas sessões de estimulação do córtex motor (ECM) sobre a sensibilidade mecânica de ratos submetidos a depleção monoaminérgica (Reserpina) e do grupo Veículo.	36
Figura 5 – Níveis de BDNF, GDNF, CDNF e TNF- α no corno posterior da medula espinal de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	38
Figura 6 – Níveis de GFAP e OX-42 no corno posterior da medula espinal de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	39
Figura 7 – Níveis das isoformas completa e truncada do receptor TrkB, fosforilação da isoforma completa e proporção entre as isoformas no corno posterior da medula espinal de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	40
Figura 8 – Fosforilação e níveis de AKT e ERK-1/2 no corno posterior da medula espinal de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	42
Figura 9 – Níveis de BDNF, GDNF, CDNF e TNF- α na substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	44
Figura 10 – Níveis de GFAP e OX-42 na substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	45

Figura 11 – Níveis das isoformas completa e truncada do receptor TrkB, fosforilação da isoforma completa e proporção entre as isoformas na substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	46
Figura 12 – Fosforilação e níveis de AKT e ERK-1/2 na substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	47
Figura 13 – Níveis de BDNF, GDNF, CDNF e TNF- α no córtex cingulado anterior (ACC) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	49
Figura 14 – Níveis de GFAP e OX-42 no córtex cingulado anterior (ACC) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	50
Figura 15 – Níveis das isoformas completa e truncada do receptor TrkB, fosforilação da isoforma completa e proporção entre as isoformas no córtex cingulado anterior (ACC) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	51
Figura 16 – Fosforilação e níveis de AKT e ERK-1/2 no córtex cingulado anterior (ACC) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de anticorpos primários utilizados..... 30

Tabela 2 – Lista de anticorpos secundários utilizados..... 30

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACC – *Anterior cingulate cortex*/córtex cingulado anterior
- AKT – AKT serina/treonina quinase
- AMPA – *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*/ácido α-Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
- ANOVA – *analysis of variance*/análise de variância
- BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*/Fator neurotrófico derivado do cérebro
- CamKII – *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*/proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II
- CDNF – *Cerebral dopamine neurotrophic factor*/fator neurotrófico dopaminérgico cerebral
- COMT – *Catechol-O-methyltransferase*/catecol O-metiltransferase
- CREB – *cAMP response element-binding protein*/proteína de ligação ao elemento responsivo do AMP cíclico
- e.p.m. – erro padrão da média
- ECM – Estimulação do córtex motor
- ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*/ensaio de imunoabsorção enzimática
- ERK-1/2 – *Extracellular signal-regulated kinase-1/2*/quinase regulada por sinal extracelular-1/2
- GDNF – *Glial cell line-derived neurotrophic factor*/fator neurotrófico derivado da glia
- GFAP – *Glial fibrillary acidic protein*/proteína glial fibrilar ácida
- HRP – *horseradish peroxidase*/peroxidase de raiz forte
- IgG – imunoglobulina G
- LC – *locus ceruleus*
- log – logaritmo
- MANF – *Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor*/fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálico
- MOR – *μ-opioid receptor*/receptor μ opióide
- MPTP – fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálico
- Nav1.7 – *Voltage-gated sodium channel 1.7*/canal de sódio dependente de voltagem 1.7
- NGF – *Nerve growth factor*/fator de crescimento do nervo

NMDA – *N-Methyl-D-aspartate*/N-metil D-Aspartato
PAG – *Periaqueductal gray*/substância cinzenta periaquedutal
PET – *Positron emission tomography*/tomografia por emissão de pósitrons
pH – potencial hidrogeniônico
PKC – *Protein kinase C*/ Proteína quinase C
p-Thr – fosfo-Treonina
p-Tyr – fosfo-Tirosina
RVM – Rostral ventromedial medula/bulbo rostral ventromedial
s.c. – subcutâneo
SDS – *Sodium dodecyl sulfate*/Dodecil sulfato de sódio
SS – *Symptom severity*/severidade de sintoma
TBS – *tris buffered saline*/salina tamponada com Tris
TBS/T – *tris buffered saline/Tween 20*/salina tamponada com Tris/Tween 20
tDCS – *Transcranial direct-current stimulation*/estimulação transcraniana por corrente contínua
TMS – *Transcranial magnetic stimulation*/estimulação magnética transcraniana
TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha*/Fator de Necrose Tumoral Alfa
Tris – trisaminometano
TrkB – *tropomyosine-related kinase B*/quinase relacionada a tropomiosina B
WPI – *Widespread pain index*/índice de dor disseminada

LISTA DE SÍMBOLOS

® – registrado

°C – grau Celsius

µg – micrograma

µl – microlitro

µs – microssegundo

CO₂ – dióxido de carbono

g – força gravitacional

G – gauge

g – grama

Hz – hertz

kg – kilograma

mA – miliampere

mg – miligrama

ml – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

NaCl – cloreto de sódio

nm – nanometro

s – segundo

TM – *trade mark*

V – volt

LISTA DE SIGLAS

CEUA – Comissão de Ética para o Uso de Animais

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

USP – Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Dor	18
1.2 Síndrome Fibromiálgica	18
1.3 Estimulação do córtex motor	21
1.4 Neuroplasticidade	23
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Indução do modelo de Fibromialgia (depleção monoaminérgica)	26
3.3 Implantação de eletrodos cranianos e estimulação elétrica	26
3.4 Monitoramento das alterações sensoriais	27
3.5 Coleta de tecidos	28
3.6 Extração de proteínas	28
3.7 ELISA	28
3.8 Western blot	29
3.9 Análise Estatística	30
3.10 Desenho experimental	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Estabelecimento da dose de reserpina para indução de sensibilidade mecânica em ratos	32
4.2 Efeito da estimulação do córtex motor (aplicação única) sobre a sensibilidade mecânica de ratos submetidos à depleção monoaminérgica	32
4.3 Efeito da estimulação do córtex motor (cinco sessões) sobre a sensibilidade mecânica de ratos submetidos à depleção monoaminérgica	34
4.4 Efeito da estimulação do córtex motor sobre os níveis de proteínas associadas à neuroplasticidade no corno posterior da medula espinal	36
4.5 Efeito da estimulação do córtex motor sobre os níveis de proteínas associadas à neuroplasticidade na PAG	42
4.6 Efeito da estimulação do córtex motor sobre os níveis de proteínas associadas à neuroplasticidade no ACC	48
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS*	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

A sensação dolorosa é desagradável e pode progredir para níveis debilitantes e prejudicar a qualidade de vida e execução das tarefas cotidianas. Fisiologicamente, a dor é desencadeada por estímulos potencialmente lesivos, de diversas modalidades (térmica, mecânica, química), tendo assim, um importante papel na manutenção da integridade do organismo. A função de alerta da dor é também essencial após a ocorrência de lesão tecidual, uma vez que assegura comportamentos de precaução para com a área lesada. Embora funcionais e até mesmo consideradas fisiológicas, as situações acima descrevem dois subtipos de dor, nociceptiva e inflamatória respectivamente, que diferem em características e mecanismos¹.

Diferentemente do que acontece com a dor nociceptiva e inflamatória, em que a sensação termina com o cessar do estímulo ou resolução do processo inflamatório, lesões no sistema nervoso, podem levar a um quadro de manutenção das sensações dolorosas, mesmo após a cura da lesão inicial. Desta maneira a dor passa a ter caráter patológico, sendo por isso chamada dor neuropática².

Curiosamente, existem ainda, situações em que as sensações dolorosas originam-se e são mantidas sem que sejam detectados sinais de processo inflamatório, ou tampouco qualquer tipo de lesão ao sistema nervoso. Estas condições vêm sendo chamadas de dor disfuncional, exatamente por ser postulado que a gênese da dor seja a disfunção do sistema nociceptivo^{3; 4}. Algumas síndromes dolorosas disfuncionais possuem etiologia conhecida, como a eritromelalgia, causada por uma mutação com ganho-de-função no canal de sódio Nav1.7, Porém a maioria não tem etiologia definida, como é o caso da síndrome de dor complexa regional-tipo 1, da síndrome do intestino irritável e da fibromialgia⁴.

1.2 Síndrome Fibromiálgica

A fibromialgia é uma síndrome complexa caracterizada principalmente pela presença de dor crônica disseminada. Além da ocorrência de dor espontânea, a percepção dolorosa se apresenta de forma desproporcionalmente exagerada frente a estímulos nódicos (hiperalgesia) e também pode ser evocada por diferentes modalidades de estímulos inócuos (alodinia). Além de dor, pode haver outras alterações sensoriais como sensação de inchaço, formigamento e perda de

sensibilidade, bem como sintomas não-sensoriais, como fadiga, sono não reparador, rigidez articular, além de comorbidades psiquiátricas como ansiedade e depressão.

Por ser desconhecida a etiologia e não haver marcadores ou qualquer tipo de exame laboratorial, o diagnóstico da fibromialgia é essencialmente clínico. Atualmente o critério diagnóstico estabelecido pelo Colégio Americano de Reumatologia em 2010, consiste na avaliação dos sintomas através de duas escalas, uma para averiguar a distribuição dos sintomas dolorosos (índice de dor disseminada – WPI) e outra para a intensidade dos sintomas dolorosos e não-dolorosos (escala de severidade de sintomas – SS). E para que seja satisfeito o diagnóstico, é preciso uma combinação de valores obtidos nas duas escalas ($WPI \geq 7$ e $SS \geq 5$ ou $WPI 3-6$ e $SS \geq 9$), que os sintomas avaliados por estas ferramentas estejam presentes a pelo menos 3 meses na mesma intensidade e que não haja doença que os justifique⁵.

Apesar das variações em função do critério diagnóstico utilizado e dos status socioeconômicos da população avaliada, as estimativas dão conta de uma prevalência média de 2,7% na população geral, numa proporção 3:1 de mulheres para homens⁶. Além disso, com idade média de 50 anos, estes pacientes compõem a população economicamente ativa. Isto, aliado ao alto grau de debilidade e baixo índice de qualidade de vida reportado pelos pacientes⁷, está associado à queda de produtividade, afastamentos e perda de emprego⁸, o que inevitavelmente implica em um problema de saúde-pública.

Com relação à patogênese da fibromialgia, a ausência de lesão ou processo inflamatório detectável somado à complexa sintomatologia, apontam para alterações no funcionamento de estruturas do sistema nervoso central. Em suporte a essa hipótese, estudos clínicos mostram alterações nos níveis de vários neurotransmissores no fluido cérebro-espinhal de pacientes fibromiálgicos, como aumento de Substância P⁹, Met-enkefalina¹⁰, glutamato, fator de crescimento do nervo (NGF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)¹¹, e diminuição de somatostatina, fator neurotrófico derivado da glia (GDNF)¹² e dos metabólitos de noradrenalina, dopamina e serotonina¹³. A diminuição no *turnover* dos neurotransmissores monoaminérgicos tem uma implicação direta na sinalização nociceptiva, uma vez que importantes regiões do sistema de controle descendente (bulbo rostral ventromedial (RVM) e *locus ceruleus* (LC)) sinalizam através desses transmissores (serotonina e noradrenalina, respectivamente). Adicionalmente, outra

evidência que sugere o envolvimento da disfunção dos sistemas monoaminérgicos com a neurobiologia da fibromialgia é a associação entre a ocorrência de polimorfismos no gene da enzima catecol O-metiltransferase (COMT) (responsável pelo metabolismo de monoaminas) e a severidade dos sintomas nos pacientes fibromiálgicos^{14; 15; 16}. Porém, este mecanismo parece ser apenas mais um na constelação de alterações observadas no sistema nervoso de pacientes fibromiálgicos. Por exemplo, estudos utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET) demonstraram uma desregulação no sistema opioide endógeno, como resultado da diminuição na disponibilidade de receptores μ opioide (MOR)^{17; 18}. Esses resultados se alinham com o nível elevado de opióides endógenos encontrados no líquido cérebro-espinhal dos pacientes, de modo que tal aumento crônico no tônus opioide pode levar à dessensibilização e infra-regulação dos receptores. Tais resultados também corroboram o fato de fármacos opióides serem ineficazes no tratamento da fibromialgia. Reforçando ainda mais o componente central na neurobiologia da fibromialgia, estudos de neuroimagem por ressonância magnética em pacientes fibromiálgicos mostram um aumento da conectividade entre áreas envolvidas com processamento da informação dolorosa como amígdala, córtex cingulado anterior (ACC), ínsula e substância cinzenta periaquedutal (PAG)^{19; 20}. Outros trabalhos mostram através de ressonância funcional, que a ativação de tais áreas é exacerbada em pacientes fibromiálgicos quando submetidos a um estímulo doloroso^{21; 22}.

Aliados a estas evidências, na tarefa de melhor entender os mecanismos fisiopatológicos da fibromialgia, modelos animais têm sido sugeridos²³. Tentando exatamente reproduzir um achado clínico, a diminuição dos neurotransmissores monoaminérgicos, Nagakura demonstrou que tal depleção, farmacologicamente induzida pela administração de reserpina, desencadeia redução dos limiares de sensibilidade, alterações comportamentais associadas à depressão, além de reponsividade terapêutica similar à observada na prática clínica²⁴.

Embora tenha havido algum progresso no entendimento de alguns mecanismos associados a sua patogênese, o tratamento farmacológico da fibromialgia é baseado em inibidores de recaptação de serotonina/noradrenalina (duloxetine e minalciprana), anticonvulsivantes (pregabalina) e antidepressivos tricíclicos (amitriptilina), sendo que apenas os três primeiros possuem utilização aprovada e apenas em alguns países. E

ainda, a eficácia desses medicamentos é muito baixo, com apenas a minoria dos pacientes apresentado alívio significativo dos sintomas²⁵. Uma opção que emerge para o tratamento destes pacientes refratários à terapêutica farmacológica é o uso de técnicas neuromodulatórias principalmente tendo o córtex motor como alvo.

1.3 Estimulação do córtex motor

A estimulação do córtex motor (ECM) como tratamento da dor neuropática é um procedimento recente, sendo primeiramente demonstrado por Tsubokawa no início dos anos 90. Neste trabalho seminal, foi demonstrado que a estimulação elétrica do córtex motor produzia melhor controle da dor do que a estimulação do córtex somatossensorial e até mesmo a estimulação do tálamo²⁶. Desde então, a estimulação do córtex motor tem sido utilizada no tratamento da dor neuropática de diversas etiologias e que se apresentam refratárias ao tratamento farmacológico²⁷. Do mesmo modo, o córtex motor vem sendo abordado como alvo de técnicas não-invasivas como a estimulação magnética transcraniana (TMS) e a estimulação transcutânea por corrente contínua (tDCS). Através dessas duas técnicas, a estimulação do córtex motor tem mostrado resultados satisfatórios e promissores no tratamento da fibromialgia^{28; 29}.

Embora seja demonstrado que aproximadamente 80% dos pacientes inicialmente responsivos à estimulação epidural continuam a se beneficiar de efeitos significativos, uma parcela considerável dos pacientes (por volta de 40%) não respondem satisfatoriamente à estimulação epidural ou por TMS^{30; 31; 32}. Felizmente, a responsividade ao TMS é um bom preditivo de resposta à estimulação invasiva³³, e por conseguinte, uma forma de selecionar bons-respondedores e evitar o fracasso de um procedimento cirúrgico complexo.

Para que a estimulação do córtex motor alcance resultados melhores e para um número maior de pacientes, é fundamental que se compreenda os mecanismos por trás dos efeitos. Uma característica importante da estimulação do córtex motor diz respeito à intensidade do estímulo. Independente da técnica utilizada, epidural ou TMS, a estimulação é administrada em intensidades inferiores ao limiar de resposta motora. Tais estímulos sublimiáres são mais propensos a ativar os axônios do que propriamente os corpos celulares³⁴. Deste modo, impulsos ortodrômicos e antidrômicos são conduzidos a áreas distantes do córtex motor³⁵. Tal característica

fornece o substrato neurobiológico para dois aspectos do efeito terapêutico da ECM, a ativação de áreas envolvidas no processamento da informação dolorosa e os efeitos de longo prazo associados à neuroplasticidade.

Com relação à ativação de áreas relacionadas ao processamento da informação dolorosa, também chamada de matriz da dor, estudos de neuroimagem demonstraram que a ECM desencadeia aumento no fluxo sanguíneo no ACC e na ínsula anterior (associados aos aspectos afetivos da dor), no tálamo lateral e medial (importante relé da circuitaria nociceptiva) e no tronco cerebral (origem das projeções descendentes)^{36; 37}. Similarmente, trabalhos realizados em animais experimentais demonstram o mesmo perfil de atividade neuronal (imunoreatividade à proteína Fos), sendo aumento de expressão no ACC e PAG, e diminuição da expressão no tálamo ventral/lateral e no corno posterior da medula espinal³⁸. Reforçando o papel da ativação do circuito descendente no efeito da ECM, a administração do antagonista opióide naloxona, sistemicamente³⁹ ou microinjetado na PAG⁴⁰, bem como a inibição farmacológica do RVM⁴¹, que recebe projeções da PAG, revertem o efeito antinociceptivo da ECM. Adicionalmente, corroborando a hipótese de que, além da ativação do circuito descendente, a ECM também opere através da ativação de circuitos envolvidos nos aspectos emocionais da dor⁴², um estudo de ressonância magnética funcional em animais demonstrou que o efeito antinociceptivo da ECM está associado à diminuição na atividade do córtex pré-frontal⁴³. Ainda, outro trabalho utilizando uma abordagem comportamental com a aplicação de condicionamento operante demonstrou que a ECM apresenta efeito sobre dor espontânea em ratos com lesão medular, efeito este, que envolve mecanismos de recompensa⁴⁴.

Apesar destas evidências, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares, principalmente os associados ao efeito tardio da ECM. Nesse sentido, algumas possibilidades emergem das características dos impulsos elétricos gerados pela ECM, como citada anteriormente. Por exemplo, enquanto os impulsos ortodrômicos podem influenciar a plasticidade sináptica aumentando a liberação de neurotransmissores do terminal pré-sináptico, os impulsos antidrômicos podem levar a liberação de transmissores retrógrados ou modificar a disponibilidade e a cinética de receptores pós-sinápticos, e assim modular fenômenos plásticos. Porém a maneira como tais fenômenos neuroplásticos tomam lugar na estimulação do córtex motor, continuam pouco compreendidos.

1.4 Neuroplasticidade

A plasticidade sináptica nada mais é senão o remodelamento morfológico e funcional da sinapse culminando com a alteração de sua atividade, seja no sentido do aumento ou da diminuição da sua eficiência. O aumento da eficiência sináptica, por exemplo, pode ser desencadeado por diversos tipos de eventos celulares e que impactam em seu decurso e duração, dentre os quais, a ativação de proteínas de sinalização, a incorporação de receptores e canais à membrana e a ativação da transcrição gênica⁴⁵. Cada vez mais moléculas são associadas à neuroplasticidade na dor patológica, porém algumas já figuram como clássicos, dado o volume de dados que reforçam suas importâncias. Por exemplo os receptores glutamatérgicos N-metil D-Aspartato (NMDA) e ácido α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), proteínas quinases como proteína quinase C (PKC) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK), fatores de transcrição como proteína de ligação ao elemento responsivo do AMP cíclico (CREB) e fatores neurotróficos e seus receptores como BDNF e quinase relacionada à tropomiosina B (TrkB)⁴⁶.

Os fatores neurotróficos ou neurotrofinas, além de essenciais para a diferenciação e sobrevivência de linhagens neuronais durante o desenvolvimento, têm mostrado possuir papel chave na plasticidade sináptica em diversas regiões do sistema nervoso⁴⁷. O BDNF ao ligar-se à isoforma completa de seu receptor específico TrkB desencadeia uma atividade catalítica de autofosforilação, seguida pela fosforilação de sítios de ligação à enzimas, como a fosfolipase C- γ , e a ativação sequencial de cascatas de sinalização que culminam, por exemplo, com a ativação da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CamKII) que leva à incorporação de vesículas contendo receptores à membrana plasmática ou a ativação de ERK-1/2 que transloca ao núcleo e por sua vez ativa o fator de transcrição CREB⁴⁸;
49; 50.

Não obstante a sua elaborada cascata de sinalização, BDNF merece ainda um lugar de destaque devido à complexidade de mecanismos que controla e a que está submetido, como a regulação epigenética da expressão via microRNA⁵¹, secreção de forma não-processada e madura⁵², que interagem com diferentes receptores⁵³, liberação por dendritos e sinalização autócrina⁵⁴, além de localização pré- e pós-sináptica de pelo menos 3 isoformas distintas de seu receptor^{55; 56}.

A demonstração de que BDNF é essencial para a plasticidade sináptica hipocampal e a formação e consolidação da memória levou a um grande interesse por esta família de proteínas e suas funções⁵⁷. Isto desencadeou a descoberta de novos fatores neurotróficos, como a famílias dos fatores neurotróficos gliais⁵⁸ e nos últimos anos, de novos integrantes como o fator neurotrófico dopaminérgico cerebral (CDNF) e fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálico (MANF)⁵⁹. Apesar de não serem conhecidos os seus receptores, sabe-se que estas neurotrofinas desempenham função protetora de neurônios dopaminérgicos em modelos animais de lesão induzida por 6-hidroxi-dopamina e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP)^{60; 61}, provavelmente através do mecanismo de proteção ao estresse do retículo endoplasmático⁶².

Além da plasticidade funcional decorrente da interação entre os elementos moleculares citados, as células gliais perfazem junto aos neurônios os elementos celulares que estabelecem a plasticidade estrutural. Embora amplamente estabelecido o papel do astrócitos e da micróglia nas situações patológicas como a dor neuropática^{63; 64}, vem sendo demonstrado que ambas células gliais também desempenham importante papel na neuroplasticidade de condições fisiológicas, como a seleção e eliminação de sinapses em processos cognitivos e de memória^{65; 66}.

Tendo em vista que fenômenos neuroplásticos estão associados ao efeito terapêutico da estimulação do córtex motor, e que a fisiopatologia da síndrome fibromiálgica também esteja associada a tais fenômenos, é essencial entender de que forma se estabelecem as alterações moleculares e celulares subjacentes à doença e à terapia, e de que maneira elas interagem para culminar na resolução ou melhora dos sintomas.

2 OBJETIVOS

Neste projeto foi avaliado o efeito antinociceptivo da estimulação elétrica do córtex motor de ratos submetidos a um modelo de fibromialgia, bem como os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito. Para tanto, os objetivos específicos foram:

1. Reproduzir o modelo de fibromialgia através da depleção monoaminérgica induzida pela administração sub-crônica de reserpina.
2. Avaliar as alterações sensoriais induzidas no modelo por meio da avaliação de sensibilidade mecânica cutânea (von Frey) e sensibilidade mecânica profunda (*PinPrick*).
3. Avaliar o efeito antinociceptivo da estimulação elétrica do córtex motor, por meio de um protocolo de estimulação única e um protocolo de estimulação múltipla.
4. Avaliar os níveis das neurotrofinas BDNF, GDNF e CDNF, da citocina TNF- α , das proteínas gliais GFAP (astrócitos) e OX-42 (micróglia), do receptor TrkB (formas fosforilada e total) e das proteínas AKT e ERK-1/2 (formas fosforilada e total) em extratos obtidos do córtex cingulado anterior, substância cinzenta periaquedutal e corno posterior da medula espinal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados em ratos machos da linhagem Sprague-Dawley, pesando entre 160 e 170 g ao início dos procedimentos experimentais, oriundos do biotério do departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram transferidos para o laboratório e mantidos em salas de experimentação com temperatura (23 ± 2 °C) e umidade (80%) controladas, ciclo claro:escuro de 12:12 horas e livre acesso à ração e água. Os animais foram manipulados de acordo com os princípios preconizados no guia para o uso ético de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção⁶⁷ e aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP (#081/2012). Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ ou por deslocamento cervical sob anestesia (quando houve coleta de tecidos), e descartados segundo os procedimentos de rotina do laboratório.

3.2 Indução do modelo de Fibromialgia (depleção monoaminérgica)

Após aproximadamente 5 dias de aclimação à sala de experimentação, os animais receberam injeção subcutânea (s.c.) de reserpina na dose de 2 mg/kg por 3 dias consecutivos²⁴. Animais do grupo controle receberam veículo (0,5% ácido acético) no mesmo volume (1 ml/kg). Em função do incômodo causado pelo veículo de diluição, os animais foram anestesiados com isoflurano (4% para indução e 2% para manutenção da anestesia, respectivamente).

3.3 Implantação de eletrodos cranianos e estimulação elétrica

Os animais tiveram os eletrodos implantados 3 dias antes da indução do modelo de fibromialgia. Para isso, foram anestesiados com uma combinação de cetamina (82 mg/kg), xilazina (7,5 mg/kg) e acepromazina (2,75 mg/kg), além de anestesia local do escalpo com lidocaína 2% (100 µl). Com o crânio fixado no estereotáxico, dois pequenos orifícios foram trepanados sobre o córtex motor direito e dois eletrodos foram implantados sobre a área representativa da pata (-1,0 mm rostral e 1,5 mm caudal ao bregma, e 1,5 mm lateral à linha média) mantendo-se a integridade da dura mater³⁹. Parafusos foram posicionados 4 a 6 mm de distância dos eletrodos e serviram de ancoragem para a resina acrílica usada na fixação dos eletrodos e conectores. Ao

término da cirurgia os animais receberam uma dose de anti-inflamatório (meloxicam 1 mg/kg, s.c.) e de antibiótico (amoxicilina 100 mg/kg, s.c.), e foram mantidos em recuperação pós-cirúrgica por 3 dias.

Para a estimulação elétrica do córtex motor, os animais foram conectados por cabos ao estimulador (Test Stimulator 3625, Medtronic®) e receberam 15 minutos de estimulação. Os parâmetros configurados foram amplitude de 1 V, frequência de 60 Hz e duração de pulso de 210 μ s⁶⁸. Os animais controle (Sham) tiveram apenas os cabos conectados, sem qualquer tipo de estimulação elétrica.

3.4 Monitoramento das alterações sensoriais

Sensibilidade mecânica profunda: Foi utilizado o teste de *PinPrick*, aplicado à pata traseira, como descrito por Tal e Bennett⁶⁹. Com os animais confinados em caixas acrílicas, sobre uma tela de metal, uma agulha 23G sem bisel foi aplicada perpendicularmente à superfície plantar. As respostas comportamentais foram cronometradas e classificadas de acordo com a seguinte escala: 0 = sem resposta; 1 = sacudida, chacoalhada ou batida rápida (menos de 1 s); 2 = batida ou chacoalhada repetida, ou guarda por até 3 s; 3 = batida, chacoalhada, guarda por mais de 3 s ou lambida; 4 = batida, chacoalhada, guarda e lambida por mais de 3 s; 5 = anteriores com vocalização⁷⁰.

Sensibilidade mecânica cutânea: Foi determinada para a pata posterior através da aplicação de filamentos de von Frey na superfície plantar, segundo método descrito por Chaplan⁷¹. Neste teste, foram usados 9 filamentos (3.22, 3.61, 3.84, 4.08, 4.31, 4.56, 4.93, 5.18, 5.46), sendo que o teste se inicia com a aplicação do filamento intermediário. Quando o animal responde ao estímulo aplicado, passa-se ao filamento de menor calibre, e quando não responde, ao de maior calibre. Ao obter-se uma sequência de resposta negativa seguida de resposta positiva inicia-se a contagem de 6 respostas que servem como parte do cálculo do limiar. O limiar foi calculado através da fórmula $10^{[X_f + K \cdot \delta]}$, onde X_f é o valor do último filamento aplicado, K é o valor referente à sequência das 6 respostas registradas e δ é a média das diferenças (em log) dos filamentos utilizados (0.28 para a sequência utilizada).

3.5 Coleta de tecidos

Ao término das medidas comportamentais, os animais foram sedados com isoflurano e eutanasiados através de deslocamento cervical. A cabeça foi cortada e mantida no gelo enquanto a medula espinal era extraída. Esta foi retirada do canal espinal através de extrusão hidráulica com salina, e dissecada sob microscópio cirúrgico para obtenção do quadrante dorsal esquerdo (compreendendo o corno posterior) da região da intumescência lombar. O encéfalo foi cuidadosamente removido do crânio e posicionado em uma matriz de corte mantida resfriada. Com auxílio de um atlas de encéfalo de rato, o encéfalo foi seccionado em fatias de 2 mm de espessura, posicionadas em uma superfície resfriada e *punchs* de 2 mm de diâmetro foram obtidos das regiões compreendendo a PAG e o ACC. Os tecidos coletados foram acondicionados em microtubos e mantidos a -80 °C até o processamento.

3.6 Extração de proteínas

Para a extração de proteínas, os tecidos foram homogenizados em tampão de lise resfriado, com o auxílio de um pistilo plástico acoplado a um motor manual (Kontes®). O tampão de lise era composto por 137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8.0, 1% Igepal, 10% glicerol e 0.25% de deoxicolato de sódio, suplementado com inibidores de protease e fosfatase (cOmplete™ ULTRA e PhoSTOP™, ROCHE). Os homogenatos foram incubados em gelo, sob agitação, por 10 minutos, seguidos por centrifugação a 10000 x *g* por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e armazenados até a realização dos ensaios de ELISA e western blot, com exceção de uma alíquota que foi utilizada para a quantificação das proteínas totais. Estas foram determinadas através de um ensaio compatível com detergentes (DC™ Protein Assay, Bio-Rad®) e utilizando albumina bovina de alta pureza como padrão.

3.7 ELISA

Os fatores neurotróficos BDNF e GDNF foram quantificados utilizando-se kits E_{MAX}® ImmunoAssay (Promega®). Os ensaios foram executados de acordo com os protocolos estipulados pelo fabricante. Com o intuito de medir apenas as formas maduras livres de ambos fatores neurotróficos, a etapa de acidificação das amostras

foi omitida. As amostras foram diluídas de acordo com os tecidos analisados, sendo ACC e PAG (1:7) e medula espinal (1:8) e avaliadas em duplicata. De acordo com o protocolo, as absorbâncias foram medidas em 450 nm em um leitor de microplacas (Sinergy™ 2, BioTek®) e as concentrações das amostras determinadas pela regressão linear da curva padrão. Então, os níveis de BDNF e GDNF foram normalizados pela concentração proteica total, previamente obtidas, de cada respectiva amostra.

3.8 Western blot

De acordo com a concentração proteica em cada amostra, o volume adequado para 30 µg de proteína foi acrescido ao mesmo volume de tampão Laemmli 2 X, suplementado com 2-mercaptoetanol (710 mM). As amostras foram então homogenizadas e aquecidas a 95 °C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida consistindo em camada de concentração a 4%, seguido do gel de separação em gradiente de 5 a 15%. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-glicina-SDS, por aproximadamente 150 minutos a 100 V (constante). Ao término da corrida, foi realizada a transferência para membranas de nitrocelulose através do método semi-seco. Para tal, foi utilizado o kit Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini (Bio-Rad®) e o sistema Turbo Transfer configurado em 15 minutos, 25 V e 1,3 A (constante). A eficiência da transferência foi monitorada pela coloração da membrana (PonceauS) e do gel (Bio-Safe™). Após a inspeção da coloração com PonceuS, as membranas foram lavadas com água ultrapura e TBS, para remoção do corante, e em seguida incubadas em solução de bloqueio (3% albumina em TBS/T) por 1 hora. Após o bloqueio, as membranas foram cortadas em tiras horizontais, de acordo com as faixas de peso molecular de interesse. Estas membranas foram então incubadas com os anticorpos primários (tabela 1), dissolvidos em solução de bloqueio, por aproximadamente 20 horas, a 4 °C, sob agitação constante. Subsequentemente, as membranas foram lavadas em TBS/T por 5 minutos, três vezes, e incubadas com os anticorpos secundários (tabela 2) dissolvidos em solução de bloqueio, por 1 hora à temperatura ambiente e agitação constante. Ao término da incubação as membranas foram lavadas por 2 vezes de 5 minutos em TBS/T e uma lavagem de 5 minutos em TBS. No caso de anticorpos conjugados a peroxidase (HRP), as membranas foram incubadas com substrato quimiofluorescente ECL Plus (Thermo Scientific™ Pierce™)

por 5 minutos. As membranas foram então avaliadas em um fotodocumentador UVITEC (Cambridge) e as intensidades das bandas quantificadas pelo software UVI-1D.

As proteínas de interesse foram normalizadas pelo controle endógeno (β -Actina). Para proteínas fosforiladas, a forma fosforilada foi normalizada pela proteína total. Em ambas situações as intensidades relativas foram então normalizadas à condição controle.

Tabela 1 – Lista de anticorpos primários utilizados

Alvo	Epítipo	Host	Fabricante	# catálogo	Diluição
TrkB	p-Tyr ⁸¹⁷	Coelho	Abcam	ab81288	1:500
TrkB	Total	Camundongo	BD	610102	1:500
OX-42	Total	Camundongo	BD	550299	1:500
AKT	p-Thr ³⁰⁸	Coelho	CellSignaling	2965	1:500
AKT	Total	Camundongo	CellSignaling	2920	1:1000
ERK-1/2	p-Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴	Coelho	CellSignaling	4370	1:500
ERK-1/2	Total	Camundongo	CellSignaling	4696	1:1000
GFAP	Total	Camundongo	Sigma	G3893	1:1000
TNF- α	Total	Coelho	Abcam	ab6671	1:500
CDNF	Total	Coelho	Sigma	PRS4343	1:500
β -Actina	Total	Camundongo	Sigma	A5316	1:5000

Tabela 2 – Lista de anticorpos secundários utilizados.

Alvo	Conjugado	Host	Fabricante	# catálogo	Diluição
IgG de Coelho	Alexa Fluor® 790	Burro	Jackson	711-655-152	1:20000-1:40000
IgG de Camundongo	Alexa Fluor® 790	Burro	Jackson	715-655-150	1:20000-1:40000
IgG de Camundongo	Peroxidase (HRP)	Burro	Jackson	715-035-151	1:40000

3.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m). A análise dos resultados comportamentais foi realizada pela análise de variância de duas vias com medidas repetidas (*Two-way* ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. A análise dos resultados de ELISA e western blot foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn quando os dados não seguirem uma distribuição normal. As análises estatísticas e a confecção dos gráficos foi realizada com o programa GraphPad Prism© (versão 6.01).

3.10 Desenho experimental

A figura 1 ilustra de forma resumida o desenho experimental. Os animais foram recebidos do biotério do ICB e habituados por 5 dias (-12 a -7) na sala de experimentação do laboratório. Então foram realizadas as medidas comportamentais basais, seguidas do procedimento de implantação de eletrodos. Os animais foram mantidos em recuperação pós-cirúrgica por 3 dias (-6 a -2), e posteriormente realizada a indução do modelo de fibromialgia (-2 a 0). Para o protocolo de sessão única de ECM, os animais foram submetidos às avaliações comportamentais Pré- e Pós-estimulação, sendo então eutanasiados para a coleta de tecidos (7). Para o protocolo de sessões múltiplas de ECM, os animais foram submetidos à uma avaliação comportamental Pré-estimulação e então iniciou-se sessões diárias de ECM por 5 dias (3 a 7). No último dia de aplicação de ECM, foram realizadas medidas comportamentais Pré- e Pós-estimulação, seguido da eutanásia para a extração dos tecidos (7).

Figura 1 – Desenho experimental e linha do tempo.

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento da dose de reserpina para indução de sensibilidade mecânica em ratos

A administração de reserpina induziu diminuição no limiar de sensibilidade mecânica. Como demonstrado na figura 2, o efeito foi induzido apenas pela dose de 2 mg/kg. Também é observado que o efeito foi significativo até o sétimo dia, retornando a níveis similares ao basal no décimo quarto dia. Assim, a análise de variância revelou um efeito significativo do tempo ($F_{2,36}=6,60$; $p=0,0036$) e da dose ($F_{2,36}=3,41$; $p=0,0440$). Devido à ausência de medida no primeiro dia para o grupo tratado com 1 mg/kg de reserpina, os dados dos demais grupos para este tempo foram incluídos no gráfico mas omitidos da análise estatística. No entanto, uma análise separada realizada com os grupos veículo e reserpina 2 mg/kg demonstrou um efeito significativo da reserpina no primeiro dia quando comparado ao grupo veículo, bem como com sua medida basal.

Figura 2 – Decurso temporal do limiar de sensibilidade mecânica cutânea avaliado com monofilamentos de von Frey em ratos tratados com reserpina ou veículo. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. ** $p<0,01$ comparado ao grupo Veículo, ### $p<0,001$ comparado à medida Basal. Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey.

4.2 Efeito da estimulação do córtex motor (aplicação única) sobre a sensibilidade mecânica de ratos submetidos à depleção monoaminérgica

Na figura 3, as barras apresentadas nos gráficos se referem a uma medida basal (Bas), uma medida antes da estimulação (Pré) e uma medida após a estimulação (Pós), sendo Pré e Pós, no 7º dia após a indução da depleção monoaminérgica.

O gráfico A mostra o efeito da ECM sobre a sensibilidade mecânica cutânea de animais submetidos à depleção monoaminérgica (Reserpina), bem como animais do grupo Veículo. De acordo com o resultado da análise *two-way* ANOVA ($F_{3,87}=7,919$, $p<0,0001$) e o pós-teste de Tukey, é possível observar que a administração de reserpina provoca uma diminuição significativa no limiar de sensibilidade (medida Pré), tanto comparado à sua medida basal quanto comparado ao grupo Veículo+Sham. Também é demonstrado o efeito da estimulação ($F_{2,87}=18,10$, $p<0,0001$), sendo possível observar o reestabelecimento do limiar no grupo Reserpina+ECM quando comparado à medida pré-estimulação. Diferentemente, nos animais tratados com reserpina e submetidos à falsa estimulação (Reserpina+Sham), o limiar continuou significativamente reduzido quando comparados à sua medida basal e ao grupo Veículo+Sham.

Nos gráficos B e C estão apresentados os efeitos da ECM sobre a sensibilidade mecânica profunda de animais submetidos à depleção monoaminérgica (Reserpina) e do grupo Veículo, aferida por dois parâmetros do teste de *PinPrick*, score nociceptivo e tempo gasto em respostas nocifensivas (B e C, respectivamente). Como observado, os resultados foram idênticos em ambos os parâmetros, sendo que a administração de reserpina provocou aumento significativo da sensibilidade mecânica, quando comparado às medidas basais, bem como quando comparados ao grupo administrado com veículo (Score Nociceptivo: $F_{3,81}=29,90$ $p<0,0001$; Tempo gasto: $F_{3,81}=6,819$ $p=0,0004$). Do mesmo modo, a *two-way* ANOVA também demonstrou o efeito da estimulação em ambos os parâmetros (Score Nociceptivo: $F_{2,81}=28,43$ $p<0,0001$; Tempo gasto: $F_{2,81}=5,034$ $p=0,0087$), e assim como observado para sensibilidade cutânea, a estimulação foi capaz de restaurar a sensibilidade do grupo Reserpina+ECM a níveis próximos ao basal e ao grupo Veículo+Sham. Como observado também, a falsa estimulação é incapaz de alterar o aumento de sensibilidade induzida pela depleção monoaminérgica (Reserpina+Sham), permanecendo significativa quando comparada à sua medida basal e ao grupo Veículo+Sham.

Figura 3 – Efeito da aplicação de uma única sessão de estimulação elétrica do córtex motor (ECM) sobre a sensibilidade mecânica de ratos submetidos à depleção monoaminérgica (Reserpina) e Veículo.

O gráfico A mostra o limiar de sensibilidade mecânica avaliado através de monofilamentos de von Frey. Os gráficos B e C mostram dois parâmetros obtidos pelo teste de *PinPrick*. Sham designa o procedimento de falsa estimulação. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. Two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos indicados.

4.3 Efeito da estimulação do córtex motor (cinco sessões) sobre a sensibilidade mecânica de ratos submetidos à depleção monoaminérgica

Na figura 4, as barras apresentadas no gráfico se referem a uma medida basal (Bas), uma medida no 3º dia, antes do início da primeira sessão de estimulação, e duas medidas no 7º dia, uma antes da quinta sessão de estimulação (Pré) e outra após a referida sessão de estimulação (Pós).

No gráfico A está demonstrado o efeito de sessões múltiplas de ECM sobre a sensibilidade mecânica cutânea de animais submetidos à depleção monoaminérgica

(Reserpina), bem como animais do grupo Veículo. A estatística *two-way* ANOVA mostrou um efeito tanto da administração de reserpina ($F_{3,124}=53,02$ $p<0,0001$), bem como da aplicação do protocolo de estimulação ($F_{3,124}=39,51$ $p<0,0001$). De acordo com o pós-teste de Tukey, foi possível notar que a administração de reserpina provocou uma diminuição significativa no limiar de sensibilidade já no 3º dia, tanto comparada à sua medida basal, quanto comparado ao grupo Veículo+Sham. E que esta diminuição permaneceu significativa no 7º dia (medida Pré), com relação à medida basal e ao grupo Veículo+Sham. No grupo tratado com reserpina e submetido à falsa estimulação (Reserpina+Sham) o limiar permaneceu significativamente reduzido (medida Pós). Também foi possível observar que este protocolo de estimulação reestabeleceu o limiar do grupo Reserpina+ECM, sendo a medida aferida após a última sessão (Pós) similar aos valores basais e do grupo Veículo+Sham. Notou-se também que sob este protocolo, a estimulação foi capaz de aumentar o limiar mecânico de animais tratados com veículo, sendo significativo quando comparado à medida Basal e ao grupo Veículo+Sham.

Nos gráficos B e C estão apresentados os efeitos das sessões múltiplas de ECM sobre a sensibilidade mecânica profunda em animais submetidos à depleção monoaminérgica (Reserpina) e do grupo Veículo, aferida pelos parâmetros do teste de *PinPrick*, score nociceptivo e tempo gasto em respostas nocifensivas (B e C, respectivamente). Como observado nas figuras, os resultados obtidos demonstraram o mesmo perfil em ambos os parâmetros. Conforme os resultados obtidos pela *two-way* ANOVA, tanto a administração de reserpina, como a aplicação do protocolo de estimulação tem efeito significativo sobre o score nociceptivo (respectivamente, $F_{3,124}=48,56$ $p<0,0001$ e $F_{3,124}=11,63$ $p<0,0001$) e sobre o tempo gasto em comportamento nocifensivo (respectivamente, $F_{3,124}=12,25$ $p<0,0001$ e $F_{3,124}=3,350$ $p=0,0213$). E de acordo com o pós-teste de Tukey, a administração de reserpina provocou aumento significativo da sensibilidade mecânica do 3º ao 7º dia, tanto quando comparado à medida basal, como quando comparado ao grupo Veículo. Assim como observado para a sensibilidade mecânica cutânea, o protocolo de múltiplas sessões de estimulação foi capaz de restaurar a sensibilidade do grupo Reserpina+ECM, alcançando níveis similares ao basal e ao grupo Veículo+Sham com a aplicação da última sessão. A falsa estimulação foi incapaz de alterar o aumento da sensibilidade induzida pela reserpina (Reserpina+Sham), com os valores

permanecendo significativamente maiores (medida Pós) quando comparada à sua medida basal e ao grupo Veículo+Sham. No entanto, diferentemente do que foi observado para a sensibilidade mecânica cutânea, a aplicação deste protocolo de estimulação não resultou em efeito antinociceptivo no grupo Veículo.

Figura 4 – Efeito da aplicação de múltiplas sessões de estimulação do córtex motor (ECM) sobre a sensibilidade mecânica de ratos submetidos a depleção monoaminérgica (Reserpina) e do grupo Veículo.

No gráfico A está representado o limiar de sensibilidade mecânica obtido através de monofilamentos de von Frey. Os gráficos B e C mostram dois parâmetros obtidos com o teste de *PinPrick*. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. Two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos indicados.

4.4 Efeito da estimulação do córtex motor sobre os níveis de proteínas associadas à neuroplasticidade no corno posterior da medula espinal

A figura 5 mostra o efeito da aplicação de sessões única e múltiplas de ECM sobre os níveis de BDNF, GDNF, CDNF e TNF- α . De acordo com a estatística ANOVA, os níveis de BDNF foram alterados significativamente ($F_{3,16}=13,69$ $p=0,0001$)

no modelo de fibromialgia e nos grupos Veículo ($F_{2,12}=8,804$ $p=0.0044$). Segundo o pós-teste de Tukey, notou-se que, na medula espinal, a depleção monoaminérgica (Reserpina+Sham) induziu uma diminuição significativa nos níveis de BDNF quando comparado ao grupo Veículo+Sham. Os resultados demonstram que a ECM foi capaz de restaurar os níveis de BDNF nos grupos tratados com reserpina apenas quando aplicada com o protocolo de sessões múltiplas (Reserpina+ECM(5X) vs. Reserpina+Sham). Além disso, os níveis de BDNF alcançados com múltiplas sessões de ECM foi significativamente maior quando comparado ao grupo submetido à uma única sessão (Reserpina+ECM(5X) vs. Reserpina+ECM). Interessantemente, em animais tratados com veículo, o protocolo de sessões múltiplas de ECM também foi capaz de induzir aumento significativo nos níveis de BDNF quando comparado ao grupo que recebeu apenas uma sessão (Veículo+ECM(5X) vs. Veículo+ECM).

Os níveis de GDNF, CDFN e TNF- α não sofreram alteração significativa em decorrência da estimulação nos animais submetidos ao modelo de fibromialgia ($F_{3,16}=0,7836$ $p=0,5203$; $F_{3,16}=0,4081$ $p=0,7493$; $F_{3,16}=0,2562$ $p=0,8558$). Também não houve efeito dos protocolos de estimulação em animais dos grupos Veículo (Kruskal-Wallis=0,560 $p=0,7825$; $F_{2,12}=0,0184$ $p=0,9817$; $F_{2,12}=0,1353$ $p=0,8747$).

Figura 5 – Níveis de BDNF, GDNF, CDNF e TNF- α no corno posterior da medula espinal de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A, B, C e D representam respectivamente BDNF, GDNF, CDNF e TNF- α . As imagens acima dos gráficos C e D correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado aos grupos indicados. (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

A figura 6 ilustra o efeito dos protocolos de estimulação sobre os níveis de GFAP e OX-42 no modelo de fibromialgia e em grupos Veículo. Segundo a ANOVA, não houve diferença estatística nos níveis de GFAP e OX-42 no modelo de fibromialgia ($F_{3,16}=0,2839$ $p=0,8363$; $F_{3,16}=0,5129$ $p=0,6792$), tampouco nos grupos Veículo (Kruskal-Wallis=1,820 $p=0,4441$; $F_{2,12}=0,6265$ $p=0,5511$).

Figura 6 – Níveis de GFAP e OX-42 no corno posterior da medula espinal de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A e B representam respectivamente GFAP e OX-42. As imagens acima dos gráficos correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. (ANOVA).

A figura 7 mostra o efeito da estimulação sobre o receptor TrkB, sendo os níveis da isoforma completa (A) e truncada (C), a fosforilação da forma completa (B) e a proporção entre as isoformas (D). Segundo a ANOVA, os protocolos de estimulação não tem efeito sobre os níveis de ambas isoformas no modelo de fibromialgia (TrkB: $F_{3,16}=0,0998$ $p=0,9590$; TrkB.T1: $F_{3,16}=0,6967$ $p=0,5675$) ou nos grupos Veículo (TrkB: $F_{2,12}=0,1295$ $p=0,8798$; TrkB.T1: $F_{2,12}=0,4020$ $p=0,6777$). Do mesmo modo, a ANOVA não mostrou diferença estatística para a proporção entre as isoformas completa e truncada no modelo de fibromialgia e nos grupos Veículo ($F_{3,16}=0,3896$ $p=0,7621$; $F_{2,12}=0,2413$ $p=0,7893$). No entanto, a ANOVA revelou o efeito da estimulação sobre a fosforilação da isoforma completa do receptor TrkB no modelo de fibromialgia ($F_{3,16}=3,547$ $p=0,0385$) mas não nos grupos Veículo ($F_{2,12}=1,818$ $p=0,2043$). O teste de Tukey revelou que a aplicação de múltiplas sessões de estimulação no modelo de fibromialgia (Reserpina+ECM(5X)) reduz significativamente a fosforilação do receptor TrkB quando comparado aos grupos Veículo+Sham e Reserpina+Sham.

Figura 7 – Níveis das isoformas completa e truncada do receptor TrkB, fosforilação da isoforma completa e proporção entre as isoformas no corno posterior da medula espinal de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A e B representam os níveis das isoformas completa e truncada, respectivamente. O gráfico C representa a fosforilação da isoforma completa do receptor TrkB e o gráfico D representa a proporção entre os níveis das duas isoformas. As imagens acima dos gráficos correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos indicados. (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

Na figura 8, os gráficos representam a fosforilação e os níveis de AKT e ERK-1/2, sendo: (A) AKT total, (B) fosforilação de AKT, (C) ERK-1/2 total e (D) fosforilação de ERK-1/2. Segundo a estatística ANOVA, não houve alteração nos níveis das

proteínas AKT ($F_{3,16}=0,3067$ $p=0,8202$) e ERK-1/2 ($F_{3,16}=0,9552$ $p=0,4376$), tampouco na fosforilação das mesmas (pAKT: $F_{3,16}=0,4399$ $p=0,7276$ e pERK-1/2: $F_{3,16}=2,225$ $p=0,1248$) em decorrência da aplicação de ECM no modelo de fibromialgia.

Do mesmo modo a estatística ANOVA não detectou diferença significativa nos níveis totais ou na fosforilação de AKT ($F_{2,12}=0,2413$ $p=0,7894$ e $F_{2,12}=0,0594$ $p=0,9425$, respectivamente total e fosforilada), bem como nos níveis totais e fosforilação de ERK-1/2 ($F_{2,12}=0,1120$ $p=0,8950$ e $F_{2,12}=1,631$ $p=0,2363$, total e fosforilada, respectivamente) em decorrência da aplicação de ECM em animais dos grupos Veículo.

Figura 8 – Fosforilação e níveis de AKT e ERK-1/2 no corno posterior da medula espinal de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A e C representam os níveis de AKT e ERK-1/2, respectivamente. Os gráficos B e D representam respectivamente a fosforilação de AKT e ERK-1/2. As imagens acima dos gráficos correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. (ANOVA).

4.5 Efeito da estimulação do córtex motor sobre os níveis de proteínas associadas à neuroplasticidade na PAG

A figura 9 mostra o efeito da aplicação de ECM sobre os níveis de BDNF (A), GDNF (B), CDNF (C) e TNF- α (D) na PAG. A análise estatística conduzida nos grupos Veículo e no modelo de fibromialgia demonstrou que os níveis de BDNF não se alteraram pela aplicação dos protocolos de ECM ($F_{2,9}=0,0070$ $p=0,9930$; $F_{3,12}=1,438$

$p=0,2804$). No entanto, enquanto os níveis de GDNF não sofreram alteração significativa no modelo de fibromialgia ($F_{3,16}=0,3049$ $p=0,8214$), a aplicação de ECM causou uma alteração significativa nos grupos Veículo ($F_{2,12}=3,993$ $p=0,0469$). De acordo com o teste de Tukey, os níveis de GDNF são significativamente maiores no grupo submetido a uma única aplicação de ECM, quando comparados ao grupo Veículo+Sham, bem como quando comparados ao grupo tratado com cinco sessões de ECM. Não houve diferença significativa entre os níveis de GDNF do grupo Sham e do grupo submetido à cinco sessões de ECM.

Com relação aos níveis do fator neurotrófico CDNF, representados no gráfico C, a estatística ANOVA não demonstrou efeito significativo dos protocolos de ECM no modelo de fibromialgia ($F_{3,16}=1,071$ $p=0,3893$) ou nos grupos Veículo ($F_{2,12}=2,568$ $p=0,1179$).

Similarmente, os níveis de TNF- α não foram alterados pela aplicação de ECM nos grupos do modelo de fibromialgia ($F_{3,16}=0,5620$ $p=0,6478$), nem nos grupos Veículo ($F_{2,12}=0,3637$ $p=0,7025$).

Figura 9 – Níveis de BDNF, GDNF, CDNF e TNF- α na substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A, B, C e D representam respectivamente BDNF, GDNF, CDNF e TNF- α . As imagens acima dos gráficos C e D correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

A figura 10 demonstra o efeito dos protocolos de ECM sobre os níveis das proteínas gliais GFAP (A) e OX-42 (B) na PAG. De acordo com a estatística ANOVA, não houve diferença significativa nos níveis de GFAP no modelo de fibromialgia ($F_{3,16}=1,796$ $p=0,1886$). No entanto, houve alteração significativa causada pela ECM nos grupos Veículo ($F_{2,12}=6,068$ $p=0,0151$), sendo, de acordo com o teste de Tukey, uma diminuição nos níveis de GFAP no grupo tratado com cinco sessões de ECM quando comparado ao grupo Sham.

Com relação aos níveis de OX-42, não houve alteração significativa no modelo de fibromialgia ($F_{3,16}=0,6517$ $p=0,5934$) ou nos grupos Veículo ($F_{2,12}=1,972$ $p=0,1818$).

Figura 10 – Níveis de GFAP e OX-42 na substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A e B representam respectivamente GFAP e OX-42. As imagens acima dos gráficos correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos indicados. (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

A figura 11 mostra o efeito dos protocolos de ECM sobre os níveis das isoformas completa (A) e truncada (C) do receptor TrkB, além da fosforilação da isoforma completa (B) e da proporção entre as isoformas (D). Nos grupos Veículo, os protocolos de ECM não alteraram os níveis das isoformas do receptor TrkB (TrkB: $F_{2,12}=0,3467$ $p=0,7139$; TrkB.T1: $F_{2,12}=1,880$ $p=0,1949$), nem da proporção entre elas ($F_{2,12}=0,7964$ $p=0,4734$) ou da fosforilação da isoforma completa ($F_{2,12}=0,2747$ $p=0,7645$). Do mesmo modo, de acordo com a estatística ANOVA, não houve alteração induzida pelos protocolos de ECM no modelo de fibromialgia, tanto na fosforilação da isoforma completa ($F_{3,16}=0,4824$ $p=0,6991$), como nos níveis das isoformas (TrkB: $F_{3,16}=0,1938$ $p=0,8991$; TrkB.T1: $F_{3,16}=1,406$ $p=0,2776$) ou na proporção entre elas ($F_{3,16}=1,386$ $p=0,2832$).

Figura 11 – Níveis das isoformas completa e truncada do receptor TrkB, fosforilação da isoforma completa e proporção entre as isoformas na substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A e C representam os níveis das isoformas completa e truncada, respectivamente. O gráfico B representa a fosforilação da isoforma completa do receptor TrkB e o gráfico D representa a proporção entre os níveis das duas isoformas. As imagens acima dos gráficos correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. (ANOVA).

Na figura 12 estão representados os níveis das proteínas AKT (A) e ERK-1/2 (C) e das formas fosforiladas pAKT (B) e pERK-1/2 (D). De acordo a estatística ANOVA, a aplicação dos protocolos de ECM no modelo de fibromialgia não alterou os níveis de AKT ($F_{3,16}=0,4275$ $p=0,7360$) ou ERK-1/2 ($F_{3,16}=0,6853$ $p=0,5740$), tampouco seus status de fosforilação (pAKT: $F_{3,16}=1,606$ $p=0,2274$; pERK-1/2: $F_{3,16}=1,477$ $p=0,2584$).

Já nos grupos Veículo, enquanto os níveis totais de AKT ($F_{2,12}=1,104$ $p=0,3629$) e ERK-1/2 ($F_{2,12}=2,145$ $p=0,1597$) não foram alterados pela aplicação de ECM, alterações significativas foram detectadas na fosforilação de AKT ($F_{2,12}=2,983$ $p=0,0888$) e na fosforilação de ERK-1/2 ($F_{2,12}=5,005$ $p=0,0263$). Em ambos os casos, o teste de Tukey revelou uma diminuição significativa no grupo submetido a cinco aplicações de ECM quando comparado ao grupo Sham.

Figura 12 – Fosforilação e níveis de AKT e ERK-1/2 na substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A e C representam os níveis de AKT e ERK-1/2, respectivamente. Os gráficos B e D representam respectivamente a fosforilação de AKT e ERK-1/2. As imagens acima dos gráficos correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. * $p<0,05$ quando comparado aos grupos indicados. (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

4.6 Efeito da estimulação do córtex motor sobre os níveis de proteínas associadas à neuroplasticidade no ACC

Na figura 13 estão representados os níveis das neurotrofinas BDNF, GDNF e CDNF, bem como da citocina TNF- α . Como ilustrado no gráfico A, houve uma alteração significativa nos níveis de BDNF no modelo de fibromialgia (Kruskal-Wallis=8,554 $p=0,0358$), mas sem alteração nos grupos Veículo ($F_{2,9}=2,065$ $p=0,1696$). De acordo como o pós-teste de Dunn, a aplicação de uma única sessão de ECM proporcionou um aumento significativo nos níveis de BDNF quando comparados ao grupo Veículo+Sham. Já as neurotrofinas GDNF e CDNF não foram alteradas pela aplicação dos protocolos de ECM tanto no modelo de fibromialgia (GDNF: $F_{3,16}=1,418$ $p=0,2742$ e CDNF: $F_{3,16}=0,5392$ $p=0,6622$) quanto nos grupos Veículo (GDNF: $F_{2,12}=0,5230$ $p=0,6057$ e CDNF: $F_{2,12}=1,196$ $p=0,3361$).

Do mesmo modo, os níveis da citocina TNF- α (D) não foram alterados pelos protocolos de ECM no modelo de fibromialgia ($F_{3,16}=0,2345$ $p=0,8710$) e nos grupos Veículo ($F_{2,12}=0,5085$ $p=0,6138$).

Figura 13 – Níveis de BDNF, GDNF, CDFN e TNF-α no córtex cingulado anterior (ACC) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A, B, C e D representam respectivamente BDNF, GDNF, CDFN e TNF-α. As imagens acima dos gráficos C e D correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos indicados. (ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

Na figura 14, os gráficos A e B representam respectivamente os níveis das proteínas glias GFAP e OX-42. De acordo com a estatística ANOVA, a aplicação de ECM induziu alterações significativas nos níveis de GFAP apenas no modelo de fibromialgia ($F_{3,15}=3,296$ $p=0,0496$), mas não nos grupos Veículo ($F_{2,12}=1,738$ $p=0,2173$). Tal diferença no modelo de fibromialgia, de acordo com o pós-teste de Tukey, corresponde a um aumento nos níveis de GFAP no grupo Reserpina+Sham, quando comparado ao grupo Veículo+Sham.

Com relação ao níveis da proteína OX-42, a estatística ANOVA não demonstrou diferença significativa no modelo de fibromialgia ($F_{3,16}=0,0954$ $p=0,9614$) ou nos grupos Veículo ($F_{2,12}=0,1193$ $p=0,8886$).

Figura 14 – Níveis de GFAP e OX-42 no córtex cingulado anterior (ACC) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A e B representam respectivamente GFAP e OX-42. As imagens acima dos gráficos correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. * $p<0,05$ quando comparado aos grupos indicados. (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

Na figura 15 estão representados os níveis do receptor TrkB em suas isoformas completa e truncada (gráficos A e C respectivamente), além da fosforilação da isoforma completa do receptor TrkB (B) e da proporção entre as duas isoformas (D). De acordo com a estatística ANOVA, não houve alteração na fosforilação ou na quantidade total da isoforma completa do receptor TrkB no modelo de fibromialgia (pTrkB: $F_{3,16}=0,8266$ $p=0,4983$ e TrkB: $F_{3,16}=0,4112$ $p=0,7472$), bem como nos grupos Veículo (pTrkB: $F_{2,12}=0,5250$ $p=0,6046$ e TrkB: $F_{2,12}=2,158$ $p=0,1583$). Similarmente, não houve diferença significativa nos níveis de isoforma truncada (Kruskal-Wallis=1,126 $p=0,7709$) e da proporção entre as isoformas (Kruskal-Wallis=0,9886 $p=0,8040$) no modelo de fibromialgia, tampouco nos grupos Veículo (TrkB.T1: $F_{2,12}=0,5972$ $p=0,5659$ e TrkB.T1/TrkB: $F_{2,12}=0,3036$ $p=0,7436$).

Figura 15 – Níveis das isoformas completa e truncada do receptor TrkB, fosforilação da isoforma completa e proporção entre as isoformas no córtex cingulado anterior (ACC) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A e C representam os níveis das isoformas completa e truncada, respectivamente. O gráfico B representa a fosforilação da isoforma completa do receptor TrkB e o gráfico D representa a proporção entre os níveis das duas isoformas. As imagens acima dos gráficos correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. (ANOVA ou Kruskal-Wallis).

Na figura 16, os gráficos representam sequencialmente os níveis e a fosforilação das proteínas AKT e ERK-1/2. Como observado nos gráficos A e C, os níveis de AKT e ERK-1/2, não sofreram alteração significativa no modelo de fibromialgia (AKT: $F_{3,16}=1,646$ $p=0,2184$ e ERK-1/2: $F_{3,16}=0,4032$ $p=0,7527$), nem nos grupos Veículo

(AKT: $F_{2,12}=1,422$ $p=0,2792$ e ERK-1/2: $F_{2,12}=0,5774$ $p=0,5762$). Porém, enquanto a fosforilação das proteínas não tiveram alteração significativa no modelo de fibromialgia (pAKT: $F_{3,16}=1,689$ $p=0,2094$ e pERK-1/2: $F_{3,16}=1,151$ $p=0,3590$), houve uma alteração significativa na fosforilação de AKT nos grupos Veículo ($F_{2,12}=3,867$ $p=0,0506$). De acordo com o pós-teste de Tukey, a aplicação de cinco sessões de ECM resultou em uma diminuição significativa quando comparado ao grupo Sham. No entanto, nos grupos controle, a fosforilação de ERK-1/2 não seguiu o mesmo padrão de AKT, permanecendo inalterada ($F_{2,12}=2,553$ $p=0,1192$).

Figura 16 – Fosforilação e níveis de AKT e ERK-1/2 no córtex cingulado anterior (ACC) de ratos submetidos ao modelo de fibromialgia e tratados com estimulação elétrica do córtex motor (ECM).

Os gráficos A e C representam os níveis de AKT e ERK-1/2, respectivamente. Os gráficos B e D representam respectivamente a fosforilação de AKT e ERK-1/2. As imagens acima dos gráficos correspondem a blots representativos. Os dados representam a média $\pm$ e.p.m. (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

5 DISCUSSÃO

O conjunto de resultados apresentados demonstram que a depleção farmacológica dos neurotransmissores monoaminérgicos induzem aumento na sensibilidade mecânica, que é revertida pela estimulação do córtex motor tanto através de um efeito agudo como também via efeito cumulativo. Interessantemente, o efeito cumulativo também ocorreu em animais “normais”, tratados com veículo. Adicionalmente, os dados demonstram que as alterações moleculares ocorrem de formas diferentes em regiões envolvidas no processamento da informação dolorosa.

A estimulação do córtex motor demonstrou que a aplicação de uma única sessão foi capaz de reverter a hipersensibilidade induzida no modelo de fibromialgia, como observado pelo retorno do limiar mecânico aos níveis basais, bem como dos parâmetros nocifensivos obtidos no teste de *PinPrick*. O mesmo perfil de efeito antinociceptivo foi obtido sob o protocolo de múltiplas sessões, em que a mesma sessão diária foi administrada por 5 dias consecutivos. Neste caso, além de restaurar a sensibilidade dos animais submetidos ao modelo de fibromialgia, a estimulação promoveu um aumento significativo no limiar mecânico de animais que receberam apenas veículo. O efeito analgésico de ECM no modelo de fibromialgia se assemelha aos resultados obtidos anteriormente por nosso grupo, em que a aplicação de uma única sessão também foi capaz de restaurar os limiares nociceptivos em animais submetidos à constrição crônica do nervo isquiático, um modelo de neuropatia periférica³⁸. Da mesma forma, os resultados são similares aos relatados por Lucas *et al*⁷², em que a aplicação de ECM, com parâmetros semelhantes aos aqui utilizados, foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica e mecânica induzidas por lesões eletrolíticas da medula espinal, um modelo de neuropatia central. O presente trabalho é o primeiro a mostrar a eficácia da estimulação do córtex motor na reversão da hipersensibilidade mecânica em um modelo animal de fibromialgia.

No que tange o efeito observado no grupo Veículo, trabalhos prévios haviam demonstrado que a aplicação de uma sessão de ECM era capaz de aumentar o limiar de sensibilidade mecânico em animais intactos, ou seja, alterando o limiar fisiológico^{39; 73}. Porém, nos dados aqui apresentados, uma sessão de estimulação foi insuficiente para promover alterações de sensibilidade no grupo Veículo. Provavelmente, tais diferenças observadas para o efeito agudo de ECM em condições fisiológicas sejam decorrentes das diferentes metodologias empregadas na avaliação da sensibilidade.

No entanto, o fato da alteração da sensibilidade em animais “normais” ter sido detectada apenas com o protocolo de múltiplas sessões sugere que estejam ocorrendo fenômenos neuroplásticos decorrentes da estimulação e que estes se acumulam ao longo das sessões para então se estabelecer neste efeito tardio.

De fato, ocorre neuroplasticidade em decorrência do uso de técnicas neuromodulatórias, pois trabalhos conduzidos em humanos dão conta da manutenção do efeito analgésico por longos períodos após a aplicação^{29; 74}, além de ser demonstrada a indução de alterações na excitabilidade cortical⁷⁵. Assim, provavelmente, esta neuroplasticidade seja o principal mecanismo por trás dos efeitos analgésicos da estimulação do córtex motor na dor crônica de diversas etiologias. E muito embora a abordagem invasiva de estimulação não seja aplicada para o tratamento da fibromialgia, nossos dados corroboram os bons resultados encontrados com a aplicação de TMS e tDCS no córtex motor^{28; 29; 74; 76}.

Para entender com mais detalhes a neuroplasticidade associada ao efeito da estimulação do córtex motor na fisiopatologia da dor, três regiões do sistema nervoso foram selecionadas com base em suas importâncias em diferentes aspectos do processamento da informação dolorosa: o corno posterior da medula espinal, a substância cinzenta periaquedutal e o córtex cingulado anterior. Nestas regiões, foram avaliadas proteínas envolvidas em algum aspecto da neuroplasticidade, sendo elas as neurotrofinas BDNF, GDNF e CDNF, a citocina TNF- α , os marcadores gliais GFAP e OX-42, o receptor TrkB e as proteínas de sinalização AKT e ERK-1/2.

No corno posterior da medula espinal, onde se estabelece a primeira sinapse do sistema somatossensorial e ocorre a primeira modulação da informação nociceptiva, as evidências mostram que BDNF está envolvido com a gênese e manutenção da dor. Seus níveis encontram-se elevados em modelos de dor neuropática, e a administração intratecal em animais normais provoca hiperalgesia térmica e alodinia mecânica^{77; 78}. No entanto, nossos resultados mostram que ao contrário do que ocorre nestes modelos de dor crônica, os níveis de BDNF foram significativamente reduzidos no modelo de fibromialgia, sugerindo que no contexto de uma disfunção dos circuitos nociceptivos medulares somado à ausência de inflamação ou lesão, a presença de dor está associado a diminuição nos níveis de BDNF. Além disso, ao reestabelecer níveis endógenos de BDNF, os resultados

sugerem que a aplicação de múltiplas sessões de ECM esteja com isso, reestabelecendo o funcionamento normal dos circuitos.

Outra neurotrofina associada à fisiopatologia da dor, GDNF, parece agir na medula espinal, de maneiras diferentes dependendo do contexto. Enquanto a indução de inflamação articular acarreta na diminuição dos níveis de GDNF paralelamente ao desenvolvimento de hiperalgesia⁷⁹, modelos de dor neuropática estão associados ao aumento da expressão do RNAm e da síntese de GDNF⁸⁰. Porém, no modelo de fibromialgia, não houve alteração nos níveis de GDNF, tampouco em decorrência da ECM, sugerindo que na medula espinal, GDNF não desempenhe papel relevante na dor associada à disfunção de sistemas monoaminérgicos, bem como no efeito antinociceptivo da ECM.

Apesar de bem estabelecido como um fator neuroprotetor de neurônios dopaminérgicos, os mecanismos exatos envolvidos no efeito de GDNF são pouco compreendidos⁸¹. Evidências recentes apontam para mecanismos de resposta ao estresse do retículo endoplasmático⁸². Ainda, não há nenhum relato acerca do papel deste fator neurotrófico na neurobiologia da dor, ou mesmo da sua detecção na medula espinal. De acordo com os resultados obtidos, a depleção monoaminérgica não alterou os níveis basais de GDNF, tampouco houve alteração em decorrência da ECM, sugerindo que esta neurotrofina não desempenhe função neste modelo de dor e no efeito terapêutico da ECM.

A citocina TNF- α é conhecida por seu caráter pró-inflamatório, e por estar aumentada em modelos de dor inflamatória e neuropática^{83; 84}, mas também vem sendo demonstrada sua importância na função sináptica em condições fisiológicas^{85; 86}. Em nossos resultados, não foram observadas alterações nos níveis de TNF- α na medula espinal, tanto em decorrência da depleção monoaminérgica, quanto da aplicação dos protocolos de ECM. Apesar de não possuir componente lesivo ou inflamatório, já foi demonstrada alteração de TNF- α neste modelo de fibromialgia, porém em outras regiões do sistema nervoso (hipocampo e córtex) e na fase inicial da depleção monoaminérgica (2 dias após a última injeção de reserpina)⁸⁷. Logo, TNF- α não está associado com a manutenção da dor neste modelo, ou com a neuroplasticidade associada ao protocolo múltiplo de ECM.

Astrócitos e micróglia desempenham papel importante na dor de origem inflamatória e neuropática^{88; 89}, inclusive através da síntese e liberação de substâncias

como TNF- α e BDNF⁹⁰. Através da avaliação dos níveis das proteínas gliais específicas, GFAP e OX-42, é possível inferir o estado de ativação destas células. Os resultados mostraram que não houve alteração nos níveis de GFAP ou OX-42 na medula espinal, em decorrência da indução do modelo de fibromialgia ou como efeito da ECM. Isto sugere que ao contrário de outros modelos de dor crônica, ambas as células gliais não desempenham papel relevante na dor induzida pela disfunção dos sistemas monoaminérgicos, e que provavelmente não foram a origem do BDNF induzido pela ECM.

Diferentemente da literatura que demonstra o aumento da fosforilação do receptor TrkB na medula espinal paralelamente à indução da dor em diversos modelos experimentais^{91; 92}, nossos resultados mostram que tal relação não é estabelecida no modelo de fibromialgia. Porém, a fosforilação do receptor TrkB mostrou-se diminuída no grupo submetido à depleção monoaminérgica após o protocolo de sessões múltiplas de ECM, sugerindo o envolvimento deste mecanismo no efeito antinociceptivo observado. Ainda se tratando da fosforilação de TrkB, seria esperado a detecção de um aumento na sua fosforilação refletindo o aumento de BDNF encontrado, uma vez que esta seria a sequência de eventos mais comum⁵³.

Tal discrepância poderia ser explicada por um aumento paralelo nos níveis da isoforma truncada e sua proporção com a isoforma completa⁵⁶. Porém, nossos resultados não demonstraram tais alterações relacionadas à isoforma truncada, mas, por ser diferencialmente sintetizado em neurônios e células gliais, e a técnica de western blot não discernir a origem celular das proteínas, há a possibilidade de um aumento da isoforma truncada em astrócitos concomitante a uma diminuição em neurônios. E assim, apesar de não contar com efeito dominante negativo do receptor truncado no neurônio, seu aumento nos astrócitos causaria um efeito sequestrante de BDNF⁵⁶, com consequente diminuição na atividade do receptor.

A literatura demonstra uma clara associação entre o aumento da fosforilação das proteínas AKT e ERK-1/2 e a geração de hipersensibilidade dolorosa^{92; 93; 94; 95}. No entanto, não foi detectada alteração na fosforilação de ambas no modelo de fibromialgia. Uma vez que estas proteínas podem ser recrutadas por vias de sinalização redundantes do receptor TrkB⁹⁶, bem como de outros receptores⁹⁷, é provável que a modulação compensatória de tais vias seja responsável pela

inalteração em suas fosforilações simultaneamente à diminuição observada no receptor TrkB após a aplicação do protocolo múltiplo de ECM.

A substância cinzenta periaquedutal é uma região de indiscutível importância na neurobiologia da dor, recebendo projeções ascendentes do corno posterior da medula espinal, mas também descendentes de várias regiões corticais como o ACC. A PAG compõem junto com outras estruturas mesencefálicas e pontinas (RVM, LC) o sistema descendente de controle da dor (inibitório e facilitatório)^{98; 99}.

As evidências indicam que parte do efeito analgésico da ECM é dependente da ativação dos mecanismos descendentes inibitórios⁴⁰, e que em pacientes fibromiálgicos, o recrutamento de tais mecanismos é deficiente ou ineficaz¹⁹. Além do indubitável efeito analgésico imediato decorrente da ativação deste circuito, também vem sendo demonstrado a ocorrência de neuroplasticidade nestas estruturas⁹⁸. Nesse sentido, foi demonstrado que a hipersensibilidade decorrente da inflamação periférica, é dependente de mecanismos facilitatórios desencadeados pela aumento dos níveis de BDNF na PAG e sua liberação no RVM¹⁰⁰. Tal mecanismo facilitatório parece não ser um elemento comum na fisiopatologia da dor, pois no modelo de fibromialgia, o estabelecimento de hipersensibilidade não encontra paralelo nos níveis de BDNF encontrados na PAG. Ainda, o efeito da ECM também não está relacionado a esse mecanismo facilitatório dependente de BDNF, uma vez que os protocolos de ECM não acarretaram alteração nos níveis de BDNF.

Apesar de estudos apontarem para a neurotrofina GDNF como portadora de efeitos pronociceptivos e antinociceptivos dependendo do contexto avaliado, não está claro o papel que esta desempenha na PAG¹⁰¹. Uma evidência aponta para um mecanismo antinociceptivo mediado pela via descendente noradrenérgica, onde a infusão de GDNF no *locus ceruleus*, reverteu a hipersensibilidade térmica e mecânica em um modelo de dor neuropática¹⁰². Nossos resultados demonstram um aumento nos níveis de GDNF apenas no grupo veículo submetido a uma única sessão de estimulação. Este rápido aumento observado como um efeito agudo da ECM, pode ser resultado do recrutamento de mecanismos de síntese proteica ou do processamento de pro-GDNF em forma madura, e desta maneira sendo a fonte endógena de GDNF para o *locus ceruleus*.

Tal como ocorre para a medula espinal, não há relato na literatura acerca da síntese de CDNF na PAG, tampouco seu papel na processamento da informação

dolorosa nessa região. Nossos resultados, mostram que CDNF está presente na PAG, mas que não está envolvido com a fisiopatologia da dor induzida no modelo de fibromialgia, ou mesmo no efeito antinociceptivo da ECM.

Assim como os resultados obtidos na medula espinal, os níveis da citocina TNF- α da PAG não foram alterados no modelo de fibromialgia, nem em função da aplicação dos protocolos de ECM. Embora a literatura demonstre um aumento duradouro de TNF- α na PAG, em um modelo de dor neuropática¹⁰³, e a contribuição desta citocina para o estabelecimento da hiperalgesia térmica em um modelo de doença de Parkinson¹⁰⁴, a sua modulação na PAG não parece compor um mecanismo compartilhado por diferentes modelos de dor.

Com relação ao envolvimento das células gliais na PAG e sua relação com a nocicepção, foi demonstrado através do mapeamento sistemático do sistema nervoso central que a ativação da micróglia pela lesão do nervo periférico se restringe à medula espinal, não havendo alteração em outras regiões, como a PAG¹⁰⁵. Nossos dados corroboram este achado, uma vez que não houve alteração nos níveis de OX-42 em decorrência da depleção monoaminérgica, nem mesmo da aplicação de ECM. Já no que se refere ao envolvimento astrocitário na PAG com a modulação da dor, foi demonstrado no modelo de contração crônica do nervo isquiático, um aumento nos níveis de GFAP por até 21 dias¹⁰⁶, sugerindo o importante papel desta célula glial no processo de facilitação descendente da dor. No entanto, nossos dados sugerem não haver participação da facilitação desempenhada por astrócitos na PAG no modelo de fibromialgia, uma vez que não foi observada alterações nos níveis de GFAP. Porém, a diminuição significativa de GFAP no grupo veículo tratado com múltiplas sessões de ECM, sugere que o efeito antinociceptivo deste protocolo esteja associado à atrofia astrocitária e o consequente enfraquecimento do circuito facilitatório previamente citado.

No que se refere ao receptor TrkB, as evidências apontam sua presença na PAG, sendo inclusive co-expressos em neurônios BDNFérgicos que se projetam para o RVM¹⁰⁷. Somada à essa evidência neuroanatômica, foi demonstrado um aumento na síntese de TrkB na PAG em decorrência de dor inflamatória induzida por CFA¹⁰⁸. Embora estes indícios apontem para um papel de TrkB na neuroplasticidade atividade-dependente, nossos resultados indicam que este mecanismo não está envolvido no modelo de depleção monoaminérgica e no efeito de ECM, uma vez que

não foi observada alteração na síntese das isoformas do receptor ou na sua fosforilação.

O único relato na literatura envolvendo a proteína ERK-1/2 na PAG e nocicepção, mostra uma diminuição da fosforilação sem alteração na sua quantidade total¹⁰⁹. Estes dados, obtidos em um modelo de neuropatia induzida por quimioterápico, diferem dos nossos resultados obtidos com o modelo de fibromialgia, pois não há alteração na fosforilação de ERK-1/2 como consequência da indução deste modelo. Apesar de não haver nenhum dado relacionando nocicepção e AKT na PAG, e por serem proteínas sequencialmente ativadas, seria provável que se encontrasse o mesmo perfil de resposta em ambas, desde que provenientes da mesma célula. De acordo com isso, a diminuição da fosforilação de AKT e ERK-1/2 observada no grupo veículo após a aplicação de sessões múltiplas de ECM, somado ao fato de serem proteínas associadas com mecanismos de potenciação sináptica, sugere que tal efeito de ECM esteja culminando com a depressão sináptica dos circuitos facilitatórios da PAG.

O córtex cingulado anterior é uma importante região da matriz da dor, principalmente no que tange as dimensões afetivo/emocionais. Apesar de estudos já terem demonstrado a existência de neurônios nociceptivos no ACC^{110; 111}, esta é uma área que se destaca pelas conexões com outras porções corticais como a ínsula e o córtex motor, e regiões subcorticais como a amígdala, tálamo e PAG¹¹². O papel do ACC na neurobiologia da dor vem sendo extensivamente estudado e um grande volume de achados experimentais demonstram sua dinâmica neuroplasticidade.

Levando em consideração o envolvimento de BDNF com a neuroplasticidade, é esperado que haja alterações em modelos de dor. De fato, tais alterações já foram reportadas, porém de formas opostas nos contextos inflamatórios e neuropáticos. Enquanto na inflamação induzida por CFA foi encontrado um aumento robusto nos níveis de BDNF concomitantemente ao aumento no número de células imunomarcadas no ACC¹¹³, o inverso ocorreu no modelo de constrição crônica do nervo isquiático, em que houve uma diminuição nos níveis de BDNF¹¹⁴. Ainda, diferentemente destas situações, nossos dados mostram que no modelo de fibromialgia, não houve alteração alguma nos níveis de BDNF. Interessantemente, a aplicação de uma única sessão de ECM levou ao aumento dos níveis de BDNF no grupo reserpina. No entanto, como este efeito de ECM não foi observado no grupo

veículo, é provável que esteja ocorrendo o sinergismo entre mecanismos neuroplásticos decorrentes do modelo e da ECM.

Com relação ao fator neurotrófico GDNF, similarmente ao encontrado em um modelo de dor oncológica¹¹⁵ em que os níveis de GDNF no ACC não se alteram a despeito do desenvolvimento da hipersensibilidade, no modelo de fibromialgia também não houve alteração desta neurotrofina. Adicionalmente, os níveis de GDNF não foram alterados em função da aplicação de ECM, sugerindo não haver também relação com efeito terapêutico observado.

No que diz respeito a outra neurotrofina avaliada neste trabalho, CDNF, semelhantemente às estruturas previamente discutidas, a literatura é escassa, havendo apenas um relato que reporta a presença de CDNF no ACC, mas sem qualquer relação à nocicepção¹¹⁶. Nossos dados corroboram com a presença desta neurotrofina no ACC, porém mostra que a mesma não está envolvida com a hipersensibilidade no modelo de fibromialgia ou com o efeito terapêutico de ECM.

No que se refere à citocina TNF- α , foi demonstrado que esta desempenha papel facilitador na eficácia sináptica, estando seus níveis aumentados no ACC após a indução de dor inflamatória¹¹⁷. Adicionalmente, foi relatado que o aumento dos níveis de TNF- α no ACC está relacionado ao componente afetivo da dor¹¹⁸. No entanto, no modelo de fibromialgia os níveis de TNF- α não foram alterados, indicando que esta citocina não desempenhe papel relevante nesta condição experimental. Do mesmo modo, não sendo importante para o efeito terapêutico da ECM, pois a aplicação destes protocolos não ocasionou alteração nos níveis desta citocina.

As células gliais podem desempenhar importantes papéis relacionados à neuroplasticidade evocada por modelos de dor crônica em estruturas supra-espinais. Embora a micróglia seja ativada na medula espinal após a lesão do nervo periférico, a avaliação sistemática de áreas envolvidas com o processamento da informação dolorosa reportou a ausência de ativação destas células no ACC¹⁰⁵. Ainda, foi demonstrado através de registros eletrofisiológicos, que a inibição farmacológica da micróglia não altera a plasticidade sináptica induzida pelos protocolos experimentais¹¹⁹. Nossos dados mostram que não houve alteração nos níveis de OX-42 no modelo de fibromialgia, neste sentido corroborando que a atividade dessas células no ACC não estão envolvidas na manutenção da dor, e tampouco estão

envolvidas com a neuroplasticidade associada ao efeito terapêutico da ECM, pois os níveis de OX-42 também permaneceram inalterados nesses grupos.

Já com relação aos astrócitos, similarmente ao relatado para modelos de dor inflamatória¹²⁰ e neuropática¹²¹, em que há um aumento nos níveis de GFAP no ACC, observamos um aumento nos níveis desta proteína astrocitária no modelo de fibromialgia. Adicionalmente, observamos em nossos resultados, que a aplicação de ECM foi capaz de impedir o aumento nos níveis de GFAP decorrentes da depleção monoaminérgica, sugerindo que ao contrário da micróglia, no ACC, os astrócitos sejam as células gliais que desempenham um papel fundamental na modulação da dor.

Sabe-se que a sinalização de BDNF através de seu receptor TrkB desempenha papel fundamental no estabelecimento de plasticidade sináptica em diversas regiões corticais e que o ACC está sujeito a tal plasticidade decorrente de modelos de dor crônica. Neste sentido, a literatura mostra que a lesão do nervo não só aumenta os níveis do receptor TrkB no ACC, como também sua ativação, pois o aumento paralelo da subunidade NR2B do receptor NMDA é revertida pelo tratamento com cicliltraxina B, um antagonista do receptor TrkB¹²². Além disso, a microinjeção do antagonista de TrkB no ACC reverte a alodinia térmica fria e inibe o comportamento aversivo relacionado ao aspecto afetivo da dor, evocada pela inflamação periférica¹¹³. No entanto, nossos dados mostram que tanto os níveis de TrkB, quanto sua fosforilação não se alteram no modelo de fibromialgia, ou mesmo como resultado da aplicação de ECM. Frente ao aumento dos níveis de BDNF observado no grupo Reserpina tratado com uma sessão de ECM, era esperado que houvesse aumento na fosforilação do receptor TrkB, porém há a possibilidade de que tal aumento de BDNF não tenha se refletido em aumento de liberação ou mesmo que tenha ocorrido o efeito sequestrante por parte da isoforma truncada, como discutido anteriormente.

Considerando que a proteína ERK-1/2 é um importante elemento de sinalização do receptor TrkB, a ausência de alteração nos níveis de fosforilação de ERK-1/2 no ACC observado nos nossos resultados estão em concordância com a não-ativação do receptor TrkB. No entanto, tal ausência de ativação de ERK-1/2 no ACC difere dos relatos da literatura, que demonstram aumento nos níveis de fosforilação de ERK-1/2 em modelos de dor neuropática orofacial¹²³, pós-incisional¹²⁴, inflamatória¹²⁵ e com o aspecto afetivo da dor¹²⁶. Além disso, também foi demonstrado que a ativação de

ERK-1/2 no ACC está envolvida diretamente com a indução e expressão de dor crônica¹²⁷ através da indução e expressão de potenciação sináptica, mas não com a manutenção deste mecanismo neuroplástico, uma vez que a inibição de ERK-1/2 no ACC foi capaz de impedir a indução de LTP mas não de reverter a LTP já estabelecida¹²⁸.

Interessantemente, nossos resultados mostram que, embora os níveis e a fosforilação de AKT no ACC estejam inalteradas no modelo de fibromialgia, sua fosforilação diminuiu em decorrência do protocolo de múltiplas sessões de ECM no grupo veículo. Apesar de ser uma proteína *downstream* ao receptor TrkB e *upstream* à ERK-1/2, e por conseguinte esperado que acompanhasse o mesmo perfil de ativação de ambas, sabe-se que AKT pode ser ativada pela sinalização de outros receptores, sendo assim um importante elemento no *crosstalk* de diferentes vias de sinalização¹²⁹.

Em vias gerais, os resultados demonstram a capacidade da estimulação do córtex motor em reverter a hipersensibilidade induzida pela depleção monoaminérgica e, dão indícios do complexo processo de neuroplasticidade que ocorre em áreas associadas com o processamento da dor. Embora os resultados mostrem alterações inesperadas e não-lineares em algumas proteínas, eles reforçam a ideia de que deve estar ocorrendo um conjunto muito bem orquestrado de mecanismos de ajuste, uma verdadeira homeostasia/alostasia, que está por trás do claro efeito antinociceptivo da ECM. Como, patologia e tratamento, são tão associadas às alterações e adaptações neuroplásticas, este trabalho começa a pavimentar o caminho para entender de que maneira ocorre a interação entre as plasticidades, e assim, o estabelecimento de uma metaplasticidade.

6 CONCLUSÕES

O modelo de fibromialgia induzido pela depleção monoaminérgica acarretou aumento da sensibilidade mecânica cutânea e profunda em ratos. A estimulação do córtex motor, aplicada através de protocolos de sessão única e de sessões múltiplas foi capaz de reverter a hipersensibilidade induzida pelo modelo de fibromialgia. Tanto a hipersensibilidade desencadeada pelo modelo empregado, como o efeito antinociceptivo da estimulação, encontrou paralelo em alterações moleculares nas regiões avaliadas. No corno posterior da medula espinal, BDNF e TrkB estão associados à hipersensibilidade e ao efeito antinociceptivo de ECM. Na PAG, os astrócitos, GDNF e a ativação de AKT e ERK-1/2 mostraram-se envolvidos apenas no efeito antinociceptivo de ECM. E, no ACC, enquanto a ativação de AKT parece estar envolvida apenas no efeito antinociceptivo da ECM, astrócitos e BDNF estão envolvidos com a hipersensibilidade e o efeito terapêutico de ECM.

REFERÊNCIAS*

- 1 SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1062-1067, Nov 2002. ISSN 1097-6256 (Print)1097-6256.
- 2 ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 429, n. 1-3, p. 23-37, Oct 19 2001. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 3 WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3742-3744, Nov 2010. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci45178> >.
- 4 COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 1-32, 2009. ISSN 0147-006x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135531> >.
- 5 WOLFE, F. et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 62, n. 5, p. 600-610, May 2010. ISSN 2151-464x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/acr.20140> >.
- 6 QUEIROZ, L. P. Worldwide epidemiology of fibromyalgia. **Curr Pain Headache Rep**, v. 17, n. 8, p. 356, Aug 2013. ISSN 1534-3081. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11916-013-0356-5> >.
- 7 VERBUNT, J. A.; PERNOT, D. H.; SMEETS, R. J. Disability and quality of life in patients with fibromyalgia. **Health Qual Life Outcomes**, v. 6, p. 8, 2008. ISSN 1477-7525. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7525-6-8> >.
- 8 SKAER, T. L. Fibromyalgia: disease synopsis, medication cost effectiveness and economic burden. **Pharmacoeconomics**, v. 32, n. 5, p. 457-466, May 2014. ISSN 1170-7690. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s40273-014-0137-y> >.
- 9 RUSSELL, I. J. et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. **Arthritis Rheum**, v. 37, n. 11, p. 1593-1601, Nov 1994. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 10 BARANIUK, J. N. et al. Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 5, p. 48, Dec 09 2004. ISSN 1471-2474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2474-5-48> >.
- 11 SARCHIELLI, P. et al. Increased levels of neurotrophins are not specific for chronic migraine: evidence from primary fibromyalgia syndrome. **J Pain**, v. 8, n. 9, p. 737-745, Sep 2007. ISSN 1526-5900 (Print)1526-5900. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2007.05.002> >.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- 12 SARCHIELLI, P. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor and somatostatin levels in cerebrospinal fluid of patients affected by chronic migraine and fibromyalgia. **Cephalalgia**, v. 26, n. 4, p. 409-415, Apr 2006. ISSN 0333-1024 (Print)0333-1024. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-2982.2005.01048.x> >.
- 13 RUSSELL, I. J. et al. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 35, n. 5, p. 550-556, May 1992. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 14 FERNANDEZ-DE-LAS-PENAS, C. et al. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism influences anxiety, depression, and disability, but not pressure pain sensitivity, in women with fibromyalgia syndrome. **J Pain**, v. 13, n. 11, p. 1068-1074, Nov 2012. ISSN 1526-5900. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2012.08.001> >.
- 15 MARTINEZ-JAUAND, M. et al. Pain sensitivity in fibromyalgia is associated with catechol-O-methyltransferase (COMT) gene. **Eur J Pain**, v. 17, n. 1, p. 16-27, Jan 2013. ISSN 1090-3801. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/j.1532-2149.2012.00153.x> >.
- 16 DESMEULES, J. et al. Central pain sensitization, COMT Val158Met polymorphism, and emotional factors in fibromyalgia. **J Pain**, v. 15, n. 2, p. 129-135, Feb 2014. ISSN 1526-5900. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2013.10.004> >.
- 17 HARRIS, R. E. et al. Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. **J Neurosci**, v. 27, n. 37, p. 10000-10006, Sep 12 2007. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2849-07.2007> >.
- 18 SCHREPF, A. et al. Endogenous opioidergic dysregulation of pain in fibromyalgia: a PET and fMRI study. **Pain**, v. 157, n. 10, p. 2217-2225, Oct 2016. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000633> >.
- 19 TRUINI, A. et al. Abnormal resting state functional connectivity of the periaqueductal grey in patients with fibromyalgia. **Clin Exp Rheumatol**, v. 34, n. 2 Suppl 96, p. S129-133, Mar-Apr 2016. ISSN 0392-856X (Print)0392-856x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 20 ICHESCO, E. et al. Altered fMRI resting-state connectivity in individuals with fibromyalgia on acute pain stimulation. **Eur J Pain**, v. 20, n. 7, p. 1079-1089, Aug 2016. ISSN 1090-3801. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ejp.832> >.
- 21 DIERS, M. et al. Differential central pain processing following repetitive intramuscular proton/prostaglandin E(2) injections in female fibromyalgia patients and healthy controls. **Eur J Pain**, v. 15, n. 7, p. 716-723, Aug 2011.

- ISSN 1090-3801. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpain.2010.12.002> >.
- 22 PUJOL, J. et al. Mapping brain response to pain in fibromyalgia patients using temporal analysis of fMRI. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5224, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005224> >.
 - 23 DESANTANA, J. M.; DA CRUZ, K. M.; SLUKA, K. A. Animal models of fibromyalgia. **Arthritis Res Ther**, v. 15, n. 6, p. 222, 2013. ISSN 1478-6354. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/ar4402> >.
 - 24 NAGAKURA, Y. et al. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. **Pain**, v. 146, n. 1-2, p. 26-33, Nov 2009. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2009.05.024> >.
 - 25 HAUSER, W. et al. Review of pharmacological therapies in fibromyalgia syndrome. **Arthritis Res Ther**, v. 16, n. 1, p. 201, Jan 17 2014. ISSN 1478-6354. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/ar4441> >.
 - 26 TSUBOKAWA, T. et al. Treatment of thalamic pain by chronic motor cortex stimulation. **Pacing Clin Electrophysiol**, v. 14, n. 1, p. 131-134, Jan 1991. ISSN 0147-8389 (Print)0147-8389. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
 - 27 NUTI, C. et al. Motor cortex stimulation for refractory neuropathic pain: four year outcome and predictors of efficacy. **Pain**, v. 118, n. 1-2, p. 43-52, Nov 2005. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214292> >.
 - 28 PASSARD, A. et al. Effects of unilateral repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex on chronic widespread pain in fibromyalgia. **Brain**, v. 130, n. Pt 10, p. 2661-2670, Oct 2007. ISSN 1460-2156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17872930> >.
 - 29 MHALLA, A. et al. Long-term maintenance of the analgesic effects of transcranial magnetic stimulation in fibromyalgia. **Pain**, v. 152, n. 7, p. 1478-1485, Jul 2011. ISSN 1872-6623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21397400> >.
 - 30 FONTAINE, D.; HAMANI, C.; LOZANO, A. Efficacy and safety of motor cortex stimulation for chronic neuropathic pain: critical review of the literature. **J Neurosurg**, v. 110, n. 2, p. 251-256, Feb 2009. ISSN 0022-3085 (Print)0022-3085. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3171/2008.6.17602> >.
 - 31 LIMA, M. C.; FREGNI, F. Motor cortex stimulation for chronic pain: systematic review and meta-analysis of the literature. **Neurology**, v. 70, n. 24, p. 2329-2337, Jun 10 2008. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000314649.38527.93> >.

- 32 LEFAUCHEUR, J. P. et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). **Clin Neurophysiol**, v. 125, n. 11, p. 2150-2206, Nov 2014. ISSN 1388-2457. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinph.2014.05.021> >.
- 33 LEFAUCHEUR, J. P. et al. Predictive value of rTMS in the identification of responders to epidural motor cortex stimulation therapy for pain. **J Pain**, v. 12, n. 10, p. 1102-1111, Oct 2011. ISSN 1526-5900. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2011.05.004> >.
- 34 LEFAUCHEUR, J. P. Cortical neurostimulation for neuropathic pain: state of the art and perspectives. **Pain**, v. 157 Suppl 1, p. S81-89, Feb 2016. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000401> >.
- 35 LEFAUCHEUR, J. P. Neurophysiology of cortical stimulation. **Int Rev Neurobiol**, v. 107, p. 57-85, 2012. ISSN 0074-7742 (Print)0074-7742. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-404706-8.00005-x> >.
- 36 GARCIA-LARREA, L. et al. Electrical stimulation of motor cortex for pain control: a combined PET-scan and electrophysiological study. **Pain**, v. 83, n. 2, p. 259-273, Nov 1999. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 37 PEYRON, R. et al. Motor cortex stimulation in neuropathic pain. Correlations between analgesic effect and hemodynamic changes in the brain. A PET study. **Neuroimage**, v. 34, n. 1, p. 310-321, Jan 01 2007. ISSN 1053-8119 (Print)1053-8119. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.08.037> >.
- 38 PAGANO, R. L. et al. Transdural motor cortex stimulation reverses neuropathic pain in rats: a profile of neuronal activation. **Eur J Pain**, v. 15, n. 3, p. 268.e1-14, Mar 2011. ISSN 1532-2149. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817578> >.
- 39 FONOFF, E. T. et al. Antinociception induced by epidural motor cortex stimulation in naive conscious rats is mediated by the opioid system. **Behav Brain Res**, v. 196, n. 1, p. 63-70, Jan 3 2009. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2008.07.027> >.
- 40 CHIOU, R. J.; CHANG, C. W.; KUO, C. C. Involvement of the periaqueductal gray in the effect of motor cortex stimulation. **Brain Res**, v. 1500, p. 28-35, Mar 15 2013. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.022> >.
- 41 VIISANEN, H.; PERTOVAARA, A. Roles of the rostroventromedial medulla and the spinal 5-HT(1A) receptor in descending antinociception induced by motor cortex stimulation in the neuropathic rat. **Neurosci Lett**, v. 476, n. 3, p. 133-137, Jun 07 2010. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.04.014> >.

- 42 GARCIA-LARREA, L.; PEYRON, R. Motor cortex stimulation for neuropathic pain: From phenomenology to mechanisms. **Neuroimage**, v. 37 Suppl 1, p. S71-79, 2007. ISSN 1053-8119 (Print)1053-8119. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.05.062> >.
- 43 JIANG, L. et al. Motor cortex stimulation suppresses cortical responses to noxious hindpaw stimulation after spinal cord lesion in rats. **Brain Stimul**, v. 7, n. 2, p. 182-189, Mar-Apr 2014. ISSN 1876-4754. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2013.12.013> >.
- 44 DAVOODY, L. et al. Conditioned place preference reveals tonic pain in an animal model of central pain. **J Pain**, v. 12, n. 8, p. 868-874, Aug 2011. ISSN 1526-5900. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2011.01.010> >.
- 45 LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, Sep 2009. ISSN 1528-8447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712899> >.
- 46 LUO, C.; KUNER, T.; KUNER, R. Synaptic plasticity in pathological pain. **Trends Neurosci**, v. 37, n. 6, p. 343-355, Jun 2014. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.04.002> >.
- 47 PARK, H.; POO, M. M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 1, p. 7-23, Jan 2013. ISSN 1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3379> >.
- 48 ERNFORS, P.; BRAMHAM, C. R. The coupling of a trkB tyrosine residue to LTP. **Trends Neurosci**, v. 26, n. 4, p. 171-173, Apr 2003. ISSN 0166-2236 (Print)0166-2236. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-2236\(03\)00064-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-2236(03)00064-x) >.
- 49 NUMAKAWA, T. et al. BDNF function and intracellular signaling in neurons. **Histol Histopathol**, v. 25, n. 2, p. 237-258, Feb 2010. ISSN 0213-3911. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 50 MINICHIELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 12, p. 850-860, Dec 2009. ISSN 1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2738> >.
- 51 CAPUTO, V. et al. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression is regulated by microRNAs miR-26a and miR-26b allele-specific binding. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28656, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028656> >.
- 52 YANG, J. et al. Neuronal release of proBDNF. **Nat Neurosci**, v. 12, n. 2, p. 113-115, Feb 2009. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2244> >.

- 53 REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. In: (Ed.). **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.361, 2006. p.1545-1564. ISBN 0962-8436 (Print)1471-2970 (Electronic).
- 54 HARWARD, S. C. et al. Autocrine BDNF-TrkB signalling within a single dendritic spine. **Nature**, v. 538, n. 7623, p. 99-103, Sep 28 2016. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature19766> >.
- 55 SALIO, C. et al. Ultrastructural evidence for a pre- and postsynaptic localization of full-length trkB receptors in substantia gelatinosa (lamina II) of rat and mouse spinal cord. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 8, p. 1951-1966, Oct 2005. ISSN 0953-816X (Print)0953-816x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04392.x> >.
- 56 FENNER, B. M. Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 23, n. 1-2, p. 15-24, Feb-Apr 2012. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.01.002> >.
- 57 MALCANGIO, M.; LESSMANN, V. A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 3, p. 116-121, Mar 2003. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628355> >.
- 58 AIRAKSINEN, M. S.; SAARMA, M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 5, p. 383-394, May 2002. ISSN 1471-003X (Print)1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn812> >.
- 59 LINDHOLM, P.; SAARMA, M. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. **Dev Neurobiol**, v. 70, n. 5, p. 360-371, Apr 2010. ISSN 1932-8451. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/dneu.20760> >.
- 60 AIRAVAARA, M. et al. CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice. **Cell Transplant**, v. 21, n. 6, p. 1213-1223, 2012. ISSN 0963-6897. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3727/096368911x600948> >.
- 61 LINDHOLM, P. et al. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. **Nature**, v. 448, n. 7149, p. 73-77, Jul 05 2007. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature05957> >.
- 62 PARKASH, V. et al. The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDNF explains why they are bifunctional. **Protein Eng Des Sel**, v. 22, n. 4, p. 233-241, Apr 2009. ISSN 1741-0126. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzn080> >.
- 63 INOUE, K.; TSUDA, M. Microglia and neuropathic pain. **Glia**, v. 57, n. 14, p. 1469-1479, Nov 01 2009. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/glia.20871> >.

- 64 ROMERO-SANDOVAL, A. et al. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. **Brain Res**, v. 1219, p. 116-126, Jul 11 2008. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.05.004> >.
- 65 MORRIS, G. P. et al. Microglia: a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research. **Neurobiol Learn Mem**, v. 105, p. 40-53, Oct 2013. ISSN 1074-7427. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2013.07.002> >.
- 66 CHUNG, W. S.; ALLEN, N. J.; EROGLU, C. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 9, 2015. ISSN 1943-0264 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a020370> >.
- 67 ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, Jun 1983. ISSN 0304-3959 (Print)0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 68 FONOFF, E. T. et al. Functional mapping of the motor cortex of the rat using transdural electrical stimulation. **Behav Brain Res**, v. 202, n. 1, p. 138-141, Aug 24 2009. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.018> >.
- 69 TAL, M.; BENNETT, G. J. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. **Pain**, v. 57, n. 3, p. 375-382, Jun 1994. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7936715> >.
- 70 CODERRE, T. J. et al. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain**, v. 112, n. 1-2, p. 94-105, Nov 2004. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494189> >.
- 71 CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, Jul 1994. ISSN 0165-0270 (Print)0165-0270. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 72 LUCAS, J. M.; JI, Y.; MASRI, R. Motor cortex stimulation reduces hyperalgesia in an animal model of central pain. **Pain**, v. 152, n. 6, p. 1398-1407, Jun 2011. ISSN 1872-6623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21396776> >.
- 73 FRANÇA, N. R. et al. Antinociception induced by motor cortex stimulation: somatotopy of behavioral response and profile of neuronal activation. **Behav Brain Res**, v. 250, p. 211-221, Aug 2013. ISSN 1872-7549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23692698> >.

- 74 FREGNI, F. et al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. **Arthritis Rheum**, v. 54, n. 12, p. 3988-3998, Dec 2006. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17133529> >.
- 75 CASTILLO SAAVEDRA, L.; MENDONCA, M.; FREGNI, F. Role of the primary motor cortex in the maintenance and treatment of pain in fibromyalgia. **Med Hypotheses**, v. 83, n. 3, p. 332-336, Sep 2014. ISSN 1532-2777. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24992875> >.
- 76 VILLAMAR, M. F. et al. Focal modulation of the primary motor cortex in fibromyalgia using 4×1-ring high-definition transcranial direct current stimulation (HD-tDCS): immediate and delayed analgesic effects of cathodal and anodal stimulation. **J Pain**, v. 14, n. 4, p. 371-383, Apr 2013. ISSN 1528-8447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23415877> >.
- 77 YAJIMA, Y. et al. Direct evidence for the involvement of brain-derived neurotrophic factor in the development of a neuropathic pain-like state in mice. **J Neurochem**, v. 93, n. 3, p. 584-594, May 2005. ISSN 0022-3042 (Print)0022-3042. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03045.x> >.
- 78 MILETIC, G.; MILETIC, V. Increases in the concentration of brain derived neurotrophic factor in the lumbar spinal dorsal horn are associated with pain behavior following chronic constriction injury in rats. **Neurosci Lett**, v. 319, n. 3, p. 137-140, Feb 22 2002. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 79 FANG, M. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor contributes to delayed inflammatory hyperalgesia in adjuvant rat pain model. **Neuroscience**, v. 117, n. 3, p. 503-512, 2003. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 80 DONG, Z. Q. et al. Changes of expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptor in dorsal root ganglions and spinal dorsal horn during electroacupuncture treatment in neuropathic pain rats. **Neurosci Lett**, v. 376, n. 2, p. 143-148, Mar 11 2005. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2004.11.044> >.
- 81 LINDAHL, M.; SAARMA, M.; LINDHOLM, P. Unconventional neurotrophic factors CDNF and MANF: Structure, physiological functions and therapeutic potential. **Neurobiol Dis**, Jul 15 2016. ISSN 0969-9961. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.009> >.
- 82 LIU, H.; TANG, X.; GONG, L. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor and cerebral dopamine neurotrophic factor: New endoplasmic reticulum stress response proteins. **Eur J Pharmacol**, v. 750, p. 118-122, Mar 05 2015. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.016> >.

- 83 XU, J. T. et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat. **Pain**, v. 123, n. 3, p. 306-321, Aug 2006. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2006.03.011> >.
- 84 WOOLF, C. J. et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. **Br J Pharmacol**, v. 121, n. 3, p. 417-424, Jun 1997. ISSN 0007-1188 (Print)0007-1188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0701148> >.
- 85 BEATTIE, E. C. et al. Control of synaptic strength by glial TNFalpha. **Science**, v. 295, n. 5563, p. 2282-2285, Mar 22 2002. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1067859> >.
- 86 SANTELLO, M.; VOLTERRA, A. TNFalpha in synaptic function: switching gears. **Trends Neurosci**, v. 35, n. 10, p. 638-647, Oct 2012. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.001> >.
- 87 ARORA, V. et al. Curcumin ameliorates reserpine-induced pain-depression dyad: behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 10, p. 1570-1581, Nov 2011. ISSN 0306-4530. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.04.012> >.
- 88 IKEDA, H.; KIRITOSHI, T.; MURASE, K. Contribution of microglia and astrocytes to the central sensitization, inflammatory and neuropathic pain in the juvenile rat. **Mol Pain**, v. 8, p. 43, Jun 15 2012. ISSN 1744-8069. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-8-43> >.
- 89 BEGGS, S.; SALTER, M. W. Microglia-neuronal signalling in neuropathic pain hypersensitivity 2.0. **Curr Opin Neurobiol**, v. 20, n. 4, p. 474-480, Aug 2010. ISSN 0959-4388. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.005> >.
- 90 TAVES, S. et al. Microglia and Spinal Cord Synaptic Plasticity in Persistent Pain. **Neural Plast**, v. 2013, 2013. ISSN 2090-5904 (Print)1687-5443 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2013/753656> >.
- 91 PEZET, S. et al. Noxious stimulation induces Trk receptor and downstream ERK phosphorylation in spinal dorsal horn. **Mol Cell Neurosci**, v. 21, n. 4, p. 684-695, Dec 2002. ISSN 1044-7431 (Print)1044-7431. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 92 XU, Q. et al. Spinal phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling cascades in inflammation-induced hyperalgesia. **J Neurosci**, v. 31, n. 6, p. 2113-2124, Feb 09 2011. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2139-10.2011> >.

- 93 SHI, T. J. et al. Expression of p-Akt in sensory neurons and spinal cord after peripheral nerve injury. **Neurosignals**, v. 17, n. 3, p. 203-212, 2009. ISSN 1424-862x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000210400> >.
- 94 SHI, X. D. et al. Activation of spinal ERK1/2 contributes to mechanical allodynia in a rat model of postoperative pain. **Mol Med Rep**, v. 7, n. 5, p. 1661-1665, May 2013. ISSN 1791-2997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2013.1347> >.
- 95 OBATA, K.; NOGUCHI, K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. **Life Sci**, v. 74, n. 21, p. 2643-2653, Apr 09 2004. ISSN 0024-3205 (Print)0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2004.01.007> >.
- 96 STEPHENS, R. M. et al. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-γ1 to mediate NGF responses. **Neuron**, v. 12, n. 3, p. 691-705, 1994/03/01 1994. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://www.cell.com/article/0896627394902232/abstract> >.Disponível em: < <http://www.cell.com/article/0896627394902232/fulltext> >.Disponível em: < <http://www.cell.com/article/0896627394902232/pdf> >.
- 97 BELCHEVA, M. M.; COSCIA, C. J. Diversity of G Protein-Coupled Receptor Signaling Pathways to ERK/MAP Kinase. **Neurosignals**, v. 11, n. 1, p. 34-44, 2002. ISSN 1424-862X (Print)1424-8638 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 98 HEINRICHER, M. M. et al. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 214-225, Apr 2009. ISSN 0165-0173 (Print)0165-0173. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.009> >.
- 99 BENARROCH, E. E. Periaqueductal gray: an interface for behavioral control. **Neurology**, v. 78, n. 3, p. 210-217, Jan 17 2012. ISSN 0028-3878. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e31823fcdee> >.
- 100 GUO, W. et al. Supraspinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for descending pain facilitation. **J Neurosci**, v. 26, n. 1, p. 126-137, Jan 04 2006. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3686-05.2006> >.
- 101 MERIGHI, A. Targeting the glial-derived neurotrophic factor and related molecules for controlling normal and pathologic pain. **Expert Opin Ther Targets**, v. 20, n. 2, p. 193-208, 2016. ISSN 1472-8222. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2016.1085972> >.
- 102 KIMURA, M. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor-mediated enhancement of noradrenergic descending inhibition in the locus coeruleus exerts prolonged analgesia in neuropathic pain. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 10, p. 2469-2478, May 2015. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13073> >.

- 103 CHU, H. et al. Effect of periaqueductal gray melanocortin 4 receptor in pain facilitation and glial activation in rat model of chronic constriction injury. **Neurol Res**, v. 34, n. 9, p. 871-888, Nov 2012. ISSN 0161-6412. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1179/1743132812y.0000000085> >.
- 104 ZHUANG, X. et al. Contribution of Pro-inflammatory Cytokine Signaling within Midbrain Periaqueductal Gray to Pain Sensitivity in Parkinson's Disease via GABAergic Pathway. **Front Neurol**, v. 7, p. 104, 2016. ISSN 1664-2295. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2016.00104> >.
- 105 ZHANG, F. et al. Selective activation of microglia in spinal cord but not higher cortical regions following nerve injury in adult mouse. **Mol Pain**, v. 4, p. 15, Apr 18 2008. ISSN 1744-8069. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-4-15> >.
- 106 NI, H. D. et al. Glial activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation of neuropathic pain through the p38 MAPK signaling pathway. **J Neurosci Res**, v. 94, n. 1, p. 50-61, Jan 2016. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.23672> >.
- 107 YIN, J. B. et al. Neurochemical properties of BDNF-containing neurons projecting to rostral ventromedial medulla in the ventrolateral periaqueductal gray. **Front Neural Circuits**, v. 8, p. 137, 2014. ISSN 1662-5110. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fncir.2014.00137> >.
- 108 RENN, C. L. et al. Full-length tropomyosin-related kinase B expression in the brainstem in response to persistent inflammatory pain. **Neuroreport**, v. 17, n. 11, p. 1175-1179, Jul 31 2006. ISSN 0959-4965 (Print)0959-4965. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/01.wnr.0000215771.61355.e1> >.
- 109 NORCINI, M. et al. Supraspinal role of protein kinase C in oxaliplatin-induced neuropathy in rat. **Pain**, v. 146, n. 1-2, p. 141-147, Nov 2009. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2009.07.017> >.
- 110 HUTCHISON, W. D. et al. Pain-related neurons in the human cingulate cortex. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 5, p. 403-405, May 1999. ISSN 1097-6256 (Print)1097-6256. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/8065> >.
- 111 SHYU, B. C.; CHEN, W. F.; SHIH, H. C. Electrically and mechanically evoked nociceptive neuronal responses in the rat anterior cingulate cortex. **Acta Neurochir Suppl**, v. 101, p. 23-25, 2008. ISSN 0065-1419 (Print)0065-1419. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 112 BLISS, T. V. et al. Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 17, n. 8, p. 485-496, Aug 2016. ISSN 1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2016.68> >.
- 113 THIBAULT, K. et al. BDNF-dependent plasticity induced by peripheral inflammation in the primary sensory and the cingulate cortex triggers cold

- allodynia and reveals a major role for endogenous BDNF as a tuner of the affective aspect of pain. **J Neurosci**, v. 34, n. 44, p. 14739-14751, Oct 29 2014. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.0860-14.2014> >.
- 114 YASUDA, S. et al. Imipramine ameliorates pain-related negative emotion via induction of brain-derived neurotrophic factor. **Cell Mol Neurobiol**, v. 34, n. 8, p. 1199-1208, Nov 2014. ISSN 0272-4340. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-014-0097-y> >.
 - 115 DING, Z. et al. Normalizing GDNF expression in the spinal cord alleviates cutaneous hyperalgesia but not ongoing pain in a rat model of bone cancer pain. **Int J Cancer**, v. 140, n. 2, p. 411-422, Jan 15 2017. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.30438> >.
 - 116 GYARFAS, T. et al. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) by anti-parkinsonian drug therapy in vivo. **Cell Mol Neurobiol**, v. 30, n. 3, p. 361-368, Apr 2010. ISSN 0272-4340. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-009-9458-3> >.
 - 117 JIA, D. et al. TNF-alpha involves in altered prefrontal synaptic transmission in mice with persistent inflammatory pain. **Neurosci Lett**, v. 415, n. 1, p. 1-5, Mar 19 2007. ISSN 0304-3940 (Print)0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2006.12.032> >.
 - 118 LU, Y.; ZHU, L.; GAO, Y. J. Pain-related aversion induces astrocytic reaction and proinflammatory cytokine expression in the anterior cingulate cortex in rats. **Brain Res Bull**, v. 84, n. 2, p. 178-182, Feb 01 2011. ISSN 0361-9230. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.12.007> >.
 - 119 SONG, Q.; LIU, M. G.; ZHUO, M. Minocycline does not affect long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of normal adult mice. **Mol Pain**, v. 11, p. 25, May 02 2015. ISSN 1744-8069. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12990-015-0025-2> >.
 - 120 CHEN, F. L. et al. Activation of astrocytes in the anterior cingulate cortex contributes to the affective component of pain in an inflammatory pain model. **Brain Res Bull**, v. 87, n. 1, p. 60-66, Jan 04 2012. ISSN 0361-9230. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.09.022> >.
 - 121 NARITA, M. et al. Sleep disturbances in a neuropathic pain-like condition in the mouse are associated with altered GABAergic transmission in the cingulate cortex. **Pain**, v. 152, n. 6, p. 1358-1372, Jun 2011. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.02.016> >.
 - 122 ZHANG, L. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rostral anterior cingulate cortex (rACC) contributes to neuropathic spontaneous pain-related aversion via NR2B receptors. **Brain Res Bull**, v. 127, p. 56-65, Oct 2016. ISSN 0361-9230. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.016> >.

- 123 THIBAULT, K. et al. Orofacial Neuropathic Pain Leads to a Hyporesponsive Barrel Cortex with Enhanced Structural Synaptic Plasticity. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0160786, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0160786> >.
- 124 DAI, R. P. et al. Biphasic activation of extracellular signal-regulated kinase in anterior cingulate cortex distinctly regulates the development of pain-related anxiety and mechanical hypersensitivity in rats after incision. **Anesthesiology**, v. 115, n. 3, p. 604-613, Sep 2011. ISSN 0003-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182242045> >.
- 125 WEI, F.; ZHUO, M. Activation of Erk in the anterior cingulate cortex during the induction and expression of chronic pain. **Mol Pain**, v. 4, p. 28, Jul 23 2008. ISSN 1744-8069. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-4-28> >.
- 126 CAO, H. et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase in the anterior cingulate cortex contributes to the induction and expression of affective pain. **J Neurosci**, v. 29, n. 10, p. 3307-3321, Mar 11 2009. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.4300-08.2009> >.
- 127 TOYODA, H. et al. Roles of the AMPA receptor subunit GluA1 but not GluA2 in synaptic potentiation and activation of ERK in the anterior cingulate cortex. **Mol Pain**, v. 5, p. 46, Aug 10 2009. ISSN 1744-8069. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-5-46> >.
- 128 TOYODA, H. et al. Requirement of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase for long-term potentiation in adult mouse anterior cingulate cortex. **Mol Pain**, v. 3, p. 36, Dec 01 2007. ISSN 1744-8069. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1744-8069-3-36> >.
- 129 AKSAMITIENE, E.; KIYATKIN, A.; KHOLODENKO, B. N. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. **Biochem Soc Trans**, v. 40, n. 1, p. 139-146, Feb 2012. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1042/bst20110609> >.