Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Departamento de Cirurgia e Anatomia Centro Multiusuário de Neuroeletrofisiologia Laboratório de Neurociências de Dor & Emoções & Laboratório de Proteção Cerebral da Infância

Neuroestimulação cortical e ativação do receptor glutamatérgico *NMDA* na camada disgranular do córtex insular posterior modulam a dor neuropática crônica

"Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)")

RENATA CRISTINA MARTINS PEREIRA

Neuroestimulação cortical e ativação do receptor glutamatérgico *NMDA* na camada disgranular do córtex insular posterior modulam a dor neuropática crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Hélio Rubens Machado

Ribeirão Preto - SP

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

MARTINS-PEREIRA, RC.

Neuroestimulação cortical e ativação do receptor glutamatérgico *NMDA* na camada disgranular do córtex insular posterior modulam a dor neuropática crônica

Fl.148; p.:30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Clínica Cirúrgica – Opção: Morfologia e Medicina Experimental

Orientador: Prof. Dr. Hélio Rubens Machado

 Córtex insular posterior disgranular; 2. lesão por constrição crônica; 3. dor neuropática crônica; 4. neuroestimulação cortical; 5. Receptores glutamatérgicos NMDA Nome: Renata Cristina Martins Pereira

Título: Neuroestimulação cortical e ativação do receptor glutamatérgico *NMDA* na camada disgranular do córtex insular posterior modulam a dor neuropática crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Aprovado em:___/__/

Banca Examinadora

Prof. Dr.
Julgamento:
Assinatura:
Profa. Dra.
Julgamento:
Assinatura:
Presidente da Banca
Prof. Dr. Hélio Rubens Machado FMRP-USP
Julgamento:
Assinatura:

Agradecimentos

Foram anos de muito esforço e dedicação, enfrentando diversos obstáculos e desafios, no entanto, a realização desta dissertação, não teria seguido o mesmo curso sem todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para o seu desenvolvimento. A todos, aqui deixo a minha sincera gratidão.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Renato Leonardo de Freitas que com sua *expertise* na área pôde me orientar, incentivar e colaborar nas decisões sobre os melhores caminhos para a execução do projeto. Sempre pronto para escutar e com uma ótima capacidade crítica que me fez chegar até este momento do projeto levantando hipóteses que com certeza contribuirão para o corpo de evidências da literatura.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Hélio Rubens Machado, que me permitiu construir este projeto e acreditou que seria possível investir nesta linha de pesquisa. Sempre muito solícito e me dando todo suporte necessário. Obrigada ao Prof. Dr. Coimbra por todo suporte laboratorial, recursos e materiais essenciais para a realização deste trabalho e todo conhecimento científico que agregou ao longo destes anos.

Um agradecimento todo especial também a Dra. Priscila de Medeiros, que com toda a sua experiência e mentoria colaborou na execução dos processos, agregou muito conhecimento e se tornou uma grande fonte de inspiração para mim. Assim como também não poderia deixar de agradecer as minhas colegas do laboratório que estiveram presentes no meu dia a dia me permitindo trocar experiências, me oferecendo um grande suporte e tornando os dias leves e agradáveis: Sylmara, Ana Carolina, Renata e Thaís.

Aos meus familiares que souberam compreender que este era um o momento de muita dedicação na minha vida e foram a base forte de carinho e paciência que eu precisava. Obrigada pai, mãe, minhas irmãs e ao meu noivo Victor que sempre esteve ao

meu lado pacientemente me ouvindo explicar o projeto de pesquisa para todos ao meu redor inúmeras vezes e decorando todos os processos.

A CAPES, um agradecimento especial pelo apoio financeiro que foi imprescindível para a realização deste trabalho.

E ao meu Deus por ter me guiado em todos os momentos e me feito entender que caminhar com a Sua presença torna tudo mais leve e abençoado.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001"

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – financing code 001" MARTINS-PEREIRA; Renata Cristina. Neuroestimulação cortical e ativação do receptor glutamatérgico *NMDA* na camada disgranular do córtex insular posterior modulam a dor neuropática crônica, 2022. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2022.

RESUMO

Introdução: A estimulação elétrica (EECIP) do córtex insular disgranular posterior (CIP) tem sido investigada como um novo alvo cortical para terapias nãofarmacológicas em pacientes com dor crônica (DC) e neuropática (DN). Objetivo: Investigar as bases neurais e neuroquímicas da antinocicepção induzida pela neuroestimulação do CIP assim como os mecanismos glutamatérgicos via ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) após a EECIP em animais neuropáticos. Métodos: Ratos Wistar machos foram submetidos aos testes de von Frey e acetona para avaliação da alodinia mecânica e ao frio, respectivamente, após 21 dias de lesão por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático ou do grupo Sham ("falso operado"). O neurotraçador bidirecional BDA (3.000) fluorescente (cascade blue; BDA-CB) ou nãofluorescente (BDA) foi microinjetado no CIP. A EECIP foi realizada em baixa frequência (20 µA, 100 Hz) por 15s através do equipamento de estimulação cerebral profunda (DBS). O efeito do bloqueio dos receptores NMDA no CIP com a microinjeção do antagonista seletivo LY235959 (em 2, 4 e 8 nmol/200nL), seguido de EECIP, foi investigado. Resultados: Foram encontradas projeções do CIP para o núcleo reticular pontino caudal (PnC), núcleo reticular parvicelular (PCRtA), área tegmental dorsomedial (DMTg) e córtex somatossensorial secundário (S₂). EECIP causou analgesia, diminuindo tanto a alodinia mecânica quanto a alodinia ao frio em ratos com DN crônica. O bloqueio dos receptores NMDA no CIP com LY235959 na maior concentração (a 8 nmol) atenuou a antinocicepção produzida pela EECIP. *Conclusão:* As projeções neuroanatômicas dos núcleos reticulares pontinos e S₂ podem contribuir para a sinalização da DC e DN. EECIP na camada disgranular atenua a DN crônica, e o sistema glutamatérgico via ativação do receptor do tipo *NMDA* no CIP disgranular pode estar envolvido na antinocicepção induzida pela EECIP em roedores com dor crônica de origem neuropática.

Palavras-chave: Córtex insular posterior; estimulação cortical; receptores glutamatérgicos *NMDA*; constrição crônica do nervo isquiático; dor neuropática crônica

MARTINS-PEREIRA; Renata Cristina. Cortical neurostimulation and *NMDA* glutamatergic receptor-activation in the dysgranular layer of the posterior insular cortex modulate chronic neuropathic pain, 2022. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2022.

ABSTRACT

Background and aims: Posterior dysgranular insular cortex (PIC) stimulation (PICS) has been investigated as a new putative cortical target for non-pharmacological therapies in patients with chronic and neuropathic pain (NP). This work investigates the neural bases of insula neurostimulation-induced antinociception and glutamatergic neurochemical mechanisms recruited by the PICS in neuropathic animals. Methods: Male Wistar rats were submitted to the von Frey and acetone tests to assess mechanical and cold allodynia after 21 days of chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve or Sham-procedure ("false operated"). The fluorescent bidirectional BDA (3000) neurotracer (cascade blue: BDA-CB) or non-fluorescent (BDA) was microinjected into the CIP. The electrical (e) PICS was performed at low frequency (20 µA, 100 Hz) for 15s by a deep brain stimulation (DBS) device. The effect of PIC N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAr) blockade with the selective antagonist LY235959 (at 2, 4 and 8 nmol/200nL) followed by PICS, was investigated in CCI rats. Results: PIC sends projections to the caudal pontine reticular nucleus (PnC), parvicellular reticular nucleus (*PCRtA*), dorsomedial tegmental area (*DMTg*) and S_2 . PICS decreased both mechanical and cold allodynia in rats with chronic NP. Blockade of NMDA receptors in the PIC with LY235959 at 8 nmol attenuated PICS-produced antinociception. Conclusion: Neuroanatomical projections from pontine reticular nuclei and S₂ may contribute to chronic NP signalling. PICS attenuates the chronic NP, and the NMDA glutamatergic

system into the PIC may be involved in PICS-induced antinociception in rodents with NP conditions.

Keywords: Posterior insular cortex; cortical stimulation; *NMDA* glutamatergic receptors; chronic constriction injury; chronic neuropathic pain

Lista de Figuras

FIGURA 1 - (A): Esquema representativo do córtex insular (CI) humano e suas divisões anteriores (CIA) e posteriors (CIP) separadas pelo sulco central. msg e psg: giro pequeno anterior (ASG), giro pequeno médio (MSG) e giro pequeno posterior (PSG); giro longo anterior (ALG) e giro longo posterior (PLG); sulco insular central (CIS) (Türe e cols., 1999). (B e C): Cituarquitetura do cortex insular posterior (CIP) com as subdivisões granular (Ig1) e (Ig2) e disgranular (Id1) (Kurth e cols., 2010a). (D): Citoarquitetura do CI em ratos com as subdivisões granular da ínsula (Ig), disgranular da ínsula (Id) e agranular da ínsula (Ia) em corte coronal em A (anterior) e em B (posterior) (Cecheto e Saper, 1987). (E, F, G): Citoarquitetura das subdivisões (Ig1, Ig2 e Id1) baseada na granularidade em camadas celulares de Meynert (Kurth e cols., 2010a CIP vem se apresentando como uma área de grande interesse para as pesquisas, pois participa das características somatossensoriais da dor e recebe projeções aferentes nociceptivas e termoceptivas do núcleo ventral posterior inferior e do núcleo ventromedial posterior do tálamo e núcleos do complexo posterior VMPo, os quais recebem aporte de neurônios espinotalâmicos da lâmina I e V (CRAIG et al, 1994). Mais de 40% das entradas espinotalâmicas se concentram no CIP granular/disgranular, além de estar intimamente conectada com o opérculo medial, tornando-as uma área chave da rede para a percepção

FIGURA 3 – Representação ilustrativa do modelo de Injúria por Constrição Crônica do Nervo Isquiático (CCI) proposto por Bennett e Xie (1988) com quatro ligaduras no nervo

FIGURA 4 - Teste de von Frey, aferindo a alodinia mecânica com o filamento de von Frey em animais com ou sem dor neuropática crônica 21 dias após a CCI ou Sham. Fonte: Laboratório de Neurociências da Dor & Emoções. FMRP-USP......47

FIGURA 8 – Fotomicrografias de secções coronais do CIP disgranular de ratos Wistar. Sítios localizados no CIP na divisão disgranular. A: 500 μ m, B: 100 μ m e conexão ipsilateral com S₂ em C: 50 μ m. (A) Representação diagramática de uma seção transversal, mostrando confirmação do local de microinjeção (* n=1) de biodextrana (BDA 3.000) conjugado com *cascade blue*, um marcador neuronial bidirecional fluorescente, no CIP disgranular representado em um desenho modificado do cérebro de rato de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005). (B) Microinjeção mostrando um local representativo de BDA (5X) em CIP disgranular com corpos celulares marcados (seta branca). (C) Fotomicrografia de uma secção coronal representando o córtex

FIGURA 11 - Representação dos sítios de neuroestimulação elétrica na região disgranular do CIP, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005). A: Representação e confirmação histológica (hematoxilina-eosina) da posição do eletrodo de estimulação

FIGURA 15 – Representação dos sítios de microinjeção do antagonista seletivo *NMDA*, o LY235959 e do sítio de neuroestimulação elétrica na região disgranular do CIP (EECIP), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005). **A:** Representação do quimitrodo de estimulação no CIP disgranular. **B:** Representações esquemáticas de sítios da microinjeção e da neuroestimulação elétrica histologicamente identificados no CIP disgranular realizadas em animais com (CCI) e sem (*Sham*) dor neuropática crônica (DNC) (\circ) LY235959 2 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 4 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 4 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 0 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 0 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 0 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 0 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 0 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 0 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 0 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) Veículo CIP + EECIP a 20 µA/15 s (\bullet)

FIGURA 20- Efeito da estimulação elétrica do córtex insular disgranular (EECIP) e do bloqueio dos receptores *NMDA* + EECIP na alodinia mecânica e térmica sobre a DN crônica induzida por CCI do nervo isquiático. A: linhas de base dos testes de *von Frey* e Acetona e cirurgia de lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) ou do procedimento Sham ("falso operado"). B: EECIP foi realizado a 20 μ A, 100 Hz durante 15s por meio do dispositivo de estimulação encefálica profunda (DBS) após 21 dias de CCI. C: O bloqueio de receptores *NMDA* foi realizado através da microinjeção de LY235959 no CIP após 21 dias de CCI, seguido então pela EECIP; D: Projeções neuroanatômicas do CIP para os núcleos pontinos (*PnC*, *PCRtA* e *DMTg*) e para o S2 quem podem contribuir para o processo de sinalização da DN crônica. A EECIP atenua a DN crônica, e o sistema glutamatérgico *NMDA* no CIP pode estar envolvido na

elaboração da antinocicepção induzida pela EECIP em roedores com dor neuropática e crônica. E: Marcação de receptores do tipo *NMDA* no CIP disgranular......90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- µg micrograma
- µL microlitro
- $\mu m micrômetro$
- BDA biodextrana
- CCA córtex cingulado anterior
- CCI injúria por constrição crônica do nervo isquiático
- CPF córtex pré-frontal
- CI córtex insular
- CIP córtex insular posterior
- DAPI sigla em inglês, diamidinophenylindol
- DAB diaminobenzidine "sigla em inglês"
- DC dor crônica
- DMTg área tegmental dorsomedial
- DN dor neuropática
- DNC dor neuropática crônica
- EECIP estimulação elétrica do córtex insular
- GABA ácido gama-aminobutírico
- HE eosina e hematoxilina
- PPTg núcleo tegmental pedunculopontino
- LTP potenciação de longo prazo
- Min minutos
- N número de animais por grupo
- NMDA N-metil D-Aspartato
- NMgR núcleo magno da rafe

NMOL - nanomol

- PCRtA núcleo reticular parvicelular (parte alfa)
- *PnC* núcleo reticular pontino caudal
- S segundos
- S1 córtex somatossensorial primário
- S2 córtex somatossensorial secundário
- IASP sigla em inglês, International Association of the Study of Pain
- OMS organização mundial de saúde
- VPI-ventral póstero-inferior
- PUA pulvinar anterior
- VPM ventro póstero medial
- VMPo porção posterior do núcleo ventro medial
- CGRP peptídeo relacionado ao gene calcitonina
- ECM estimulação elétrica do córtex motor
- ECM1 estimulação elétrica do córtex motor primário
- IA ínsula agranular
- ID ínsula disgranular
- IG ínsula granular
- Ig1 ínsula granular
- Ig2 ínsula granular
- Id1 ínsula disgranular
- CIA córtex insular anterior
- Cg1 córtex cingulado
- CCA córtex cingulado anterior
- PMv córtex pré motor ventral

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

IM-intramuscular

NDR - núcleo dorsal da rafe

RMf - ressonância magnética funcional

CIGC - sigla em inglês "granular caudal insular córtex"

Cpu - caudate-putamen

IPAC - sigla em inglês, interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure

TMS - sigla em inglês transcranial magnetic stimulation

- SCP substância cinzenta periaquedutal
- SNC sistema nervoso central
- CDME corno dorsal da medula espinal

ACC - córtex cingulado anterior "sigla em inglês"

LC - locus ceruleus

DBS - sigla em inglês, deep brain stimulation

CM - córtex motor

SCPdm - substância cinzenta periaquedutal dorso-medial

TAAE - transportadores de aminoácidos excitatórios

iGluRs - receptores ionotrópicos

mGluRs - receptores metabotrópicos

NMDA - N-metil-D-aspartato

AMPA - ácido-amino- 3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiônico

KA - cainato

GLOSSÁRIO DE TERMOS USADOS NO ESTUDO DA DOR NEUROPÁTICA (IASP, 2014)

• Alodinia: dor devido a um estímulo que normalmente não provoca dor.

• Analgesia: ausência de dor em resposta à estimulação que normalmente seria dolorosa.

• Autotomia: termo usado para descrever uma forma de automutilação que pode resultar no aparecimento de feridas ou na amputação dos dígitos.

• Causalgia: síndrome de dor ardente sustentada, alodinia e hiperpatia após uma lesão traumática do nervo, muitas vezes combinada com disfunção vasomotora e sudomotora e alterações tróficas posteriores.

• Desaferentação: perda de fibras nervosas sensoriais que normalmente conduzem informações sensoriais dos tecidos periféricos para a medula espinal.

• Disestesia: sensação anormal desagradável, sendo espontânea ou provocada.

• Dor: uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos.

• Dor por desaferentação: dor iniciada ou causada por uma lesão primária do sistema nervoso central ou periférico.

• Dor neuropática: dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial.

• Dor neuropática central: dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial central.

• Dor neuropática periférica: dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial periférico.

• Dor nociceptiva: dor decorrente de dano real ou potencial ao tecido não-neural devido à ativação de nociceptores.

• Estímulo nocivo: um estímulo que é danoso para o tecido normal.

• Hiperalgesia: aumento da dor de um estímulo que normalmente provoca dor.

• Hipoalgesia: sensação dolorosa diminuída em resposta a um estímulo normalmente doloroso.

• Limiar de dor: intensidade mínima de um estímulo que é percebido como doloroso.

• Neuropatia: distúrbio da função ou mudança patológica de um nervo. Acometimento de um nervo: mononeuropatia; acometimento de vários nervos: multiplexação mononeuropatia. Se difusa e bilateral: polineuropatia.

• Nocicepção: processo neural de codificação de estímulos nocivos.

• Neurônio nociceptivo ou fibra aferente primária: neurônio central ou periférico do sistema nervoso somatossensorial que é capaz de codificar estímulos nocivos.

• Nociceptor: um receptor sensorial de alto limiar do sistema nervoso somatossensorial periférico que é capaz de transduzir e codificar estímulos nocivos.

• Sensibilização: aumento da capacidade de resposta dos neurônios nociceptivos para sua entrada normal e/ou recrutamento de uma resposta para entradas normalmente sublimítrofes.

• Sensibilização central: maior capacidade de resposta dos neurônios nociceptivos no sistema nervoso central à sua entrada aferente normal ou sublimiar.

• Sensibilização periférica: maior capacidade de resposta e limiar reduzido de neurônios nociceptivos na periferia para a estimulação de seus campos receptivos.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 Epidemiologia e Processamento fisiológico da dor	26
1.2 Dor neuropática	28
1.3 Vias descendentes inibitórias e facilitatórias e a modulação endógena da dor	30
1.4 Estimulação elétrica encefálica e cortical	32
1.5 Córtex Insular: citoarquitetura, conectividade e funcionalidade	33
1.6 Neurotransmissão Glutamatérgica	39
2 OBJETIVO GERAL	42
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Animais	44
3.2 Modelos de dor neuropática	44
3.3 Modelo de alodinia mecânica: Teste de von Frey	44
3.4 Modelo de alodinia ao frio: Teste de Acetona	46
3.5 Teste de campo aberto (<i>open-field test</i>)	48
3.6 Cirurgia Estereotáxica: Implantação de eletrodo ou quimitrodo da camada disgran	ular
do CIP	48
3.7 Imunofluorescência	49
3.7.1 Traçamento das vias neurais da camada disgranular do CIP	49
3.7.2 Imunofluorescência de receptores NMDA na camada disgranular do CIP	.51
3.7.3 Drogas neurotraçadoras	52
3.8 Estimulação elétrica da camada disgranular do CIP	52

3.8.1 Desenho do procedimento experimental de neuroestimulação elétrica do CIP
disgranular53
3.9 Bloqueio dos receptores <i>NMDA</i> seguido pela estimulação elétrica do CIP54
3.9.1 Desenho do procedimento experimental de bloqueio do CIP seguido pela
estimulação elétrica
3.10 Drogas
3.11 Histologia
3.12 Análises estatísticas
4 RESULTADOS
4.1 Estudo neuroanatômico das conexões aferentes e eferentes da subdvisão disgranular
do CIP para núcleos reticulares pontinos e córtex somatossensorial secundário57
4.2 Imunofluorescência de receptores NMDA na subdivisão disgranular do CIP61
4.3 Efeito da Neuroestimulação Elétrica (por meio do aparelho DBS) do CIP disgranular
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)62
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)
sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)

APÊNDICES	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
5 DISCUSSÃO	80
disgranular sobre o teste de alodinia ao frio (teste de acetona)	76
4.4.3 Efeito do bloqueio de receptors NMDA seguida da Neuroestimulação	do CIP

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e processamento fisiopatológico da dor

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association of the Study of Pain* – IASP, sigla em inglês), em sua mais nova definição traduzida para o português, a dor é uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial (DESANTANA e cols., 2020). A dor crônica (DC) pode ser definida como uma condição de saúde multidimensional, persistente por mais de 6 meses, embora está mais relacionada com a sensibilização do sistema nervoso central e periférico do que em relação ao tempo de duração propriamente dito (MERSKEY, BOGDUK; 2012).

Considerada como uma crise de saúde devido à alta prevalência e à incapacidade física e emocional associadas, a DC se apresenta mais prevalente entre mulheres com idade mais avançada. A incidência da DC em adultos com idades entre 18 e 25 anos é de aproximadamente 14% contra 62% entre aqueles acima de 75 anos. Estima-se que a DC seja uma das principais causas de incapacidade em muitas regiões do mundo, em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, podendo inibir a capacidade das pessoas de realizar atividades laborais e cotidianas, além de prejudicar sua mobilidade (TURNER, FRANKLIN, FULTON-KEHOE, 2004; SANTOS, SOUSA, ANTES e cols., 2015; FAYAZ, 2016).

No Brasil, de acordo com um estudo realizado por de Souza e colaboradores (2017), a prevalência de DC foi de 39%, com média de idade de 41 anos e predominância feminina de 56%. Esta prevalência é alta em comparação com as expectativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), entretanto, equivale à de países desenvolvidos com alta prevalência de DC.

No processamento fisiopatológico da dor, sinais nociceptivos são transmitidos da periferia por neurônios sensoriais (aferentes sensoriais de primeira ordem ou fibra aferente primária) e estes evocam atividade nas terminações nervosas livres (químicos, térmicos e mecânicos) agrupados em canais iônicos. A transdução do estímulo nocivo externo é iniciada com a despolarização da membrana, onde os potenciais de ação serão conduzidos pelas fibras C e Aδ. Esses neurônios aferentes primários se conectam com interneurônios de segunda ordem, e os axônios desses neurônios de projeção decussam no nível da medula espinal unindo as fibras ascendentes do sistema anterolateral que por sua vez, projetam-se através do trato espinotalâmico para o tronco encefálico e para os núcleos talâmicos, transferindo informações sobre a intensidade e a duração dos estímulos nocivos periféricos (GRACE e cols., 2014).

No tálamo lateral, os aferentes do trato espinotalâmico atingem principalmente o complexo posterior, incluindo os núcleos ventral póstero inferior (VPI), pulvinar anterior (PUA), núcleos suprageniculados posteriores e núcleos do sistema lateral e medial o ventro póstero lateral (VPL) e ventro póstero medial (VPM) (JESSEL, KELLY, 1991). Além disso, há descrições de projeções espinotalâmicas que se conectam com a porção posterior do núcleo ventral medial do tálamo (VMPo), o qual é considerado como um *relé* relacionado a dor e a sensação de temperatura em humanos (BLOMQVIST e cols., 2000; MONTES et., 2005). Os neurônios de terceira ordem, então, projetam-se para áreas corticais como córtex somatossensorial S₁ que codificam os sinais de dor, temperatura e pressão e são responsáveis pelos aspectos sensitivo-discriminativos dando início ao caminho de percepção da dor. Outras áreas ainda participam das características sensitivo-discriminativas da dor como a ínsula e o S₂ (GRACE e cols., 2014).

Diversos estudos identificaram ainda regiões do encéfalo como córtex cingulado anterior (CCA,) córtex pré-frontal (CPF), córtex insular (CI), complexo amigdalóide, tálamo, cerebelo, área tegmentar ventral e o núcleo *accumbens* que são ativadas por estímulos nocivos (LEKNES, 2008; BUSHNEL, 2013) e que fornecem substratos neurais e neuroquímicos, pelo quais, aspectos emocionais, cognitivos e motivacionais podem alterar a sensação ou a experiência dolorosa (OSSIPOV, MORIMURA e PORRECA 2014).

1.2 Dor neuropática

A Dor Neuropática (DN) está entre as diversas condições de saúde que afetam a sociedade e a qualidade de vida de pacientes, sobrecarregando os sistemas de saúde. Se apresenta como uma condição crônica altamente significativa e prevalente na população adulta e sua cronificação afeta cerca de 20% (JAMES e cols., 2018). De acordo com as IASP, a DN é definida como "dor que aparece como consequência direta de lesão ou doença que afeta o sistema nervoso" (TREEDE, 2008). A DN caracteriza-se por uma doença do sistema nervosa somatossensorial central ou periférico, estando associada à dor persistente, à dor paroxística espontânea ou evocada, como a alodinia (condição em que estímulos normalmente inócuos são percebidos como nociceptivo) e a hiperalgesia (aumento da sensibilidade a estímulos nocivos) (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Além desta classificação, em que as características da DN são claramente distintas da dor nociceptiva, um novo conceito de dor mista, vem sendo reconhecido como um grupo adicional de distúrbios da dor, denominado como "dor nociplástica" (FREYNHAGEN e cols., 2019).

A DN de origem periférica, como consequência direta de uma lesão no nervo, produz resposta inflamatória e degeneração *walleriana* causando hiperemia e inchaço, através da liberação de macrófagos e células e *Schwann*. Além disso, há liberação de mediadores vasoativos, como peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP),

substância P, bradicininas, prostaglandina e óxido nítrico (SCHOLZ & WOOLF, 2007) causando sensibilização periférica. Diante de uma lesão persistente ou uma sinalização sensorial alterada. como consequência direta do aumento de ativação e hiperexcitabilidade dos nociceptores, ocorre a liberação de uma variedade de neurotransmissores (glutamato, substância P e ATP) em terminais nervosos centrais. A liberação desses neurotransmissores leva ao aumento da atividade de moléculas sinalizadoras que alteram a expressão de genes, resultando em mudanças neuroquímicas na medula espinal. A amplificação dos sinais dolorosos facilitam a transmissão do sinais nociceptivos causando hiperalgesia secundária (BASBAUM e cols., 2009).

Normalmente, interneurônios inibitórios atuam para diminuir a excitabilidade neuronial e modulam a transmissão nociceptiva, todavia, perante uma lesão, esta inibição pode ser perdida. Adicionalmente, a desinibição pode permitir que fibras Aβ participem da circuitaria nociceptiva, onde estímulos inócuos passam a ser percebidos como dolorosos, juntamente com a liberação de ATP que estimulam células gliais resultando na liberação de BDNF. Estas promovem o aumento na excitabilidade neuronial e aumentam as respostas aos estímulos nócuos (hiperalgesia) e inócuos (alodinia) (BASBAUM e cols., 2009). Todos esses fatores contribuem para mudanças nos segmentos espinais causando sensibilização central no corno posterior da medula espinal (CDME) e em segmentos supraespinais no encéfalo (SIDDALL & COUSINS, 1997, BRIDGES e cols., 2001).

A DN ativa as fibras mecanorreceptivas $A\beta$ normalmente envolvidas com estímulos não dolorosos, mas que enviam impulsos ectópicos exagerados para a medula espinal, contribuindo assim, para a amplificação da dor espontânea, hiperalgesia e alodinia (SCHAIBLE & RICHTER, 2004). Há também o envolvimento das fibras C produzindo descargas em queimação e as fibras $A\delta$, causando parestesias (AMIR, 2002).

Várias organizações profissionais tentam produzir diretrizes de prática clínica para o tratamento da DN com opióides, anticonvulsivantes, antidepressivos, antagonistas de *NMDA* e anti-inflamatórios não-esteróidais, porém, por questões metodológicas e conceituais sua aplicabilidade torna-se limitada ocasionando baixa eficácia no alívio da dor e consequentemente má qualidade de vida das pessoas (CRUCCU; TRUNI, 2017). Enquanto em muitos casos essas terapias são suficientes para o controle da dor, 40% dos pacientes tornam-se resistentes e permanecem sintomáticos (HANSSON e cols., 2009). Sendo assim, o presente trabalho pretende contribuir na proposição de uma possível área do córtex que pode ser alvo de neuroestimulação em modelos animais de DN.

1.3 Vias descendentes inibitórias e facilitatórias e a modulação endógena da dor

Ao longo dos últimos anos, inúmeros estudos trazem a ativação do mesencéfalo e sítios medulares exercendo controle bidirecional sobre a nocicepção. A supressão da dor se dá pela ativação do sistema descendente de modulação da dor e pode ser mediada por dois importantes sistemas: (1) via substância cinzenta periaquedutal (SCP), que recebe informações dos centros superiores e exerce um importante efeito analgésico (2) e via medula rostroventral medial (RVM), que pode facilitar ou inibir as entradas nociceptivas na medula espinal. Sendo assim, ocorre a ativação do sistema descendente facilitatório da dor através da ativação do núcleo magno da rafe (NMgR) (KWON, 2014; OSSIPOV, MORIMURA e PORRECA, 2014).

Há evidências na literatura que a SCP, através de estudo de estimulação elétrica tanto em animais (REYNOLDS, 1969; JIANG, 2014) quanto em humanos (HOSOBUCHI, 1977), está envolvida com modulação inibitória das entradas nociceptivas mediada por opiódes. Esta região mesencefálica recebe aferências de diversas áreas corticais e somestésicas. De fato, o CCA, uma importante área envolvida nos aspectos emocionais da dor, pode ser modulado devido ativação da SCP (PETROVIK e cols., 2002).

A SCP apresenta conexões bidirecionais com o complexo amigdalóide, envolvido no medo inato e condicionado, e também, recebe aferências ascendentes oriundas do núcleo parabraquial e do corno dorsal da medulla espinal (CDME) (GAURIAU e BERNARD, 2002). Freitas e colaboradores (2005), através de um estudo neuroanatômico funcional, mostrou conexões neurais entre o teto mesencefálico e núcleos do sistema inibitório da dor, evidenciando assim, a interligação entre os núcleos do colículo superior, colículo inferior com a coluna dorsal da SCP. Também foi mostrado conexões entre o colículo inferior e SCP com o núcleo dorsal da rafe (NDR) e locus coeruleus (LC), que são susbstratos neurais responsáveis pela elaboração da analgesia (FREITAS e cols., 2005).

Estudos revelam que a SCP envia projeções para núcleos pontinos contendo neurotransmissores noradrenérgicos incluindo o LC que é um importante núcleo de saída do sistema endógeno envolvido com analgesia (FREITAS e cols., 2005; de Freitas e cols., 2013) e a RVM participa nesta conexão inibindo as entradas nociceptivas ao nível do corno dorsal da medula espinal através da liberação de noradrenalina e serotonina (GAO, KIM e MASON, 1997; BAJIC e PROUDFIT, 1999; ODEH e ANTAL, 2001). Além disso, outros estudos apontam para a participação de neurotransmissores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos no hipocampo dorsal e serotoninérgicos todos envolvidos com antinocicepção em núcleos meséncefálicos como SCPdm, SCPvl, NDR e LC (de FREITAS e cols., 2013 e 2016).

Assim como as eferências da SCP, o RMV é considerado como o último *relé* comum na modulação descendente. O RVM também apresenta projeções neurais

envolvidos na facilitação ou inibição das entradas nociceptivas. Vias oriundas da SCP ou RVM se projetam para o CDME, e se comunicam com neurônios e interneurônios do sistema descendente e vias ascendentes. As vias entre a SCP/RVM possuem células "*On e Off*" capazes de produzir mecanismos neurais que modulam facilitando ou inibindo a dor, através das suas projeções descendentes para o CDME (OSSIPOV, MORIMURA e PORRECA, 2014).

Portanto, mecanismos que amplificam a dor podem estar envolvidos com a cronificação da dor e relacionadas ao desenvolvimento e manutenção da sensibilização central (espinal e cortical) através da ativação das vias descendentes facilitatórias da dor (LOVICK, 2008; FENTON, 2015).

1.4 Estimulação elétrica encefálica e cortical

Diante das alterações nociplásticas do sistema nervoso periférico e central, e considerando a refratariedade com o tratamento farmacológico em condições de DC e DN, a neuromodulação se torna uma alternativa terapêutica para o tratamento tanto da DC e DN. A neuromodulação, relacionada a estimulação encefálica ou cortical têm obtido grandes avanços e atenção por sua eficácia no tratamento de várias síndromes dolorosas desde a década de 90, (TSUBOKAWA e cols., 1991; GARCIA-LARREA e cols., 1999; NGUYEN e cols., 1999).

Também, foi demonstrado que a estimulação elétrica do córtex motor (ECM) induziu antinocicepção em ratos *naïve*, devido inibição de núcleos talâmicos e a desinibição da SCP, sendo esse efeito mediado pelo núcleo ventral póstero-medial (VPM) de ratos com constrição crônica (CCI) do nervo isquiático (PAGANO e cols., 2011). Em adição, nosso grupo de pesquisa, demonstrou que a neuroestimulação elétrica do córtex motor primário (ECM₁) atenuou a alodinia ao frio em ratos com DNC, 21 dias após a CCI

(MEDEIROS e cols., 2019). Embora a ECM seja um método potencialmente eficaz no tratamento da dor em pacientes, e seu alívio é geralmente parcial em longo prazo em cerca de 50% dos pacientes com DN refratária, tornando necessária a busca de novos alvos corticais seguros e eficazes para o tratamento destes pacientes (; FONTAINE, 2009; ANDRÉ-OBADIA e cols., 2014).

No que diz respeito às demais técnicas de estimulação invasiva para atenuar a DC, são apresentadas a estimulação do nervo occipital, estimulação do nervo vago, estimulação da medula espinal e estimulação encefálico profunda. O modo de ação de todas essas técnicas é apenas parcialmente compreendido, mas pode ser muito diferente de uma técnica para outra. A seleção de pacientes ainda é um desafio. Diretrizes recentes baseadas em consenso para a prática clínica são apresentadas quando disponíveis. (MOISET e cols., 2020; KNOTKOVA e cols., 2021). Diante disso, a pesquisa pré-clínica se faz necessária, e o presente projeto propõe avaliar a envolvimento do CIP como possível alvo neural acerca dos procedimentos para produção de analgesia.

1.5 Córtex insular: citoarquitetura, conectividade e funcionalidade

O córtex insular (CI) é uma porção do córtex cerebral oculta pelo opérculo frontal e temporal, que apesar do seu envolvimento em múltiplos tipos de processamento de informação, a contribuição desta região para a modulação da dor através da entrada de estímulos *down-top* ou *top-down* não está esclarecida (MORIARTY, MCGUIRE e FINN, 2011).

Diversos estudos tem ampliado o papel neurofisiopatológico da ínsula como uma área somatossensorial, uma área sensorial multifacetada e um componente do córtex de integração ao sistema límbico das emoções (CRAIG, 2002; BAMIOU e cols., 2003; GARCIA-LARREA, 2012; MAFFEI e cols., 2012; BERMUDEZ-RATTONI, 2014).

Na ínsula, foi evidenciado uma conectividade funcional entre a região posteriordorsal para a região antero-basal, com associação cada vez mais forte com áreas responsáveis pelos aspectos cognitivos e emocionais, implicadas também, nos processos sensoriais e motores. Esta característica conectiva, torna a ínsula fundamental em todas as dimensões da dor que formam a experiência consciente da dor (sensório-discriminativo, afetivo-emocional e cognitivo-avaliativo) (CAUDA e cols., 2011; KELLY e cols., 2012).

Em revisões sistemáticas da literatura, a ativação da ínsula é quase sempre observada em estudos de imageamento em humanos saudáveis, em modelos de dor experimental, e em pacientes com dor (PEYRON e cols., 2000; APKARIAN e cols., 2005).

Anatomicamente, e com base em sua citoarquitetura em humanos, o CI é dividido em duas zonas pelo sulco insular central e estabelece um limite entre as seções insulares ventral-anterior e dorsal-posterior. Enquanto a ínsula anterior é composta por três giros curtos principais (anterior, médio e posterior) e mais raramente de giros acessórios, a ínsula posterior compreende dois giros longos (anterior e posterior), às vezes incompletamente separados (TURE e cols., 1999) (Figura 1 A).

A ínsula também pode ser subdividida com base em sua granularidade em três regiões: o CI agranular (IA), o CI disgranular (ID) e o CI granular (IG) em ratos de acordo com CECHETO e SAPER (1987); embora pouco explorado, essa diferença de granularidade sustenta as diferentes funções neurofuncionais atribuídas a ínsula (Figura 1G e D).

Situada na porção anterior do sulco central, o córtex insular anterior (CIA) é dividido em duas sub-regiões: região agranular ventral e disgranular dorsal (CECHETO; SAPER, 1987). A região agranular rostral da ínsula envolvida com alterações fisiológicas associadas a estados emocionais (OGAWA, HASEGAWA, MURAYAMA, 1992). As

principais conexões neurais estão envolvidas nos aspectos afetivos do processamento nociceptivo, bem como no sistema modulatório descendente, além de estar extensamente interconectada com regiões pré-límbica e infra-límbica ventrais do CPFm (FOX e cols., 2005), o complexo amigdalóide (STEHBERG, 2012), o núcleo *accumbens* (JASMIN e cols., 2004) e a área cingulada 1 (Cg₁), todos associados ao processamento emocional da nocicepção.

O CIP, apresenta 2 áreas granulares (Ig1 e Ig2). A área Ig1 apresenta uma camada IV bem desenvolvida além de uma ampla camada II e V menos distinta. A área Ig2, também mostra uma camada IV claramente visível. A Ig2 difere de Ig1 por uma camada II menor, uma parte intermediária menos densa de células da camada III e uma camada mais densa de células V, além da área disgranular (Id1) com uma camada IV invadida por células piramidais das camadas adjacentes III e V. Essa área tem, portanto, uma arquitetura disgranular. Além disso, a camada III possui menos densidade celular e distingue Id1 de áreas vizinhas (KURTH e cols., 2010a) (Figura 1B, C, E, F, G).


FIGURA 1 - (**A**): Esquema representativo do córtex insular (CI) humano e suas divisões anteriores (CIA) e posteriors (CIP) separadas pelo sulco central. msg e psg: giro pequeno anterior (ASG), giro pequeno médio (MSG) e giro pequeno posterior (PSG); giro longo anterior (ALG) e giro longo posterior (PLG); sulco insular central (CIS) (Türe e cols., 1999). (**B e C**): Citoarquitetura do cortex insular posterior (CIP) com as subdivisões granular (Ig1) e (Ig2) e disgranular (Id1) (Kurth e cols., 2010a). (**D**): Citoarquitetura do CI em ratos com as subdivisões granular da ínsula (Ig), disgranular da ínsula (Id) e agranular da ínsula (Ia) em corte coronal em A (anterior) e em B (posterior) (Cecheto e Saper, 1987). (**E, F, G**): Citoarquitetura das subdivisões (Ig1, Ig2 e Id1) baseada na granularidade em camadas celulares de *Meynert* (Kurth e cols., 2010aO CIP vem se

apresentando como uma área de grande interesse para as pesquisas, pois participa das características somatossensoriais da dor e recebe projeções aferentes nociceptivas e termoceptivas do núcleo ventral posterior inferior e do núcleo ventromedial posterior do tálamo e núcleos do complexo posterior VMPo, os quais recebem aporte de neurônios espinotalâmicos da lâmina I e V (CRAIG et al, 1994). Mais de 40% das entradas espinotalâmicas se concentram no CIP granular/disgranular, além de estar intimamente conectada com o opérculo medial, tornando-as uma área chave da rede para a percepção da dor (CRAIG, 2003).

Dados de ressonância magnética funcional mostram a íntima conectividade anatômica da parte granulosa caudal no CIP ao CM₁, secundário e somatossensorial. Essas conexões seriam via projeções corticais com fibras recíprocas entre S₁, S₂/CM e CIP (FROT; MAUGUIERE, 2003 e FROT; MAGNIN; MAUGUIERE; GARCIA-LARREA, 2013); além de estar principalmente ligado ao córtex cingulado médio (CCM), envolvido na sensação de dor, ao *operculum* (FROT e cols., 1999; BAUMGARTNER e cols., 2006; DOSENBACH e cols., 2006) e complexo amigdalóide (NAKASHIMA e cols., 2000).

Em primatas, as subdivisões do CI têm sido investigadas e estudos mostram que a ínsula disgranular é considerada como uma zona intermediária entre a área granular e agranular (EVRARD, 2019). A ínsula disgranular está conectada a ínsula granular compartilhando características somatossensoriais com projeções com S_1/S_2 (MESULAM e MUFSON, 1982b; FRIEDMAN e cols., 1986; BURTON e cols., 1995; CIPOLLONI e PANDYA, 1999). A ínsula disgranular possui projeções com córtex cingulado posterior (CCP), CM (MESULAM e MUFSON, 1982b; MUFSON e MESUALM, 1982; MORECRAFT e cols., 2004), área motora suplementar e pré-motora (AMS) (LUPPINO e cols., 1993) e estriado dorsal e ventral (CHIKAMA e cols., 1997; FUDGE e cols., 2005).

A ínsula disgranular em primatas, ainda apresenta outras subdivisões como a porção do monte e ventral que compartilha projeções com Cg₁ (MESULAM e MUFSON, 1982b; MUFOSN e MESULAM, 1982), córtex pré-motor ventral (PMv) (GERBELLA e cols., 2011), complexo amigdalóide (AGGLETON e cols., 1980; TURNER e cols., 1980). Além disso, há projeções nestas subdivisões para hipotálamo lateral e SCP (SALEH e cols., 2017), tornando-a, assim, como parte integrante no processo interoceptivo sensóriomotor e indicando a natureza multimodal desta região (EVRARD, 2019). Esta citoarquitetura proposta por Evrard em 2019 sobre mapeamento em primatas se assemelha aos esquemas sobre divisão anatômica da ínsula humana proposto desde trabalhos de Brodmann (VOGT, 1911; ROSE, 1928; BROCKHAUS, 1940; MOREL e cols., 2013).

O CI disgranular apresenta uma natureza multimodal e é parte integrante do fluxo integrativo de processamento de informação interoceptiva, apresentando um gradiente de informações em um fluxo caudal-rostral (CRAIG, 2009, FUJITA e cols., 2010), ou seja, da porção posterior para a porção anterior da ínsula granular dorsal, à ínsula disgranular intermediária e, finalmente, à ínsula agranular anterior (EVRARD, 2019). Ela também responde a estímulos inócuos barorreceptivos e mecanorreceptivos conforme mostrados em estudo eletrofisiológico de registro extracelular *single unit* em primatas (ZHANG e cols., 1999).

Estudos apontam para um papel do CIP na dor patológica, sobretudo em pacientes com DNC, que podem apresentar atividade conectiva anormal ipsilateral e contralateral (GARCIA-LARREA e PEYRON, 2013). Esses pacientes respondem a percepções térmicas e de dor mecânica através de estudos de potenciais evocados por estimulação a laser (GARCIA-LARREA, 2010).

Desta forma, através de conexões que possibilitam a modulação das dimensões cognitivo-avaliativas, afetivo-emocionais e sensitivo-discriminativas da dor, sugere-se que a estimulação elétrica, e a neuroquímica subjacente do CIP, poderá constituir objeto de interesse para tratar a DC e DN, uma vez que esta área está bastante correlacionada com a ocorrência de alodinia em modelos de DN. Além disso, o CIP está implicado na integração de estímulos dolorosos e térmicos através da estimulação elétrica invasiva e não invasiva, o que a torna viável na modulação das percepções térmicas em humanos (DENIS e cols., 2016).

A técnica de estimulação elétrica em estruturas encefálicas tem sido uma ferramenta muito utilizada em pacientes refratários com DC e DN. Sendo assim, tentaremos elucidar essa área do CI, na sua região posterior, como uma estratégia de neuroestimulação para a atenuação da DNC em roedores. Portanto, a realização de um estudo multidisciplinar, investigando aspectos neuroanatômicos, neurofisiológicos e psicofarmacológicos do CIP, pode nos trazer novas evidências acerca do conhecimento sobre os mecanismos da dor e sua modulação, assim como, poderá fornecer novas alternativas no tratamento da dor crônica e neuropática.

1.6 Neurotransmissão glutamatérgica

Em nível cortical, onde a percepção da dor é processada, as sinapses glutamatérgicas, especialmente os receptores inotrópicos do tipo *NMDA*, desempenham um papel importante na transmissão da dor e plasticidade em longo prazo (LTP). De fato, a estimulação elétrica de CM₁ influencia diretamente essas áreas corticais envolvidas no processamento de informações dolorosas, incluindo o CCA, CI, S₁, S₂ e CPF (ZHUO, 2016).

O glutamato é principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. Basicamente, todos os neurônios centrais recebem sinapses glutamatérgicas e possuem receptores para o glutamato (PRYBYLOWSKI, WENTHOLD, 2004). Os receptores glutamatérgicos são divididos em dois grandes grupos: o ionotrópicos (iGLURs) e metabotrópicos (mGLURs). Os iGluRs podem ser de três tipos: N-metil-D-aspartato (*NMDA*), ácido-amino3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiônico (AMPA) e cainato (KA). Todos eles agregam, no mesmo complexo protéico transmembranar, sítios de recepção ao ligante e canal iônico. Assim, a neurotransmissão mediada pelos iGluRs é rápida, pois afeta diretamente o fluxo de íons (principalmente Na⁺ e Ca²⁺) e, consequentemente, o estado eletroquímico da membrana pós-sináptica (RUGGIERO e cols., 2011).

Por sua vez, os mGluRs são acoplados a proteínas G e participam dos mecanismos de resposta intracelular através da ativação de segundos mensageiros. Por esse motivo, são responsáveis pela geração de respostas pós-sinápticas mais lentas (PINHEIRO, MULLE, CHRISTOPHE, 2008; OLNEY, 1969). Os receptores *NMDA* localizam-se na membrana pós-sináptica das sinapses excitatórias e exibem maior permeabilidade ao Ca2+ do que os receptores AMPA e KA, característica que lhes confere um papel mais ativo em mecanismos neurotóxicos, e por este motivo, é o receptor mais estudado devido o seu envolvimento com a neurotoxicidade. Este processo neurotóxico pode ser atenuado pelo mecanismo de recaptação por transportadores de alta afinidade presentes nos astrócitos removendo-o da fenda sináptica evitando a sua permanência no espaço extracelular. O L-Glu é convertido em glutamina e posteriormente serão reconvertidas em glutamato novamente conferindo assim um efeito neuroprotetor como demonstrado na figura 2 (RUGGIERO e cols., 2011).

No CI, o desequilíbrio nas concentrações de glutamato pode contribuir para a sensibilização central da dor, estando com níveis aumentados em condições de DN e fibromialgia (HARRIS e cols., 2009 e PETROL e cols., 2012).



FIGURA 2. Sinalização da neurotransmissão glutamatérgico evidenciando a síntese de glutamato e ciclo entre neurônio e célula da glia. A ação do glutamato liberado na fenda sináptica é limitada pela recaptação através de transportadores específicos em neurônios e células glias adjacentes. No terminal pré-sináptico, a glutamina liberada por células gliais é recaptada pelos neurônios e convertida em glutamato. O glutamato é transportado para dentro das células através de transportadores de aminoácidos excitatórios (TAEs) e armazenado em vesículas portransportadores vesiculares de glutamato (TVGlu). Fonte: Adaptado de Ruggiero e cols., 2011.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar as bases neurais, fisiopatológicas e psicofarmacológicas da dor neuropática crônica (DNC) através do neurotraçamento das vias a partir do córtex insular posterior (CIP), da neuroestimulação elétrica do CIP (*deep brain stimulation: DBS*) ou do bloqueio de receptores *NMDA* glutamatérgicos seguido pela neuroestimulação do CIP em animais com DNC.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Estudar as possíveis redes neurais que se conectam com o CIP disgranular, que podem participar da modulação de dor. Para isso, foi microinjetado o neurotraçador de captação bidirecional fluorescente BDA 3000 conjugado com *cascade blue* (BDA-CB), ou o neurotraçador não-fluorescente (BDA), em animais com DNC;

Estudar a possível participação do CIP disgranular na modulação da DNC, através da neuroestimulação deste córtex por meio da neuroestimulação elétrica (DBS: 20 μ A por 15 s) após 21 dias da injúria por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático, avaliandose o efeito da neuroestimulação sobre no teste de alodinia mecânica (teste de *von Frey*) e alodinia ao frio (teste da acetona) em animais com e sem DNC;

✓ Avaliar o comportamento exploratório, a atividade locomotora e o comportamento relacionado à ansiedade nos roedores CCI ou Sham por 5 minutos, através da realização do teste de campo aberto (*open-field test*) imediatamente após a neuroestimulação elétrica do CIP disgranular (20 μ A/15 s) em animais com ou sem DNC;

✓ Estudar a possível participação do sistema glutamatérgico, via bloqueio dos receptores do tipo *NMDA*, seguida da neuroestimulação elétrica do CIP disgranular (20 μ A/15 s) sobre a modulação da DNC, após 21 dias a CCI ou *Sham*. Para isso foi realizada a microinjeção do antagonista seletivo de receptores *NMDA*, o LY235959 (2, 4 e

8nmol/200nL) no CIP, avaliando-se o efeito no teste de alodinia mecânica (teste de *von Frey*) e de alodinia ao frio (teste da acetona) em animais com e sem DNC;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando inicialmente aproximadamente 100 g (~40 dias), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Foram alojados no Biotério do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob um ciclo claro/escuro de 12/12 h, em temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (55%) controladas, com livre acesso à água e ração, disponibilizadas *ad libitum*. A manipulação dos animais seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal e o projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, que seguem a lei federal N° 11.794, de 8 de outubro de 2008. Os experimentos foram realizados segundo os princípios éticos, elaborados pela CEUA já aprovados pela FMRP-USP (Processo: 241/2019).

3.2 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA

Para induzir a neuropatia experimental, os animais foram submetidos ao procedimento de lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI), como previamente descrito por Bennett & Xie (1988), modificado por Sommer & Myers (1995) e adaptado por Medeiros e colaboradores (2019a, b; 2020a, b, c), como demonstrado na figura 3.

Inicialmente, os animais foram anestesiados através da administração por via intramuscular (IM), na pata posterior esquerda, utilizando-se uma solução na proporção de 0.1 ml de cetamina a 92 mg/kg (União Química Farmacêutica Nacional, Brasil), para 0.2 ml a 9.2 mg/kg xilazina (Hertape/Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brasil). Os animais são colocados sobre uma mesa com o dorso para cima e, a pata posterior direita presa por um esparadrapo. Foi realizada tricotomia desta pata, a desinfecção com iodopolvidina, e em seguida, a realização da incisão longitudinal de 15 mm na altura da coxa, região dorso-lateral, em nível de trocânter/fêmur. O nervo isquiático direito foi acessado e exposto através da dissecação dos músculos, grande glúteo e bíceps femoral. Foi realizada uma simples ligadura, modelo adaptado de Medeiros et al. (2019a, b; 2020a, b, c, d) com fio *Cat-gut* 4-0 no nervo isquiático da pata direita proximal à trifurcação isquiática. A tensão gerada na ligadura foi de intensidade leve, suficiente para causar leve isquemia sem interromper o fluxo sanguíneo total. As incisões na pele foram suturadas com o fio *mononylon* 5-0, em seguida, água oxigenada foi passada no membro posterior direito do roedor. O grupo controle "falso operado" (*Sham*) foi submetido a todos os procedimentos cirúrgicos, através da exposição do nervo isquiático direito, mas sem a CCI com a ligadura do mesmo.



FIGURA 3 – Representação ilustrativa do modelo de Injúria por Constrição Crônica do Nervo Isquiático (CCI) proposto por Bennett e Xie (1988) com quatro ligaduras no nervo isquiático. Figura retirada de Joachim Scholz e cols., 2008. *Nota bene*: no presente projeto, realizamos apenas uma ligadura no nervo isquiático dos roedores. Esta proposta

foi adaptada em nosso grupo de pesquisa (vide Medeiros e cols., 2019a, b; 2020a, b, c; 2021; Negrini-Ferrari e cols., 2021; Malvestio e cols., 2021).

3.3 MODELO DE ALODINIA MECÂNICA: TESTE DE VON FREY

Foi utilizado o teste filamentos de *von Frey* (*North Coast, EUA*), para avaliar o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico. Consiste em conjunto de monofilamentos de nylon, de várias espessuras, que exercem diferentes graus de força, quando aplicadas sobre a superfície plantar da pata. Permitindo assim, avaliar a quantidade de força necessária para evocar o comportamento de retirada da mesma (CHAPLAN e cols., 1994).

Os animais foram individualmente colocados em caixas acrílicas, medindo 23x20x18, cm, dispostas sobre uma mesa com assoalho de grade de aço não maleável, com 5 mm² de espaço entre as malhas. Por entre as malhas de assoalho, foi aplicada a ponta da haste de estimulação, no centro plantar da pata traseira do rato, até que o animal tenha a resposta de retirada da pata estimulada. Este procedimento foi realizado na pata direita lesada do animal CCI (pata ipsilateral) e também na pata esquerda (contralateralmente a cirurgia de CCI ou *Sham*) em todos os animais (Figura 4).

Após 30 min de aclimatação dos animais no aparato experimental, foi aplicado a linha de base 1 de *von Frey* (antes das cirurgias de CCI ou *Sham*); após 21 dias da CCI ou *Sham* e antes do tratamento farmacológico ou da estimulação, foi realizada a linha de base 2 de *von Frey*; e o teste campo aberto foi realizado por 5 minutos antes e após o tratamento farmacológico ou a neuroestimulação no CIP. E por fim, após 5 min do teste de campo aberto, o teste de *von Frey* foi realizado durante 30 minutos nos roedores de 10 em 10 minutos.



FIGURA 4 - Teste de von Frey, aferindo a alodinia mecânica com o filamento de von Frey em animais com ou sem dor neuropática crônica 21 dias após a CCI ou Sham. Fonte: Laboratório de Neurociências da Dor & Emoções. FMRP-USP.

3.4. MODELO DE ALODINIA AO FRIO: TESTE DA ACETONA

Para avaliação da alodinia ao estímulo frio, foi empregado o teste de acetona (AC). No teste, os ratos foram posicionados sobre uma plataforma (a mesma utilizada no teste de *von Frey*) na qual se tem acesso a superfície inferior da pata do animal. Para o teste, 0,5 mL de acetona a 100% foi ministrada na superfície plantar da pata traseira do rato, a partir de baixo da grelha. A aferência da nocicepção é dada por um score que consiste em 3 classes: 0 - nenhum movimento; 1 - movimento rápido e brusco da pata; 2 - movimento repetido de levantamento da pata; 3 - movimentação da pata seguida por lambida (FLATTERS; BENNETT, 2004). Se o animal esboçar algum comportamento no período de 20 segundos observa-se por mais 20s soma dos comportamentos esboçados em 40 segundo, repetidos em três tempos corresponde a medida nociceptiva do teste. Caso o score em 20s seja 0 não é necessário mais 20s.

Também foi aplicado acetona na pata esquerda do animal, que é contralateral à cirurgia de CCI ou *Sham* (figura 5).



FIGURA 5 - Teste de acetona, aferindo a alodinia ao frio com a aplicação de 20 µL de acetona, nas patas direita e esquerda traseira dos animais, submetidos à cirurgia de CCI ou *Sham*. Fonte: Laboratório de Neurociências da Dor & Emoções. FMRP-USP.

3.5. TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN-FIELD TEST)

O aparato de campo aberto consiste em uma arena circular em acrílico cristal (97 cm de diâmetro e paredes de 32,5 cm de altura, topo aberto e piso dividido em 19 seções semelhantes). Cada animal foi colocado suavemente no centro do aparato experimental e o comportamento foi filmado (Sony Habdycam) durante 5 minutos imediatamente após a estimulação elétrica e da microinjeção de droga no CIP. O teste avaliou a exploração ambiental e a atividade locomotora geral (número de cruzamentos e levantamentos), e permitiu avaliar um comportamento relacionado à ansiedade em roedores: a preferência por posicionamento junto a amurada da arena. Assim, foi aferido o tempo de permanência no centro ou na periferia da arena de campo aberto (MEDEIROS e cols., 2021).

3.6 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA: IMPLANTAÇÃO DO ELETRODO OU QUIMITRODO DA CAMADA DISGRANULAR DO CIP

14 dias após a cirurgia de CCI ou *Sham*, os animais (n=8) foram levados ao aparelho estereotáxico (Insight, Brasil), onde suas cabeças foram fixadas pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Antes da exposição da calota craniana, a pele e o tecido subcutâneo foram anestesiados com solução de lidocaína a 2% (0,1 mL, s.c.). O periósteo foi retirado e a calota craniana secada com H₂O₂ a 10%.

Um eletrodo, para a estimulação encefálica cortical [*deep brain stimulation* (DBS)] ou quimitrodo (constituído por uma cânula-guia acoplada ao eletrodo) foi implantado no CIP disgranular para a neuroestimulação ou para microinjeção de antagonista farmacológico seguida da neuroestimulação, respectivamente, segundo as coordenadas AP= - 0,48 mm; ML= 5,8 mm e DV= 6,9 mm para eletrodo e DV= 6,0 mm para cânula-guia, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2005). Para os procedimentos químicos como a microinjeção do antagonista, a cânula-guia deveria ter 15 mm, microagulha para microinjeção, de 16 mm, e eletrodo para a neuroestimulação, de 16 mm. Depois de implantados, o eletrodo ou o quimitrodo foi fixada na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável que, por sua vez, foi ancorada por dois parafusos de fornitura de aço inoxidável.

3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA

3.7.1 TRAÇAMENTO DAS VIAS NEURAIS DA CAMADA DISGRANULAR DO CIP

Os roedores com (ratos CCI; n=4) foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1 ml de cetamina a 10 % (Agener, na dose de 90 mg/kg, IP) para 0,2 ml de xilasina a 4% (Dopaser, na dose de 10 mg/kg, IP), e fixados no aparelho estereotáxico (Insight, Brasil). A barra dos incisivos superiores foi posicionada a 3,3 mm abaixo da linha interaural, de forma que o crânio fique na posição horizontal entre bregma e

lambda. Uma micropipeta foi introduzida verticalmente, visando a camada disgranular do CIP, segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2005) AP= - 0,48 mm; ML= 5,8 mm e DV= 6,9 mm.

Através desse dispositivo, a biodextrana (BDA) não-fluorescente e o BDA conjugado com *cascade blue* (BDA-CB), um traçador neuronial bidirecional fluorescente, de peso molecular 3000 foi administrado no CIP disgranular, com o intuito de investigar a anatomia conectiva desta área com os núcleos que possam modular a dor. A citoarquitetura e demais características das células neurais marcadas, assim como a hodologia neural foram avaliadas por microscopia de luz (fotomicroscópio AxioImager Z1; Zeiss).

Foi realizado o neurotraçamento em animais 21 dias após a CCI. Os compostos utilizados foram injetados por via intracerebral (i.c.), diretamente na estrutura estudada, utilizando um sistema constituído de uma agulha gengival (30G) acoplada a um fio de polietileno que, por sua vez, foi acoplado a uma microsseringa (Hamilton 10 μ L, EUA) microinjetada por uma bomba de infusão com fluxo de 0,2 μ L/min. Completado o período de microinjeção, a calvária foi suturada com fio de sutura mononylon 5-0 para proteger a trepanação de impurezas.

Para o procedimento fluorescente (BDA-CB), passados 5 dias de pós-operatório, os animais foram profundamente anestesiados com 0,1 ml de cetamina a 10% (Agener, na dose de 90 mg/kg, IP) para 0,2 ml de xilasina a 4% (Dopaser, na dose de 10 mg/kg, IP) e perfundidos por via intracardíaca com salina tamponada, seguida de paraformaldeído a 4%, em tampão fosfato, 0,05 M, pH 7,3. Em seguida, os encéfalos foram removidos, processados para a obtenção de cortes congelados e secções de 20 µm foram obtidas no criostato (AM 1950; Leica) e depositadas em placas de acrílico, confeccionadas para a técnica de *free floating*. As secções foram lavadas em tampão fosfato, pH 7,3. As vias

neurais traçadas foram capturadas por sistemas de imagens (AxioImager Z1, Zeiss) equipado com espelho duplo dicroico DD 488/568 e filtro de barragem LP 590 para subsequente localização do local do sítio da injeção e para observarmos as células fluorescentes. Estas secções foram montadas entre lâmina e lamínula, com DAPI. Todos os procedimentos foram realizados ao abrigo da luz fluorescente.

Para a marcação com biodextrana (BDA) não fluorescente, foi usado o método da avidina-biotina (ABC standart Elite kit; Vector Labohamsterries) com reação 3-3'diaminobenzidina (DAB; Sigma) peroxidase intensificada com níquel. As secções foram completamente lavadas em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,4) após a incubação, montadas em lâminas de vidro revestidas com gelatina, contrastadas usando o método Nissl cresil violeta, e vistas sob um fotomicroscópio (AxioImager Z1, Zeiss).

3.7.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA DE RECEPTORES *NMDA* NA CAMADA DISGRANULAR DO CIP

Para todas as marcações por imunofluorescência realizadas no presente trabalho, foram obtidas cortes seriados com espessura de 20 µm obtidas no criostato (CM 1950 Leica, Wetzlar, Germany). Em cada marcação as lâminas foram lavadas com tampão (TBS 0,1M) e em seguida incubadas em glicina (0,2M). Em sequência, após a lavagem as lâminas foram incubadas em BSA 2% para bloqueio de ligações inespecíficas. Após o bloqueio foi aplicado o anticorpo primário (overnight) e após as lavagens, o anticorpo secundário. Ao final as lâminas foram lavadas e cobertas com uma lamela de Prolong com 4 ', 6-Diamidino-2 dicloridrato de-fenilindol (DAPI) (Life Technologies, Camarillo, CA, EUA). As lâminas então foram observadas em microscópio (AxioImager Z1, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e fotografadas com auxílio do programa ZEISS ZEN lite para análise qualitativa e quantitativa em aumentos de 10, 20 e 40x. As células marcadas positivamente foram consideradas para fotomicrografia com o auxílio do programa ImageJ.

Neste sentido, foi marcado o receptor *NMDA* glutamatérgico na camada disgranular do CIP, com o anticorpo primário Anti-*NMDA*R1, Rabbit polyclonal seguido do anticorpo secundário Alexa Fluor 594 conjugate – Goat anti-Mouse IgG (H+L) (1:2000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Por fim, as lâminas foram cobertas com uma lamela de Prolong com 4 ', 6-Diamidino-2 dicloridrato de -fenilindol (DAPI) (Life Technologies, Camarillo, CA, EUA).

3.7.3 DROGAS NEUROTRAÇADORAS

Foram utilizadas a biodextrana (BDA) não-fluorescente de peso molecular 3000 ou o BDA 3.000 conjugada com *cascade blue* (BDA-CB) fluorescente.

3.8 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DA CAMADA DISGRANULAR DO CIP

Uma semana após a cirurgia estereotáxica (para implantação do eletrodo ou quimitrodo na camada disgranular do CIP), os animais foram colocados em uma arena circular (60 cm de diâmetro e 50 cm de altura com o chão dividido em 12 seções), com o compartimento experimental iluminado com 40-W de lâmpada fluorescente (350 lx no chão da arena nível). Depois, o eletrodo implantado no CIP, foi ligado a um gerador de estímulos (STG3008-FA, sistema multicanal, Alemanha), o que permitiu aplicar corrente de pulsos (largura de impulso de cátodo 100µs, intervalo de pulso 100 e pulso anódico largura de 100 µs durante 15 segundos).

A neuroestimulação cortical foi realizada na intensidade de 20 μ A por 15 segundos (segundo MEDEIROS e cols., 2019; NEGRINI-FERRARI e cols., 2021;

FERREIRA e cols., 2022) em animais com e sem dor neuropática (CCI ou *Sham*) conforme distribuição dos grupos descrito na tabela 1. Após a realização da neuroestimulação no campo aberto, o comportamento do animal foi avaliado por 60 segundos, e em seguido, o mesmo foi levado para o aparato de von Frey para aferição da alodinia mecânica e a alodinia ao frio. Cada animal foi utilizado apenas uma vez e foi estimulado eletricamente uma vez no CIP disgranular. Um grupo controle foi realizado, através da implantação do eletrodo, mas sem a estimulação do CIP (0 μ A/15 s). O efeito da neuroestimulação cortical sobre o teste de alodinia mecânica (teste de *von Frey*) e de alodinia ao frio (teste da acetona), em animais com ou sem DNC (CCI ou *Sham*) foi avaliado por até 30 minutos após a neuroestimulação do CIP.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais relacionados à neuroestimulação elétrica da camada disgranular do córtex insular posterior (EECIP) em animais com ou sem dor neuropática crônica (DNC) induzida por CCI ou *Sham*, respectivamente.

Procedimento Cirúrgico	Neuroestimulação cortical	Número de animais por grupo (n)
Sham	EECIP 0 µA/15 s	8
Sham	EECIP 20 µA/15 s	8
CCI	EECIP 0 µA/15 s	7
CCI	EECIP 20 µA/15 s	8

3.8.1 DESENHO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE NEUROESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NO CIP DISGRANULAR



FIGURA 6 – Representação esquemática da sequência temporal dos experimentos envolvendo a neuroestimulação elétrica da camada disgranular do CIP por meio do equipamento *deep brain stimulation* (DBS) em ratos com ou sem DNC.

3.9 BLOQUEIO DOS RECEPTORES *NMDA* SEGUIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO CIP DISGRANULAR

Grupos independentes de animais (n=8 por grupo), foram submetidos após 7 dias da cirurgia estereotáxica a implantação de um quimitrodo (cânula-guia acoplada ao eletrodo) no CIP disgranular. Foi realizada a microinjeção de 200 nL do antagonista seletivos de receptores *NMDA*, o LY235959 a 2, 4 e 8 nmol no CIP disgranular conforme descrição na tabela 2. Para microinjeção no CIP, uma microagulha (Mizzi), conectada a uma microsseringa (Hamilton, 10 μ L) foi introduzida no quimitrodo, e ultrapassando a sua extremidade final em 1 mm. Um catéter de polietileno foi acoplado à microagulha para monitorar as microinjeções, que serão feitas através de uma bomba de infusão de drogas (Stoelting), e em seguida, após 5 minutos da microinjeção, foi realizado a neuroestimulação no mesmo local para analisar o efeito do bloqueio de receptores *NMDA* no CIP disgranular.

Tabela 2 Distribuição dos grupos experimentais que foram estudados para avaliar o

 bloqueio do receptor *NMDA*, seguida da neuroestimulação do CIP (EECIP).

Procedimento	Tratamento	Número de animais por
Cirurgico		grupo (n)
CCI	Veículo CIP + EECIP 0 µA/15s	8
CCI	Veículo CIP + EECIP 20 µA/15s	8
CCI	LY235959 2 nmol CIP + EECIP 20 µA/15s	8
CCI	LY235959 4 nmol CIP + EECIP 20 μ A/15s	7
CCI	LY235959 8 nmol CIP + EECIP 20 μ A/15s	8
CCI	LY235959 8 nmol CIP + EECIP 0 µA/15s	8
Sham	LY235959 8 nmol CIP + EECIP 20 μ A/15 s	8
Sham	Veículo CIP + EECIP 0 µA/15 s	7
Sham	Veículo CIP + EECIP 20 µA/15 s	8
Sham	LY235959 8 nmol CIP + EECIP 0 µA/15s	4

3.9.1 **DESENHO** DO **PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL** DE **BLOQUEIO** DO RECEPTOR **NMDA** DO CIP Е EM **SEGUIDA** NEUROESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO CIP



FIGURA 7 – Representação esquemática da sequência temporal dos procedimentos experimentais envolvendo o bloqueio do receptor do tipo *NMDA* no CIP, por meio da microinjeção do antagonista LY235959, seguida da neuroestimulação do CIP, avaliando-se a DNC.

3.10 DROGAS

Foram utilizados salina fisiológica (NaCl 0,9%) para diluir o antagonista seletivo de receptor *NMDA*, o LY235959 nas concentrações de 2, 4 e 8nmol. O veículo e a droga foram administrados randomicamente no volume de 200nL, e em grupos independentes de animais.

3.11 HISTOLOGIA

Após a realização dos procedimentos neurofisiológicos e neurofarmacológicos, os animais foram anestesiados através da administração por via IP, com 3 mL de solução de uretana 25 %, perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução de NaCl a 0,9 %, em volume suficiente para retirar todo o sangue do animal, seguida de solução tamponada de paraformaldeído 4 %, em volume suficiente para fixar os tecidos. Os encéfalos foram retirados e mantidos refrigerados, no fixador (paraformoldeído 4 %) por no mínimo 24h e, em seguida, mergulhados em solução de sacarose 20%, guardados também em geladeira para preservação, por 24 h. Após estes processos, foram congelados e cortados com o auxílio de um micrótomo, em secções coronais de 40 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro, gelatinizados, secos ao ar ambiente e corados com azul de metileno. Posteriormente, os cortes foram analisados com o auxílio de microscopia de luz (AxioImager Z1; Zeiss), e a posição das pontas dos eletrodos de estimulação e das agulhas de microinjeção no neuroeixo, foram assinalados em anagramas do atlas de Paxinos & Watson (2005). Somente animais com sinais de presença da extremidade final do eletrodo ou cânula-guia dentro da camada disgranular do CIP foram incluídos na análise estatística.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o teste estatístico de Análise de Variância (TWO-WAY ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo pósteste de *Tukey* para comparação intra e entre os grupos. Os resultados que apresentaram um valor de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Desta forma, foi analisado o efeito da estimulação de acordo com o tempo. Para os dados relacionados ao Teste de Campo Aberto (*open field test*), inicialmente foi realizado o teste Shapiro-Wilk para avaliar se os dados apresentavam uma distribuição normal. Os grupos que não apresentaram uma distribuição normal foram submetidos ao teste não-paramétrico de KrusKal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Foi utilizado o programa *Graph Prism* (versão 8.0.2 *GraphPad Software*, EUA) para análise estatística e confecção dos gráficos.

4. RESULTADOS

4.1 Estudo neuroanatômico das conexões aferentes e eferentes da subdivisão disgranular do CIP para núcleos reticulares pontinos e córtex somatossensorial secundário

Foi realizado o estudo das conexões entre os neurônios do CIP e outras áreas neocorticais ou com as estruturas do sistema modulador da dor marcada com neurotraçador endógeno situado no tronco encefálico. Foi realizado a microinjeção do neurotraçador Biodextrana conjugado com Cascade Blue fluorescente (BDA-CB) de peso molecular 3.000 (Figura 8A e B) ou do neurotraçador de BDA 3.000 não-fluorescente (Figura 9A e B) na região disgranular do CIP.

Neurônios marcados com neurotraçador BDA-CB foram encontrados no córtex somatossensorial secundário (S₂) conectados à região disgranular do CIP de ratos Wistar,

conforme mostrado na Figura 8C. Células neuronais, fibras axonais e botões terminais marcadas com neurotraçador BDA não-fluorescente foram encontrados no núcleo reticular pontino caudal (*PnC*), sugerindo uma conexão recíproca entre a região disgranular do CIP e o *PnC*, conforme mostrado na Figura 9C e D. Pericários neuroniais e fibras axonais foram marcados para o neurotraçador BDA no núcleo reticular parvicelular (*PCRtA*), situado dorsolateralmente ao núcleo reticular pontino caudal, conforme mostrado na figura 9E e F, sugerindo assim, saídas de vias para a região disgranular do CIP. Finalmente, pericários neuroniais e fibras axonais marcados com neurotraçador BDA também foram encontrados no centro de controle inibitório da área tegmental ventral GABAérgica núcleo tegmental dorsomedial (*DMTg*), sugerindo saídas modulatórias atingindo a região disgranular do CIP, como mostrado na Figura 9G.



FIGURA 8 – Fotomicrografias de secções coronais do CIP disgranular de ratos Wistar. Sítios localizados no CIP na divisão disgranular. A: 500 μ m, B: 100 μ m e conexão ipsilateral com S₂ em C: 50 μ m. (A) Representação diagramática de uma seção transversal, mostrando confirmação do local de microinjeção (* n=1) de biodextrana (BDA 3.000) conjugado com *cascade blue*, um marcador neuronial bidirecional fluorescente, no CIP disgranular representado em um desenho modificado do cérebro de rato de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005). (B) Microinjeção mostrando um local representativo de BDA (5X) em CIP disgranular com corpos celulares marcados (seta branca). (C) Fotomicrografia de uma secção coronal representando o córtex

somatossensorial secundário (S_2) de um rato Wistar evidenciando conexões neurais entre neurônios do CIP disgranular e do S_2 .



FIGURA 9 – Fotomicrografias de cortes transversais do córtex insular posterior (CIP) disgranular de ratos Wistar. (**A**) Representação diagramática de uma secção transversal, mostrando a confirmação histológica do local de microinjeção (círculo preto n = 4) de biodextrana (BDA) não-fluorescente, um traçador bidirecional, de peso molecular 3000, no CIP disgranular representado em um desenho modificado do cérebro de rato de acordo com o atlás de Paxinos e Watson (2005). (**B**) Local representativo do sítio da microinjeção de BDA no CIP disgranular (seta preta). (**C e D**) Fotomicrografia de secção coronal representativa de núcleos pontinos de rato Wistar mostrando conexões neurais entre neurônios do CIP disgranular e o núcleo reticular pontino caudal (*PnC*): fibras axonais (ponta de seta preta); botões terminais (ponta de seta aberta) e corpos celulares (seta preta). (**G**) Fotomicrografias representativas de cortes transversais da área tegmental dorsomedial (*DMTg*) com fibras axonais (ponta de seta preta), que se conectam com o CIP disgranular.

4.2 Imunofluorescência de receptores *NMDA* na subdivisão disgranular do CIP



FIGURA 10 – Fotomicrografias de cortes transversais do córtex insular posterior (CIP) disgranular de ratos Wistar. (A) Representação diagramática de uma secção transversal, mostrando a confirmação histológica do local de receptores *NMDA* positivos para os anticorpos primário Anti-*NMDA*R1, Rabbit polyclonal e secundário Alexa Fluor 594

conjugate – Goat anti-Mouse IgG (H+L) no CIP disgranular representado em um anagrama modificado do cérebro de rato de acordo com o atlás de Paxinos e Watson (2005). (**B**) Fotomicrografia 20X e (**C**) 40X de secção coronal representativa com a presença de receptores *NMDA* ao redor de corpos celulares em DAPI (seta branca) e corpos celulares marcados com DAPI sem a presença de receptores *NMDA* (ponta de seta branca).

Foi realizado estudo imunofluorescente para investigar a presença de receptores *NMDA* glutamatérgicos envolvidos com respostas modulatórias em condições de DN crônica na camada disgranular do CIP. A marcação com anticorpo primário Anti-*NMDA*R1, Rabbit polyclonal e secundário Alexa Fluor 594 conjugate – Goat anti-Mouse IgG (H+L) mostrou receptores *NMDA* positivos de coloração avermelhada co-localizados ao redor de corpos celulares mostrados em azul marcados com DAPI (Figura 10A). No entanto, é possível observar que há a presença de corpos celulares que não foram marcados com o receptor *NMDA* sugerindo a presença de outros receptores (Figura 10 B e C).

4.3 Efeito da Neuroestimulação Elétrica (por meio do aparelho DBS) do CIP disgranular sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica (DNC)

4.3.1 Análise histológica

Os resultados obtidos foram baseados apenas nas respostas de animais cujo posicionamento do eletrodo para neuroestimulação estavam na região disgranular do CIP. Na figura 10A, é possível observar a representação do local do eletrodo de estimulação no CIP disgranular. Os anagramas dos sítios de neuroestimulação do CIP disgranular estão representados na figura 10B.



FIGURA 11 – Representação dos sítios de neuroestimulação elétrica na região disgranular do CIP, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005). A: Representação e confirmação histológica (hematoxilina-eosina) da posição do eletrodo de estimulação no CIP disgranular. B: Representações esquemáticas de sítios de estimulação elétrica histologicamente identificados (\circ) EECIP a 0 μ A/15 s (Sham), (\bullet) EECIP a 20 μ A/15 s (Sham), (\Box) EECIP a 0 μ A/15 s (CCI), (\bullet) EECIP a 20 μ A/15 s (CCI), realizadas em animais com dor neuropática crônica (DNC).

4.3.2 Efeito da Neuroestimulação do CIP disgranular sobre o teste de alodinia mecânica

Com o objetivo de investigar a participação da subdivisão disgranular do CIP na dor neuropática periférica crônica induzida pela CCI, foi realizada a estimulação elétrica do CIP a 20 µA por 15 segundos contralateralmente ao membro posterior operado (*Sham* ou CCI), seguido pela aferição da alodinia mecânica, através do teste de *von Frey* em animais com ou sem DNC.

A estimulação elétrica do CIP (EECIP) disgranular diminuiu a alodinia mecânica, causando analgesia nos animais avaliados através do teste de *von Frey* após 21 da cirurgia de CCI.

O teste de análise de variância *Two-way ANOVA* mostrou que houve significante efeito sobre o limiar de alodinia mecânica no tratamento $[F_{(3,27)} = 22,02; p < 0,001]$, tempo $[F_{(4,108)} = 38,03; p < 0,001]$ e interação do tratamento *versus* o tempo $[F_{(12,108)} =$ 15,17; p < 0,001] em animais que passaram pela EECIP 21 dias após a CCI. A análise *post hoc* do teste de múltiplas comparações de *Tukey* evidenciou que o grupo sem estímulo no CIP/CCI (0 µA/15 s) teve alodinia mecânica (pata direita) significativamente maior quando comparado com o grupo sem estímulo no CIP/Sham (20 µA/15 s) (p <0,001) (Figura 11A). Além disso, evidenciamos que a neuroestimulação (20 µA/15s) no CIP/CCI diminuiu a alodinia mecânica na pata direita dos animais, quando comparado com o grupo sem neuroestimulação (0 µA/15s) no CIP/CCI (Figura 11A); ou seja, a neuroestimulação elétrica na região disgranular do CIP causou analgesia nos animais com DNC 10 minutos após a estimulação. Em adição, quando a alodinia mecânica dos animais foram aferidas na pata esquerda, não houve alteração dos limiares nociceptivos mecânicos dos animais CCI ou *Sham* (Figura 11B).



FIGURA 12 - Efeito da estimulação elétrica no CIP (EECIP) sobre o limiar de alodinia mecânica dos animais através do teste de *von Frey* 21 dias após a CCI ou Sham (n=8) realizada na pata direita (A) e na pata esquerda (B). *, denota diferença nas repostas de alodinia mecânica entre os grupos *Sham* e CCI. #, denota diferença entre os grupos CCI com ($20 \mu A/15 s$) e sem estimulação ($0 \mu A/15 s$). Houve diminuição da dor neuropática (aumentando o limiar) no primeiro tempo imediatamente após a EECIP. LB1: linha de base 1, antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI ou *Sham*; LB2: linha de base 2, após 21 dias da CCI ou *Sham*; Seta B: após a LB2, EECIP dos animais seguido do teste de *von Frey* realizada até 20 minutos.

4.3.3 Efeito da Neuroestimulação do CIP disgranular sobre o teste de acetona (alodinia ao frio)

Com o objetivo de investigar a participação da subdivisão disgranular do CIP na dor neuropática periférica crônica induzida pela CCI, foi realizada a estimulação elétrica do CIP a 20 μ A por 15 segundos contralateralmente ao membro posterior operado, seguido pela aferição da alodinia ao frio, através do teste de acetona em animais com (CCI) ou sem (*Sham*) DNC. A estimulação elétrica no CIP (EECIP) disgranular diminuiu a alodinia ao frio, causando analgesia nos animais avaliados através do teste de acetona após 21 da cirurgia de CCI.

O teste de análise de variância *Two-way ANOVA* mostrou que houve significante efeito sobre o limiar de alodinia ao frio no tratamento $[F_{(3,27)} = 29,40; p < 0,001]$, tempo $[F_{(4,108)} = 35,89; p < 0,001]$ e interação do tratamento *versus* o tempo $[F_{(12,108)} = 13,41; p < 0,001]$ em animais que passaram pela EECIP 21 dias após o CCI ou *Sham*. A análise *post hoc* do teste de múltiplas comparações de *Tukey* evidenciou que o grupo sem estímulo (0 µA/15 s) no CIP/CCI teve alodinia ao frio (pata direita) significativamente maior quando comparado com o grupo sem estímulo (0 µA/15 s) no CIP/Sham (p < 0,001) (Figura 12A). Ou seja, a CCI foi eficaz em produzir a DNC em animais. No entanto, evidenciamos que a neuroestimulação (20 µA/15 s) no CIP/CCI não diminuiu significativamente a alodinia ao frio na pata direita dos animais, quando comparado com o grupo sem neuroestimulação (0 µA/15 s) no CIP/CCI não diminuiu significativamente a alodinia ao frio dos animais foram aferidas na pata esquerda, não houve alteração dos limiares nociceptivos térmico dos animais CCI ou *Sham* (Figura 12B). Teste de acetona



FIGURA 13 – Efeito da estimulação elétrica no CIP (EECIP) sobre o índice de alodinia ao frio dos animais através do teste acetona 21 dias após a CCI (n=8 com EECIP e n=7 sem EECIP) ou *Sham* (n= 8 com EECIP e n=8 sem EECIP) realizada na pata direita (A) e na pata esquerda (B). *, denota animais CCI com EECIP (20 μ A/15 s) apresentando aumento no limiar de alodinia ao frio imediatamente após a estimulação. #, denota animais CCI sem estimulação (0 μ A/15 s) mantendo a alodinia ao frio e diferença entre animais CCI sem EECIP e com EECIP. LB1: linha de base 1, antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI ou Sham; LB2: linha de base 2, após 21 dias da CCI ou *Sham*; Seta B: após a LB2, realização da EECIP dos animais, seguido do teste de acetona até 30 minutos.

4.3.4 Efeito da Neuroestimulação do CIP disgranular sobre o teste de campo aberto

Para avaliação da atividade locomotora e exploratória, assim como do comportamento associado à ansiedade, foi realizado o teste de campo aberto (*open field test*) em que os animais foram colocados em uma arena circular por um período de 5

minutos imediatamente após a estimulação elétrica do CIP (EECIP). Neste processo, foi observado que o comportamento de levantamento e cruzamento entre os animais de todos os grupos (CCI com e sem estimulação elétrica e *Sham* com e sem estimulação elétrica) não se alteraram.

A análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CCI e *Sham* com e sem estimulação [H= 4.878 p > 0,05, respectivamente], dados que podem ser observados na figura 13A.

Em relação a avaliação do comportamento relacionado à ansiedade, 21 dias após a cirurgia, os ratos de ambos os grupos *Sham* e CCI com e sem EECIP foram testados no teste de campo aberto para avaliar o tempo de permanência na área central e periférica do aparato. Em relação ao tempo de permanência no centro da arena, não houve diferença estatisticamente significante [H=3.974; p > 0,05] entre os grupos. Muito embora não houve diferença estatística (p > 0,05), observamos uma tendência do grupo CCI com estimulação em permanecer um tempo maior no centro da arena quando comparado com animais CCI sem estimulação (Figura 13B). Em relação aos animais *Sham*, há uma tendência de aumento do tempo de permanência no centro do campo aberto em relação aos animais CCI sem estimulação (p > 0,05) (figura 13B). Em relação aos tempo de permanência na periferia, também não houve diferença significativa entre os grupos [H= 3,599; p > 0,05] (Figura 13C).

Teste de Campo Aberto



FIGURA 14 - Representação dos resultados do teste de campo aberto para avaliar o comportamento exploratório e locomotor (A) em uma arena circular entre animais *sham* e CCI (cruzamentos e levantamentos) com (20 μ A/15 s) ou sem (0 μ A/15 s) a estimulação elétrica do CIP, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. Em (B e C) representação dos resultados do teste de campo aberto para avaliar o tempo de permanência no centro da arena e na periferia em animais CCI e *Sham* com e sem estimulação elétrica do CIP disgranular.

4.4 Efeito do Bloqueio de receptores *NMDA* seguida pela estimulação elétrica do CIP sobre a Modulação da Dor Neuropática Crônica

4.4.1 Análise histológica

Os resultados obtidos foram baseados apenas nas respostas de animais cujo posicionamento do quimitrodo para microinjeção do antagonista *NMDA*, o LY235959 e para a neuroestimulação elétrica estavam na região disgranular do CIP. Na figura 14A, é possível observar a representação do local do quimitrodo de estimulação no CIP disgranular. Os anagramas dos sítios de microinjeção do antagonista e de neuroestimulação elétrica do CIP disgranular estão representados na figura 14B.



FIGURA 15 – Representação dos sítios de microinjeção do antagonista seletivo *NMDA*, o LY235959 e do sítio de neuroestimulação elétrica na região disgranular do CIP (EECIP), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005). **A:** Representação do quimitrodo de estimulação no CIP disgranular. **B:** Representações esquemáticas de sítios da microinjeção e da neuroestimulação elétrica histologicamente identificados no CIP disgranular realizadas em animais com (CCI) e sem (*Sham*) dor neuropática crônica (DNC) (\odot) LY235959 2 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 4 nmol CIP + EECIP a 20 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 4 nmol CIP + EECIP a 0 µA/15 s (CCI), (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 0 µA/15 s (CCI) A (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP A 0 µA/15 s (CCI) A (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP A (\bullet) PA/15 S (CCI) A (\bullet) LY235959 8 nmol CIP + EECIP A (\bullet) LY235959 A (\bullet) A (\bullet) LY235959 A (\bullet) A (\bullet) LY
s (CCI), (\diamond) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 20 μ A/15 s (*Sham*), (\diamond) Veículo CIP + EECIP a 0 μ A/15 s (*Sham*), (Δ) LY235959 8 nmol CIP + EECIP a 20 μ A/15 s (CCI), (*) Veículo CIP + EECIP a 20 μ A/15 s (*Sham*), (#) LY235959 8 nmol + EECIP a 0 μ A/15 s (*Sham*).

4.4.2 Efeito do bloqueio de receptores NMDA seguida da Neuroestimulação do CIP disgranular sobre alodinia mecânica (teste de von Frey)

Com o objetivo de investigar a participação dos receptores *NMDA* glutamatérgicos da subdivisão disgranular do CIP sobre a dor neuropática periférica crônica induzida pela CCI, foi realizado o bloqueio dos receptores *NMDA* por meio da microinjeção de LY235959 nas concentrações de 2, 4 e 8 nmol, seguida pela neuroestimulação elétrica do CIP (EECIP) a 20 μ A por 15 segundos contralateralmente ao membro posterior operado, seguido pela aferição da alodinia mecânica, através do teste de *von Frey* em animais com (CCI) ou sem (*Sham*) DNC.

A microinjeção de LY235959 na concentração de 8nmol bloqueou o efeito analgésico produzido pela EECIP, mantendo o limiar de alodinia mecânica baixo, quando comparado com o grupo veículo + EECIP nos animais avaliados através do teste de *von Frey* 21 após a cirurgia de CCI.

O teste de análise de variância *Two-way ANOVA* mostrou que houve significante efeito sobre o limiar de alodinia mecânica no tratamento $[F_{(5,41)} = 14,29; p < 0,001]$, tempo $[F_{(4,164)} = 165,6; p < 0,001]$ e interação do tratamento *versus* o tempo $[F_{(20,164)} =$ 3,217; p < 0,001] em animais que passaram pelo bloqueio seguido de EECIP 21 dias após a CCI. A análise *post hoc* do teste de múltiplas comparações de *Tukey* evidenciou que o grupo que recebeu microinjeção de LY235959 na concentração de 8 nmol bloqueou por até 10 minutos o efeito analgésico produzido pela EECIP quando comparado com o grupo veículo + EECIP (p < 0,001). O bloqueio dos receptores *NMDA* com 8 nmol seguido pela EECIP não foi diferente do grupo que recebeu a microinjeção de 8 nmol sem EECIP, denotando que o bloqueio farmacológico dos receptores *NMDA* por si só não altera o limiar de alodinia mecânica (p > 0,05 em todos os tempos). Além disso, o bloqueio prévio no CIP com a microinjeção de LY235959 a 8 nmol foi diferente estatisticamente quando comparado com o grupo de 2 nmol imediatamente após a EECIP (p < 0,001) (Figura 15A). Em adição, quando a alodinia mecânica dos animais foram aferidas na pata esquerda, não houve alteração dos limiares nociceptivos mecânicos dos animais CCI (p < 0,05) (Figura 15B).

Em relação aos dados de teste de *von Frey* em animais *Sham*, a análise de variância *Two-way ANOVA* mostrou que não houve diferença estatística significante entre os grupos tratados com veículo ou 8 nmol seguido pela EECIP $[F_{(3,115)} = 0,9172; p > 0,05]$, tempo $[F_{(4,115)} = 4,995; p < 0,001]$ e interação do tratamento *versus* o tempo $[F_{(12,115)} = 0,4117; p > 0,05]$ em animais que passaram pelo bloqueio de receptores *NMDA*, seguido de EECIP 21 dias após o procedimento *Sham*. A análise *post hoc* do teste de múltiplas comparações de *Tukey* evidenciou que não houve diferença entre os grupos avaliados em todos os tempos (p > 0,05) (Figura 16A-B).



FIGURA 16 - Efeito do bloqueio de receptores do tipo *NMDA* com a microinjeção do antagonista seletivo LY235959 (a 2, 4 e 8 nmol/200 nL) no CIP disgranular, seguida pela neuroestimulação elétrica (EECIP) sobre o limiar de alodinia mecânica dos animais, através do teste de *von Frey* 21 dias após a CCI (n=8) realizada na pata direita (A) e na pata esquerda (B). #, denota diferença significativa em relação ao grupo veículo + sem EECIP. *, denota diferença significativa em relação ao grupo veículo + EECIP. LB1: linha de base 1, antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI; LB2, após 21 dias da CCI ou foi aferido nova linha de base; Seta B: após a LB2, foi realizada a microinjeção de LY235959 ou veículo, seguida de EECIP ou sem EECIP e o teste de *von Frey* foi realizado até 20 minutos.



FIGURA 17 - Efeito do bloqueio de receptores *NMDA* com a microinjeção antagonista seletivo LY235959 na dose de 8 nmol ou veículo no CIP disgranular, seguida pela neuroestimulação elétrica (EECIP) sobre o limiar de alodinia mecânica através do teste de *von Frey* 21 dias após o procedimento Sham (n=4 a 8) realizada na pata direita (A) e na pata esquerda (B) dos animais. LB1: linha de base 1, antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia *Sham*; LB2: após 21 dias do procedimento *Sham* foi aferido nova linha de base; Seta B: após a LB2, foi realizada a microinjeção de LY235959 ou veículo, seguida por EECIP e o teste de *von Frey* foi realizado até 20 minutos.

4.4.3 Efeito do bloqueio de receptores NMDA seguida da Neuroestimulação do CIP disgranular sobre o teste de alodinia ao frio (teste de acetona)

Com o objetivo de investigar a participação dos receptores *NMDA* glutamatérgicos da subdivisão disgranular do CIP sobre a dor neuropática periférica crônica induzida pela CCI, foi realizado a microinjeção do antagonista seletivo dos receptores *NMDA* nas concentrações de 2, 4 e 8 nmol, seguida pela neuroestimulação elétrica do CIP (EECIP) a 20µA por 15 segundos contralateralmente ao membro posterior operado. Em seguida foi aferido a alodinia ao frio, através do teste de acetona em animais com (CCI) ou sem (*Sham*) DNC.

A microinjeção de LY235959 na concentração de 8 nmol bloqueou o efeito analgésico produzido pela EECIP imediatamente, mantendo o limiar de alodinia ao frio baixo quando comparado com o grupo veículo + EECIP nos animais após 21 da cirurgia de CCI. O teste de análise de variância Two-way ANOVA mostrou que houve significante efeito sobre o limiar de alodinia ao frio no tratamento $[F_{(5,41)} = 2,554; p < 0,05]$, tempo $[F_{(4,164)} = 92,09; p < 0,0001]$ e interação do tratamento *versus* o tempo $[F_{(20,164)} = 2,885; p$ < 0,01] em animais que passaram pelo bloqueio receptores NMDA, seguido da EECIP 21 dias após a CCI. A análise post hoc do teste de múltiplas comparações de Tukey evidenciou que o grupo microinjeção de LY235959 na concentração de 8 nmol bloqueou o efeito analgésico produzido pela EECIP quando comparado com o grupo veículo + EECIP (p < 0.05). O bloqueio dos receptores NMDA com microinieção de LY235959 a 8 nmol, seguido pela EECIP não foi diferente do grupo que recebeu a microinjeção de 8 nmol sem EECIP, denotando que o bloqueio por si só não altera o limiar de alodinia ao frio (p > 0.05 em todos os tempos). Além disso, o bloqueio prévio dos receptores NMDA do CIP através da microinjeção de LY235959 a 8 nmol foi diferente estatisticamente quando comparado com o grupo LY235959 a 2 nmol imediatamente após a EECIP (p < p

0,05) (Figura 17A). Em adição, quando a alodinia ao frio dos animais foi aferida na pata esquerda, não houve alteração dos limiares nociceptivos dos animais CCI (p > 0,05) (Figura 17B).

Em relação aos dados no teste de acetona em animais *Sham*, o teste de análise de variância *Two-way ANOVA* mostrou que não houve diferença estatística significante entre os grupos tratados com veículo ou 8 nmol seguido pela neuroestimulação do CIP $[F_{(3,115)} = 2,608; p > 0,05]$, tempo $[F_{(4,115)} = 5,890; p > 0,05]$ e interação do tratamento *versus* o tempo $[F_{(12,115)} = 0,9816; p > 0,05]$ em animais que passaram pelo bloqueio seguido de neuroestimulação elétrica no CIP 21 dias após o procedimento Sham. A análise *post hoc* do teste de múltiplas comparações de *Tukey* evidenciou que não houve diferença entre os grupos avaliados em todos os tempos (Figura 18A-B).

Teste de Acetona



FIGURA 18 - Efeito do bloqueio de receptores *NMDA* através da microinjeção do antagonista seletivo LY235959 (a 2, 4 e 8 nmol/200 nL) no CIP disgranular, seguida pela neuroestimulação elétrica (EECIP) sobre o limiar de alodinia ao frio dos animais através do teste de acetona 21 dias após a CCI (n=8) realizada na pata direita (A) e na pata esquerda (B). #, denota diferença significativa em relação ao grupo veículo + sem EECIP. *, denota diferença significativa em relação ao grupo veículo + EECIP LB1: linha de base 1, antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI; LB2: após 21 dias da CCI foi aferido nova linha de base; Seta B: após a LB2, microinjeção de LY235959 + EECIP foi realizada nos animais e o teste de acetona foi realizada até 30 minutos.

Teste de Acetona



FIGURA 19 - Efeito do bloqueio de receptores do tipo *NMDA* com a microinjeção do antagonista seletivo LY235959 na dose de 8 nmol ou veículo no CIP disgranular, seguida pela neuroestimulação elétrica (EECIP) sobre o limiar de alodinia mecânica através do teste de acetona 21 dias após o procedimento *Sham* (n=8) realizada na pata direita (A) e na pata esquerda (B) dos animais. LB1: linha de base 1, antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia *Sham*; LB2: após 21 dias do procedimento *Sham* foi aferido nova linha de base; Seta B: após a LB2, foi realizada a microinjeção de LY235959 ou veículo, seguido por EECIP e o teste de *von Frey* foi realizado até 20 minutos.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, estudamos as bases neurais, fisiológicas e farmacológicas que envolvem o CIP disgranular na modulação da dor em animais com DCN, abordando a neuroestimulação desta área cortical como forma de melhor a compreensão dos mecanismos envolvidos na neuromodulação e em processos antinociceptivos. Assim, utilizamos modelo de mononeuropatia periférica adaptado por Medeiros e colaboradores (2019a, b; 2020a, b, c, d; 2021), que compreende apenas uma ligadura ao redor do nervo isquiático. Este modelo de neuropatia foi capaz de induzir alodinia mecânica e térmica em ratos Wistar observado através dos testes de *von Frey* e acetona 21 dias após a CCI.

Os mecanismos que envolvem ativação periférica e espinal são mais bem estudados do que os mecanismos corticais e supraespinais, tornando-se objeto de interesse em nosso laboratório avaliar a participação dessas áreas na geração, amplificação e modulação da dor crônica (DC) e dor neuropática (DN). Esse dano, tal qual a lesão de nervo, gera no membro correspondente hipersensibilidade mecânica e térmica, capazes de induzir alterações comportamentais sensórias, como alodinia, hiperalgesia e dor espontânea (BENNETT e XIE, 1988).

Nossos resultados também demonstraram que a neuroestimulação elétrica a 20 μ A por 15 s da subdivisão disgranular do CIP (EECIP) foi capaz de influenciar a alodinia mecânica e térmica (frio) da pata traseira, ocasionando um aumento dos limiares de alodinia mecânica e ao frio imediatamente após a neuroestimulação. A analgesia teve duração de 10 minutos, e após este período, houve diminuição da analgesia, porém, não retornando totalmente aos limiares condizentes com a alodinia basal verificada na linha de base 2 no presente estudo.

Sabe-se que estímulos dolorosos ativam o CI e a maioria dos estudos por imageamento cerebral indicam que a ativação é bilateral, porém, pouco se sabe sobre os mecanismos modulatórios que envolvem essas respostas (OSTROWSKY et al, 2002). Além disso, observa-se que o CI é constantemente ativado em condições de DN (APKARIAN, BUSHNELL et al. 2005).

Há um crescente interesse pela compreensão dos mecanismos envolvidos na neuromodulação, e até o momento, a região do córtex motor primário (M₁) constitui em uma área cortical de interesse na clínica, uma vez que está envolvido com a ativação de projeções córtico-talâmicas, que ativariam o tálamo lateral, e consequentemente, ativando áreas como CCA, CI, córtex orbitofrontal. Todas as vias mencionadas acima, uma vez participando da circuitaria neural, podem ativar as vias do sistema descendente inibitório de dor (GARCIA-LARREA e PEYRON, 2007). Portanto, considerar essas áreas nãomotoras como futuros alvos de investigação ampliará os conhecimentos sobre modelos pré-clínicos e clínicos para atenuação de dor.

Um estudo com 1.768 pacientes utilizando meta-análise de ressonância magnética funcional conduzido por Kurth e colaboradores (2010), revelou que a ínsula média e posterior era crucialmente ativada após os estímulos dolorosos induzidos por temperatura, estimulação elétrica, física ou hipersensibilidade e em diferentes partes do corpo.

De acordo com Dimov e colaboradores (2018), a estimulação do CIP disgranular e agranular aumentou substancialmente o limiar analgésico, revertendo a hipersensibilidade mecânica e evidenciando que receptores opióides e canabinóides podem estar envolvidos na mediação da neuroquímica desta antinocicepção. O estudo realizou única estimulação elétrica em animais com DN com duração de 15 min (frequência de 60 hz, largura de pulso 210 µs), contudo, não foi informado o tempo de duração dos efeitos antinociceptivos. Outro achado deste estudo, envolve a expressão aumentada dos receptores opióides e canabinóides na coluna dorsolateral da SCP, um importante núcleo do sistema endógeno de inibição de dor. Em nosso estudo, afim de se compreender os

mecanismos envolvidos na analgesia, realizamos a estimulação elétrica do CIP disgranular por 15 segundos (largura de pulso 300 µs), e obtemos efeito analgésico por 10 minutos em animais com DNC 21 dias após a CCI.

Compreender a influência dos parâmetros utilizados durante a estimulação é de grande importância (MORO e cols., 2002; DESBONNET e cols., 2004; KRINGELBACH e cols., 2007; MAEDA e cols., 2009,). A frequência, sobretudo, tem substancial influência na ativação dos elementos neurais. Além disso, a frequência e largura de pulso comumente usadas em pesquisas com animais são semelhantes às usadas na prática clínica (SESIA e cols., 2008, 2010; KLAVIR e cols., 2009, 2011; HAMANI e cols., 2010a, b; ROUAUD e cols., 2010).

Um papel neuromodulatório da subdivisão agranular do CI sobre a termonocicepção foi evidenciada. Através da inibição cortical por meio do aumento local da neurotransmissão inibitória GABAérgica (via ativação de receptores GABA_A), causa a ativação do sistema descendente modulatório e inibe as aferências de neurônios espinais nociceptivos, aumentando assim, o limiar de dor em roedores. Em contrapartida, a ativação de receptores GABA_B produz hiperalgesia por meio de projeções entre o CI com o complexo amigdalóide (JASMIN e cols., 2003).

No contexto do envolvimento de estruturas sub-corticais citadas acima, a regulação do medo e ansiedade também pode ser mediada por projeções do CIP para o complexo amigdalóide, sobretudo, o núcleo lateral e central. Esse mecanismo neural, torna o CIP bastante representativo não somente sobre estados corporais e sensoriais, mas abrangendo estados afetivos e emocionais que podem exercer regulação e modulação da dor (GEHRLACH e cols., 2019).

Em nosso estudo, foi observado que os animais com DNC se mantiveram na periferia da arena de campo aberto durante os 5 minutos avaliados. E quando foi

82

realizado a estimulação elétrica do CIP disgranular, houve uma tendência maior de exploração do centro da arena, denotando um comportamento associado como menos ansiedade. De acordo com Gehrlach e colaboradores (2019), a estimulação optogenética do CIP ativa neurônios glutamatérgicos que medeiam comportamentos relacionado a ansiedade. Eles concluíram que o aumento da atividade do CIP causou efeito ansiogênico com redução da exploração, em contrapartida, a inibição desta circuitaria de neurônios glutamatérgicos no CIP, aumentou a exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado.

Com esses dados, temos importantes evidências de que o CIP pode ser uma importante região cortical envolvida na elaboração de comportamentos do tipo ansiosos e de que antagonista glutamatérgicos nas regiões mais caudais do CIP, causa efeito ansiolítico e nas regiões mais rostrais do CIP, causa efeitos ansiogênicos. Esses achados podem ser explicados parcialmente em decorrência de diferentes populações neuroniais encontradas ao longo do eixo rostro-caudal da ínsula e o fluxo de informações da região caudal para rostral, alterando assim, a conectividade e funcionalidade (Méndez-Ruette e cols., 2019).

Há relatos na literatura mostrando a eficácia do sistema glutamatérgico em uma variedade de funções: como no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, no aprendizado, na memória, e incluindo, em condições de DN (VALLI, 2014). De fato, o CI possui receptores glutamatérgicos do tipo *NMDA*, e nessas diversas funções supracitadas, apresentou ativação cerebral em um contexto de aprendizagem, associados a melhores resultados comportamentais mediante administração de D-cicloserina, um agonista *NMDA* (KLASS e cols., 2017).

A rede cortical de processamento da DNC pode envolver o CIP (APKARIAN, BUSHNELL e cols., 2005). Demonstramos através de estudo imunohistoquímico, que os receptores do tipo *NMDA* estão presentes na camada disgranular do CIP em animais com DN crônica e acordo com o estudo neurofisiológico realizado no presente trabalho, a microinjeção do antagonista seletivo de receptores do tipo *NMDA*, o LY235959 (na maior concentração de 8 nmol), foi capaz de bloquear o efeito analgésico produzido pela EECIP. Os limiares de alodinia mecânica e térmicos foram mantidos baixos imediatamente após a EECIP. Quando a mesma concentração de LY235959 (8 nmol) foi microinjetada sem a presença da EECIP, não houve alteração do limiar de alodinia mecânica e alodinia ao frio, comprovando assim, que a droga por si só não causou alterações nos limiares de dor.

Com isso, observamos uma evidência que este receptor possui relação e participa da elaboração das respostas analgésicas em estágios crônicos de DN, como após 21 dias de CCI em roedores. Esses resultados confirmam parcialmente nossa hipótese do trabalho, e apoia a visão de que a analgesia induzida pelo EECIP envolve redes neurais dependentes do glutamato e da ativação dos receptores do tipo *NMDA*.

Receptores glutamatérgicos são encontrados em áreas corticais somatossensoriais, motoras e no córtex cingulado anterior (ACC). Desempenham um importante papel na modulação da dor aguda e inflamatória. Através de seus mecanismos centrais, há a inibição do aumento da transmissão de estímulos nociceptivos da pata inflamada (NETO e cols., 2001). Além disso, ZHUO (2016), evidenciou anatomicamente que os neurônios do CI e ACC provavelmente interajam contribuindo para o processo central da informação dolorosa.

Em adição, foi demonstrado que a estimulação elétrica do CM ativa neurônios do CIP, resultando em uma regulação positiva do limiar de dor, exercendo influência direta sobre o tálamo posterior e o sistema descendente inibitório de dor via ativação da SCP. Estes achados também mostram mudanças na atividade das estruturas corticais e

84

subcorticais envolvidas no processamento e modulação da dor (KISHIMA e cols., 2007). Também, há relatos de alterações na expressão de proteína c-FOS, que se mostra aumentada ao redor do eletrodo e do local de estimulação, demonstrando aumento na atividade neuronial observada após estimulação elétrica da ínsula; isto pode influenciar diretamente a ativação da via descendente inibitória da dor por meio de conexões com áreas relacionadas a neuromatriz da dor (ALONSO-MATIELO e cols., 2021).

O CM é um importante alvo de pesquisadores, e há um estudo mostrando que a estimulação elétrica do M_1 atenua a alodinia mecânica em roedores com DNC, através da participação e do recrutamento de receptores *NMDA* da SCPdm (NEGRINI-FERRARI e cols., 2021).

Os mecanismos farmacológicos envolvem canais ligados a receptores *NMDA* póssinápticos, que tendem a permanecer abertos por mais tempo, permitindo assim, um fluxo significativo de cálcio e uma rápida retirada de glutamato da sinapse por seus transportadores. Este mecanismo é necessário para a neurotransmissão excitatória normal e prevenção contra toxicidade induzida por glutamato. É provável que o CI também compartilhe vias de sinalização dependentes de cálcio em condições de lesão periférica e do nervo espinal, podendo desencadear uma regulação positiva dos receptores *NMDA* e produzir a LTP (ZHUO, 2016).

Não obstante, várias evidências na literatura vêm mostrando diferenças funcionais da participação das subregiões do CI em condições dolorosas e comportamentais. A inibição do aumento de receptores *NMDA* ou GluN2B no CI anterior, através de antagonistas, pode prevenir ou atenuar a DN. A microinjeção unilateral de antagonistas ionotrópicos do receptor de glutamato restaura para valores nociceptivos relacionados aos valores pré-lesão. Além disso, o aumento dos níveis endógenos de GABA ou o aumento

85

da sinalização nos receptores glicinérgicos inibitórios tiveram efeitos semelhantes aos dos antagonistas do receptor de glutamato (WATSON, 2016).

De outro modo, há relatos de que lesões excitotóxicas do CIP, causando morte celular através da microinjeção de *NMDA* na subdivisão granular caudal (CIGC), causa efeito antialodínico (BENISON e cols., 2011). A hipótese para esta modulação é via trato córtico-espinal, uma projeção que apresenta densas projeções intracorticais para o córtex sensório-motor, onde é a origem do trato (MILLER, 1987). De acordo com BALIKI, e cols., em 2003, o trato córtico-espinal contém fibras eferentes descendentes que podem provocar dor crônica. Além disso, o bloqueio do córtex sensório-motor produz atenuação da alodinia em ratos a longo prazo.

O CI está intimamente conectado com diversas áreas corticais (GERBELLA e cols., 2011, LUPPINO e cols., 1993, MESULAM e MUFSON, 1982b; MUFSON e MESULAM, 1982; MORECRAFT e cols., 2004), sua porção média e posterior recebe duas vezes mais entradas dos córtices sensoriais, além de projetar neurônios excitatórios e inibitórios para estriato envolvidos com a modulação de respostas motoras, para o complexo amigdalóide (bidirecionalmente) e para o tálamo (GERHLACH e cols., 2020). Evidências também sugerem um papel específico do córtex opérculo-insular na termonocicepção (ínsula granular posterior), onde a estimulação magnética transcraniana (TMS) (por corrente *Teta Burst* induz a redução bilateral da capacidade de perceber a dor pelo calor pelas fibras Aδ (termonociceptor) 20 min após a estimulação a laser em indivíduos saudáveis estimulados (ALGOET & MOURAUX, 2018). A TMS reduz as respostas dolorosas ao frio, além de ser uma técnica segura e bem tolerada, de acordo com Ciampi e colaboradores, em 2012.

Em adição, o CIGC contém eferências para S_1 e sugere a existência de um *loop* espinal-CIGC-S₁. De fato, o trato córtico-espinal, é postulado como sendo um

componente chave na manutenção da alodinia. Em nossa histologia, os sítios de neuroestimulação elétrica do CI, embora estivessem concentrados todos na parte posterior, não se concentraram nessa porção mais caudal, o que pode nos trazer informações adicionais sobre diferenças funcionais das subdivisões no que se refere a modulação da dor. É sabido que para estados de ansiedade, de acordo com Méndez-Ruette e colaboradores (2019), pode haver diferentes populações de neurônios ao longo do eixo rostro-caudal que permitem essas características específicas, e por fim, fornece uma base neuroanatômica e funcional para explicar os achados.

Uma conexão do CIP disgranular com o S_2 é confirmada por nosso estudo neuroanatômico através da microinjeção do neurotraçador fluorescente BDA conjugado com *cascade blue*. Abre-se assim, novas possibilidades para a compreensão dos mecanismos neurais e fisiopatológicos da analgesia encontradas no presente trabalho. Uma vez que as regiões insulares e somatossensorais, também chamadas de córtex opérculo-insulares são cruciais para a sensação de dor, o estudo com a aplicação de TMS sobre estas regiões diminui a sensibilidade de dor, além de reduzir dor visceral crônica e aumentar o limiar nociceptivo (VALMUNEN e cols., 2009).

Adicionalmente, nosso estudo neuroanatômico também evidenciou a presença de projeções do CIP disgranular com núcleos reticulares localizados na ponte. O neurotraçador não-fluorescente BDA 3000 bidirecional microinjetado no CIP disgranular, mostrou neurônios positivos para o neurotraçador com a marcação de corpos celulares, fibras e axônios em núcleos pontinos, no tronco encefálico, como o núcleo reticular pontino caudal (*PnC*), o núcleo reticular parvicelular, parte alfa (*PCRtA*) e com a área tegmental dorsomedial (*DMTg*).

Com relação ao *PnC*, localizado na formação reticular da ponte, é ativado em condições de mononeuropatia periférica (CCI), participa da modulação nociceptiva

(DEMARCO e LYDIC, 2003) e recebe aferências GABAérgicas vindas do CI. Neurônios da parte caudal do núcleo reticular pontinho se projetam para neurônios motores espinais, e portanto, possuem uma interface sensório-motora; além disso, expressam neurotransmissores glumatatérgicos excitatórios oriundos do núcleo tegmental pendúculopontino (PPTg), colículos superior e inferior (KOCH and SCHNITZLER, 1997).

O *PCRtA* é relativamente pouco estudado, mas que também integra funções sensoriais e motoras e estabelece conexões com o *PnC*, cuja conexão encontramos em nosso trabalho. Estas conexões formam um circuito autonômico/límbico/nociceptivo com alto fluxo de conectividade com o CI (CAUZZO e cols., 2021). Contudo, há poucas evidências da neuroanatomia conectiva do *DMTg*, sendo esta área ainda não explorada em modelos experimentais e em condições de dor. Juntas, essas conexões sugerem que a área disgranular do CIP está envolvida na integração da atividade sensório-motora e estão relacionadas com a regulação do comportamento afetivo-emocional como demonstrado em um estudo de estimulação elétrica (CARUABA e cols., 2011).

A ínsula disgranular e agranular também apresentam projeções com as camadas laterais e dorsolaterais da SCP, conexões estas que não foram observadas em nosso estudo, no entanto, confirmados em estudos preliminares em primatas (SALEH e cols., 2019). Estas colunas da SCP, estão envolvidas com o controle da dor através da analgesia opióide e da interação com receptores *NMDA* glutamatérgicos (FUNDYTUS, 2001).

De acordo com Sukhotinsky et colaboradores (2006), uma região descrita como área de anestesia tegmental mesopontina localizada no tronco cerebral contém diversos núcleos envolvidos com percepções nociceptivas. Estas áreas apresentam múltiplas projeções descendentes, sendo a mais proeminente a medula ventral rostromedial (RVM) e menos densas em região de *locus coeruleus* (LC) e suas adjacências. Dentre essas áreas adjacentes estão os núcleos encontrados em nosso estudo, o *PnC*, que se conecta com o CI, e é associada a modulação da dor. Sendo assim, essas conexões podem exercer ações antinociceptivas por meio um *relé* da via bulboespinal e da ativação de núcleos do sistema endógeno de modulação de dor, tais como a SCP, o NDR e o LC (vide Freitas e cols., 2005).

Estas evidências neuroanatômicas podem fornecer explicação e base neural do controle cortical na elaboração da analgesia (LINNMAN e cols., 2012). Em resumo, evidenciamos que a subdivisão disgranular do CIP está envolvida na modulação da DNC em animais com lesão por injúria do nervo isquiático (CCI). A neuroestimulação do CIP disgranular atenua a alodinia mecânica e ao frio em animais com DNC. O bloqueio prévio dos receptores NMDA, seguido da EECIP, diminui a analgesia induzida pela neuroestimulação cortical. Observamos, também, neurônios da camada disgranular do CIP que se conectam com núcleos localizados no tronco encefálico especificamente na ponte, e então, podem modular a experiência dolorosa em animais com DNC conforme ilustrado na figura 19. А dor compreende múltiplos componentes, sendo eles discriminativos/avaliativos, motivacionais, afetivos e cognitivos, e diversas áreas encefálicas envolvidas na percepção e na modulação da dor vem obtendo interesse de estudo. Considerando que o CIP é uma área cortical que vem recebendo atenção da pesquisa pré-clínica e clínica e tem a capacidade inerente de integrar amplo conjunto de informações sensoriais, afetivas e emocionais e conexões eferentes para modular a dor crônica, mostramos que a camada disgranular do CIP pode ser um alvo para neuromodulação em condições de dor neuropática e dor crônica.



FIGURA 20 - Efeito da estimulação elétrica do córtex insular disgranular (EECIP) e do bloqueio dos receptores *NMDA* + EECIP na alodinia mecânica e térmica sobre a DN crônica induzida por CCI do nervo isquiático. A: linhas de base dos testes de *von Frey* e Acetona e cirurgia de lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) ou do procedimento Sham ("falso operado"). B: EECIP foi realizado a 20 μ A, 100 Hz durante 15s por meio do dispositivo de estimulação encefálica profunda (DBS) após 21 dias de CCI. C: O bloqueio de receptores *NMDA* foi realizado através da microinjeção de LY235959 no CIP após 21 dias de CCI, seguido então pela EECIP; D: Projeções neuroanatômicas do CIP para os núcleos pontinos (*PnC*, *PCRtA* e *DMTg*) e para o S₂ quem podem contribuir para o processo de sinalização da DN crônica. A EECIP atenua a DN crônica, e o sistema glutamatérgico *NMDA* no CIP pode estar envolvido na elaboração da antinocicepção induzida pela EECIP em roedores com dor neuropática e crônica. E: Marcação de receptores do tipo *NMDA* no CIP disgranular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGLETON, J. P., BURTON, M. J., PASSINGHAM, R. E. Cortical and subcortical afferents to the amygdala of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Brain Res**, v. 190, p. 347–368, 1980.

ALMADA, R. C., RONCON, C. M., ELIAS-FILHO, D. H., COIMBRA, N. C. Endocannabinoid signaling mechanisms in the substantia nigra pars reticulata modulate GABAergic nigrotectal pathways in mice threatened by urutu-cruzeiro venomous pit viper, Neuroscience, v. 303, p. 503–514, 2015.

ALONSO-MATIELO, H., GONÇALVES, E. S., CAMPOS, M., OLIVEIRA, V. R. S., TONIOLO, E. F., ALVES, A. S., LEBRUN, I., de ANDRADE, D. C., TEIXEIRA, M. J., BRITTO, L. R. G., HAMANI, C., DALE, C. S. Electrical stimulation of the posterior insula induces mechanical analgesia in a rodent model of neuropathic pain by modulating GABAergic signaling and activity in the pain circuitry. **Brain Res**, v. 1, p. 1754:147237, 2021.

AMIR, R., LIU, C. N., KOCSIS, J. D., DEVOR, M. Oscillatory mechanism in primary sensory neurones. **Brain**, Oxford, v. 125, p. 421-435, 2002.

ANDRÉ-OBADIA, N., MERTENS, P., LELEKOV-BOISSARD, T., AFIF, A., MAGNIM, M., GARCIA-LARREA, L. Is Life better after motor cortex stimulation for pain control? Results at long-term and their prediction by preoperative rTMS. **Pain Physician**, 17(1):53-62, 2014.

APKARIAN, A. V., BUSHNELL, M. C., TREEDE, R. D., ZUBIETA, J. K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **Eur J Pain**, v. 9, p. 463–484, 2005.

BAJIC, D., PROUDFIT, HK. "Projeções de neurônios na substância cinzenta periaquedutal para grupos de células pontina e medulares de catecolaminas envolvidas na modulação da nocicepção". **Journal of Comparative Neurology**, v. 405, p. 359-379, 1999.

BALIKI, M., AL-AMIN, H. A., ATWEH, S. F., JABER, M., HAWWA, N., JABBUR, S. J., APKARIAN, A. V., SAADE, N. E. Attenuation of neuropathic manifestations by local block of the activities of the ventrolateral orbitofrontal area in the rat. **Neuroscience,** v. 120, p. 1093–1104, 2003.

BAMIOU, D. E., MUSIEK, F. E., LUXON, L. M. The insula (Island of Reil) and its role in auditory processing. Literature review. **Brain Res Brain Res Rev,** v. 42(2), p.143-54, 2003.

BASBAUM, A. I, BAUTISTA, D. M, SCHERRER, G., JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139(2), p. 267-84, 2009.

BAUMGARTNER, U., TIEDE, W., TREEDE, R. D., CRAIG, A. D. Laser-evoked potentials are graded and somatotopically organized anteroposteriorly in the operculoinsular cortex of anesthetized monkeys. **J Neurophysiol**, 96: 2802–2808, 2006.

BENISON, A. M., S. CHUMACHENKO, et al. "Caudal granular insular cortex is sufficient and necessary for the long-term maintenance of allodynic behavior in the rat attributable to mononeuropathy." **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. **31**(17), p. 6317-6328, 2011.

BENISON, A. M. Insular Cortex: Functional Mapping and Allodynic Behavior in the Rat. *Psychology and Neuroscience Graduate Theses & Dissertations*. 30, 2012.

BENNET, G. J. & XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensations like those seen in man. **Pain**, 33:87-107, 1988.

BERMUDEZ-RATTONI, F. The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. **Neurobiol Learn Mem**, v. 109, p. 207-16, 2014.

BLOMQVIST, A.; ZHANG, E-T.; CRAIG, A. D. Cytoarchitectonic and inmunohistochemical characterization of a specific pain and temperature relay, the

posterior portion of the ventral medial nucleus, in the human thalamus. **Brain**, v. 123, n. 3, p. 601-619, 2000.

BRIDGES, D.; THOMPSON, S. W. N.; RICE, A. S. C. Mechanisms of neuropathic pain. **British Journal of Anaesthesia**. London, v. 87, n. 01, p. 12- 26, 2001.

BROCKHAUS, H. Die Cyto- und Myeloarchitektonik des Cortex claustralis und des Claustrum beim Menschen. *J. Psychol. Neurol*, v. 49, p. 249–348, 1940.

BRODMAM, K. *Vergleichende LokalizationLehre der Grosshirnrinde*. Leipzig: Johann Ambrosius Barth, 1909.

BURTON, H., FABRI, M., ALLOWAY, K. Cortical areas within the lateral sulcus connected to cutaneous representations in areas 3b and 1: a revised interpretation of the second somatosensory area in macaque monkeys. **J. Comp. Neurol**, v. 355, p. 539–562, 1995.

BUSHNELL, M. C., ČEKO, M., LOW, L. A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, 14, n. 7, p. 502-511, 2013.

CARUANA, F., JEZZINI, A., SBRISCIA-FIORETTI, B., RIZZOLATTI, G., GALLESE, V. Emotional and social behaviors elicited by electrical stimulation of the insula in the macaque monkey. *Curr. Biol.* v. 21, p. 195–199, 2011.

CAUDA, F., D'AGATA, F., SACCO, K., DUCA, S., GEMINIANI, G., VERCELLI, A. Functional connectivity of the insula in the resting brain. **Neuroimage**, v. 55(1), p. 8-23, 2011.

CAUZZO, S., SINGH, K., STAUDER, M., GARCÍA-GOMAR, M. G., VANELLO, N., PASSINO, C., STAAB, J., INDOVINA, I., BIANCIARDI, M. Functional connectome of brainstem nuclei involved in autonomic, limbic, pain and sensory processing in living humans from 7 Tesla resting state fMRI. **Neuroimage**, v. 21, 50:118925, 2022.

CECHETO, D. F., SAPER, C. B. Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 262, p. 27-45, 1987.

CIAMPI, A. D., GALHARDONI, R., PINTO, L. F., LANCELOTTI, R., ROSI, J. JR, MARCOLIN, M. A., TEIXEIRA, M. J. Into the island: a new technique of non-invasive cortical stimulation of the insula. **Neurophysiol Clin**, v. 42(6), p. 363-8, 2012.

CHAPLAN, S. R., BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1994.

CIPOLLONI, P. B., PANDYA, D. N. Cortical connections of the frontoparietal opercular areas in the rhesus monkey. **J. Comp. Neurol**, v. 403, p. 431–458, 1999.

CHIKAMA, M., MCFARLAND, N. R., AAMARAL, D. G., HABER, S. N. Insular cortical projections to functional regions of the striatum correlate with cortical cytoarchitectonic organization in the primate. **J. Neurosci**, v. 17, p. 9686–9705, 1997.

CRAIG, A. D., BUSHNELL, M. C., ZHANG, E. T., BLOMQVIST, A. A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. **Nature**, 372: 770–773, 1994.

CRAIG, A. D. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, p. 655–666, 2002.

GRAIG, A. D. Pain mechanisms: Labelled lines versus convergence in central processing. **Annu Rev Neurosci**, v. 26, p. 1-30, 2003.

CRAIG, A. How do you feel — now? The anterior insula and human awareness. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, p. 59–70, 2009.

CRUCCU, G., TRUINI, A. A review of Neuropathic Pain: From Guidelines to Clinical Practice. **Pain Ther**, v. 6 (Suppl 1):S35–S42 Italy, 2017.

GEORGE J., DEMARCO HELEN A., BAGHDOYAN, AND RALPH LYDIC. Differential Cholinergic Activation of G Proteins in Rat and Mouse Brainstem: Relevance for Sleep and Nociception. **The journal of comparative neurology**, v. 457, p. 175–184, 2003.

DE FREITAS, R. L., SALGADO-ROHNER, C. J., HALLAK, J. E. C., DE SOUZA CRIPPA, J. A. *et al.* Involvement of prelimbic medial prefrontal cortex in panic-like elaborated defensive behaviour and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei: role of the endocannabinoid CB1 receptor. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 8, p. 1781-1798, 2013.

DE FREITAS R.L., BOLOGNESI L.I., TWARDOWSCHY A., CORREA F.M., SIBSON N.R., COIMBRA N.C., Neuroanatomical and neuropharmacological approaches to postictal antinociception-related prosencephalic neurons: the role of muscarinic and nicotinic cholinergic receptors. **Brain Behav** 3:286-301, 2013.

DE FREITAS R.L., MEDEIROS P., KHAN A.U., COIMBRA N.C. micro1 -Opioid receptors in the dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal grey matter are critical for the enhancement of post-ictal antinociception. **Synapse, v.** 70, p. 519-530, 2016.

DENIS, D. J., MAROUF, R., RAINVILLE, P., BOUTHILLIER, A., NGUYEN, D. K. Effects of insular stimulation on thermal nociception. **European Journal of Pain**, v. 20(5), p. 800–810, 2016.

DESANTANA, J. M., PERISSINOTTI, D. M. N., DE OLIVEIRA JR, J. O., CORREIA, L. M. F., OLIVEIRA, C. M., FONSECA, P. R. B. Tradução para a língua portuguesa da definição revisada de dor pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (**IASP**). **SBED**, 2020.

DESBONNET, L., TEMEL, Y., VIISSER-VANDEWALLE, V., BLOKLAND, A., HORNIKX, V., STEINBUSCH, H. W. Premature responding following bilateral stimulation of the rat subthalamic nucleus is amplitude and frequency dependent. **Brain Res,** v. 1008(2), p. 198-204, 2004.

DIMOV, L. F., TONIOLO, E. F., ALONSO-MATIELO, H., de ANDRADE, D. CIAMPI, GARCIA-LARREA, L., BALLESTER, GERSON, TEIXEIRA, M. J., DALE, C. S. Electrical stimulation of the insular cortex as a novel target for the relief of refractory pain: An experimental approach in rodents. **Behavioural Brain Research**, v. 346, pp. 86-95 2018.

DOSENBACH, N. U., VISSCHER, K. M., PALMER, E. D., MIEZIN, F. M., WENGER, K. K., KANG, H. C, et al. A core system for the implementation of task sets. **Neuron**, v. 50, p. 799–812, 2006.

ECKHORN R., THOMAS U. A new method for the insertion of multiple microprobes into the neural and muscular tissue, including fiber electrodes, fine wires, nedles and microsensors. **J. Neurosci Methods**, v. 46, p. 175-179, 1993.

EVRARD, H. C. The Organization of the primate Insular Cortex. **Front Neuroanat**, v. 13:43, 2019.

FAYAZ, A., CROFT, P., LANGFORD, R. M., DONALDSON, L. J., JONES, G. T. Prevalência de dor crônica no Reino Unido: uma revisão sistemática e meta-análise de estudos populacionais. **British Medical Journal, v.** 6 (6), 2016.

FENTON, B. W.; SHIH, E.; ZOLTON, J. The neurobiology of pain perception in normal and persistent pain. **Pain Manag**, v. 5, n. 4, p. 297-317, 2015.

FLATTERS, S. J. L.; BENNETT, G. J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristineinduced painful peripheral neuropathy. Pain, v. 109, n. 1–2, p. 150–161, 2004

FREYNHAGEN, R., PARADA, H. A., CALDERON-OSPINA, C. A., et al. Current understanding of the mixed pain concept: a brief narrative review. **Current Medical Research and Opinion**, v. 35(6), p. 1011–1018, 2019.

FRIEDMAN, D. P., MURRAY, E. A., O'NEILL, J. B., MISHKIN, M. Cortical connections of the somatosensory fields of the lateral sulcus of macaques: evidence for a corticolimbic pathway for touch. **J. Comp. Neurol**, v. 252, p. 323–347, 1986.

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(2), p. 251-6, 2009.

FOX, M. D., SNYDER, A. Z., VINCENT, J. L., CORBETTA, M, VAN ESSEN, D. C., RAICHLE, M. E. The human brain is intrinsically organized into dynamic, anticorrelated functional networks. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, p. 9673–9678, 2005.

FREITAS R. L., FERREIRA, C. M. R., RIBEIRO, S. J., CARVALHO, A. D., ELIAS-FILHO, D. H., GARCIA-CAIRASCO, N., COIMBRA, N. C. Intrinsic neural circuits between dorsal midbrain neurons that control fear-induced responses and seizure activity and nuclei of the pain inhibitory system elaborating postictal antinociceptive processes: a functional neuroanatomical and neuropharmacological study. **Experimental Neurology**, v.191, Issue 2, 2005.

FROT, M., RAMBAUD, L., GUENOT, M., MAUGUIERE, F. Intracortical recordings of early pain-related CO2-laser evoked potentials in the human second somatosensory (SII) area. **Clin Neurophysiol**, v. 110, p. 133–145, 1999.

FROT, M., MAUGUIERE, F. Dual representation of pain in the operculoinsular cortex in humans. **Brain**, v. 126, p. 438–450, 2003.

FROT, M., MAGNIN, M., MAUGUIERE, F., GARCIA-LARREA, L. Cortical representation of pain in primary sensory-motor areas (S1/M1): a study using intracortical recordings in humans. **Hum Brain Mapp**, v. 34, p. 2655–2668, 2013.

FUDGE, J. L., BREITBART, M. A., DANISH, M., PANNONI, V. Insular and gustatory inputs to the caudal ventral striatum in primates. J. Comp. Neurol. v. 490, p. 101–118, 2005.

FUJITA, S., ADACHI, K., KOSHIKAWA, N., KOBAYASHI, M. Spatiotemporal dynamics of excitation in rat insular cortex: intrinsic corticocortical circuit regulates caudal-rostro excitatory propagation from the insular to frontal cortex. **Neuroscience**, v. 165, p. 278–292, 2010.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception. **CNS drugs**, v. 15(1), p. 29-58, 2001.

GAO, K., KIM, Y.H., MASON, P. Neurônios pontomedulares serotoninérgicos não são ativados por estimulação antinociceptiva na substância cinzenta periaquedutal. **J Neurosci**, v. 17, p. 3285–3292, 1997.

GARCIA-LARREA, L., PEYRON, R., MERTENS, P., GREGOIRE, M. C., LAVENNE,F., LE BARS, D., LAURENT, B. Electrical stimulation of motor cortex for pain control:A combined Pet-Scan and electrophysiological study. Pain, v. 83, P. 259-273, 1999.

GARCIA-LARREA, L. & PEYRON, R. Motor cortex stimulation for neuropathic pain: From phenomenology to mechanisms. *Neuroimage* 37 Suppl 1, S71–S79, 2007.

GARCIA-LARREA, L., PERCHET, C., CREAC'H, C., CONVERS, P., PEYRON, R., LAURENT, B., MAUGUIERE, F., MAGNIN, M. Operculo-insular pain (parasylvian pain): a distinct central pain syndrome. **Brain**, v. 133(9), p. 2528-2539, 2010.

GARCIA-LARREA, L. The posterior insular-opercular region and the search of a primary cortex for pain. **Neurophysiol Clin**, v. 42(5), p. 299-313, 2012.

GARCIA-LARREA, L., PEYRON, R. Pain matrices and neuropathic pain matrices: a review. **Pain;** v. 154 Suppl 1, S29-43, 2013.

GAURIAU, C., BERNARD, J. F. Vias de dor e circuitos parabraquiais no rato. **Exp Fisiol**, 87 :251-258, 2002.

GERBELLA, M., BELMALIH, A., BORRA, E., ROZZI, S., LUPPINO, G. Cortical connections of the anterior (F5a) subdivision of the macaque ventral premotor area F5. **Brain Struct. Funct.** 216 43–65, 2011.

GERHLACH, D. A., DOLENSEK, N., KLEIN, A. S. *et al.* Aversive state processing in the posterior insular cortex. **Nat Neurosci**, *v*. 22, p. 1424–1437, 2019.

GEHRLACH, D. A., WEIAND, C., GAITANOS, T. N., CHO, E., KLEIN, A. S., HENNRICH, A. A., CONZELMANN, K-K., GOGOLLA, N. A whole-brain connectivity map of mouse insular cortex. **eLife**, v. 9, e55585, 2020.

GRACE, M. P., HUTCHINSON, R. M., MAIER, S. F., WATKINS, L. R. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nat Ver Immunol**, v. 14(4), p. 217-231, 2014.

HAMANI, C., DIWAN, M., ISABELA. S. et al. Effects of diferente stimulation parameters on the antidepressant-like response of medial prefrontal cortex deep brain stimulation in rats. **J Psychiatr Res, v.** 44, p. 683–687, 2010 a.

HANSSON, P. T., ATTAL, N., BARON, R., CRUCCU, G. Toward a definition of pharmacoresistant neuropathic pain. **Eur J Pain**, v. 13(5), p. 439-40, 2009.

HARRIS, R. E., SUNDGREN, P. C., CRAIG, A. D., KIRSHENBAUM, E., SEM, A., NAPADOW, V., CLAUW, D. J. Elevated insular glutamate in fibromyalgia is associated with experimental pain. **Arthritis Rheum**, v. 60, p. 3146-3152, 2009.

HOSOBUCHI, Y., ADAMNS, J. E., LINCHITZ, R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. **Science**, v. 197, p. 83-186, 1977.

JAMES, S. L.; ABATE, D.; ABATE, K. H.; ABAY, S. M. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, 392, n. 10159, p. 1789-1858, 2018.

JASMIN, L., RABKIN, S. D., GRANATO, A., BOUDAH, A., OHARA, P. T. Analgesia and hyperalgesia from GABAmediated modulation of the cerebral cortex. **Nature**, v. 424, p. 316–320, 2003.

JASMIN, L., BURKEY, A. R., GRANATO, A., OHARA, P. T. Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: a tract-tracing study in the rat. **J Comp Neurol**, 468, p. 425–440, 2004.

JIANG, L., JI, Y., VOULALAS, P. J., KEASER, M., XU, S., GULLAPALLI, R. P., GREENSPAN, J., MASRI, R. Motor cortex stimulation suppresses cortical responses to noxious hindpaw stimulation after spinal cord lesion in rats. **Brain Stimul**, v. 7, p. 182-189, 2014.

JESSEL, T. M., KELLY, D. D. Pain and Analgesia. In: Kandell, E. R.; Schwartz, J. H., Jessel, T. M. (Ed.) Principles of Neural science, New York: Elsevier, p. 385-399, 1991.

KELLY, C., TORO, R., DI MARTINO, A., COX, C. L., BELLEC, P., CASTELLANOS,F. X., MILHAM, M. P. A convergent functional architecture of the insula emerges across imaging modalities. Neuroimage, v. 61(4), p. 1129-42, 2012.

KISHIMA, H., SAITOH, Y., OSAKI, Y., NISHIMURA, H., KATO, A., HATAZAWA, J., & YOSHIMINE, T. Motor cortex stimulation in patients with deafferentation pain: activation of the posterior insula and thalamus, **Journal of Neurosurgery JNS**, 107(1), 43-48. Retrieved Feb 15, 2022.

KLASS, A., GLAUBITZ, B., TEGENTHOFF, M., LISSEK, S. d -Cycloserine facilitates extinction learning and enhances extinction-related brain activation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 144, p. 235–247, 2017.

KLAVIR, O. 1., WINTER, C., JOEL, D. High but not low frequency stimulation of both the globus pallidus and the entopeduncular nucleus reduces 'compulsive' lever-pressing in rats. **Behav Brain Res**, v. 216, p. (1):84-93, 2011.

KNOTKOVA, H., HAMANI, C., SIVANESAN, E., LE BEUFFE, M. F. E, MOON, J. Y., COHEN, S. P., HUNTOON, M. A. Neuromodulation for chronic pain. Lancet, v. 397(10289), p. 2111-2124, 2021.

KWON, M., ALTIN, M., DUENAS, H., ALEV, L. The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. **Pain Practice**, v. 14, p. 656-667, 2014.

KOCH, M., SCHNITZLER, H. U. The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. **Behav Brain Res**, v. 89(1-2), p. 35-49, 1997.

KRINGELBACH, M. L., JENKINSON, N., OWEN, S. L et al. Translational principles of deep brain stimulation. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, p. 623–635, 2007.

KURTH, F., EICKHOFF, S. B., SCHLEICHER, A., HOEMKE, L., ZILLES, K., AMUNTS, K. Cytoarchitecture and probabilistic maps of the human posterior insular cortex. **Cereb Cortex**, 20(6), p. 1448-61, 2010a.

KURTH, F., ZILLES, K., FOX, P. T., LAIRD, A. R., EICKHOFF, S. B. A link between the systems: functional differentiation and integration within the human insula revealed by meta-analysis. **Brain Struct Funct**, 214(5-6), p. 519-34, 2010b.

LEITE FERREIRA, L., PEREIRA GENEROSO, L., MEDEIROS, A. C, DE MEDEIROS P., LEONARDO DE FREITAS, R., LOURENÇO DA SILVA M., RESENDE TORRES DA SILVA, J. Infralimbic medial prefrontal cortex alters electroacupuncture effect in animals with neuropathic chronic pain, **Behavioural Brain Research**, v. 424, 2022.

LENOIR, C., ALGOET, M., MOURAUX, A. Deep continuous theta burst stimulation of the operculo-insular cortex selectively affects Aδ-fibre heat pain. **J Physiol**, v. 596(19), p. 4767-4787, 2018.

LEKNES, S.; TRACEY, I. A common neurobiology for pain and pleasure. **Nature Reviews Neuroscience**, 9, n. 4, p. 314, 2008.

LINNMAN, C., MOULTON, E. A., BARMETTLER, G., BECERRA, L., BORSOOK, D. Neuroimaging of theperiaqueductal gray: state of the field. **Neuroimage**, v. 60(1), p. 505-22, 2012.

LOVICK, T. A. Pro-nociceptive action of cholecystokinin in the periaqueductal grey: a role in neuropathic and anxiety-induced hyperalgesic states. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 32, n. 4, p. 852-862, 2008.

LUPPINO, G., MATELLI, M., CAMARDA, R., RIZZOLATTI, G. Corticocortical connections of area F3 (SMA-proper) and area F6 (pre-SMA) in the macaque monkey. J. Comp. Neurol. *v*. 338, p. 114–140, 1993.

MAEDA, Y., IKEUCHI, M., WACNIK, P, SLUKA, K. A. Increased *c-fos* immunoreactivity in the spinal cord and brain following spinal cord stimulation is frequency-dependent. **Brain Res**, v. 1259, p. 40-50, 2009.

MAFFEI, A., HALEY, M., FONTANINI, A. Neural processing of gustatory information in insular circuits. **Curr Opin Neurobiol**, v. 22(4), p. 709-16, 2012.

MALVESTIO, R. B. et al. Cannabidiol in the prelimbic cortex modulates the comorbid condition between the chronic neuropathic pain and depression-like behaviour in rats: The role of medial prefrontal cortex 5-HT1A and CB1 receptors. **Brain Research Bulletin**, 2021.

MEDEIROS, P.; NEGRINI-FERRARI, S.E.; MEDEIROS, A.C.; FERREIRA, L.L.; DA SILVA, J.R.T.; DA SILVA, J.A.; COIMBRA, N.C.; DE FREITAS, R.L. The Primary 102 Motor Cortex Stimulation Attenuates Cold Allodynia in a Chronic Peripheral Neuropathic Pain Condition in Rattus norvegicus. **WJNS**, v.9, n.3, 2019a

MEDEIROS P., NEGRINI-FERRARI S.E., PALAZZO E., MAIONE S., FERREIRA S.H., DE FREITAS R.L., COIMBRA N.C. N-methyl-D-aspartate Receptors in the Prelimbic Cortex are Critical for the Maintenance of Neuropathic Pain. **Neurochem Res.** v. 44(9), p. 2068-2080, 2019b

MEDEIROS P., DE FREITAS R.L., BOCCELLA S., IANNOTTA M., BELARDO C., MAZZITELLI M., ROMANO R., DE GREGORIO D., COIMBRA N.C., PALAZZO E., MAIONE S. Characterization of the sensory, affective, cognitive, biochemical, and neuronal alterations in a modified chronic constriction injury model of neuropathic pain in mice. **J Neurosci Res**, v. 98(2), p. 338-352, 2020a

MEDEIROS P, OLIVEIRA-SILVA M, NEGRINI-FERRARI SE, MEDEIROS AC, ELIAS-FILHO DH, COIMBRA NC, DE FREITAS RL. CB₁-cannabinoid-, TRPV₁-vanilloid- and *NMDA*-glutamatergic-receptor-signalling systems interact in the prelimbic cerebral cortex to control neuropathic pain symptoms. **Brain Res Bull**, v. 165, p. 118-128, 2020b

MEDEIROS, P., SANTOS, I.R., MEDEIROS, A., SILVA, J.A., FERREIRA, S., DE FREITAS, R.L., COIMBRA, N.C. Indomethacin attenuates mechanical allodynia during the organization but not the maintenance of the peripheral neuropathic pain induced by nervus ischiadicus chronic constriction injury. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 53 (5), e9255, 2020c

MEDEIROS P, DOS SANTOS IR, JÚNIOR IM, PALAZZO E, DA SILVA JA, MACHADO HR, FERREIRA SH, MAIONE S, COIMBRA NC, DE FREITAS RL. An Adapted Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve Produces Sensory, Affective, and Cognitive Impairments: A Peripheral Mononeuropathy Model for the Study of Comorbid Neuropsychiatric Disorders Associated with Neuropathic Pain in Rats. **Pain Med**, v. 22(2), p. 338-351, 2021. MÉNDEZ-RUETTE, M., LISAINSAMBARTH, S., MORAGA-AMARO, R., QUINTANA-DONOSO, D., MÉNDEZ, L., TAMBURINI, G., CORNEJO, F., TORRES, R. F. and STEHBERG, J. The Role of the Rodent Insula in Anxiety. Front. Physiol. 10:330, 2019.

MERSKEY, H. & BOGDUK, N. Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definition of Pain Terms (pp. 287), 2nd ed, **IASP Press**, Seattle, 1994.

MERSKEY, H., BOGDUK, N. Classificação de dor crônica: descrições de síndromes de dor crônica e definições de termos de dor / elaboradas pela associação internacional para o estudo da dor. *Task Force sobre taxonomia*. 2º 1994 Atualize 2012.

METZ, A. E. et al. Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 7, p. 2423–2428, 2009.

MESULAM, M. M., MUFSON, E. J. Insula of the old world monkey. I. Architectonics in the insulo-orbito-temporal component of the paralimbic brain. J. Comp. Neurol. 212, p. 1–22, 1982a.

MESULAM, M. M., MUFSON, E. J. Insula of the old world monkey. III: Efferent cortical output and comments on function. **J. Comp. Neurol**. 212, p. 38–52, 1982b.

MILLER, M. W. The origin of corticospinal projection neurons in rat. **Exp Brain Res**, v. 67, p. 339–351, 1987.

MOISSET, X., LANTERI-MINET, M. & FONTAINE, D. Neurostimulation methods in the treatment of chronic pain. **J Neural Transm**, v. 127, p. 673–686, 2020.

MORECRAFT, R. J., CIPOLLONI, P. B., STILWELL-MORECRAFT, K. S., GEDNEY, M. T., PANDYA, D. N. Cytoarchitecture and cortical connections of the posterior

cingulate and adjacent somatosensory fields in the rhesus monkey. **J. Comp. Neurol**, *v*. 469, p. 37–69, 2004.

MOREL, A., GALLAY, M. N., BAECHLER, A., WYSS, M., GALLAY, D. S. The human insula: architectonic organization and postmortem MRI registration. **Neuroscience**, v. 236, p. 117–135, 2013.

MORO, E., ESSELINK, R. J., XIE, J. et al. The impact on Parkinson's disease of electrical parameter settings in STN stimulation. **Neurology**, v. 59, p. 706–713, 2002.

MONTES, C., MAGNIN, M., MAARRAWI, J., FROT, M., CONVERS, P., MAUGUIERE, F., GARCIA-LARREA, L. Thalamic thermo-algesic transmission: central posterior (VP) complex versus VMpo in the light of a thalamic infarct with central pain, v. 113, p. 223-232, 2005.

MORIARTY, O., MCGUIRE, B. E., FINN, D. P. The effect of pain on cognitive function: a review of clinical and preclinical research. **Prog Neurobiol**, v. 93, p. 385–404, 2011.

MUFSON, E. J., MESULAM, M. M. Insula of the old world monkey. II: Afferent cortical input and comments on the claustrum. **J. Comp. Neurol**, *v*. 212, p. 23–37, 1982.

NAKASHIMA, M., EUMURA, M., YASUI, K., OZAKI, H., TABATA, S., TAEN, A. An anterograde tract-tracing study on the projetions from the thalamic gustatory area in the rat: distribution of neurons prejecting to the insular cortex and amygdaloid complex. **Neuroscience research: the official journal of the japan neuroscience society**, v. 36, p. 297-309, p. 2000.

NEGRINI-FERRARI, S. E., MEDEIROS, P., MALVESTIO, R. B., DE OLIVEIRA, S. M., MEDEIROS, A. C., COIMBRA, N. C., DE FREITAS, R. L. The primary motor cortex electrical and chemical stimulation attenuates the chronic neuropathic pain by activation of the periaqueductal grey matter: The role of *NMDA* receptors. **Behavioural Brain Research,** v. 415, p.113522, 2021.

NETO, F. L.; SCHADRACK, J.; PLATZER, S.; ZIEGLGANSBERGER, W. *et al.* Upregulation of metabotropic glutamate receptor 3 mRNA expression in the cerebral cortex of monoarthritic rats. **J Neurosci Res**, v. 63, n. 4, p. 356-367, 2001.

NGUYEN, J. P., LEFAUCHEUR, J. P., DECQ, P., UCHIYAMA, T., CARPENTIER, A, Fontaine D, Brugiers P, Pollin B, Feve A, Rostaing S, Cesar P, Keravel Y. Chronic motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic pain. Correlations between clinical electrophysiological and anatomical data. **Pain**, v. 82, n 3, p. 245-251, 1999.

NIEUWENHUYS, R. The insular cortex: a review. Prog Brain Res, 195, p. 123-63, 2012.

ODEH, F., ANTAL, M. "The projections of the midbrain periaqueductal grey to the pons and medulla oblongata in rats," **European Journal of Neuroscience**, v. 14, no. 8, p. 1275–1286, 2001.

OGAWA, H., HASEGAWA, K., MURAYAMA, N. Difference in taste quality coding between two cortical taste areas, granular and dysgranular insular areas, in rats. **Exp Brain Res**, 91: 415–424, 1992.

OLNEY, J. W. Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate, **Science**; v. 164, p. 719-21, 1969.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Current opinion in supportive and palliative care**, v. 8, n. 2, p. 143, 2014.

OSTROWSKY, K., MAGNIN, M., RYVLIN, P., ISNARD, J., GQUENOT, M., MAUGUIÈRE, F. Representation of pain and somatic sensation in the human insula: a study of responses to direct electrical cortical stimulation. **Cereb Cortex**, v. 12(4), p. 376-85, 2002.

PAGANO, R. L., ASSIS, D. V., CLARA, J. A., ALVES, A. S., DALE, C. S., TEIXEIRA, M. J., FONOFF, E. T., BRITTO, L. R. Transdural motor cortex stimulation reverses neuropathic pain in rats: A profile of neuronal activation. **European Jornal of Pain**, v. 15, n. 3, p. 268-277, 2011.

PAXINOS, G., Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2005.

PETROU, M., POP-BUSUI, R., FOERSTER, B. R., EDDEN, R. A., CALLAGHAN, B. C., HARTE, S. E., HARRIS, R. E., CLAUW, D. J., FELDMAN, E. L. Altered excitationinhibition balance in the brain of patients with diabetic neuropathy. **Acad Radiol**, v. 19, p. 607-612, 2012.

PETROVIC, P., KALSO, E., PETERSSON, K. M., INGVAR, M. Placebo e analgesia opióide: imagem de uma rede neuronal compartilhada. **Ciência**; v. 295, p.1737-1740, 2002.

PEYRON, R., LAURENT, B., GARCIA-LARREA, L. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis. **Neurophysiol Clin**; v. 30(5), p. 263-88, 2000.

PINHEIRO, O. S., MULLE, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, p. 423-36, 2008.

PRYBYLOWSKI, K., WENTHOLD, R. J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. **J Biol Chem**, v. 279, p. 9673-6, 2004.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, p. 444-445, 1969.

ROSE, M. Die Inselrinde des Menschen und der Tiere. J. Physchol. Neurol, v. 37, p. 467–624, 1928.

ROUAUD, T., LARDEUX, S., PANAYOTIS, N. et al. Reducing the desire for cocaine with subthalamic nucleus deep brain stimulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, p. 1196–1200, 2010.
RUGGIERO, R. N., BUENO-JÚNIOR, L.S., ROSS, J. B. de, FACHIM, H. A., PADOVAN-NETO, F. E., MERLO, S., ROHNER, C. J., IKEDA, E. T., BRUSCO, J., MOREIRA, J. E. Neurotransmissão glutamatergica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. Medicina (Ribeirão Preto), v. 44(2), p. 143-56, 2011.

SALEH, T. O., LOGOTHETIS, N. K., EVRARD, H. C. "Insular projections to brainstem homeostatic centers in the macaque monkey," in *Poster presented at the 12th* National Congress of the Belgian Society for Neuroscience (*BSN 2017*), Ghent, 2017.

SCHOLZ, J., WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1361-1368, 2007.

SCHAIBLE, H. G., RICHTER, F. Pathophysiology of pain. Langenbeck's Archive Surgery, Berlin, v. 389, p. 237-243, 2004.

SESIA, T., TEMEL, Y., LIM, L. W. et al. Deep brain stimulation of the nucleus accumbens core and shell: opposite effects on impulsive action. **Exp Neurol**, v. 214: 135–139, 2008.

SIDDALL, P. J., COUSINS, M. J. Spinal pain mechanisms. **Spine**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 98-104, 1997.

SANTOS, S. A., SOUZA, J. B., ANTES, D. L., D'ORSI, E. Prevalência da crônica e sua associação com uma situação sociodemográfica e atividade física sem lazer em idosos de Florianópolis, Santa Catarina: estudo de base populacional. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18 (1), p. 234-247, 2015.

SOMMER, C.; MYERS, R. R. Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. Acta neuropathologica, v. 90, n. 5, p. 478-485, 1995.

SOUZA, J. B., GROSSMANN, E., PERISSINOTTI, D. M., JUNIOR, J. O. O., FONSECA, P. R. B., POSSO, I. P. Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception,

and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey. **Pain Research** and **Management**, 2017.

STEHBERG, R. M-AAJ. The Insular Cortex and the Amygdala: Shared Functions and Interactions. **InTech**, 2012.

TREEDE, R. D., JENSEN, T. S., CAMPBELL, J. N., et al. Neurophatic pain: redefinition and a granding system for clinical and research purproses. **Neurology**, v. 70, p. 1630-1635, 2008.

TSUBOKAWA, T.; KATAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T.; HIRAYAMA, T. et al. Treatment of thalamic pain by chronic motor cortex stimulation. **Pacing and Clinical Electrophysiology**, v. 14, n. 1, p. 131-134, 1991.

TURE, U., YASARGIL, D. C., AL-MEFTY, O., YASARGIL, M. G. Topographic anatomy of the insular region. **J Neurosurg**, v. 90(4), p. 720-33, 1999.

TURNER, B. H., MISHKIN, M., KNAPP, M. Organization of the amygdalopetal projections from modality-specific cortical association areas in the monkey. **J. Comp. Neurol,** v. 191, p. 515–543, 1980.

TURNER, J. A., FRANKLIN, G., FULTON-KEHOE, D., e outros. Predição de incapacidade crônica em distúrbios osteomusculares relacionados ao trabalho: um estudo prospectivo, de base populacional. **Distúrbios Musculoesqueléticos do BMC**, 2004.

VALMUNEN, T., PERTOVAARA, A., TAIMINEN, T., VIRTANEN, A., PARKKOLA, JAASKELAINEN, S. K. Modulation of facial sensitivity by navigated rTMS in healthy subjects. **Pain**, v. 142(1-2), p. 149-58, 2009.

WATSON, C. J. Insular balance of glutamatergic and GABAergic signaling modulates pain processing. **Pain**, v. 157(10), p. 2194-2207, 2016.

ZHANG, Z. H., DOUGHERTY, P. M., OPPENHEIMER, S. M. Monkey insular cortex neurons respond to baroreceptive and somatosensory convergent inputs. **Neuroscience**, v. 94, p. 351–360, 1999.

ZHUO, M. Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain. **Neuropharmacology**, v.112, p. 228-234, 2016.

APÊNDICE

Manuscrito: Neuromodulation (Elsevier)

Cortical neurostimulation and *NMDA* glutamatergic receptor-activation in the dysgranular layer of the posterior insular cortex modulate chronic neuropathic pain

Running title: PIC activation attenuates the neuropathic pain

Renata Cristina Martins Pereira^{1,3}; Priscila Medeiros^{1,2,5}, Norberto Cysne Coimbra^{2,4};

Hélio Rubens Machado³, Renato Leonardo de Freitas^{1,2,4}*

¹Laboratory of Neurosciences of Pain & Emotions and Multi-User Centre of Neuroelectrophysiology, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

²Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP), 14049-900, Brazil.

³Brain Protection Laboratory in Childhood, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo, Brazil.

⁴Behavioural Neurosciences Institute (INeC), Av. do Café, 2450, Ribeirão Preto (SP), 14050-220, Brazil.

⁵Federal University of São Carlos (UFSCar), UFSCar Pain Clinic, São Carlos, 13565-905, São Paulo, Brazil.

*Corresponding authors: Prof. Dr. Renato Leonardo de Freitas

Laboratory of Neurosciences of Pain and Emotions and Multiuser Centre of Neuroelectrophysiology, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of

the University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. <u>defreitas.rl@gmail.com or rlfreitas@usp.br</u>

Abbreviations

- NP Neuropathic pain
- CNP Chronic Neuropathic pain
- PICS Electrical stimulation of the posterior insular cortex
- NMDA N-methyl-D-aspartate
- NMDAr N-methyl-D-aspartate receptors
- IC Insular cortex
- PIC Posterior insular cortex
- PAG Periaqueductal grey matter
- CCI Chronic constriction injury
- Sham -- "false operated" control group

BDA-Biodextran

- DAPI Diamidinophenylindol
- DAB-Diaminobenzidine
- HE Hematoxylin and eosin
- LTP Long term potentiation
- GABA Gamma-aminobutyric acid
- S_2 Secondary somatosensory cortex
- PnC Caudal pontine reticular nucleus
- PCRtA Parvicellular Reticular Nucleus (Alpha Part)
- PPTg Tegmental penduculopontine nucleus
- DMTg Dorsomedial tegmental area
- DBS Deep brain stimulation
- VPM Ventral posteromedial nucleus
- MCS Motor cortex stimulation

PICS - Posterior insular cortex stimulation

CEUA - Ethics Committee for the Use of Laboratory Animals

Highlights

- CCI of the sciatic nerve evokes mechanical and cold allodynia in rats;
- Insula cortex electrical stimulation attenuates the cold allodynia in CCI rats;
- Insula cortex electrical stimulation decreased the mechanical allodynia in CCI

rats;

- *NMDA* plays a role in antinociception induced by insula-electrical stimulation;
- Insula is connected to S₂, *PnC*, *PCRtA* and *DMTg* nuclei.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest concerning the work presented herein.

Funding and Acknowledgements

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Research grant 2013/12916-0 and Multi-user Equipment grant 2014/11869-0) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (427397/2018-9). Neither of these funding sources had any role in the study design, collection, analysis, and interpretation of the data, report writing, or decision to submit the paper for publication. FAPESP (Scientific Initiation Scholarship grant 2001/03752-6, M.Sc. fellowship grant 2003/05256-1, post-doctoral fellowship grant 2009/17258-5, and researcher fellowship grant 2014/07902-2) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES Sc.D. fellowship grant 001) supported Renato Leonardo de Freitas. FAPESP also supported Priscila de Medeiros (Sc.D. fellowship grant 2012/25167-2; post-doctoral fellowship grant 150806/2021-3). CAPES supported Renata C. M. Pereira (M.Sc. fellowship grant 88887.474986/2020-00).

The authors thank Daoud Hibrahim Elias-Filho, Paulo Castilho and Maria Rossatto for their expert technical assistance.

ABSTRACT

Background and aims: Posterior dysgranular insular cortex (PIC) stimulation (PICS) has been investigated as a new putative cortical target for non-pharmacological therapies in patients with chronic and neuropathic pain (NP). This work investigates the neural bases of insula neurostimulation-induced antinociception and glutamatergic neurochemical mechanisms recruited by the PICS in neuropathic animals. *Methods:* Male Wistar rats were submitted to the von Frey and acetone tests to assess mechanical and cold allodynia after 21 days of chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve or Sham-procedure ("false operated"). The fluorescent bidirectional BDA (3000) neurotracer (cascade blue: BDA-CB) or non-fluorescent (BDA) was microinjected into the CIP. The electrical (e) PICS was performed at low frequency (20 µA, 100 Hz) for 15s by a deep brain stimulation (DBS) device. PIC N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAr) blockade with the selective antagonist LY235959 (at 2, 4 and 8 nmol/200nL) followed by PICS was investigated in CCI rats. Results: PIC sends projections to the caudal pontine reticular nucleus (PnC), alpha part of the parvicellular reticular nucleus (PCRtA), dorsomedial tegmental area (DMTg) and S₂. PICS decreased both mechanical and cold allodynia in rats with chronic NP. Blockade of NMDA receptors in the PIC with LY235959 at 8 nmol attenuated PICS-produced antinociception. Conclusion: Neuroanatomical projections from PIC to pontine reticular nuclei and S_2 may contribute to chronic NP signalling. PICS attenuates the chronic NP, and the NMDA glutamatergic system into the PIC may be involved in PICS-induced antinociception in rodents with NP conditions.

Keywords: Posterior dysgranular insular cortex (PIC); cortical neurostimulation; *NMDA* glutamatergic receptors; chronic constriction injury; chronic neuropathic pain

1. Introduction

Considered a health crisis due to its high prevalence and associated physical and emotional disability, chronic pain (CP) is one of the leading causes of disability in many regions of the world^{1, 2}. Neuropathic pain (NP) is a critical and prevalent chronic condition in the adult population, and its chronicity affects about 20% of people ³.

Several healthy professional efforts to produce clinical practise guidelines for NP treatment through opioids, anticonvulsants, antidepressants, *NMDA* antagonists, and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) administrations. However, due to methodological and conceptual reasons, its applicability becomes limited, resulting in low efficacy in pain relief and consequently people's poor quality of life ⁴. While these therapies are sufficient to control pain in many cases, up to 40% of patients become resistant and remain symptomatic ⁵.

Considering cases in which the condition is refractory to pharmacological treatment, neuromodulation is an alternative therapeutic for the treatment of CP and NP. Significant advances and attention have been obtained for its effectiveness in treating several pain syndromes since the 1990s, such as the cortical epidural stimulation ^{6, 7, 8}. It was demonstrated that electrical stimulation of the motor cortex (ECM) induced antinociception in naïve rats due to inhibition of thalamic nuclei and disinhibition of the periaqueductal grey matter (PAG) and mediated by the ventral posteromedial nucleus (VPM) of the thalamus in rats with chronic constriction injury of the *nervus ischiadicus* (sciatic nerve)⁹.

The primary motor cortex (M_1) electrical stimulation (MCS) attenuated cold allodynia in rats with chronic NP 21 days after CCI ¹⁰. In addition, Negrini-Ferrari and colleagues (2021) showed that the M_1 cortex glutamatergic system is also involved in the modulation of chronic NP in the model of nerve injury in rats. The antinociceptive effect of MCS may depend on glutamate signalling recruiting *NMDA*r located on the dorsal collum of PAG neurons in rodents with chronic NP¹¹.

There is a growing interest in understanding the mechanisms involved in neuromodulation. Therefore, considering these non-motor areas as potential research targets, exploration of the activity of new cortical telencephalic areas will expand knowledge about putative preclinical and clinical models for pain attenuation. Evaluating the involvement of the PIC as a possible neural target regarding the procedures for producing analgesia can be crucial.

Studies point to the posterior insular cortex (PIC) role in pain control, especially in patients with chronic and NP. These patients may have abnormal cortical activity ipsilateral and contralateral stimuli¹². They may differentially respond to thermal and mechanical pain perceptions evoked by laser stimulation ¹³. It is known that painful stimuli activate the insular cortex (IC), and most functional imaging studies indicate that the insular activation is bilateral. However, little is known about the modulatory mechanisms of these responses ¹⁴. Furthermore, brain imaging studies show that the IC is constantly activated under NP conditions ¹⁵.

Glutamatergic neurotransmission recruiting *NMDA*r interacts in several functions such as neural development, synaptic plasticity, learning, memory and especially NP conditions ¹⁶. Increased glutamate concentrations can contribute to pain and central sensitisation and increase levels in NP conditions ^{17, 18}. In contrast, increased brain activation is observed in fMRI studies with the administration of d-cycloserine, an *NMDA* agonist, in the learning context, denoting better behavioural outcomes ¹⁹.

In this sense, studying the effect of PICS (by DBS device) and the *NMDA* receptors selective antagonist LY235959 microinjections effects on PICS-induced antinociception modulation becomes interesting. The present study addresses these issues

by studying the effects caused by both PICS and blockade of *NMDA* receptors focused on the dysgranular layer of the PIC in laboratory animals submitted to an experimental neuropathy procedure.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (N = 83), initially weighing approximately 100 g (~40 days), supplied by the Central Animal Facility of the University of São Paulo, Ribeirão Preto Campus, were used. They were housed in the vivarium of the Department of Surgery and Anatomy of Ribeirão Preto School of Medicine of the University of São Paulo (FMRP-USP), under a 12/12 h light/dark cycle, in controlled temperature (22 ± 2 °C) and humidity (55%), with free access to water and feed, made available ad libitum. The handling of animals followed the Ethical Principles in Animal Experimentation. The project was submitted to the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the FMRP-USP, which follows federal law No. 11.794, of October 8, 2008. The experiments were carried out according to the ethical principles, elaborated by the Animal Experimentation Ethics Committee, approved by FMRP-USP (Process: 241/2019).

2.2. Nociceptive test: mechanical allodynia threshold

The *von Frey* filament test (North Coast, USA) was used to assess the nociceptive threshold to mechanical stimulation. It consists of a set of nylon monofilaments of various thicknesses, which exert different degrees of force when applied to the plantar surface of the paw. Thus, allowing the evaluation of the amount of force necessary to evoke the withdrawal behaviour ²⁰.

The animals were individually placed in acrylic boxes, measuring 23x20x18 cm, arranged on a table with a non-malleable steel grid floor, with 5 mm² of space between the meshes. The tip of the stimulation rod was applied Between the floor meshes on the centre of the plantar hind paw of each rat until the animal displayed the response of withdrawal of the stimulated paw. This procedure was performed on the injured right paw of each CCI animal (ipsilateral paw) and the left paw (contralaterally to the CCI or *Sham* surgery).

The *von Frey* test baseline 1 (before CCI or *Sham* surgeries) was recorded 30 minutes after laboratory animals acclimatized in the experimental apparatus; *von Frey* test baseline 2 was performed 21 days after the CCI or *Sham* procedure before each pharmacological treatment or insular cortex stimulation. The open-field test was performed for 5 minutes before and after the pharmacological treatment or deep brain stimulation in the PIC. Furthermore, 5 min after the open field test, the *von Frey* test was performed for 30 minutes in rodents every 10 minutes (Figure 1).

2.3. Nociceptive test: Acetone Test (Cold Allodynia model)

The *acetone* test (AC) was used to assess cold stimulus allodynia. In the test, the rats were positioned on a platform (the same used in the *von Frey* test) in which the lower surface of the animal's paw was accessed. 0.5 ml of 100% *acetone* was administered to the plantar surface of the rat's hind paw, starting from the bottom of the grid. The nociception afferent is given by a score that consists of 3 classes: 0 - no movement; 1 - rapid and sudden movement of the paw; 2 - the repeating movement of lifting the paw; 3 - paw movement followed by licking ²¹. If the animal behaviour is sketched in 20 seconds, it is observed by measure plus 20 s the sum of the behaviours sketched in 40

seconds, Repetition in three nociceptive times of the test. If the score in 20 s is 0, no more 20 s are needed.

Acetone was also applied to the animal's left paw, which is contralateral to the CCI or Sham surgery (Figure 1).

2.4. Open Field Test

The open field apparatus consists of a circular crystal acrylic arena (97 cm in diameter and 32.5 cm high walls, open-top and floor divided into 19 similar sections). Each animal was placed gently in the centre of the enclosure, and the motor behaviour was recorded by a handcam (Sony Handycam) for 5 minutes immediately after the PIC electrical stimulation. The test evaluated the environmental exploration and general locomotor activity (the number of crossings surveys)²².

2.5. Surgery for chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve procedure

To induce experimental peripheral mononeuropathy, the animals were submitted to the procedure of chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve, as previously described by Bennett & Xie²³, modified by Sommer & Myers²⁴ and adapted by Medeiros et al. ^{25, 26}.

Initially, the animals were anaesthetised by intramuscular (IM) administration in the left hind paw, using a solution in the proportion of 0.1 ml of ketamine at 92 mg/kg (União Química Farmacêutica Nacional, Brazil), for 0.2 ml of 9.2 mg/kg xylazine (Hertape/Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brazil). The animals are placed on a table with the backup, and the right hind paw will be held by tape. Trichotomy of this paw and skin disinfection with iodine-polvidin were performed. Then a 15-mm longitudinal incision was made at the height of the thigh, dorsolateral region, at the level of the trocanter/femur. The right sciatic nerve was accessed and exposed through muscular dissection of the greater gluteus and femoral biceps. A simple ligation was performed, an experimental model adapted from Medeiros et al. ^{25, 26} with 4-0 Cat-gut thread in the sciatic nerve of the right paw proximal to the sciatic nerve trifurcation. The tension generated in the ligation was of mild intensity, sufficient to cause mild ischemia without interrupting total blood flow. The skin incisions were sutured with 5-0 mononylon suture, and then hydrogen peroxide was passed on the right hind limb of the rodent. The "false operated" control group (*Sham*) underwent all surgical procedures by exposing the right sciatic nerve but without its ligation (without the CCI) (Figure 1).

2.6. Stereotaxic surgery

Fourteen days after CCI or *Sham* surgery, the animals (n=8) were taken to the stereotaxic apparatus (Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil), where the temporal boulder and upper incisors fixed their heads. Before exposing the skullcap, the skin and subcutaneous tissue were anaesthetised with a 2% lidocaine solution (0.1 mL, s.c.). The periosteum was removed, and the skullcap dried with 10% H₂O₂. An electrode was implanted in the posterior insula cortex (PIC) for deep brain stimulation (DBS) procedure, or a chemitrode (electrode with a guide-cannula) was used for microinjection of drugs (before the electrical stimulation) directly into the area functionally associated with the hind limb, according to the following coordinates: AP= - 0.48 mm; ML = 5.8 mm and DV = 6.9 mm for electrode and DV = 5.9 mm for chemitrode with guide cannula, according to the Atlas of Paxinos and Watson ²⁷. For intracortical microinjections of drugs, the guide-cannula must be 15 mm, the injector needle 16 mm long, and for PICS, a 16 mm electrode was used.

After implantation, either the electrode or the chemitrode was fixed to the calvaria with a self-curing acrylic prosthesis, which, in turn, was anchored by two stainless steel furniture screws (Figure 1).

2.7 Electrical stimulation of Dysgranular Layer of the PIC (PICS)

One week after stereotaxic surgery (for implantation of the electrode in the dysgranular layer of the PIC), the animals were placed in a circular arena (60 cm in diameter and 50 cm in height with the floor divided into 12 sections), with the experimental compartment illuminated with 40-W of a fluorescent lamp (350 lx at arena floor level). Then, the electrode implanted in the PIC was connected to a stimulus generator (STG3008-FA, multichannel system, Germany) which allowed the application of pulse current (cathode pulse width 100µs, pulse interval 100, and anodic pulse width of 100µs, repeating for 15 seconds). Brain stimulation was performed at the intensity in steps of 20 µA for 15 seconds. After this procedure, the animal was taken to the von Frey apparatus to measure mechanical allodynia and hypersensitivity to cold in animals with and without NP. Each animal was used only once and received electrical stimulation once in the PIC. An additional group was performed, with electrode implantation, but without PICS. The effect of insular cortex deep brain stimulation on mechanical allodynia test (von Frey test) and cold sensitivity test (acetone test) in animals with chronic NP was evaluated for up to 30 minutes after PIC neurostimulation. After three days, the animals were stimulated and placed in the open field test to assess both locomotor and exploratory responses and anxiety-related behaviour for 5 minutes (Figure 1A).

2.8 Blockade of NMDA receptors followed by PICS

After 7 days of stereotaxic surgery for implantation of a PIC chemitrode, 200nL of LY235959 (2, 4 and 8 nmol) were microinjected in PIC to verify the effect of the PIC *NMDA* receptor blockade in NP rats. For microinjection into the PIC, a thin needle (Mizzi) connected to an 10 μ L syringe (Hamilton, Reno, Nevada, USA) was inserted into the chemitrode. It is end reached 1 mm below the guide cannula. A polyethylene catheter was attached to the needle to monitor the microinjections, which were made through a drug infusion pump (Stoelting, Kiel, Wisconsin, USA), then, after 5 minutes of microinjection, electrostimulation was performed in the same place to analyse the effect of *NMDA* receptor blockade in the PIC on rats with neuropathy (Figure 1B).

2.9 Neural tract tracing

The rodents (CCI; n = 5) were anaesthetised with a solution in the proportion of 0.1 ml of 10% ketamine (in a dose of 90 mg/kg, IP) to 0.2 ml of 4% xylazine (in a dose of 10 mg/kg, IP), and fixed in a stereotaxic device (Insight, Brazil). The bar of the maxillary incisors was positioned 3.3 mm below the interaural line so that the skull was in a horizontal position between bregma and lambda. A micropipette was introduced vertically, targeting the dysgranular layer of the PIC, according to the coordinates AP= - 0.48 mm; ML= 5.8 mm and DV= 6,9 mm for injection needle.

Through this device, a cascate blue-conjugated dextran (molecular weight 3000), a bidirectional neural tract tracer was administered by an injection pump (Stoelting Co., model 250) in the PIC to investigate the connections between PIC with nuclei of the endogenous pain modulation system. The cytoarchitecture and other characteristics of the labelled neural cells and the neural hodology were evaluated by light microscopy (AxioImager Z1 photomicroscope; Zeiss, Oberkochen, Germany). Fluorescent neurotracing was performed on animals 21 days after the CCI or *Sham* procedure. The neural tract tracer was deposited in the PIC, using a system consisting of a gingival needle (30G) coupled to a polyethylene thread which, in turn, coupled to a 10 μ L syringe (Hamilton, USA) microinjected by an infusion pump with a flow rate of 0.2 μ L/min. Upon the microinjection period, the calvaria was sutured with 5-0 mononylon suture thread to protect the trepanation from impurities.

For the neurotracing procedure, the animals were deeply anaesthetised with ketamine (90 mg/kg, IP) and xylazine (10 mg/kg, IP). After anaesthesia, they were infused intracardially with buffered saline, followed by 4% paraformaldehyde in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.3. Then, the brain was removed, cryoprotected to obtain frozen 20 µm sections in a cryostat (AM 1950; Leica, Wetzlar, Germany) and deposited on acrylic plates, according to the free-floating technique. Sections were washed in phosphate buffer, pH 7.3 and observed under microscopy (AxioImager Z1, Zeiss) for subsequent localisation of the injection site and the labelled cells. These sections were mounted between slides and coverslipped with DAPI.

For the non-fluorescent labelling procedure, the Biodextran labelling was visualized using the avidin-biotin method (ABC standard Elite kit; Vector Labohamsterries) with nickel-enhanced 3-3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma) peroxidase reaction. Sections were washed thoroughly in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) after incubation, mounted on gelatin-coated glass slides, stained using the Nissl cresyl violet method, and viewed under a photomicroscope (AxioImager Z1, Zeiss) (Figure 1C).

2.10 Perfusion and Histology

After performing the neurophysiological and neuropharmacological procedures, the animals were anaesthetised through intraperitoneal (IP) administration with 3 mL of 25% urethane solution, perfused through the left cardiac ventricle with 0.9% NaCl solution, followed by a buffered 4% paraformaldehyde solution. The brain was removed and kept refrigerated in fixative (4% paraformaldehyde) for at least 24 hours and then immersed in a 20% sucrose solution, also stored in a refrigerator for cryoprotection for 24 hours. After these processes, the brain was frozen and cut with a microtome (CM 1950, Leica, Wetzlar, Germany) in 40 μm thick coronal sections. The sections were mounted on glass slides, gelatinised, air-dried and stained with methylene blue. Subsequently, the sections were analysed with the aid of light microscopy (AxioImager Z1; Zeiss, Oberkochen, Germany), and the position of the tips of the stimulation electrodes and the microinjection needles on the neuraxis were marked in anagrams of Paxinos & Watson's rat brain in the stereotaxic atlas ²⁷. Only animals with signs of the presence of the end of either the stimulation electrode or the injector needle within the dysgranular layer of the PIC were included in the statistical analysis.

2.11 Statistical analysis

The results were analyzed using a two-way repeated-measures analysis of variance (TWO-WAY ANOVA) statistical test, followed by Tukey's post-test for intraand inter-group comparison. Results that presented a value of p < 0.05 were considered statistically significant. In this way, the effect of stimulation was determined according to time. For the data related to the open-field test, a normal distribution was performed. The groups that did not show a normal distribution were submitted to non-parametric Kruskal-Wallis test followed by the Dunn post-test. The Graph Prism program (version 8.0.2 GraphPad Software, USA) was used for statistical analysis and graphing.

2. Results

2.1 Histological analysis

Histologically confirmed sites of PICS (stimulation and non-stimulation) or drug infusion (physiological saline and LY235959 microinjections) in the PIC in CCI or *sham* rats are shown in Figure 2B and 2C, respectively. Representative photomicrographs of transverse sections of the insula, indicating a drug microinjection site in the dysgranular PIC, are shown in Figure 2A.

3.4 The dysgranular insular cortex (PIC) electrical stimulation (PICS) attenuates the chronic neuropathic pain (NP)

3.4.1 von Frey test (mechanical allodynia threshold)

In order to investigate the participation of the dysgranular subdivision of PIC in CCI-induced chronic peripheral neuropathic pain, PICS at 20μ A for 15 seconds was applied contralaterally to the operated hind limb, followed by mechanical allodynia recording in animals with and without chronic NP. PICS decreased mechanical allodynia in animals according to *von Frey* test in the 21st day after CCI surgery.

Two-way ANOVA revealed that there was a significant effect of the treatment on mechanical allodynia the threshold [F $_{(3,27)} = 22.02$; p < 0.001], of time [F $_{(4,108)} = 38.03$; p < 0.001] and of treatment versus time interaction [F $_{(12,108)} = 15.17$; p < 0.001] in animals submitted to the PICS 21 days after CCI. No PICS/CCI group had greater complementary mechanical allodynia (right paw) when compared to no PICS/*Sham* group (Tukey's posthoc test; p < 0.001) (Figure 3A). Furthermore, the PICS (20 μ A / 15 s)/CCI group decreased mechanical allodynia in the right paw of animals in comparison to without PICS (0 μ A / 15 s)/CCI group (Figure 3A), suggesting that the DBS of the dysgranular

region of the PIC causes analgesia in animals with CNP 10 minutes after the neurostimulation. In addition, when the mechanical allodynia was measured in the left paw, there was no change in the mechanical nociceptive thresholds of CCI or *Sham* rats (Figure 3B).

3.4.2 Acetone test (cold allodynia threshold)

In order to investigate the participation of the dysgranular subdivision of PIC in CCI-induced chronic peripheral neuropathic pain, the PICS at 20 μ A for 15 seconds contralaterally to the operated hind limb was performed followed by the measurement of cold allodynia in animals with or without CNP. PICS decreased allodynia to cold in animals evaluated using the *acetone* test in the 21st day after CCI surgery.

Considering the cold allodynia threshold, according to the repeated measure twoway ANOVA, there was a significant effect of treatment $[F_{(3,27)}= 29.40; p < 0.001]$, of time $[F_{(4,108)}= 35.89; p < 0.001]$ and of treatment versus time interaction $[F_{(12,108)}= 13.41;$ p < 0.001] in animals that underwent at PICS 21 days after CCI or *Sham* procedure. No PICS/CCI group had significantly greater allodynia to cold (right paw) when compared to the without PICS/*Sham* group (Tukey's post-hoc test; p < 0.001) (Figure 4A). That is, CCI was effective in producing CNP in animals. However, PICS (20 μ A/15 s)/CCI animals did not significantly decrease cold allodynia in the right paw when compared to the without PICS (0 μ A/15 s) /CCI group (p > 0.05) (Figure 4A). In addition, when the cold allodynia was measured in the left paw, there was no change in the thermal nociceptive thresholds of CCI or *Sham* animals (Figure 4B).

3.5 Locomotor and exploratory activity (open-field test)

To evaluate locomotor and exploratory activity, an open-field test was performed, in which the animals were placed in a circular arena for a period of 5 minutes immediately after the electrical stimulation of the PIC (PICS). In this process, it was observed that the crossing behaviour between the animals of all groups (CCI with and without electrical stimulation and *Sham* with and without electrical stimulation) did not change.

The non-parametric Kruskal-Wallis analysis followed by the Dunn post test showed that there was no statistically significant difference between the CCI and *Sham* groups with and without stimulation [H= 4,878 p > 0.05, respectively], data show in Figure 5.

3.6 Effect of NMDAr blockade in dysgranular insular cortex on PICS-induced antinociception

3.6.1 von Frey test (mechanical allodynia threshold)

In order to investigate the participation of *NMDA*r located in dysgranular subdivision of the PIC in CCI-induced chronic peripheral NP, the *NMDA*r were blocked by microinjections of LY235959 at different doses (2, 4 and 8 nmol), followed by PICS at 20 μ A for 15 seconds applied contralaterally to the operated hind limb. The mechanical allodynia was recorded in animals with or without chronic NP.

The microinjection of LY235959 at a concentration of 8 nmol blocked the analgesic effect produced by PICS, maintaining the low threshold of mechanical allodynia compared to the vehicle/PICS group submitted to the *von Frey* test 21 days after CCI surgery.

Regarding the mechanical allodynia, according to a repeated measure two-way ANOVA, there was a significant effect of treatment [$F_{(5,41)}$ = 14.29; p < 0.001], of time $[F_{(4,164)} = 165.6; p < 0.001]$ and f treatment versus time interaction $[F_{(20,164)} = 3.217; p < 0.001]$ 0.001] in animals underwent NMDAr blockade, followed by PICS 21 days after CCI. The pretreatment of PIC with LY235959 at the highest dose (8 nmol) blocked the analgesic effect produced by PICS when compared to the vehicle /PICS-treated group (Tukey's post-hoc test; p < 0.001) up to 10 minutes. The effect of NMDAr blockade with LY235959 in a dose of 8 nmol followed by PICS was not significantly different from the LY235959 (8nmol) PIC/ without PICS-treated group, suggesting that the NMDAr blockade in PIC per se does not change the mechanical allodynia threshold (p > 0.05 at all times). In addition, the effect of PIC NMDAr blockade with LY235959 at the highest dose was significantly different compared to the PIC NMDAr blockade with LY235959 at the lowest dose (2 nmol) recorded immediately after PICS (Tukey's post-hoc test; p < p0.001) (Figure 6A). Finally, when the mechanical allodynia was investigated in the left paw, there were no significant changes in the mechanical nociceptive thresholds of CCI animals (Figure 6B).

3.6.2 Acetone test (cold allodynia threshold)

In order to investigate the participation of *NMDA* glutamatergic receptors of the dysgranular subdivision of the PIC in CCI-induced chronic peripheral NP, PIC *NMDA*r were blocked by microinjections of LY235959 at different concentrations (2, 4 and 8 nmol) followed by electrical neurostimulation of PIC at 20 μ A for 15 seconds contralaterally to the operated hind limb, followed by cold allodynia measurement, through the *acetone* test in animals with or without chronic NP.

The microinjection of LY235959 at the higher concentration of 8 nmol blocked the analgesic effect produced by PICS, maintaining low the cold allodynia threshold in PIC stimulation/PIC vehicle-treated group in animals submitted to the acetone test 21days after CCI surgery. According to the repeated measure two-way ANOVA, there was a significant effect of treatment $[F_{(5,41)} = 2.554; p < 0.05]$, of time $[F_{(4,164)} = 92.09; p < 0.05]$ 0.001] and of treatment versus time interaction $[F_{(20.164)} = 2.885; p < 0.01]$ in animals submitted to the PIC NMDAr blockade followed by PICS 21 days after CCI. Microinjection of LY235959 at the highest concentration (8 nmol) in PIC blocked the analgesic effect produced by PICS compared to the vehicle PIC/PIC stimulation-treated group immediately after PICS up to 5 minutes post-DBS (Tukey's post-hoc test; p < 0.05). The effect of PIC NMDAr blockade with LY235959 at 8 nmol followed by PICS was not significantly different from that recorded in the LY235959 (8nmol) PIC/PIC nonstimulation-treated group, suggesting that the NMDAr blockade in PIC does not significantly change the mechanical allodynia threshold at any time (p > 0.05 in all cases). In addition, the effect of PIC NMDAr blockade with LY235959 at the highest dose was significantly different compared to the PIC NMDAr blockade with LY235959 at the lowest dose (2 nmol) recorded immediately after PICS (Tukey's post-hoc test; p < 0.05) (Figure 7A). Finally, when the mechanical allodynia was investigated in the left paw, there were no significant changes in the mechanical nociceptive thresholds of CCI animals (Figure 7B).

3.7 Neural tract-tracing of pathways connected to the PIC

Deposits of either the 3000 MW Cascade Blue-conjugated dextran (CB) neurotracer (Figure 8B) or the biotinylated dextran-amine (BDA) neurotracer (Figure 9B) in the dysgranular region of the PIC (Figure 8) were performed in order to study the neuroanatomical connections between PIC neurons and either other neocortical areas or the endogen neurotracer-labelled pain modulatory system structures situated in the brain stem.

CB neurotracer-labelled neurons were found in the S2 somatosensory cortex of Wistar rats connected to the dysgranular region of the PIC, as shown in Figure 8C. BDA neurotracer-labelled neuronal cells, axonal fibres and terminal buttons were found in the caudal pontine reticular nucleus (*PnC*), suggesting a reciprocate connection between the dysgranular region of the PIC and the *PnC*, as shown in Figure 9C and D. Both BDA neurotracer-labelled neuronal perikarya and axonal fibres were also found in the alpha part of the parvicellular reticular nucleus (*PCRtA*), dorsolaterally situated to the nucleus reticularis pontis caudalis, as shown in figure 9 E and F, suggesting outputs to the dysgranular region of the PIC. Finally, BDA neurotracer-labelled neuronal perikarya and axonal fibres were found in the GABAergic ventral tegmental area inhibitory control centre dorsomedial tegmental nucleus (*DMTg*), suggesting modulatory outputs reaching the dysgranular region of the PIC, as shown in Figure 9G.

3. Discussion

We demonstrated in this work that the electrical stimulation of the PIC attenuated both mechanical and thermal allodynia in animals with chronic NP after 21 days of the CCI procedure in Wistar rats. Microinjection of a selective *NMDA*r antagonist followed by electrical stimulation of this same target insular area blocked PICS-induced antinociception. These findings suggest that the antinociceptive effect produced by PICS involves glutamate-dependent neural networks in the PIC. Connections between the dysgranular region of the PIC and both cortical and brainstem reticular nuclei, such as the S₂ somatosensory cerebral cortex, the reticular pontine nuclei, the parvicellular reticular nucleus, and the dorsomedial tegmental nucleus, many of them reciprocated connected a neural network supporting the neuromodulation of chronic NP in CCI animals.

In fact, our findings showed that the electrical neurostimulation at 20 μ A for 15s of the insular cortex dysgranular subdivision could influence the contralateral hind paw mechanical and thermal hypersensitivity (cold) (contralateral to the site of stimulation), causing an increase in mechanical and cold allodynia thresholds recorded immediately after PIC stimulation. Another study shows that electrical stimulation of the PIC produces antinociception²⁸. 30 Our findings are the first evidence involving the antinociceptive effect by PICS of the dysgranular layer and insular glutamatergic modulation by *NMDA*rsignalling.

Several studies have shown the efficacy of the glutamatergic system in a variety of functions such as neural development, synaptic plasticity, learning, memory and especially in neuropathic pain conditions ¹⁶. The insula cortex interacts with *NMDA*r in these several functions, participates in a circuit involving descending modulatory pain systems for antinociceptive effects ²⁹ and studies involving the administration of d-cycloserine an *NMDA* agonist have shown greater brain activation of this region and better behavioural results in learning contexts ¹⁹.

As previously mentioned, the cortical processing network of the chronic NP involves the PIC ¹⁵. According to the neurophysiological study carried out in this work, the microinjection of the selective *NMDA*r antagonist LY235959 at the highest dose was able to block the analgesic effect produced by PIC electrical stimulation, maintaining low the mechanical and thermal allodynia thresholds recorded immediately after PICS. When the same concentration of LY235959 was microinjected in the PIC without PICS, the result was the same; the drug itself did not cause significant changes in mechanical and thermal allodynia thresholds only in the presence of the neurostimulation of the insula.

This interesting finding suggests a role of *NMDA*r and glutamatergic neurotransmission in the dysgranular region of the PIC a with analgesic responses in chronic NP stages, precisely after 21 days of CCI in rodents. These results partially confirm our working hypothesis and support the view that DBS-induced analgesia involves glutamatedependent neural networks and *NMDA*r on neurons of the insula.

Glutamatergic receptors found in somatosensory, motor and cingulate cortexes have been shown to modulate acute and inflammatory pain. Neutralisation of the increased transmission of nociceptive stimuli from the inflamed paw has occurred through central mechanisms ³⁰, and anatomical evidence suggests that IC and the cingulate cortex (ACC) neurons probably interact, contributing to the central processing of painful information ³¹.

The motor cortex has also been demonstrated to be involved in pain modulation. The recruitment of *NMDA*r in motor cortex neurons seems critical for the attenuation of mechanical allodynia through direct connections with the dmPAG ¹¹. The suggested mechanisms of glutamatergic neurotransmission involve channels linked to *NMDA*r that tend to remain open longer, allowing a significant flow of calcium and rapid removal of glutamate from the synapse by its transporters. This mechanism is necessary for normal excitatory neurotransmission and the prevention of glutamate-induced toxicity. It is likely that IC also shares calcium-dependent signalling pathways under conditions of peripheral injury. However, it may trigger an up-regulation of *NMDA*r for LTP ¹⁶.

In addition, it has been shown that the PIC is a structure that is constantly activated during electrical stimulation of the motor cortex, resulting in an upregulation of the pain threshold exerting a direct influence on the posterior thalamus and descending pain inhibitory system structures (for example, PAG)²⁹. There are also reports of changes in c-FOS protein expression that are increased around electrodes inserted in the insula,

134

demonstrating an increase in neuronal activity observed after electrical stimulation of the PIC activating the descending inhibitory pain pathway through connections with the pain matrix ³². Together, these data provide solid evidence that the PIC, intimately connected with several cortical and subcortical areas, participates in the modulatory processes involving analgesia ^{33, 34, 35, 36, 37, 28, 32}.

Several pieces of evidence have shown functional differences in the participation of IC subregions in painful and behavioural conditions. The inhibition of the increase in *NMDA* or GluN2B receptors in the anterior IC by antagonists can prevent or treat the NP, and unilateral microinjection of ionotropic glutamate receptor antagonists restores nociceptive behaviours to pre-injury values. Furthermore, increased endogenous GABA levels or increased signalling at inhibitory glycinergic receptors had similar effects as glutamate receptor antagonists ³⁸.

On the other hand, studies involving *NMDA* excitotoxic lesions of the most caudal portion of the PIC caused modulation of allodynic manifestations ³⁹. The stimulation sites in our histology showed some positions varying along the anteroposterior axis. However, they were not concentrated in this more caudal portion of the insula, which may provide us additional information about functional differences of the insula cortex subdivisions regarding pain modulation since there may be different populations of neurons along the rostroposterior axis that allow these specific features. They ultimately provided a basis for explaining our findings ⁴⁰.

Shreds of evidence also suggest a specific role of the *operculum*-insular cortical area in thermal nociception. Studies with transcranial magnetic stimulation (TMS) on these regions demonstrate an impairment of the sensitivity of discrimination of pain stimuli intensity, reduce chronic visceral pain, and increase the nociceptive threshold ⁴¹, reducing the perception of thermal pain ⁴². These findings may corroborate a bidirectional

135

projection with the S_2 somatosensory cortex confirmed in our neurotracing study, thus opening new possibilities for understanding the analgesic mechanisms found here since the insular and somatosensory cortexes are critical for the sensation of both sensorydiscriminative and subjective/emotional pain.

Other evidence found by our study suggests the interaction of IC with reticular nuclei located in the brainstem. The caudal pontine reticular nucleus (*PnC*), a critical nucleus located in the pontine reticular formation, participates in nociceptive modulation⁴³ and expresses glutamatergic neurotransmitters inhibited by projections from the pedunculopontine tegmental nucleus (PPTg) and both superior and inferior colliculi ⁴⁴. The alpha part of the parvicellular reticular nucleus (*PCRtA*), relatively little studied in painful conditions, integrates sensory and motor functions to establish connections with the *PnC* forming an autonomic/limbic/nociceptive circuit with a high degree of interconnectivity with the IC ⁴⁵.

Little is explored in the neuroanatomical research concerning the dorsomedial tegmental nucleus and cerebral cortical areas, such as the insula, but DMT_g plays a relevant role in GABAergic control of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. It is possible that outputs from DMT_g to insula can provide an inhibitory control on the dysgranular region of the PIC during motivational behaviour impairment during chronic NP conditions.

4. Conclusion

In summary, the electrical stimulation of the PIC caused the antiallodynic effect, and the microinjection of a selective *NMDA*r antagonist (by LY235959) blocked the analgesic effect produced by PICS in CCI rats. The possible analgesic effect of increased activity of insula neurons may depend on the recruitment of *NMDA*r in the PIC. In addition, we found some reciprocated projections between PIC and nuclei located in the pontine reticular formation and S_2 somatosensory cortex that may partially explain the effects obtained in this study. Future investigations are still needed to understand these cortical pain control mechanisms deeply. However, the PIC is a cortical area receiving attention from preclinical and clinical research with the inherent ability to integrate a comprehensive set of sensory, affective, and emotional information and efferent connections to modulate chronic and neuropathic pain.

References

[1] A. Fayaz, P. Croft, R. M. Langford, L. J. Donaldson, G. T. Jones, G. T.
 Prevalence of chronic pain in the UK: a systematic review and meta-analysis of population studies.
 BMJ, 6 (2016), e010364

[2] S. A. Santos, J. B. Souza, D. L. Aantes, E. D'orsi.

Prevalência da crônica e sua associação com uma situação sociodemográfica e atividade física sem lazer em idosos de Florianópolis, Santa Catarina: estudo de base populacional.

Rev bras epidemiol, 18 (2015), pp. 234-247

[3] S. L. James, D. Abate, K. H. Abate, S. M. Abay, C. Abbafati, N. Abbasi, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet, 392 (2018), pp. 1789-1858

[4] G. Cruccu, A. Truini.A review of Neuropathic Pain: From Guidelines to Clinical Practice.Pain Ther, 6 (2017), pp.35–42

[5] P. T. Hansson, N. Attal, R. Baron, G. Cruccu.Toward a definition of pharmacoresistant neuropathic pain.Eur J Pain, 13(2009), pp. 439-40

[6] T. Tsubokawa, Y. Katayama, T. Yamamoto, T. Hirayama, S. Koyama.Treatment of thalamic pain by chronic motor cortex stimulation.Pacing and Clin Electrophysiol, 14 (1991), pp 131-134

[7] L. Garcia-Larrea, R. Peyron, P. Mertens, M. C. Gregoire, F. Lavenne, D. Le Bars, B. Laurent.

Electrical stimulation of motor cortex for pain control: A combined Pet-Scan and electrophysiological study.

Pain, 83 (1999), pp. 259-273

[8] J. P. Nguyen, J. P. Lefaucheur, P. Decq, T. Uchiyama, A. Carpentier, D. Fontaine, et al.

Chronic motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic pain. Correlations between clinical electrophysiological and anatomical data. Pain, 82 (1999), pp. 245-251

[9] R. L. Pagano, D. V. Assis, J. A. Clara, A. S. Alves, C. S. Dale, M. J. Teixeira, et al. Transdural motor cortex stimulation reverses neuropathic pain in rats: A profile of neuronal activation.

Eur J Pain Suppl, 15 (2011), pp. 268-277

[10] P. Medeiros, S. E. Negrini-Ferrari, A. C. Medeiros, L. L. Ferreira, J. R. T. Da Silva, J. A. Da Silva, N. C. Coimbra, R. L. De Freitas.

The Primary Motor Cortex Stimulation Attenuates Cold Allodynia in a Chronic Peripheral Neuropathic Pain Condition in Rattus norvegicus. WJNS, 9(2019), pp. 138-152

[11] S. E. Negrini-Ferrari, P. Medeiros, R. B. Malvestio, M. de Oliveira Silva, A. C. Medeiros, N. C. Coimbra, et al.

The primary motor cortex electrical and chemical stimulation attenuates the chronic neuropathic pain by activation of the periaqueductal grey matter: The role of *NMDA* receptors.

Behav Brain Res, 415 (2021), pp., 113522.

[12] L. Garcia-Larrea, R. Peyron.

Pain matrices and neuropathic pain matrices: a review.

Pain, 154, (2013), pp, 29-43, 2013

[13] L. Garcia-Larrea, C. Perchet, H. C. Creac'h, P. Convers, R. Peyron, B. Laurent, et al. Operculo-insular pain (parasylvian pain): a distinct central pain syndrome.Brain, 133(2010), pp. 2528-2539

[14] K. Ostrowsky, M. Magnin, P. Ryvlin, J. Isnard, M. Gquenot, F. Mauguère. **Representation of pain and somatic sensation in the human insula: a study of responses to direct electrical cortical stimulation.** Cereb Cortex, 12(2002), pp. 376-85

[15] A. V. Apkarian, M. C. Bushnell, R. D. Treede, J. K. Zubieta.
Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease.
Eur J Pain, 9 (2004), pp. 463–484

[16] L. G. Valli.

Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas.

Rev bras.neurol psiquiatr, 18(2014), pp. 58-67

[17] R. E. Harris, P. C. Sundgren, A. D. Craig, E. Kirshenbaum, A. Sen, V. Napadow, et al.

Elevated insular glutamate in fibromyalgia is associated with experimental pain. Arthritis Rheum, 60 (2009), pp. 3146-3152

[18] M. Petrou, R. Pop-Busui, B. R. Foerster, R. A. Edden, B. C. Callaghan, S. E. Harte, et al.

Altered excitation-inhibition balance in the brain of patients with diabetic neuropathy.

Acad Radiol, 19 (2012), pp. 607-612

[19] A. Klass, B. Glaubitz, M. Tegenthoff, S. Lissek.

d -Cycloserine facilitates extinction learning and enhances extinction-related brain activation.

Neurobiol Lear Mem, 144 (2017), pp. 235–247

[20] S. R. Chaplan, F. W. Bach, J. W. Pogrel, J. M. Chung, T. L. Yaksh.Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw.J Neurosci Methods, 53(1994), pp. 55-63

[21] S. J. L. Flatters, G. J. Bennett, G. J.

Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. Pain, 109 (2004), pp. 150–161

[22] P. Medeiros, I. R. Dos Santos, I. M. Júnior, E. Palazzo, J. A. da Silva, H. R. Machado, et al.

An Adapted Chronic Constriction Injury of the Sciatic Nerve Produces Sensory, Affective, and Cognitive Impairments: A Peripheral Mononeuropathy Model for the Study of Comorbid Neuropsychiatric Disorders Associated with Neuropathic Pain in Rats.

Pain Med, 22 (2021), pp. 338-351

[23] G. J. Bennett, Y. K. Xie.A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man.Pain, 33(1988), pp. 87-107.

[24] C. Sommer, R. R. Myers. **Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush.** Acta neuropathol, 90(1995), pp. 478-485

[25] P. Medeiros, S. E. Negrini-Ferrari, E. Palazzo, S. Maione, S. H. Ferreira, R. L. De Freitas, et al.

N-methyl-D-aspartate Receptors in the Prelimbic Cortex are Critical for the Maintenance of Neuropathic Pain.

Neurochem Res, 44(2019), pp. 2068-2080

[26] P. Medeiros, R. L. de Freitas, S. Boccella, M. Iannotta, C. Belardo, M. Mazzitelli, et al.

Characterization of the sensory, affective, cognitive, biochemical, and neuronal alterations in a modified chronic constriction injury model of neuropathic pain in mice.

J Neurosci Res, 98(2020), pp. 338-52

[27] G. PAXINOS, C. Watson.

The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact 6th Edition, Academic Press, New York, 400(2005).

[28] L. F. Dimov, E. F. Toniolo, H. Alonso-Matielo, D. C. de Andrade, L. Garcia-Larrea, G. Ballester, et al.

Electrical stimulation of the insular cortex as a novel target for the relief of refractory pain: An experimental approach in rodents. Behav Brain Res, 346(2018), pp. 86-95

[29] H. Kishima, Y. Saitoh, Y. Osaki, H. Nishimura, A. Kato, J. Hatazawa, J.
 Motor cortex stimulation in patients with deafferentation pain: activation of the posterior insula and thalamus.

JNS, 107(2022), pp. 43-48.

[30] F. L. Neto, J. schadrack, S. Platzer, W. Zieglgansberger, et al.

Up-regulation of metabotropic glutamate receptor 3 mRNA expression in the cerebral cortex of monoarthritic rats.

J Neurosci Res, 63(2001), pp. 356-367

[31] M. Zhuo.

Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain. Neuropharmacology, 112 (2016), pp. 228-234

[32] H. Alonso-Matielo, E. S. Gonçalves, M. Campos, V. R. S. Oliveira, E. F. Toniolo, A. S. Alves AS, et al.

Electrical stimulation of the posterior insula induces mechanical analgesia in a rodent model of neuropathic pain by modulating GABAergic signaling and activity in the pain circuitry.

Brain Res, 1754 (2021), pp. 147237

[33] M. Gerbella, A. Belmalih, E. Borra, S. Rozzi, G. Luppino.

Cortical connections of the anterior (F5a) subdivision of the macaque ventral premotor area F5.

Brain Struct Funct, 216(2011), 43–65

[34] G. Luppino, M. Matelli, R. Camarda, G. Rizzolatti. Corticocortical connections of area F3 (SMA-proper) and area F6 (pre-SMA) in the macaque monkey.

J Comp Neurol, 338 (1993), pp. 114–140

[35] M. M. Mesulam, E. J. Mufson.

Insula of the old world monkey. III: Efferent cortical output and comments on function.

J Comp Neurol, 212 (1982), pp. 38–52, 1982

[36] E. J. Mufson, M. M. Mesulam.

Insula of the old world monkey. II: Afferent cortical input and comments on the claustrum.

J Comp Neurol, 212 (1982), pp. 23–37

[37] R. J. Morecraft, P. B. Cipolloni, K. S. Stil Well-Morecraft, M. T. Gedney, D. N. Pandya.

Cytoarchitecture and cortical connections of the posterior cingulate and adjacent somatosensory fields in the rhesus monkey.

J Comp Neurol, 469 (2004), pp. 37-69

[38] C. J. Watson.

Insular balance of glutamatergic and GABAergic signaling modulates pain processing.

Pain, 157(2016), pp. 2194-2207.

[39] A. M. Benison, S. Chumachenko, J. A. Harrison, S. F. Maier, S. P. Falci, L. R. Watkins, et al.

Caudal granular insular cortex is sufficient and necessary for the long-term maintenance of allodynic behavior in the rat attributable to mononeuropathy. J. neurosci, 31(2011), pp. 6317-6328

[40] M. Méndez-Ruette, S. Linsambarth, Moraga-Amaro R, Quintana-Donoso D, Méndez L, Tamburini G, Cornejo F, Torres RF and Stehberg J **The Role of the Rodent Insula in Anxiety.**Front Physiol, 10 (2019), 330.

[41] Valmunen T, Pertovaara A, Taiminen T, Virtanen A, Parkkola R, Jääskeläinen SK. **Modulation of facial sensitivity by navigated rTMS in healthy subjects.** Pain, 142 (2009), pp.149-58.

[42] C. Lenoir, M. Algoet, A. Mouraux.
Deep continuous theta burst stimulation of the operculo-insular cortex selectively affects Aδ-fibre heat pain.
J Physiol, 596(2018), pp. 4767-4787

[43] G. J. Demarco, H. A. Baghdoyan, R. Lydic.
Differential Cholinergic Activation of G Proteins in Rat and Mouse Brainstem: Relevance for Sleep and Nociception.
J Comp Neurol, 457 (2003), pp. 175-84

[44] M. Koch, H. U. Schnitzler.

The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation.

Behav Brain Res, 89 (1997), pp. 35-49

[45] S. Cauzzo, K. Singh, M. Stauder, M. G. García-Gomar, N. Vanello, C. Passino, et al. Functional connectome of brainstem nuclei involved in autonomic, limbic, pain and sensory processing in living humans from 7 Tesla resting state fMRI. Neuroimage, 250 (2022), 118925

FIGURE CAPTIONS

FIGURE 1 - Timeline of the experimental procedure. The animals (n = 8 per group) were divided into groups. The temporal sequence of experiments involving electrical stimulation in the dysgranular region of the posterior insular cortex (PICS) using the deep brain stimulation (DBS) equipment (A), the blockade of the dysgranular PIC through the microinjection of the *NMDA*r selective antagonist LY235959, followed by electrical stimulation of PIC in rats with CNP (B) and neural tract tracing (C). The mechanical or thermal stimulus-induced response threshold was measured once before the chronic constriction injury (CCI) of the ischiadicus nervus or *sham* procedure (day 1). On the 14th day, the stereotaxic surgery was performed to implant the electrical stimulation electrode or chemitrode for microinjection of drugs inside the insula. After 21 days of CCI or *sham* procedures, the mechanical stimulus-induced response threshold was measured before the *NMDA*r blockade or PICS. The mechanical and thermal withdrawal responses threshold was measured at the following time until 30 minutes after the pharmacological treatment or neurostimulation of the insula, respectively. Subsequently, the animals were perfused, and histological analyses were conducted.

FIGURE 2 – Diagrammatic representation of electrical neurostimulation sites in the dysgranular region of the posterior insular cortex (PICS), according to the atlas by Paxinos and Watson (2005). **A**: Representation of the stimulation electrode on the PIC. **B**: Schematic representations of histologically identified electrical stimulation sites (\circ) PICS at 0µA/15s (*Sham*), (\bullet) PICS at 20µA/15s (*Sham*), (\Box) PICS at 0µA/15s (CCI), (\bullet) PICS at 20µA/15s (*CCI*), performed in animals with chronic neuropathic pain (DNC). **C**: Representation of sites of microinjections of LY235959 in insula plus the PICS, according to the atlas by Paxinos and Watson (2005). Schematic representations of histologically identified PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 2nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 4nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (CCI), (\bullet) LY235959 8nmol PIC + PICS at 20µA/15s (*Sham*), (\bullet) Vehicle PIC + PICS at 0µA/15s (*Sham*), (\bullet) Vehicle PIC + PICS at 0µA/15s (*Sham*), (\bullet) Vehicle PIC + PICS at 20µA/15s (*Sham*), (\bullet) Vehicle PIC + PICS at 20µA/15s (*Sham*), (\bullet) Vehicle PIC + PICS at 20µA/15s (*Sham*), (\bullet) Vehicle PIC + PICS at 20µA/15s (*Sham*), (\bullet) Vehicle PIC + PICS at 20µA/15s (*Sham*), (\bullet) Vehicle PIC + PICS at 20µA/15s (*Sham*), (\bullet) Vehicle PIC + PICS at 20µA/15s (*Sham*), (\bullet) Vehicle PIC + PICS at 20µA/15s (*Sham*), (\bullet) Vehi
FIGURA 3- Effect of neurostimulation/DBS of the dysgranular region os the posterior insular cortex PIC (PICS) on the mechanical allodynia threshold of animals using the *von Frey* test 21 days after CCI or *Sham* (n=8) performed on the right paw (A) and on the left paw (B). *, denotes difference in mechanical allodynia responses between the *Sham* and CCI groups. #, denotes difference between the CCI groups with ($20 \mu A/15 s$) and without ($0 \mu A/15 s$) stimulation. There was a decrease in neuropathic pain (increasing the threshold) in the first time immediately after PICS. BL1: baseline 1, before procedures; Arrow A: CCI or *Sham* surgery; BL2: baseline 2, after 21 days of CCI or *Sham*; PICS of the animals followed by the *von Frey* test performed up to 20 minutes.

FIGURE 4- Effect of neurostimulation/DBS of the dysgranular region os the posterior insular cortex PIC (PICS) on the cold allodynia index of animals through the *acetone* test 21 days after CCI (n=8 with PICS and n=7 without cPICS) or *Sham* (n= 8 with PICS and n=8 without PICS) performed on the right paw (A) and on the left paw (B). *, Denotes CCI animals with PICS (20 μ A/15 s) showing an improvement in cold allodynia threshold immediately after stimulation. #, Denotes CCI animals without stimulation (0 μ A/15 s) maintaining cold allodynia and difference between CCI animals without PICS and with PICS. BL1: baseline 1, before procedures; Arrow A: CCI or *Sham* surgery; BL2: baseline 2, after 21 days of CCI or *Sham*; Arrow B: after BL2, performance of the PICS of the animals, followed by the *acetone* test for up to 30 minutes.

FIGURE 5- Representation of rat locomotor behaviour recorded in the open-field test to evaluate the exploratory behaviour displayed in a circular arena in *Sham* and CCI animals (crossing and rearing) after the electrical stimulation of the dysgranular region of the posterior insular cortex (PICS). There was no statistically significant difference between the groups.

FIGURE 6- Effect of *NMDA* receptor blockade with microinjection of the selective antagonist LY235959 (at 2, 4 and 8 nmol/200 nL) in the disgranular region of the PIC, followed by electrical neurostimulation (PICS) on the mechanical allodynia threshold of animals, through the test *von Frey* test 21 days after CCI (n=8) performed on the right paw (A) and on the left paw (B). #, denotes a significant difference in relation to the vehicle group + without PICS. *, denotes a significant difference in relation to the vehicle

+ PICS group. BL1: baseline 1, before procedures; Arrow A: CCI surgery; BL2, after 21 days of CCI or a new baseline was measured; Arrow B: after BL2, microinjection of LY235959 or vehicle was performed, followed by PICS or without PICS and the *von Frey* test was performed up to 20 minutes.

FIGURE 7- Effect of *NMDA* receptor blockade through microinjection of the selective antagonist LY235959 (at 2, 4 and 8 nmol/200 nL) in disgranular PIC, followed by electrical neurostimulation (PICS) on the cold allodynia threshold of animals through the *acetone* test 21 days after CCI (n=8) performed on the right paw (A) and on the left paw (B). #, denotes a significant difference in relation to the vehicle group + without PICS. *, denotes a significant difference in relation to the vehicle group + PICS. BL1: baseline 1, before the procedures; Arrow A: CCI surgery; BL2: after 21 days of CCI, a new baseline was measured; Arrow B: after BL2, microinjection of LY235959 + PICS was performed in the animals and the *acetone* test was performed up to 30 minutes.

FIGURE 8- Photomicrographs of transverse sections of dysgranular region of the posterior insular cortex (PIC) of Wistar rats. (A) Diagramatic representation of insula transverse section, showing a histologically confirmed microinjection site (* n=1) of the 3000 MW Cascate Blue-conjugated dextran (CBD) in dysgranular PIC depicted in a modified drawing from Paxinos and Watson's rat brain in stereotaxic coordinates atlas (2005). (B) Photomicrograph of a transverse section of insula showing a representative site of CBD deposit in dysgranular PIC (white arrow). (C) Photomicrograph of a representative coronal section of the S2 somatosensory cortex of a Wistar rat showing neural connections between dysgranular PIC neurons and S₂.

FIGURE 9- Photomicrographs of transverse sections of the dysgranular region of the posterior insular cortex (PIC) of Wistar rats. (A) Diagramatic representation of a transverse section, showing a histologically confirmed microinjection site (black circle n=4) of the 3000 MW biotinylated dextranamine (BDA) deposits in the dysgranular PIC depicted in a modified drawing from Paxinos and Watson's rat brain in stereotaxic coordinates atlas (2005). (B) representative site of BDA microinjection in dysgranular IC (black arrow). (C and D) Photomicrograph of a representative coronal section of the pontine nucleus of a Wistar rat showing neural connections between dysgranular PIC

neurons and PnC nucleus: BDA-labelled axonal fibres (black arrowheads), terminal buttons (open arrowheads), and cell bodies (black arrow). (E and F) Representative photomicrographs of transverse sections of *PCRtA* nucleus: BDA-labelled cell bodies (black arrow) and axonal fibres (black arrowhead). (G) Representative photomicrographs of transverse sections of *DMTg* nucleus with BDA-labelled axonal fibres (black arrowhead) and cell bodies (black arrow).

FIGURE 10- *Graphical Abstract:* Effect of electrical (e) stimulation (PICS) and PIC *NMDA*r blockade followed by PICS on thermal and mechanical allodynia in chronic NP induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve or *Sham* procedure. A: *von Frey* and *Acetone* tests baselines and CCI or *Sham* surgery was performed. B: PICS was performed in low-frequency (20 μ A, 100 Hz) during 15 s by deep brain stimulation (DBS) device after 21 days of CCI or *Sham*. C: The PIC *NMDA*r blockade was performed through LY235959 microinjection followed by PICS after 21 days of CCI; D: Neuroanatomical projections from PIC to pontine and midbrain nuclei (*PnC*, *PCRtA* and *DMTg*), and S₂ may contribute to the process of NP signalling. PICS attenuates the chronic NP, and the *NMDA* glutamatergic system into the PIC may be involved in PICS-antinociception in rodents with NP conditions.

ANEXO 1

Neurochemical Research

Electrical stimulation and NMDA receptors activation of the infralimbic medial prefrontal cortex modulate chronic neuropathic pain conditions

Manuscript Number:		
Full Title:	Electrical stimulation and NMDA receptors activation of the infralimbic medial prefrontal cortex modulate chronic neuropathic pain conditions	
Article Type:	Original	
Keywords:	neuropathic pain, infralimbic cortex; medial prefrontal cortex; cobalt chloride; glutamatergic NMDA receptor; cerebral cortex neurostimulation	
Corresponding Author:	Renato Leonardo de Freitas, Ph.D. University of Sao Paulo Faculty of Medicine of Ribeirao Preto: Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto Ribeirão Preto, SÃO PAULO BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	University of Sao Paulo Faculty of Medicine of Ribeirao Preto: Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Thais Lohanny Moura-Pacheco	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Thais Lohanny Moura-Pacheco	
	Priscila Medeiros de Freitas, PhD	
	Renata Cristina Martins Pereira	
	Lourenço Sbragia, PhD	
	Christie Ramos Leite-Panissi, PhD	
	Hélio Rubens Machado, PhD	
	Norberto Cysne Coimbra, PhD	
	Renato Leonardo de Freitas, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Research Grant 2013/12916-0)	Dr Renato Leonardo de Freitas
	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Multi-user Equipment Grant 2014/11869- 0)	Dr Renato Leonardo de Freitas
Abstract	Neuropathic pain (NP) represents a complex disorder with sensory, cognitive, and emotional symptoms. The medial prefrontal cortex (mPFC) takes critical regulatory roles and may change functionally and morphologically during NP. There is an incomplete understanding of neurophysiological and psychopharmacological bases of NP phenomenon. This study aimed to investigate the participation of infrailmbic (IFL) division of the mPFC in chronic NP as well as the role of N-methyl-D-aspartic acid receptor (NMDAr) in NP induced by a modified approach for chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in Wistar rats. The electrical neurostimulation of the IFL cortex was performed by low-frequency (20 µA, 100 Hz) stimuli applied during 15s by a deep brain stimulation (DBS) device 21 days after CCI. IFL neurons inactivation by microinjection of cobalt chloride (CoCl2 at 1 mm/200 nL) and the IFL chemical stimulation with the glutamatergic receptors agonist NMDA (at 0.25, 1.0, or 2.0 nmol)	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Into the IFL cortex were performed 21 days after CCI. von Frey and acetone tests were performed to investigate mechanical and cold allodynia. IFL cortex stimulation by DBS decreased the mechanical allodynia in CCI rats. CoCI2 into the IFL cortex changed neither the mechanical nor the cold allodynia. IFL cortex chemical stimulation by an NMDA receptor agonist (at 2.0 nmol) decreased mechanical allodynia. NMDA at any dose (0.25, 1.0, and 2.0 nmol) reduced the duration of shaking/licking in the cold test. These findings suggest that the IFL division of the mPFC and cerebral cortex NMDAr are involved in the attenuation of chronic NP in Wistar rats.

ANEXO 2

Volume 14, número 3 - Número Temático Cérebro & Mente: Interações



Psicologia em Pesquisa



https://periodicos.ufjf.br/index.php/psicologiaempesquisa

Modelos neuropsicobiológicos para estudo da dor e das emoções

Neuropsychobiological models for the study of pain and emotions

Modelos neuropsicológicos para el estudio del dolor y las emociones

Priscila de Medeiros¹, Ana Carolina Medeiros², Renata Cristina Pereira Martins³, Sylmara Esther

Negrini-Ferrari⁴, Juliana Almeida da Silva⁵, José Aparecido da Silva⁶, Norberto Cysne Coimbra⁷ &

Renato Leonardo de Freitas8

⁸ Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL. E-mail: defreitas.rl@gmail.com ORCID: http://orcid.org/0000-0003-1799-5326



¹ Universidade de São Paulo - USP. E-mail: prienfmedeiros@hotmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6787-9801

² Universidade de São Paulo - USP. E-mail: medeiros96.carol@gmail.com ORCID: http://orcid.org/0000-0001-7743-9159

³ Universidade de São Paulo - USP. E-mail: renatamartinsp@hotmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9165-5525

⁴ Universidade de São Paulo - USP. E-mail: sylmaraferrari@gmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3498-5659

⁵ Universidade de São Paulo - USP. E-mail: julisilva18@hotmail.com ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7188-5120

⁶ Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF. E-mail: jadsilva@ffclrp.usp.br ORCID: http://orcid.org/0000-0002-1852-369X

⁷ Universidade de São Paulo - USP. E-mail: nccoimbr@fmrp.usp.br ORCID: http://orcid.org/0000-0002-4676-2620