



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 na Infância

Efeito da estimulação elétrica e química do córtex motor primário na modulação da dor neuropática crônica por meio do envolvimento da substância cinzenta periaquedutal

Ribeirão Preto – SP

2020

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)

SYLMARA ESTHER NEGRINI FERRARI

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E QUÍMICA DO CÓRTEX MOTOR
PRIMÁRIO NA MODULAÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA POR MEIO DO
ENVOLVIMENTO DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL**

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

2019

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 a fonte.

Negrini-Ferrari, Sylmara Esther.

Efeito da estimulação elétrica e química do córtex motor primário na modulação da dor neuropática crônica por meio do envolvimento da substância cinzenta periaquedutal

. Ribeirão Preto, 9.

41 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: **Neurociências e Ciência do Comportamento**

Orientador: Prof. Dr. Hélio Rubens Machado

Nome: Sylmara Esther Negrini Ferrari

Título: Efeito da estimulação elétrica e química do córtex motor primário na modulação da dor neuropática crônica por meio do envolvimento da substância cinzenta periaquedutal

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. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

“Tenha coragem de seguir seu coração e sua intuição.
Eles já sabem o que você realmente deseja. Todo o
resto é secundário.”

(Steven Jobs)

Agradecimentos

Nesses anos de mestrado, de muito estudo, esforço e empenho, me deparei com diversas dificuldades e nada mais justo do que expressar minha gratidão, através de palavras, as pessoas que estiveram comigo e me ajudaram de diversas formas.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao professor Renato L. de Freitas, sem sua confiança e sem que acreditasse em mim quando iniciei a iniciação científica, hoje não estaria aqui. No decorrer dessa jornada travamos diversas batalhas, juntos pudemos resolver algumas, outras nem tanto, mas foram essas que me impulsionaram e deram forças para que hoje estivéssemos todos aqui, comemorando mais uma conquista. Fica aqui meu reconhecimento científico e principalmente minha admiração e respeito.

Gostaria de expressar gratidão ao professor Dr. Hélio Machado que confiou em nosso trabalho, sem esse ilustre profissional não seria possível à realização desse sonho. Obrigada ao professor Coimbra que disponibilizou tempo, espaço e material para a realização do trabalho e também disponibilizou sempre de muito conhecimento.

Gostaria de deixar aqui o meu carinho para todos os amigos dos laboratórios que desde sempre estiveram comigo e me apoiaram, ajudaram, trocaram experiências, conhecimentos e muito além, trocamos empatia. Por essa razão minha gratidão a Priscila nossa mentora e uma mulher batalhadora que vou sempre admirar, a Ana, Renata, Thais, Mari e ao Rafa por todas as risadas e momentos vividos durante todo esse processo.

Aos meus familiares que mesmo não entendendo o que eu fazia, por mais que tenha explicado milhões de vezes, estavam ao meu lado, se preocupando e me orientando da melhor forma possível. Obrigada Mãe, tia, tio, irmão, cunhada, primo e pai.

Não poderia deixar de agradecer a Milena, minha companheira, aquela que sempre esteve ao meu lado, obrigada por toda dedicação, paciência e compreensão para com a nossa família,

obrigada por estar sempre disposta a me ajudar, principalmente depois de dias exaustivos de trabalho, saiba que essa conquista é nossa!

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

A todos aqueles que embora não nomeados, me apoiaram em distintos momentos e por suas presenças afetivas e inesquecíveis o meu muito obrigado!

NEGRINI-FERRARI; Sylmara Esther. Efeito da estimulação elétrica e química do córtex motor primário na modulação da dor neuropática crônica por meio do envolvimento da substância cinzenta periaquedutal. 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2019.

RESUMO

Atualmente existem indicações para o uso da estimulação encefálica profunda [(*deep brain stimulation* (DBS))], para o manejo da dor crônica (DC) e neuropática (DN). A estimulação do córtex motor (CM) é uma técnica aplicada para o tratamento de pacientes que apresentam a síndrome da dor talâmica após acidente vascular encefálico, sendo também utilizada para o manejo de outros tipos de DN e DC. Entretanto, pouco se sabe sobre os seus mecanismos fisiopatológicos, neurais e da neuroquímica subjacente ao efeito analgésico produzido pela neuroestimulação, especialmente no CM primário (M₁). Sendo assim, a proposta do presente estudo foi avaliar se a estimulação elétrica (EE) e química (EQ) do M₁ modula a DN crônica, e se o possível efeito analgésico da EE do M₁ recruta a coluna dorso-medial (dm) da substância cinzenta periaquedutal (SCP), um núcleo do sistema endógeno de inibição de dor, assim como os receptores glutamatérgicos do tipo N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Ratos Wistar machos foram utilizados para indução da mononeuropatia periférica, sendo realizada a injúria por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático direito. O limiar nociceptivo foi aferido, avaliando-se a alodínia mecânica através do teste de *von Frey*. Após 21 dias da CCI, foi realizada a neuroestimulação elétrica (EE: 20µA/15s) do M₁ através do equipamento DBS (*MiniMatrix da Thomas Recording, Germany*) ou a EQ, através da microinjeção de 200nL do agonista NMDA (2, 4 e 8nmol) no M₁ de animais neuropáticos. Foi realizado o pré-tratamento da SCPdm por meio da microinjeção de LY235959 (na dose de 8nmol/200nL), um antagonista de receptores do tipo NMDA, seguido, pela EE do M₁ em ratos com DN crônica. Também avaliamos a capacidade de locomoção dos ratos CCI e Sham com o teste de campo aberto, após isso os animais foram submetidos ao treinamento físico na esteira durante 7 dias. Os resultados mostraram que a EQ do M₁ através do agonista NMDA (nas doses de 2 e 8nmol) e a EE

do M₁ atenuaram a DN crônica através da diminuição da alodinia mecânica dos animais. O pré-tratamento da SCPdm com o antagonista de receptores NMDA, o LY235959 (8nmol), atenuou o efeito analgésico causado pela EE do M₁ em animais com DN crônica. A locomoção geral dos animais não mostrou diferença entre os grupos. Mas o exercício físico não foi capaz de atenuar a dor neuropática dos ratos submetidos a CCI. Conclui-se que a estimulação química dos receptores NMDA no M₁ produz analgesia, atenuando a DN crônica. Além disso, a presente pesquisa demonstra que a neuroestimulação elétrica do M₁ também causa analgesia, atenuando a DN crônica e este efeito é dependente da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na dmSCP em ratos Wistar.

PALAVRAS-CHAVE: Córtex motor primário. Estimulação do córtex motor. Receptores glutamatérgicos NMDA. Analgesia. Substância cinzenta periaquedutal. Alodinia mecânica. Dor neuropática crônica.

NEGRINI-FERRARI; Sylmara Esther. Effect of electrical and chemical Stimulation of the primary motor cortex on the modulation of chronic neuropathic pain by periaqueductal gray matter involvement. 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2019.

ABSTRACT

Currently, there is evidence to use deep brain stimulation (DBS) for chronic pain (CP) and neuropathic pain (NP) management. The motor cortex stimulation (MCS) is a procedure applied for the treatment in a patient that has the thalamic pain syndrome after stroke and the MCS is also indicated to CP and NP pain management. However, little is known about the pathophysiological, neural and neurochemical mechanisms underlying the analgesic effect. The aims of the present work were evaluated whether the primary (M_1) MCS can modulate CP and neuropathic pain NP in rodents, investigating the psychopharmacological and neural mechanisms that result in its analgesic effect. Male Wistar rats were used. The chemical and electrical stimulation of the M_1 was made and it was preceded by the blockage of the NMDA receptors located in the periaqueductal grey matter (dmPAG), an endogenous inhibitory system of pain during the electrical M_1 -stimulation. Male Wistar rats were used to induce peripheral mononeuropathy by chronic constriction injury (CCI) of the right sciatic nerve. The nociceptive threshold was measured through of mechanical allodynia evaluation in the von Frey test. After 21 days of CCI, it was performed the electrical stimulation of M_1 through of DBS equipment (*MiniMatrix Thomas Recording, Germany*) or chemical stimulation in M_1 by microinjection of the NMDA agonist (2, 4 and 8nmol) in neuropathic rats. The blockade of NMDA receptors with LY235959 (at 0.25, 4 and 8nmol) in the dmPAG was also performed before the M_1 -electrical stimulation. We also evaluated the locomotion capacity of CCI and Sham rats with the open field test, after which animals were subjected to physical training on the treadmill for 7 days. The M_1 chemical and electrical stimulation attenuate the NP, decreasing the mechanical allodynia in CCI rats. The pre-treatment of dmPAG with NMDA receptors antagonist, LY235959 (at 8nmol), blockaded the analgesic effect caused by M_1 electrical stimulation. The general locomotion of the animals showed no difference between the groups. However, physical exercise was not able to mitigate the neuropathic pain of rats submitted to CCI. In conclusion, the M_1 -electrical stimulation attenuated the chronic NP and

this effect is dependent on the activation of NMDA receptors in dmPAG of chronic NP in Wistar rats.

KEYWORDS: Primary motor cortex. Deep brain stimulation. NMDA glutamatergic receptors. Mechanical allodynia. Analgesia. Periaqueductal grey. chronic neuropathic pain.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Principais causas de anos vividos com deficiência, padronização por idade por localidade para ambos os sexos combinados, 2017. Fonte: Figura modificada do Global Burden of Disease Study 2017. (JAMES *et. al.*, 2018) 28
- Figura 2 - Representações esquemáticas das vias ascendentes de dor e temperatura: da transdução à percepção. Resposta ao estímulo lesivo (químico, mecânico ou térmico), levando à liberação de mediadores inflamatórios que sensibilizam os nociceptores, transformando-os em um estímulo elétrico. (A) Tipos de neurônios aferentes primários responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva periférica. (B) Modulação da informação nociceptiva pelo corno dorsal da medula espinal enviada para áreas supracorticais pelo trato espinotalâmico conhecido como sistema anterolateral (C). Percepção da dor: chegada da informação ao córtex somatossensorial primário (S₁) após segunda sinapse com o núcleo ventral pósterolateral do tálamo pelo sistema anterolateral (D). CDME= corno dorsal da medula espinal, S₁ = córtex somatossensorial primário, VPL = Ventral pósterolateral. Fonte: Adaptado de PURVES, 2010. 31
- Figura 3 - Representação esquemáticas das interconexões das vias ascendente (Azul) e descendente (Vermelho) do SNC responsáveis pela percepção, modulação e cognição da dor, representadas de acordo com suas áreas anatômicas (A) e representação das áreas subjacentes interligadas ao processo descendente de modulação da dor (B). CDME = corno dorsal da medula espinal, PB = núcleo parabraquial, HT = hipotálamo, SCP = substância cinzenta periaquedutal, LC= *locus coeruleus*, FRB = formação reticular bulbar, NMgR = núcleo magno da rafe. Fonte: Figura: Adaptada de PURVES, 2010. 34
- Figura 4 Representação esquemática do fenômeno que envolve a inibição da via descendente responsável pela modulação da dor, denominada “sensibilização central”. BDNF = Fator Neurotrófico do Cérebro. Fonte: Adaptado de Qaseem, 2017. 36
- Figura 5 Modelos animais experimentais de dor neuropática periférica. Fonte: Revista Dor. Modelos experimentais para o estudo da dor neuropática. Fonte: SOUSA, 2016. 38
- Figura 6 - Alterações causadas pelo exercício no sistema nervoso sensorial. Visão geral das inúmeras vantagens mecânicas positivas que podem contribuir para os benefícios sensoriais

globais criados com a atividade física. NR₁ = subunidade do receptor de NMDA, BDNF: Fator neurotrófico do cérebro, TrkB = Receptor de tropomiosina quinase B, NT-3 = neurotrofina 3, SNAP1= sinapsina I, NGR= fator de crescimento do nervo, GAP43 = proteína associada ao crescimento 43, TRPM8= Receptores transitórios de canais de cátions subfamília M membro 8. TRPV₁: Receptor vanilóide (canal iônico) de potencial transitório. Fonte: Adaptado de Cooper, 2016. 43

Figura 7 - Síntese do glutamato e seu ciclo entre neurônio e células da glia. A glutamina é sintetizada no neurônio pré-sináptico e liberada como glutamato na fenda sináptica, sendo reabsorvida através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (TAAE) e sintetizado em glutamina pela enzima glutamina-sintetase localizada na célula glial. Em seguida, é enviado novamente para o neurônio pré-sináptico. Fonte: Purves, 2010. 45

Figura 8 - Representação esquemática dos receptores glutamatérgicos e suas subdivisões. Fonte: Adaptado de Purves, 2010. NMDA = N-metil-D-aspartato, AMPA = ácido-amino- 3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico, KA = cainato, mGluR= receptores metabotrópicos do glutamato. 46

Figura 9 - Modelo de Constrição Crônica do Nervo Isquiático (CCI) proposto por Bennet e Xie (1988) com quatro ligaduras no nervo isquiático. Fonte: Joachim Scholz e cols., 2008. *Nota bene:* no presente trabalho, foi realizada apenas uma ligadura no nervo isquiático dos roedores. Esta proposta fora realizada em nosso grupo de pesquisa (Medeiros e cols., 2019a,b,c). 52

Figura 10 - Teste de von Frey, aferindo a alodinia mecânica com o uso do filamento de von Frey (10g) em animais com dor neuropática crônica 21 dias após a CCI. Fonte: Laboratório de Neurociências da Dor & Emoções. FMRP-USP. 54

Figura 11 - Procedimento experimental da estimulação química do córtex motor primário. CCI = constrição crônica do nervo isquiático. CM = Córtex Motor, Min = minutos. 57

Figura 12 – Gerador de estímulos (STG3008-FA, sistemas multicanal, Alemanha) (A). Animal recebendo o estímulo elétrico no córtex motor primário e posicionado no aparato do

teste de campo aberto (B). Fonte: Laboratório de Neurociências da Dor & Emoções – FMRP-USP.	58
Figura 13 - Procedimento experimental da eletroestimulação pelo aparelho <i>Deep Brain Stimulation</i> no córtex motor primário. CCI = constrição crônica do nervo isquiático. CM = Córtex Motor. EECM = Eletroestimulação do Córtex Motor, DBS = <i>Deep Brain Stimulation</i>	60
Figura 14 - Bloqueio do receptor glutamatérgico do tipo NMDA da SCPdm (um núcleo do sistema endógeno de inibição de dor), seguida pela estimulação elétrica do M_1 . Representação esquemática da sequência temporal dos experimentos envolvendo a estimulação por meio do equipamento DBS no CM após pré-tratamento da SCPdm com LY235959, um antagonista de receptores NMDA. CCI = constrição crônica do nervo isquiático. CM = Córtex Motor. SCPdm = Substância Cinzenta Periaquedutal. DBS = <i>Deep Brain Stimulation</i>	61
Figura 15 - Bloqueio do receptor glutamatérgico do tipo NMDA do sistema endógeno de inibição da dor, seguida pela estimulação química do CM primário. Representação esquemática da sequência temporal dos experimentos envolvendo a estimulação química do CM, por meio da microinjeção do agonista NMDA após pré-tratamento da SCPdm com o LY235959, um antagonista de receptores NMDA. CCI = constrição crônica do nervo isquiático. CM = Córtex Motor. SCPdm = Substância Cinzenta Periaquedutal. NMgR = Núcleo Magno da Rafe.....	63
Figura 16 Avaliação da atividade física sobre a dor neuropática crônica. Representação esquemática da sequência temporal dos experimentos envolvendo treinamento da esteira nos animais com ou sem constrição crônica do nervo isquiático.	65
Figura 17 - Representação dos sítios de microinjeção do tratamento do córtex motor (CM) primário (M1) histologicamente confirmados. Microinjeções de veículo / grupo CCI (o), NMDA 2 nmol / grupo CCI (●), NMDA 4 nmol / grupo CCI (□), NMDA 8 nmol / grupo CCI (■), veículo / grupo Sham (▲), NMDA 2 nmol / grupo Sham (Δ), NMDA 4 nmol / grupo Sham (◇), NMDA 8 nmol / grupo Sham (◆) realizado no hemisfério cerebral contralateral do córtex motor primário (M_1) em relação ao lado CCI ou procedimento simulado <i>sham</i>	66

Figura 18 - Representação esquemática dos sítios de eletroestimulação do córtex motor primário histologicamente confirmados. EECM 0 μ A/15s – Sham (n: 8); EECM 20 μ A/15s – Sham (n: 8); EECM 0 μ A/15s – CCI (n: 8); EECM 20 μ A/15s – CCI (n: 8);..... 67

Figura 19 Representação dos sítios de microinjeção do tratamento do córtex motor (CM) primário (M₁) e da coluna dorso-medial da substância cinzenta periaquedutal (SCPdm) de acordo com o atlas estereotáxico de Paxinos; Watson (1997). A: Microinjeções do veículo SCPdm / estímulo M1 / grupo CCI (o), LY235959 0,25 nmol SCPdm / estímulo M1 / grupo CCI (◄), LY235959 2 nmol SCPdm / estímulo M1 / grupo CCI (►), LY235959 8 nmol SCPdm / estímulo Grupo M1 / CCI (▼), veículo SCPdm / sem estímulo M1 / grupo CCI (■), LY235959 8 nmol SCPdm / sem estímulo M1 / grupo CCI. Veículo SCPdm / estímulo M1 / grupo Sham (x), LY235959 8 nmol SCPdm / estímulo M1 / grupo Sham (◊), veículo SCPdm / sem estímulo M1 / grupo Sham (⊕), LY235959 8 nmol SCPdm / sem estímulo M1 / grupo CCI (⊗). D-E: Fotomicrografias representativas de uma seção transversa do encéfalo mostrando um local de córtex motor primário (M1) e microinjeção do córtex cerebral periaquedutal mesocromo (SCPdm), respectivamente. 68

Figura 20 - Representação dos resultados do teste de campo aberto (*Open Field*) para avaliar o comportamento exploratório em uma arena circular entre animais *sham* e CCI, durante a permanência na área central (A), na periferia (B), no cruzamento (C) e no levantamento(D). Os dados foram representados pelo teste não-paramétrico t *de Student* P > 0,05, sem diferença entre os grupos..... 70

Figura 21 - Avaliação da alodinia mecânica na pata direita (ipsilateral) do animal após a estimulação química do córtex motor (EQCM) primário (M₁), através da microinjeção do agonista de NMDA sobre a DNC. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento *sham*; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI e/ou *sham*; seta B = EQCM. Grupos CCI (O) Veículo CM, (■) EQCM - NMDA 2nmol (n = 8), (▲) EQCM NMDA - 4nmol (n = 8) e (▼) EQCM NMDA - 8nmol (n = 8). Grupos Sham: (◆) Veículo CM (n = 8). * diferença entre o grupo EQCM NMDA – 8nmol e Veículo CM; # p < 0,05 diferença significativa entre o grupo EQCM NMDA – 4nmol, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguido pelo teste de post-hoc de Tukey. 72

Figura 22 - Avaliação da alodinia mecânica na pata esquerda (contralateral) do animal após a EQCM primário (M_1) através da microinjeção do agonista de NMDA sobre a DNC. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI e/ou Sham; seta B = Estimulação química do córtex motor. Grupos CCI (O) Veículo CM, (■) EQCM - NMDA 2nmol (n=8), (▲) EQCM NMDA - 4nmol (n=8) e (▼) EQCM NMDA - 8nmol (n=8). Grupos Sham: (◆) Veículo CM (n=8). Não houve efeito estatisticamente significativo, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguido pelo teste de *post-hoc* de Tukey. 73

Figura 23 - Estimulação elétrica do córtex motor (M_1) atenua a dor neuropática crônica. Avaliação da alodinia mecânica na pata direita (ipsilateral) do animal após a EECM primário (M_1) com o *Deep Brain Stimulation* (DBS) em animais *sham* ou CCI. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia CCI ou procedimento *sham*; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI ou *sham*; seta B = EECM. Grupos *sham* = “falso-operado”: (O) EECM - 0 μ A/15s (n=8), (□) EECM - 20 μ A/15s (n = 8) (●) EECM - 0 μ A/15s (n = 8), (□) EECM - 20 μ A/15s (n = 8). Os dados foram apresentados como médias e erro padrão da média. + p < 0,001 em relação ao grupo EECM 0 μ A/15s – *Sham*; *p<0,001 em relação ao grupo EECM 0 μ A/15s – CCI, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey. 75

Figura 24 Avaliação da alodinia mecânica na pata esquerda (contralateral) do animal após a EECM primário (M_1) com o *Deep Brain Stimulation* (DBS) em animais *sham* ou CCI.. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia CCI ou procedimento *sham*; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI e/ou *sham*; seta B = EECM. Grupos *sham* = “falso-operado”: (O) EECM - 0 μ A/15s (n = 8), (□) EECM - 20 μ A/15s (n = 8) (●) EECM - 0 μ A/15s (n = 8), (□) EECM - 20 μ A/15s (n = 8). Os dados foram apresentados como médias e erros padrão da média. Não houve diferença estatisticamente significante segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey. 77

Figura 25 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA da SCPdm na analgesia induzida pela EQCM. Representação da estimulação química do córtex motor (EECM) com o bloqueio dos receptores de NMDA na SCPdm com a utilização de LY235959. Pata ipsilateral e

contralateral, respectivamente. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI; seta B = Estimulação química da SCPdm seguida da estimulação química do córtex motor. : (◆) Veículo SCPdm + Veículo CM - Sham (n = 7), (●) Veículo SCPdm + Veículo CM – CCI (n = 7), (O) LY235959 8nmol SCPdm + Veículo CM – CCI (n = 7), (■) LY235959 8nmol SCPdm + EQCM NMDA - 8nmol, (▲) LY235959 0,25nmol SCPdm + EQCM NMDA - 8nmol, (∇) LY235959 2nmol SCPdm + EQCM NMDA - 8nmol, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguido pelo teste de *post-hoc* de Tukey..... 79

Figura 26 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA na SCPdm sobre a analgesia induzida pela EECM. Representação do bloqueio dos receptores de NMDA na SCPdm com a utilização de LY235959, seguida pela estimulação elétrica do córtex motor (EECM) sobre a alodinia mecânica avaliada na pata ipsilateral dos animais com DNC induzida pela CCI. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI; seta B = Estimulação química da SCPdm seguida da estimulação elétrica do córtex motor. CCI: (◆) Veículo SCPdm + EECM a 0 μ A / 15s (n = 7), (■) Veículo SCPdm + EECM a 20 μ A / 15s (n = 7), (●) LY235959 8nmol SCPdm + EECM a 0 μ A / 15s (n = 7), (◇) LY235959 0,25nmol SCPdm + EECM a 20 μ A / 15s (n = 7), (Δ) LY235959 2nmol SCPdm + EECM a 20 μ A / 15s (n = 7), (○) LY235959 8nmol SCPdm + EECM a 20 μ A / 15s (n = 7). # p < 0,001 em relação ao grupo Veículo SCPdm + EECM a 0 μ A / 15s (CCI) *p < 0,001 em relação ao veículo SCPdm + EECM a 20 μ A / 15s (CCI), segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey..... 81

Figura 27 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA-SCP na analgesia induzida pela EECM. Representação da estimulação elétrica do córtex motor (EECM) com o bloqueio dos receptores de NMDA na SCPdm com a utilização de LY235959. Pata contralateral. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI; seta B = Estimulação química da SCPdm e estimulação elétrica do córtex motor. CCI: (◆) Veículo SCPdm + EECM a 0 μ A / 15s (n = 7), (■) Veículo SCPdm + EECM a 20 μ A / 15s (n = 7),

(●) LY235959 8nmol SCPdm + EECM a 0 μ A / 15s (n = 7), (◇) LY235959 0,25nmol SCPdm + EECM a 20 μ A / 15s (n = 7), (Δ) LY235959 2nmol SCPdm + EECM a 20 μ A / 15s (n = 7), (○) LY235959 8nmol SCPdm + EECM a 20 μ A / 15s (n = 7), segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey. 82

Figura 28 - Efeito da atividade física aeróbica em relação à atenuação da dor neuropática crônica, seguida pela EECM em ratos com DNC. Pata ipsilateral. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 14 dias da CCI; LB3 – Linha de base após 21 dias de CCI e 6 de treinamento seta B = Teste da esteira seguida da estimulação elétrica do córtex motor. Sham: (∇) S/ esteira + S/ EECM; (O) C/ esteira + S/ EECM; (□) C/ esteira + S/ EECM; CCI: grupo (Δ) S/ esteira + S/ EECM; (▲) S/ Esteira + C/ EECM; (◆) C/ Esteira + S/ EECM; (■) C/ Esteira + C/ EECM # p < 0,001 em relação aos grupos Sham, * p < 0,001 em relação ao grupo S/ esteira + S/ EECM, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey..... 85

Figura 29 Efeito da atividade física aeróbica em relação à atenuação da dor neuropática crônica. Pata ipsilateral. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 14 dias da CCI; LB3 – Linha de base após 21 dias de CCI e 6 de treinamento seta B = Teste da esteira seguida da estimulação elétrica do córtex motor. Sham: (∇) S/ esteira + S/ EECM; (O) C/ esteira + S/ EECM; (□) C/ esteira + S/ EECM; CCI: grupo (Δ) S/ esteira + S/ EECM; (▲) S/ Esteira + C/ EECM; (◆) C/ Esteira + S/ EECM; (■) C/ Esteira + C/ EECM, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey. ... 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
CB ₁	receptor canabinoide do tipo CB ₁
CCA	córtex cingulado anterior
CCI	injúria por constrição crônica
CPFM	córtex “pré-frontal medial”
DC	dor crônica
DN	dor neuropática
DNC	dor neuropática crônica
EPM	erro padrão da média
Min	minutos
N	número de animais por grupo
NMDA	N-metil D-Aspartato
NMgR	núcleo magno da rafe
NMOL	nanomol
PrL	córtex pré-límbico
S	segundos
S1	córtex somatossensorial primário
S2	córtex somatossensorial secundário

SCP substância cinzenta periaquedutal

TRPV₁ receptor vaniloide (canal iônico) de potencial transitório

SNC Sistema Nervoso Central

CDME corno dorsal da medula espinal

ACC córtex cingulado anterior - *sigla em inglês*

PFC córtex pré-frontal

ATV área tegmentar ventral

Nca núcleo accumbens

VPL ventral pósterolateral (Núcleo talâmico)

PB núcleo parabraquial

HT hipotálamo

LC locus ceruleus

FRB formação reticular bulbar

BDNF fator neurotrófico derivado do cérebro - *sigla em inglês*

FBSS síndrome pós-laminectomia - *sigla em inglês*

EECM estimulação elétrica do córtex motor

DBS *Deep Brain Stimulation* – *sigla em inglês*

CM córtex motor

SCPdm substância cinzenta periaquedutal dorso-medial

RPE reflexo pressor do exercício

ASIC3 canais iônicos de detecção de ácido 3 GRD – gânglio da raiz dorsal

NGF fator de crescimento nervoso – *sigla em inglês*

NT-3 neurotrofina 3

SNAP1 sinapsina I

GAP43 proteína associada ao crescimento 43

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-propiónico

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.

Hiperalgisia: aumento da dor de um estímulo que normalmente provoca dor.

Hipoalgisia: 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: 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	27
1.1 Epidemiologia da dor	27
1.2 Dor e nocicepção.....	28
1.3. Vias descendentes e modulação da dor	32
1.4 Sensibilização central.....	35
1.5 Modelos animais de dor neuropática.....	37
1.6 Dor neuropática crônica, analgesia e córtex motor.....	39
1.7 Atividade física e analgesia nas dores neuropáticas.....	41
1.8 Neurotransmissão Glutamatérgica e Córtex Motor.....	44
2 OBJETIVO GERAL	49
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1. Animais.....	51
3.2 Modelos de dor neuropática.....	51
3.3 Teste de Von Frey	52
3.4 Cirurgia estereotáxica: implantação do eletrodo e da cânula-guia.....	54
3.6 Teste de campo aberto (<i>open field</i>)	55
3.7 Histologia.....	55
3.8 Drogas.....	56
3.9 Análises estatísticas.....	56

3.10 Procedimentos experimentais	56
3.10.1 Microinjeção e estimulação química do córtex motor primário	56
3.10.2 Estimulação elétrica do córtex motor primário	58
3.10.3 Bloqueio do receptor NMDA do sistema endógeno de inibição de dor, seguida da estimulação elétrica do córtex motor primário	60
3.10.4 Bloqueio do receptor NMDA do sistema endógeno de inibição da dor, seguido pela estimulação química do cortex motor	62
3.10.5 Avaliação da atividade física sobre a dor neuropática crônica	63
4 RESULTADOS	66
4.1 Teste do campo aberto (<i>Open Field</i>).....	69
4.2 Estimulação química do córtex motor (EQCM) primário (M1) atenua a dor neuropática crônica	70
4.3 Estimulação elétrica do córtex motor (EECM) primário (M ₁) atenua a dor neuropática crônica.	75
4.4 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA da SCPdm na analgesia induzida pela EQCM	77
4.5 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA da SCPdm na analgesia induzida pela estimulação elétrica do córtex motor (EECM)	79
4.6 Efeito da Atividade Física sobre a DNC	84
5 DISCUSSÃO	87
6 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
APÊNDICES	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da dor

Estudos mostraram que o declínio das taxas de mortalidade de 1990 a 2016 levou ao aumento da expectativa de vida, ao envelhecimento da população global e a uma expansão do ônus não fatal de doenças e lesões. Esses estudos também mostraram que uma parcela substancial da população mundial experimenta uma perda de saúde não fatal considerável, considerando as diferenças entre regiões, faixas etárias e sexos (VOS, 2017).

A dor destaca-se como um dos principais problemas de saúde pública, e sua relevância é constatada através de medidas de incidência e prevalência na população adulta (Deyo, 2001). A dor crônica (DC) ou persistente tem sido destacada como uma das condições clínicas mais incapacitantes no mundo. Além do sofrimento, a DC altera o quadro econômico e social da população, segundo o Instituto do Comitê de Medicina de Pesquisa Avançada em Dor (*Institute of Medicine Committee on Advancing Pain Research*, 2011). Sendo uma das principais causas de incapacidade, pode estar associada à comorbidades como: doenças neurológicas, traumáticas, fatores psicológicos e socioculturais (STEWART, 2003).

Considerando as principais razões de anos vividos com deficiência em todos os países, demonstrou-se que a lombalgia foi a primeira causa de incapacidade de 126 países dos 195 avaliados, como apresentado na figura 1 (DEYO, 2001; JAMES, 2018).

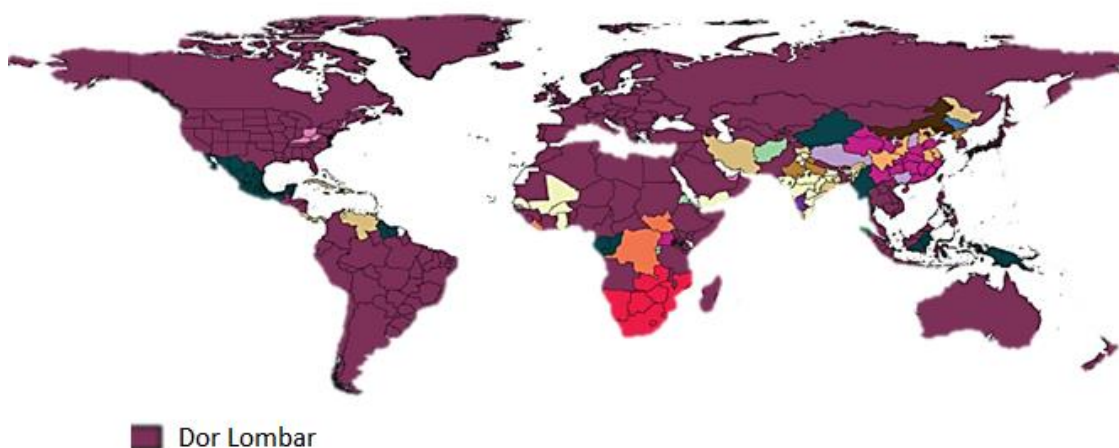


Figura 1 - Principais causas de anos vividos com deficiência, padronização por idade por localidade para ambos os sexos combinados, 2017. Fonte: Figura modificada do Global Burden of Disease Study 2017. (JAMES *et. al.*, 2018)

Globalmente, três doenças crônicas (dor lombar, distúrbios de dor de cabeça e transtornos depressivos) prevaleceram como três das quatro principais causas de anos vividos com deficiência, causando coletivamente 162 milhões de disfuncionalidades em 2017, implicam um em cada cinco anos vividos com deficiência globalmente. Essa parcela significativa da população pode ter acesso a tratamento e assistência, pois os distúrbios que levam a dor de cabeça e ao transtorno depressivo podem ser tratados com terapêutica de baixo custo. A persistência de tais patologias é preocupante, dada a relação do primeiro com a autoagressão e o último com a potencial perda de status funcional na força de trabalho (JAMES, 2018). Por essa razão, o estudo da dor e sua cronificação, principalmente da dor lombar crônica, é essencial para a saúde mundial.

A lombalgia é definida como dor e desconforto localizados entre a margem costal e a prega glútea inferior, com ou sem dor na perna. Pode haver dor irradiada para o membro inferior, e esse quadro é chamado de lombociatalgia, quando há o envolvimento do nervo isquiático no quadro clínico, que pode ser de origem radicular ou referida. Nos portadores de dor lombar crônica o diagnóstico e novas abordagens de tratamento para o componente neuropático e das suas comorbidades (distúrbio do sono, ansiedade, depressão) é fundamental. (BOYCE-RUSTAY; JARVIS, 2009)

1.2 Dor e nocicepção

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association of the Study of Pain - IASP*), define-se dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada à lesão tecidual, real ou potencial, ou descrita em termos desta lesão. Além disso, pode ser definida pelo tempo: quando a dor é aguda, sua duração é até 4 semanas; subaguda, de 4 a 12 semanas e, para ser considerada dor crônica ou persistente, o tempo necessário é maior que 12 semanas (QASEEM, 2017).

Atualmente sabemos que a dor está presente em nossas vidas como uma das principais formas de alerta ao sistema nervoso, sendo essencial para a integridade do

indivíduo e para a sobrevivência da espécie. Com isso, buscamos compreender o processamento da dor, assimilando-a como o processamento sensorial de uma estimulação mecânica, química ou elétrica.

De fato, a percepção da dor depende de vias e receptores específicos, podemos considerar como dor estímulos que incluem componentes discriminativos da sensibilidade dolorosa, componentes esses que serão destacados mais a frente. (FENTON, 2015). O processamento nociceptivo, mecanismo pelo qual estímulos periféricos são transmitidos ao sistema nervoso central, permite aos animais sentir e evitar estímulos potencialmente prejudiciais aos tecidos, sendo fundamental para a sobrevivência. Essa elaboração depende de nociceptores, que são receptores especializados que detectam e respondem a estímulos químicos, mecânicos ou térmicos (TRACEY, 2017).

A resposta a um estímulo lesivo é a liberação de mediadores inflamatórios locais como a adenosina, bradicinina, histamina, serotonina, prostaglandina, neurotrofinas e substância P, que, por sua vez, ativam ou sensibilizam os nociceptores. Esse processo é chamado de sensibilização periférica, que consiste na ativação ou sensibilização de nociceptores, diminuindo seu limiar de despolarização, e com isso ocorre a transformação do estímulo (químico, mecânico ou térmico) em elétrico. Tal processo é dependente de um potencial de ação, que irá transmitir o sinal aferente ao corno dorsal da medula espinal (CDME) por meio do primeiro neurônio aferente da via nociceptiva (fibras A δ e C) (APKARIAN e cols., 2005; GARLAND, 2012).

Ainda sobre a transmissão do estímulo nociceptivo, através do contato do neurônio aferente primário com neurônios de segunda ordem no CDME, a via nociceptiva cruza o plano mediano da medula, ascendendo para regiões supraespinais, como o núcleo talâmico ventral pósterolateral (JULIUS, 2013). De fato, a dor é processada por uma rede diversa e ampla de neurônios, sendo esses destinos centrais mediadores de diferentes aspectos da resposta sensorial e comportamental mediante o estímulo doloroso. O sistema nervoso central (SNC) coordena componentes discriminativos sensoriais, afetivo-motivacionais e cognitivos da dor. O primeiro é ligado à localização, intensidade e qualidade do estímulo, ao passo que o segundo refere-se ao desprazer, medo, ansiedade e depressão, sendo o terceiro, por sua vez,

relacionado à atenção e memória da dor (DE OLIVEIRA, 2000; PURVES, 2010; TRACEY, 2017).

O caminho para a percepção da dor é longo (Figura 2). Apenas após a chegada da informação ao córtex somatossensorial primário (S_1) via núcleo talâmico ventral póstero-lateral, inicia-se o processamento desta informação pelo sistema anterolateral do tracto espinotalâmico, responsável pela transmissão da sensibilidade não discriminativa (dor, temperatura, pressão). (DINAKAR; STILLMAN, 2016).

Diversos estudos identificaram regiões do encéfalo ativadas por estímulos nocivos, incluindo o córtex somatossensorial primário e secundário (S_1 e S_2 , respectivamente), córtex cingulado anterior (ACC), córtex pré-frontal (PFC), ínsula, complexo amígdala, tálamo, cerebelo e circuito de recompensa mesolímbico, que inclui a área tegmentar ventral (ATV) e o núcleo accumbens (NAc) (BUSHNELL, 2013; LEKNES, 2008). Acredita-se que os córtices somatossensitivos (S_1 e S_2) e a ínsula codifiquem características sensoriais da dor, tais como, qualidade (picada, queimação ou dor), localização e duração. A região pré-frontal e o sistema límbico (ACC, PFC, complexo amígdaloide, ATV e NAc) codificam respostas emocionais e motivacionais, e estão implicados no aspecto afetivo e contextual da dor. As conexões entre esses locais fornecem um meio pelo qual sinais emocionais e motivacionais podem alterar a experiência e a percepção da dor através de interações com o sistema descendente modulador da dor. (OSSIPOV, 2014) Além disso, as conexões estão associadas a diversos componentes descritos pela literatura como: perceptivo-discriminativo, permite que o organismo identifique o estímulo doloroso; afetivo-emocional, integra o sistema límbico ao estímulo percebido pelo componente anterior, ou seja, ocorre uma reação emocional decorrente da percepção da dor; cognitivo-comportamental, envolvendo fatores atualmente denominados psicossociais. (BOYCE-RUSTAY; JARVIS, 2009; *Institute of Medicine Committee on Advancing Pain Research*, 2011)

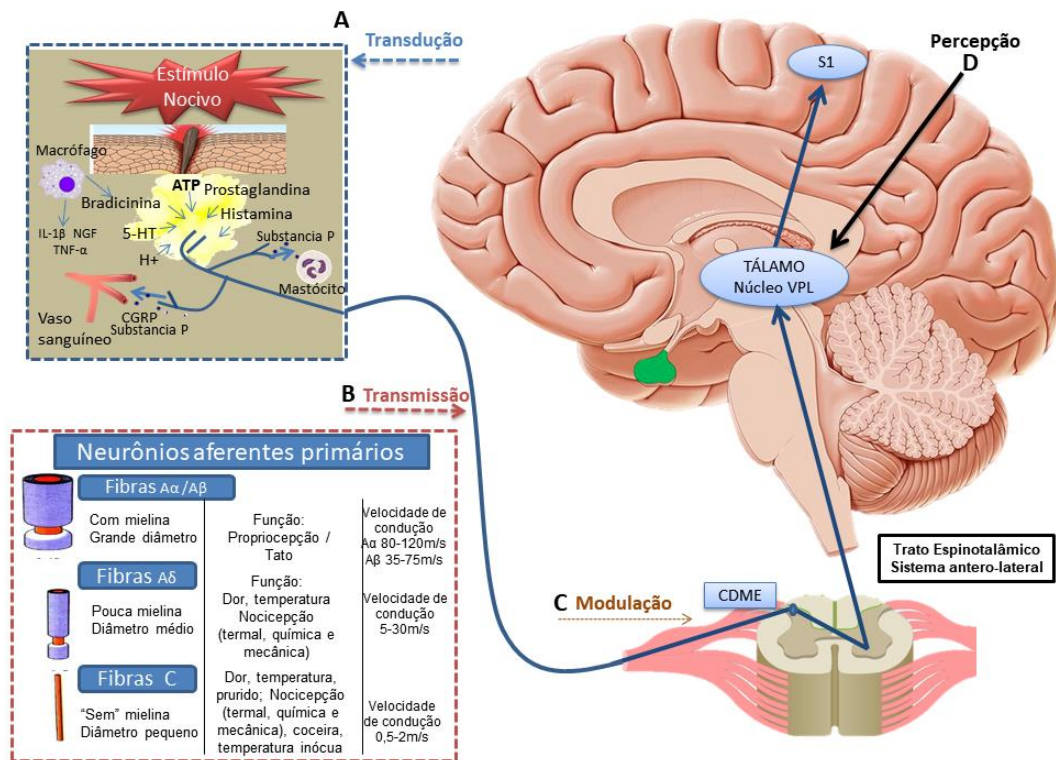


Figura 2 - Representações esquemáticas das vias ascendentes de dor e temperatura: da transdução à percepção. Resposta ao estímulo lesivo (químico, mecânico ou térmico), levando à liberação de mediadores inflamatórios que sensibilizam os nociceptores, transformando-os em um estímulo elétrico. (A) Tipos de neurônios aferentes primários responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva periférica. (B) Modulação da informação nociceptiva pelo corno dorsal da medula espinal enviada para áreas supracorticais pelo trato espinotalâmico conhecido como sistema anterolateral (C). Percepção da dor: chegada da informação ao córtex somatossensorial primário (S₁) após segunda sinapse com o núcleo ventral pósterolateral do tálamo pelo sistema anterolateral (D). CDME= corno dorsal da medula espinal, S₁ = córtex somatossensorial primário, VPL = Ventral pósterolateral. Fonte: Adaptado de PURVES, 2010.

1.3. Vias descendentes e modulação da dor

Para a compreensão da neurofisiologia da dor é necessário ampliar o foco além dos impulsos nociceptivos aferentes que se originam na periferia para grandes áreas corticais, além de atentar aos mecanismos endógenos envolvidos na manutenção e modulação da dor em todos os níveis do SNC. (MARCHAND, 2014).

Vias descendentes possuem um componente importante para a supressão da dor através do medo inato e condicionado, sendo uma característica do SNC, em mamíferos, para controlar a percepção dolorosa na presença de situações desse tipo. A analgesia é mediada pelas vias inibitórias descendentes que são oriundas do complexo amigdalóide, substância cinzenta periaquedutal (SCP) e medula rostroventral medial (MRV), através do núcleo magno da rafe (NMgR). (KWON, 2014)

A percepção da dor é um processo dinâmico e está sujeito à modulação contínua pelo sistema descendente, que influencia a transmissão da entrada sensorial ao nível do CDME. Nos últimos anos, estudos são direcionados para desvendar fontes do controle descendente do processamento nociceptivo, seu mecanismo de ação e fatores que determinam seu nível de atividade. (LOVICK, 2008)

Em 1950, Melzack e Wall defendiam a teoria do portão da dor, destacado como uma teoria que admitia existir nos cornos posteriores medulares um mecanismo neural que comporta como um “portão”, podendo aumentar ou diminuir impulsos decorrentes da transmissão de fibras periféricas ao sistema nervoso central. O influxo somático submete-se pois, à influência reguladora do portão, mesmo antes de criar uma percepção à dor e consequente reação. (MELZACK R, WALL PD., 1965)

De fato, estudos das vias descendentes mostraram que a transmissão da modulação da dor origina-se de um conjunto de áreas do SNC. Por exemplo, a SCP que recebe projeções oriundas da região somestésica do córtex tem conexões recíprocas com o complexo amigdalóide e com o núcleo parabraquial. Além disso, pelas entradas nociceptivas ascendentes do CDME, ademais, há o envolvimento dos núcleos como a formação reticular, *locus ceruleus* e a NMgR na modulação da dor, conforme ilustrado na Figura 3. (GAURIAU, 2002).

A SCP é a primeira região do sistema descendente de modulação da dor. Obtêm informações de outros centros encefálicos superiores, sendo capaz de produzir analgesia

quando ativada. Estudos mostram que a eletroestimulação ou a microinjeção de agonistas opióides nessa região causam efeito antinociceptivo tanto em animais (REYNOLDS, 1969; JIANG, 2014) quanto em humanos (HOSOBUCHI, 1977).

De Freitas e colaboradores (2005) realizaram estudo neuroanatômico demonstrando uma profusa conexão e que a SCPdm, o colículo inferior, o colículo superior e o NDR enviam projeções para o LC. Além disso, foram observadas conexões entre o córtex somestésico, área septal medial, núcleo mediano da rafe e hipocampo dorsal com LC (de FREITAS e col., 2013). Sendo assim, o LC se apresenta como um importante núcleo de saída do sistema endógeno de modulação da dor, que recebe diversas conexões das regiões encefálicas e envia projeções para o CDME, resultando, assim, em analgesia.

Receptores opióides localizados em neurônios e fibras do SNC e periférico, quando ativados, liberam opióides endógenos, resultando no processo de inibição ou analgesia da dor, sendo assim, estão ligados ao sistema modulatório descendente da dor. Em adição, outras evidências na literatura também mostram que estruturas espinais e supraespinais podem exercer a modulação da nocicepção, e que a SCP e a NMgR estão diretamente envolvidas no controle da dor endógena através da via inibitória. (LOVICK, 2008; KWON, 2014)

Os receptores colinérgicos do tipo muscarínicos e nicotínicos do hipocampo dorsal (Hd) (de Freitas e col., 2013), assim como os receptores opioides do tipo μ_1 e serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/2C} localizados na SCPdm, na SCPvl (de Freitas e col., 2014, 2016) e no LC (de FREITAS e col., 2016) e os receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₆ e 5-HT₇ do NDR (FREITAS e col., 2008; 2009) estão envolvidos e são recrutados para elaboração da antinocicepção induzidas por crises convulsivas. Sendo assim, diversos sistemas farmacológicos podem ser recrutados a partir de núcleos prosencefálicos (como o Hd) e mesencefálicos do sistema endógeno de inibição de dor (como a SCP, NDR e LC) para produzir analgesia.

Outros estudos também mostraram que a estimulação da NMgR pode estar relacionada à facilitação ou a inibição da informação nociceptiva, pois a estrutura liga-se diretamente ao CDME e também recebe transmissões diretas da SCP para que ocorra a inibição sensorial no CDME (LOVICK, 2008; FENTON, 2015). Sendo assim, o

sistema descendente pode ser facilitatório ou inibitório, possuindo participações funcionais importantes na cronificação da dor (o facilitatório) e na diminuição da dor (o inibitório) (MILLAN, 1999; LOCKWOOD; DICKENSON, 2019). Compreender o processo de cronificação da dor é de extrema importância porque quando as vias descendentes de modulação da dor encontra-se em desequilíbrio se pode afirmar que estará presente um processo chamado sensibilização central, que resulta no aumento da intensidade e da persistência do sintoma doloroso, como será explicado adiante. A sensibilização central é ocasionada pelo estímulo nociceptivo persistente, alterações morfológicas espinais e corticais (para amplificar a dor), além da ativação do sistema descendente facilitatório, sobressaindo sobre o sistema descendente modulatório de dor. (MILLAN, 1999)

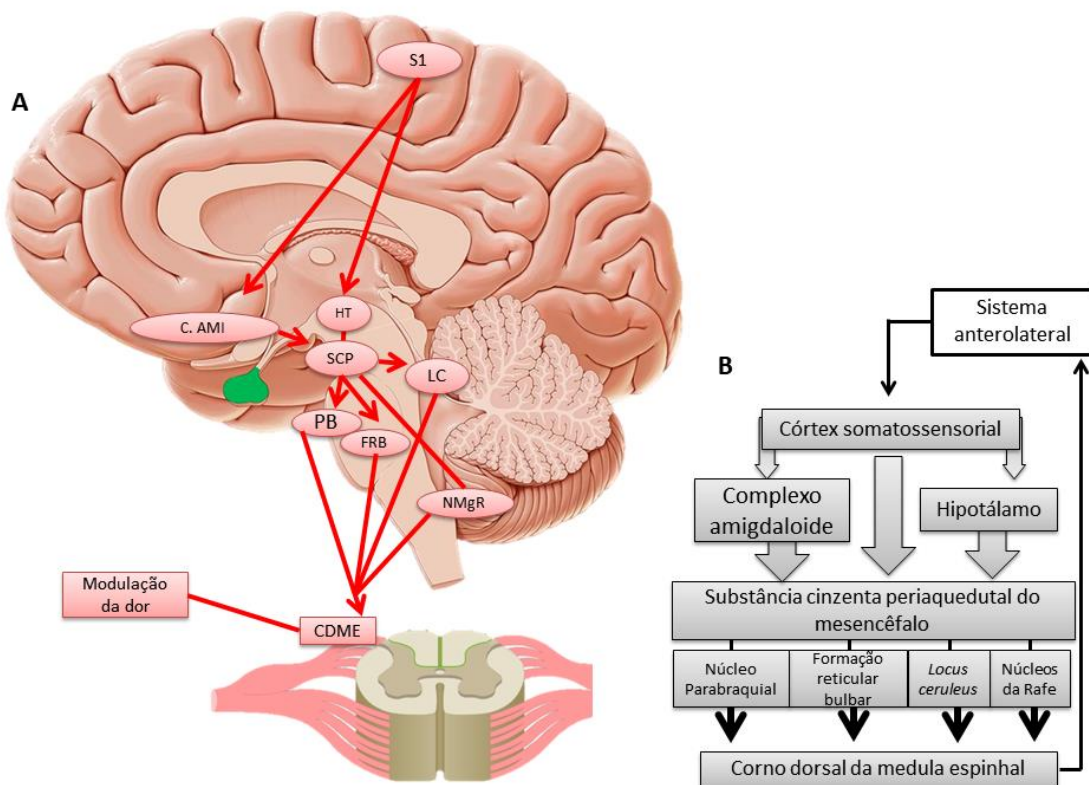


Figura 3 - Representação esquemática das interconexões do SNC responsáveis pela, modulação e cognição da dor, representadas de acordo com suas áreas anatômicas (A) e representação das áreas subjacentes interligadas ao processo descendente de modulação

da dor (B). CDME = corno dorsal da medula espinal, PB = núcleo parabraquial, HT = hipotálamo, SCP = substância cinzenta periaquedutal, LC= *locus coeruleus*, FRB = formação reticular bulbar, NMgR = núcleo magno da rafe. Fonte: Figura: Adaptada de PURVES, 2010.

1.4 Componentes envolvidos na dor neuropática

Após a hiperalgesia primária, desencadeia-se a hiperalgesia secundária, que ocorre quando um estímulo doloroso persistente ativa fibras do tipo C, provocando a liberação de glutamato, substância P e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em terminais nervosos centrais. Com isso, há ativação de receptores do AMPA, NMDA e tirosinoquinases, que aumentam as atividades de um grupo de moléculas sinalizadoras que alteram a expressão de genes, resultando em mudanças neuroquímicas (neuroplasticidade) na medula espinal, amplificando, assim, os estímulos dolorosos (MOALEM, TRACEY, 2006; MUIR III, 2009).

A sensibilização central é o fenômeno que envolve a inibição da via descendente responsável pela modulação da dor, causando um desequilíbrio entre estímulos excitatórios e inibitórios que contribuem para a redução do limiar e consequente aumento na intensidade da dor, levando a sensação dolorosa para locais não lesionados. Normalmente, um processo adaptativo que deve ser resolvido, se perpetuado, pode originar alterações que mantêm esse estado, resultando em dor crônica, conforme ilustrado na Figura 4. (KWON, 2014; QASEEM, 2017).

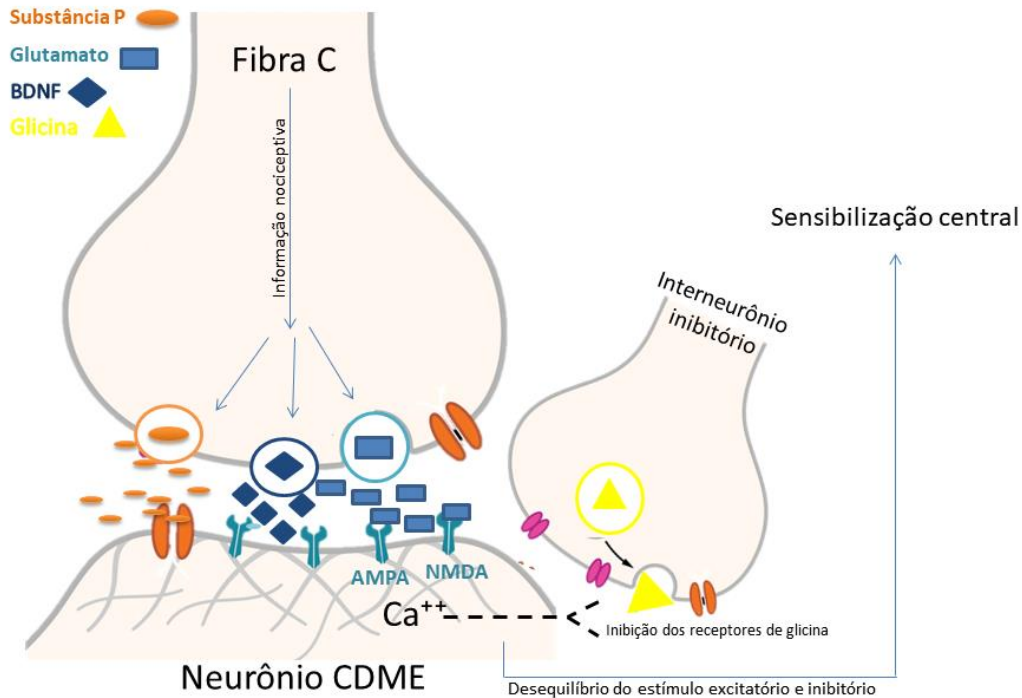


Figura 4 Representação esquemática do fenômeno que envolve a inibição da via descendente responsável pela modulação da dor, denominada “sensibilização central”. BDNF = Fator Neurotrófico do Cérebro. Fonte: Adaptado de Qaseem, 2017.

Independentemente do tipo de dor, a cronificação pode estar presente, e a mais prevalente é a dor neuropática (DN) crônica. Considerada um dos principais problemas de saúde nos países desenvolvidos, a DNC afeta cerca de 20% da população adulta. Pacientes acometidos por síndromes neurológicas representam 25% do total de doentes atendidos em grandes clínicas de dor. (JAMES *et al.*, 2018)

De acordo com a IASP, a DN é definida como “dor que aparece como consequência direta de lesão ou doença que afeta o sistema nervoso” (TREEDE, 2008, p.). As neuropatias dolorosas normalmente estão associadas à dor persistente, à dor paroxística espontânea, à alodinia (condição em que estímulos normalmente inócuos são percebidos como nociceptivo) e à hiperalgesia (aumento da sensibilidade

a estímulos nocivos) (Merskey, 1986). Um desequilíbrio entre a sinalização somatossensorial facilitatória, inibitória e alterações dos canais iônicos pode estar relacionado ao mecanismo da DN crônica (DNC). (QASEEM, 2017).

A DNC tem prevalência significativa na prática clínica e causa prejuízos na qualidade de vida dos pacientes acometidos. Os casos podem ser subdivididos em quatro classes: 1. Lesão nervosa periférica focal e multifocal (traumática, isquêmica ou inflamatória); 2. Polineuropatias periféricas generalizadas (tóxicas, metabólicas, hereditárias ou inflamatória); 3. Lesões do SNC (acidente vascular cerebral, esclerose múltipla e lesão da coluna vertebral) e 4. Complexos distúrbios neuropáticos (Complexo da Síndrome da Dor Regional — CSDR), de acordo com a classificação proposta por Baron (2010).

Os modelos animais são importantes para o estudo da DN e DC, pois por meio deles se pode compreender o envolvimento da sensibilização de neurônios aferentes periféricos e centrais (Koltzenburg; Scadding, 2001; Boyce-Rustay; Jarvis, 2009; Colloca, 2017; Alves, 2010), além de elucidar como promover a ativação de processos antinociceptivos em animais com DN e DC. (MEDEIROS e col., 2019a, b, c)

1.5 Modelos animais de dor neuropática

Os modelos são descritos na literatura para reproduzir déficits sensitivos, como alodinia, hiperalgesia e dor espontânea por curtos períodos de tempo. Existem diversos tipos de modelos animais que avaliam diferentes etiologias e manifestações da DN. Tais modelos podem evidenciar mecanismos tanto periféricos quanto centrais da DNC. (SOUSA, 2016)

No início da década de 90, novos modelos experimentais animais foram desenvolvidos para serem estudos e, assim, facilitar a compreensão dos mecanismos relacionados à DNC, sendo os modelos de ligadura parcial do nervo isquiático elaborado em 1990 (SELTZER, 1990) e o de ligadura de um ou dois nervos espinais de roedores (L5 ou L5 e L6) desenvolvido por Kim; Chung (1992) as principais ferramentas para estudo. Dessa maneira, pode-se elucidar a axotomia realizada pela

transecção completa do nervo isquiático na região média da coxa, e o animal desenvolve uma anestesia, servindo de base para estudos de dor crônica do membro mutilado ou dor desaferentada.

O modelo utilizado no presente trabalho foi o de injúria por constrição crônica do nervo isquiático (CCI), atualmente um dos principais modelos utilizados para investigar mononeuropatia periférica. Este foi desenvolvido por Bennett e Xie, em 1988, e modificado por Sommer e Myers em 1995 que, no lugar de quatro ligaduras frouxas, passou a utilizar apenas uma. Os animais assim operados desenvolvem a hiperalgesia mecânica e não apresentam índice de autotomia (Medeiros e cols., 2019a, b, c). Estudos de Medeiros e colaboradores (*Idem*) mostraram que apenas uma ligadura pode ser suficiente para que o animal tenha todos os sintomas da DNC. Em virtude disso, o modelo utilizado nesse estudo foi o de uma ligadura, considerando que este, além de melhor manuseio, propicia a diminuição de autotomias. Todos os modelos podem ser observados na figura 5:

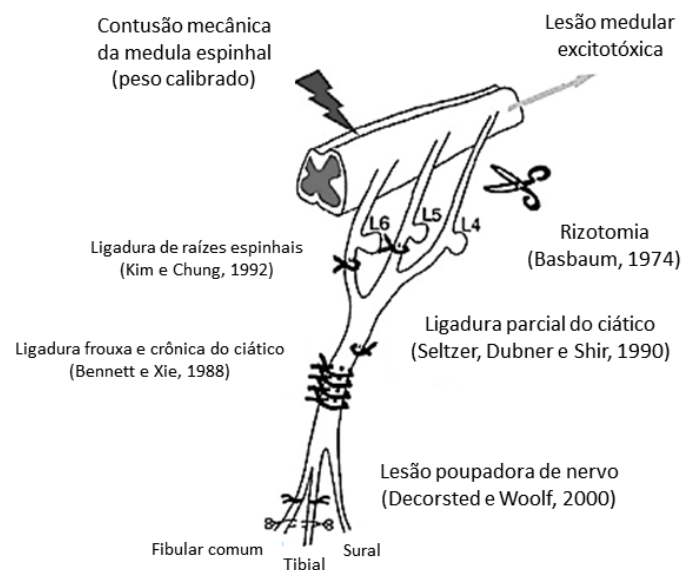


Figura 5 Modelos animais experimentais de dor neuropática periférica. Fonte: Revista Dor. Modelos experimentais para o estudo da dor neuropática. Fonte: SOUSA, 2016.

1.6 Dor neuropática crônica, analgesia e córtex motor

A dor neuropática (DN) geralmente é de forte intensidade e pode afetar os pacientes por toda a vida. Pacientes com doenças degenerativas, como a doença de Parkinson ou demências, podem apresentar dor neuropática como uma complicação do quadro, tanto quanto os pacientes portadores de patologias ortopédicas, assim como a síndrome da cirurgia das costas com falha (FBSS, sigla em inglês) e dor neuropática de origem periférica. Os sintomas da DN diferem entre os pacientes, dificultando o tratamento (HONEY, 2016; KIM, 2016). Atualmente, diretrizes apontam o uso da neuroestimulação, que consiste na estimulação de estruturas que exercem controle inibitório nas vias ascendentes da dor quando o tratamento farmacológico é refratário (GUASTELLA, 2008).

A estimulação elétrica do córtex motor (EECM) e a estimulação encefálica profunda (*Deep Brain Stimulation* – DBS, sigla em inglês) são modalidades de tratamento usadas para modular a DN por estimulação elétrica. A EECM foi introduzida em 1991 por Tsubokawa e cols. para o tratamento de pacientes que apresentavam a síndrome da dor talâmica após acidente vascular encefálico, e desde então, tem sido utilizada na prática clínica (KIM, 2016; TSUBOKAWA, 1991 E 1991B).

O DBS foi relatado pela primeira vez para o tratamento da dor nociceptiva em 1954. Na década de 1970, muitos centros especializados de dor estavam usando o DBS para tratar DN. (BOCCARD, 2015). De fato, a neuroestimulação é aplicada principalmente em pacientes que não respondem à terapêutica farmacológica e a outras não farmacológicas. (RASCHE e cols., 2006). Segundo estudiosos, um infarto supratalâmico tornaria as células nociceptivas do córtex somestésico desaferentadas e consequentemente hiperativas. A estimulação elétrica do córtex motor (CM) por uma via intracortical excitaria células não-nociceptivas, tais como as táteis do córtex somestésico, as quais inibiriam as hiperativas, resultando no processo analgésico. (TSUBOKAWA, 1991; VILELA-FILHO; CORRÊA, 2010; PAGANO, 2012).

A EECM e DBS possuem vantagens para clínicos e pacientes: a EECM e DBS são mais simples e fáceis de implementar, quando comparados a outros métodos cirúrgicos utilizados para a modulação da dor, como estimulação direta dos

nervos periféricos e neurectomia, podendo ser considerados alternativas para o controle da dor. (FONOFF, 2009; KIM, 2016)

De fato, outros recursos terapêuticos podem resultar em danos quando comparamos ao tratamento elétrico: o farmacológico pode causar dependência e tolerância, e a estimulação direta dos nervos periféricos ou neurectomia pode causar danos irreversíveis aos nervos (FONOFF, 2009).

De acordo com pesquisas que utilizaram métodos eletrofisiológicos, a inibição da atividade de neurônios localizados no CDME, gerado por estímulos mecânicos, é reduzida durante a estimulação, tanto do córtex somestésico primário quanto do córtex motor, efeito que desaparece após finalizado o estímulo (SENPATI, 2005a,b).

De fato, propôs-se que a inibição da atividade neuronal no CDME seria responsável pelo efeito antinociceptivo, decorrente da estimulação elétrica do CM (KURODA, 2000; SENNAPATI, 2005a,b). Os mecanismos envolvidos na antinocicepção não estão totalmente desvendados, entretanto, sabe-se que o glutamato é considerado um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central e diretamente relacionado à plasticidade neural, a doenças neurológicas, psicológicas e comportamentais. (GALER, 2000; MALETIC, 2009; ROSENBERG, 2015).

Estudos mostraram que o DBS foi capaz de reduzir as dores em longo prazo em diversas patologias, como neuropatia periférica, neuropatia trigeminal, dor talâmica, FBSS, dor no membro fantasma, lesões do plexo braquial, dor após acidente vascular cerebral e lesão medular. Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo analgésico e sua eficácia para a dor neuropática crônica. (BOCCARD, 2015; 2012)

A alodinia ao frio é um achado clínico frequente em pacientes com dor neuropática. Um estudo realizado em animais de laboratório demonstrou que, ao avaliar a alodinia ao frio pelo teste de acetona 21 dias após a constrição crônica do nervo ciático, que a estimulação do CM₁ pelo procedimento DBS diminuiu a alodinia ao frio imediatamente e até 30 minutos após a estimulação M1 em ratos com dor neuropática crônica. (MEDEIROS e cols., 2019)

Sendo assim, foram investigados os mecanismos da modulação de dor neuropática crônica decorrente da estimulação do córtex motor que, possivelmente, ativam as vias descendentes inibitórias recrutadas através dos núcleos do sistema endógeno de dor (BASBAUM & FIELDS, 1984; FREITAS e cols., 2005; 2008; 2009; 2013; 2014; 2016; FELIPPOTTI e cols., 2011; 2012), produzindo efeito antinociceptivo no modelo de DNC em animais.

1.7 Atividade física e analgesia nas dores neuropáticas

O exercício físico tem sido proposto como uma terapia complementar não invasiva, que promove a reparação do tecido nervoso em síndromes neurológicas e/ou neurodegenerativas distinta (COTMAN; BERCHTOLD, 2002; COTMAN e cols., 2007; VAN PRAAG, 2008, ARIDA e cols., 2013, INTLEKOFER. COTMAN, 2013).

Entende-se por atividade física qualquer movimento corporal produzido por contração muscular que aumente o gasto energético (Howley, 2001). Estudos nos mostram que o exercício é capaz de melhorar a neurogênese em indivíduos adultos praticantes, sendo assim, é uma atividade muito eficaz para melhora da dor crônica, além de ter grande influência no desenvolvimento cerebral. (GOMES DA SILVA; ARIDA, 2015).

Um dos efeitos do exercício é a ativação dos nervos sensoriais aferentes dos músculos ativos para a medula espinal. Durante a atividade física, as fibras sensoriais dos músculos recrutados são aumentadas, fornecendo feedback importante sobre os sistemas cardiovasculares e respiratórios (Mitchell, 1985). A via sensorial do reflexo pressor do exercício (RPE) cruza-se com as vias sensoriais dolorosas conhecidas através das alterações do potencial receptor transitório vanilóide 1 (TRPV₁, sigla em inglês) dos canais iônicos de detecção de ácido 3 (ASIC3 sigla em inglês) e do canal de sódio. Tal conversa cruzada pode fornecer possíveis caminhos pelos quais os benefícios conhecidos dos exercícios também podem se conectar a estados sensoriais dolorosos. (O'LEARY e cols., 1999; AMANN e cols., 2011).

Estudos demonstram que alterações moleculares e celulares nos neurônios sensoriais GRD podem ser induzidas pelo exercício. Os benefícios podem aparecer rapidamente, entre eles, a melhor regeneração após lesão nervosa com apenas 3 ou 7 dias de exercício. Tal efeito pode estar relacionado ao aumento da produção de vários sinais moleculares, incluindo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento nervoso (NGF), neurotrofina 3 (NT-3), sinapsina I (SNAP1) e proteína associada ao crescimento 43 (GAP43) em gânglios sensoriais, estimulando o crescimento axonal. (MOLTENI e cols., 2004; LÓPEZ e cols., 2015).

Os sistemas imunológico e nervoso interagem nos estados de dor crônica por meio de células imunes, da glia e de neurônios responsáveis por coordenar essas respostas, além da excitação do caminho da dor. Muitas dessas interações incluem a síntese e liberação de mediadores inflamatórios e neurotransmissores, segundo Ren; Dubner (2010).

Citocinas pró-inflamatórias têm sido implicadas em condições nociceptivas inflamatórias e neuropáticas em uma ampla gama de pesquisas (Mika e cols., 2013). O marcador de inflamação mais proeminentemente estudado, o TNF- α , tem sido implicado como tendo um papel fundamental nos mecanismos periféricos e centrais de sensibilização a estímulos dolorosos. Os benefícios do exercício não se limitam apenas à periferia, pois também exibem um valor substancial para o sistema nervoso central. Os numerosos benefícios do exercício no sistema nervoso sensorial periférico e central são destacados na figura 6. (COOPER e cols, 2016).

Alteração provocada pelo exercício no sistema nervoso sensorial

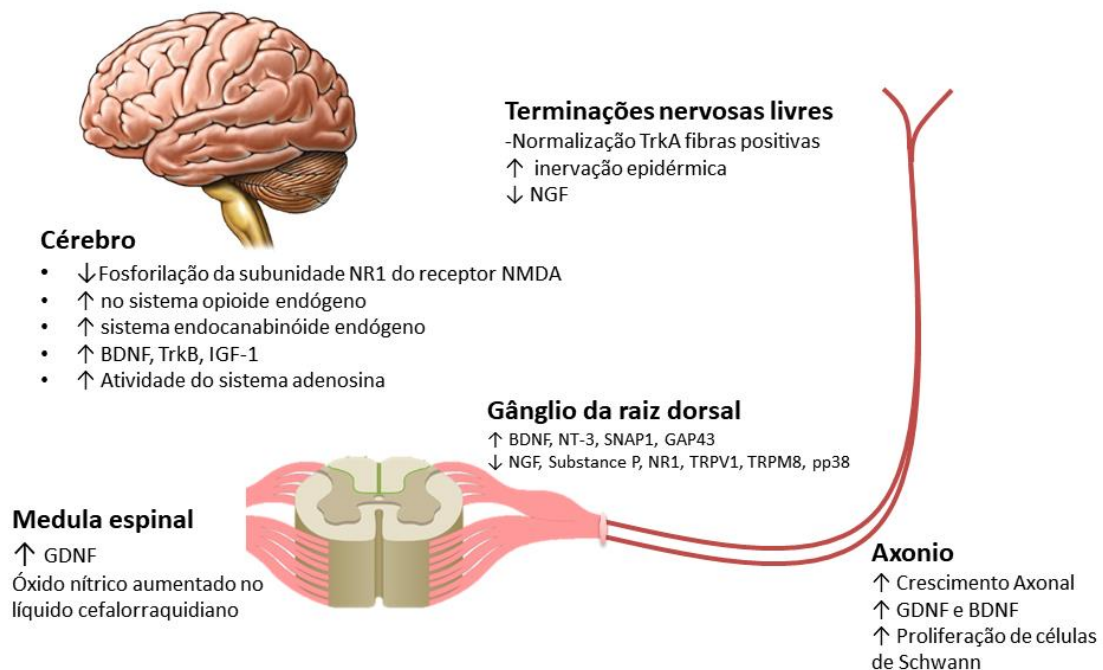


Figura 6 - Alterações causadas pelo exercício no sistema nervoso sensorial. Visão geral das inúmeras vantagens mecânicas positivas que podem contribuir para os benefícios sensoriais globais criados com a atividade física. NR₁ = subunidade do receptor de NMDA, BDNF: Fator neurotrófico do cérebro, TrkB = Receptor de tropomiosina quinase B, NT-3 = neurotrofina 3, SNAP1= sinapsina I, NGR= fator de crescimento do nervo, GAP43 = proteína associada ao crescimento 43, TRPM8= Receptores transitórios de canais de cátions subfamília M membro 8. TRPV₁: Receptor vanilóide (canal iônico) de potencial transitório. Fonte: Adaptado de Cooper, 2016.

Estudos demonstram que ocorre atraso do início da neuropatia associada à diabetes com exercício contínuo através das alterações na função do canal de cálcio no gânglio da raiz dorsal. Esse atraso da DN diabética permite modificações na sinalização nociceptiva da periferia, trazendo benefícios adicionais, como o aumento da velocidade de condução do nervo motor, modificando ou atrasando o curso natural da neuropatia periférica diabética. (BALDUCCI, 2006)

Em modelos animais, a corrida foi capaz de atenuar diferentes formas de alodinia, em que se vinculam diferentes marcadores moleculares, como hiperalgesia mecânica, fria (TRPM₈) e de calor (TRPV₁). Os marcadores moleculares foram

positivamente alterados pela corrida forçada (Yoon, 2015). Estudos de dor associados ao nervo isquiático relatam que o exercício físico tem uma influência negativa na nocicepção. Embora esse não seja um modelo amplamente utilizado de dor, nesse caso, foi observado o exercício produzindo mais hiperalgesia em ratos com dor neuropática periférica, induzida pela cialtagia, comparado ao grupo controle não exercitado. (BERTOLINI, 2011)

O tratamento da dor é complexo e para a utilização do exercício físico devem-se propor programas que combatam a plasticidade do SNC formada pela persistência do sintoma algico. Dentre elas, predominam a prescrição de exercícios aeróbicos, de fortalecimento e alongamentos de músculos e tendões (LEMSTRA; OLSZYNSKI, 2005). Os mecanismos envolvidos na ação analgésica e o exercício físico ainda não são muito esclarecidos, entretanto descreve-se a ação analgésica pelo sistema opióide endógeno e também os movimentos aplicados como fatores que auxiliam na dessensibilização de áreas dolorosas por meio da estimulação exteroceptiva. (CASTRO, 2010).

Gaffuri (2011) submeteu os animais com DNC a exercícios físicos e não obteve uma diferença significativa sobre os grupos em relação à atenuação da dor. Contudo, os resultados de Gonçalves; Luciano (1999) com ratos treinados em esteira ergométrica mostraram atenuação da resposta inflamatória, em comparação com ratos sedentários.

Entretanto, investigamos se o treinamento em esteira em combinação com a estimulação elétrica do córtex motor para assim, saber se ocorre atenuação da dor quando o animal foi submetido ao treinamento aeróbio em animais com dor neuropática crônica.

1.8 Neurotransmissão Glutamatérgica e Córtex Motor

O glutamato (L-Glu) é um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central (SNC), exercendo um papel crucial na plasticidade sináptica. É um aminoácido não essencial que não cruza a barreira hematoencefálica, sintetizado no citoplasma do neurônio pré-sináptico, empacotado em vesículas e liberado na fenda

sináptica. O glutamato é retirado da fenda por diversos transportadores de aminoácidos excitatórios (TAAEs) e levado para células gliais onde haverá a conversão de glutamato em glutamina através da ação da enzima glutamina sintetase. A glutamina é reabsorvida pelos terminais nervosos, permitindo um ciclo de suprimento adequado de neurotransmissores, conforme demonstrado na Figura 7. (FEATHERSTONE, 2009; VALLI, 2014).

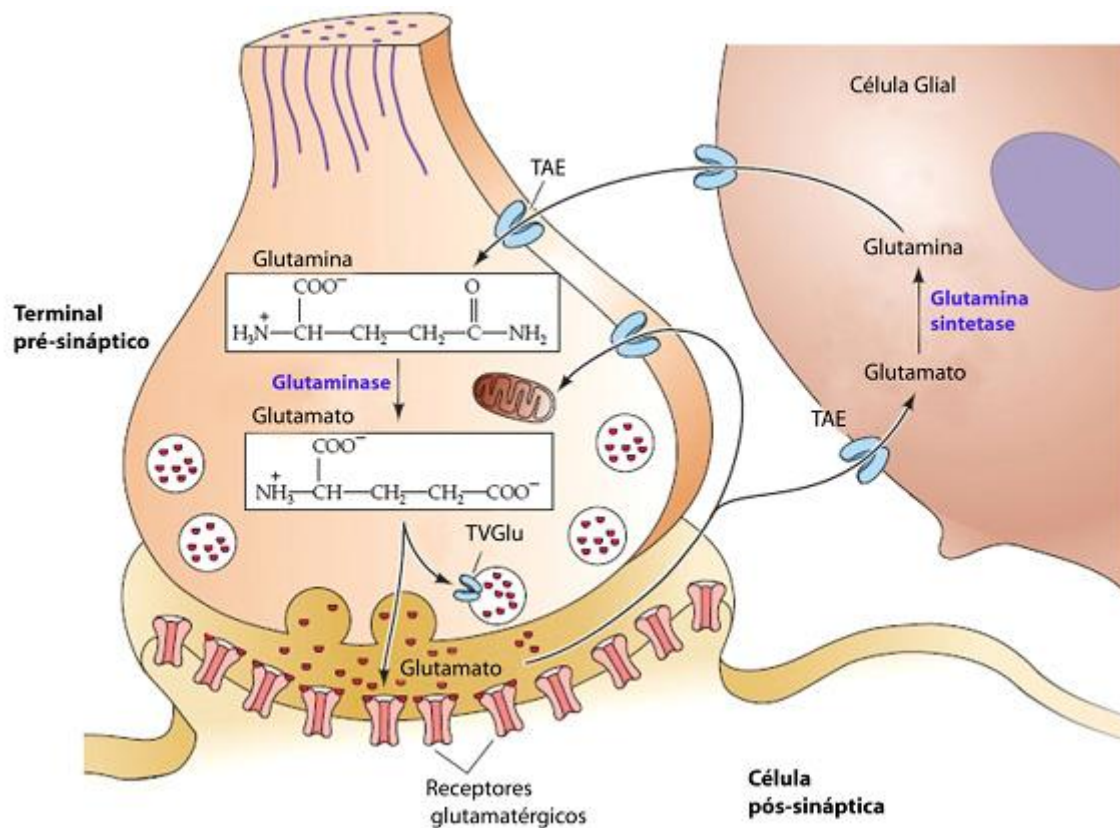


Figura 7 - Síntese do glutamato e seu ciclo entre neurônio e células da glia. A glutamina é sintetizada no neurônio pré-sináptico e liberada como glutamato na fenda sináptica, sendo reabsorvida através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (TAAE) e sintetizado em glutamina pela enzima glutamina-sintetase localizada na célula glial. Em seguida, é enviado novamente para o neurônio pré-sináptico. Fonte: Purves, 2010.

Os receptores glutamatérgicos são divididos em dois grupos: os ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs) (Figura 8). Os receptores iGluRs geram uma resposta excitatória no neurônio pós-sináptico, diferentemente dos mGluRs, que são responsáveis por uma resposta mais lenta, aumentando ou diminuindo a excitabilidade das células pós-sinápticas (FEATHERSTONE, 2009). Os iGluRs podem ser de três tipos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino- 3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA), e agem diretamente no fluxo de íons, principalmente no canal Na^+ e Ca^{2+} da célula pós-sináptica. (PINHEIRO; MULLE, 2008).

Tipos de receptores glutamatérgicos

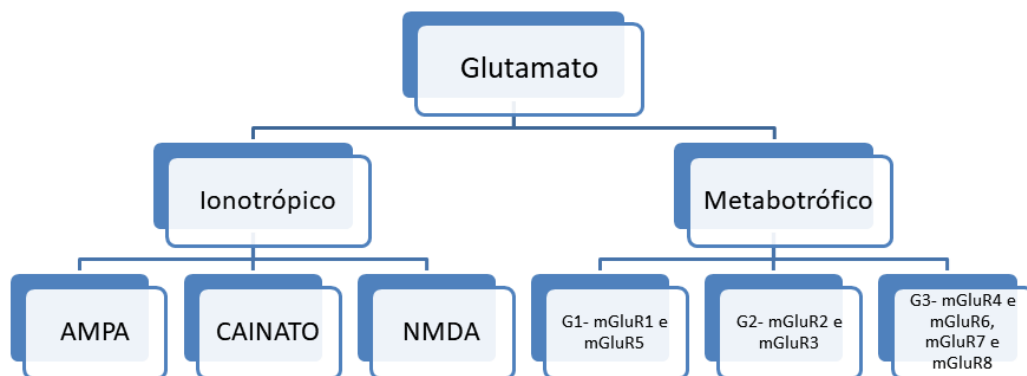


Figura 8 - Representação esquemática dos receptores glutamatérgicos e suas subdivisões. Fonte: Adaptado de Purves, 2010. NMDA = N-metil-D-aspartato, AMPA = ácido-amino- 3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico, KA = cainato, mGluR= receptores metabotrópicos do glutamato.

Os canais ligados aos receptores NMDA tendem a permanecer abertos por mais tempo e sua ativação ocorre quando três eventos acontecem simultaneamente: (i) a ligação do neurotransmissor glutamato ao receptor; (ii) sua ligação à glicina (co-agonista obrigatório) e (iii) a despolarização da membrana pós-sináptica. (COTMAN,

1994). A despolarização das células axonais piramidais, o envolvimento de receptores NMDA e opióides endógenos podem desempenhar uma atividade analgésica quando estimulado o córtex motor. A descoberta da interação dos receptores opióides do tipo μ e glutamatérgicos foram importantes para a compreensão de mecanismos que induzem à tolerância e à perda da eficácia analgésica dos opióides. (GARCIA-LARREA; PEYRON, 2007)

É importante sabermos os mecanismos de recaptação do glutamato por neurônios ou células gliais, pois estes determinam o tempo que o neurotransmissor estará disponível na sinapse, pois problemas na transmissão glutamatérgica correlacionam-se a numerosas doenças neurológicas e transtornos psiquiátricos (GREWER, 2005; VALLI, 2014). Atualmente, sabe-se que os mecanismos glutamatérgicos participam do desenvolvimento neural, da plasticidade sináptica, aprendizado, memória, epilepsia, isquemia neural, tolerância, dependência de drogas, ansiedade, depressão e na DN (PRYBYLOWSKI, 2004, AVERILL e cols., 2017; BARKER-HALISKI; WHITE, 2015).

Desde o relato de Tsubokawa (1991) indicando que a estimulação elétrica do CM produziu analgesia em 73% dos pacientes submetidos a EECM pós-AVC. Sugeriu-se que essa área cortical ganhou notoriedade por sua eficácia no tratamento de síndromes crônicas de DN (PRYBYLOWSKI, 2004; de ANDRADE, 2019). Evidências sugerem que os aminoácidos excitatórios e inibitórios desempenham papéis importantes na SCP e em outros centros cerebrais envolvidos na modulação da dor. Embora se tenha evidências clínicas e experimentais de que esses aminoácidos glutamatérgicos estão envolvidos na transmissão da dor, o mecanismo subjacente ao efeito analgésico da estimulação do CM na liberação de neurotransmissores na coluna dorsomedial da SCP permanece incerto. (MARTINS, 2008; HO, 2013).

Avaliamos se a estimulação elétrica via equipamento DBS ou a estimulação química (EQ), via micro injeção do agonista NMDA no CM primário (M_1), atenuam a dor neuropática crônica induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos. Podemos supor que a estimulação do córtex motor primário ativa seletivamente neurônios do SCPdm que, por sua vez, inibem os neurônios nociceptivos hiperativos dentro do CDME. O envolvimento do sistema glutamatérgicos, através do bloqueio dos

receptores NMDA na coluna dorso medial da SCP (SCPdm) com o antagonista glutamatérgico LY255959, também foi investigado sobre o possível efeito analgésico induzido pela estimulação elétrica do córtex motor (EECM) em animais com dor crônica de origem neuropática.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral foi estudar as bases neurais e psicofarmacológicas e mecanismos analgésicos na dor neuropática crônica (DNC). Pretende-se ademais avaliar o efeito da estimulação elétrica (*deep brain stimulation; DBS*) e química (ativação dos receptores NMDA) do córtex motor (CM) primário (M_1) para mensuração da modulação da DNC. Além disso, investigar-se a analgesia ocasionada pela estimulação elétrica depende dos receptores NMDA da substância cinzenta periaquedutal (SCP), um núcleo do sistema endógeno de modulação da dor. Por fim, investiga se o efeito do exercício físico como um adjuvante da neuroestimulação do M_1 para produzir o efeito analgésico em animais com dor DNC.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o comportamento locomotor em animais submetidos a CCI e Sham pelo teste de *open-field*, em grupos independentes de animais;
- ✓ Estudar a possível participação do CM na modulação da DNC, após 21 dias da injúria por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático, através da neuroestimulação do M_1 a $20\mu\text{A}/15\text{s}$ por meio do aparelho de DBS (*deep brain stimulation*), avaliando-se o efeito no teste de alodinia mecânica (teste de *von Frey*) em animais com DNC, em grupos independentes de animais;
- ✓ Estudar o possível envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica, via ativação do receptor NMDA do CM sobre a modulação da DNC, após 21 dias a CCI, através da microinjeção do agonista NMDA (a 2, 4 e $8\text{nmol}/200\text{nL}$) no M_1 , avaliando-se o efeito no teste de alodinia mecânica (teste de *von Frey*) em animais com DNC, em grupos independentes de animais;
- ✓ Estudar a possível participação do sistema endógeno de inibição dor mediante estimulação elétrica do CM. Será realizado o bloqueio prévio dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) após 21 dias da CCI, através do pré-tratamento da SCPd com LY235959 (a 2, 4, ou $8\text{nmol}/200\text{nL}$), um antagonista de receptores NMDA, seguido pela estimulação elétrica ou química do M_1 , avaliando-se o

efeito no teste de alodinia mecânica (teste de *von Frey*) em animais com DNC, em grupos independentes de animais;

✓ Avaliar o efeito da atividade física em animais com DNC. Para isso, foi realizado o teste da esteira em animais com DNC com ou sem estimulação elétrica do CM, avaliando-se o efeito no teste de alodínia mecânica (teste de *von Frey*) em animais com DN, em grupos independentes de animais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados, no presente trabalho, ratos albinos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*), de linhagem Wistar, pesando inicialmente entre 80-100g. Esses animais foram alojados em caixas com dois exemplares, e ficaram acondicionados sob ciclo claro/escuro de 12/12h (luzes ligadas às 7h), e com temperatura entre 22-23°C, sendo-lhes permitido livre acesso à comida e água durante todo o experimento, a não ser durante os registros comportamentais. Os experimentos foram realizados segundo os princípios éticos elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CEUA-FMRP-USP, Processos: 067/2012 e 036/2017) e segundo as diretrizes da *IASP* para pesquisa com estímulos nociceptivos em animais (Zimmermann, 1983).

3.2 Modelos de dor neuropática

Para induzir a mononeuropatia periférica experimental, os animais foram submetidos ao procedimento de lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI), como descrito por Bennett e Xie em 1988. O modelo clássico de CCI consiste na realização de quatro ligaduras do nervo isquiático. Contudo, no presente trabalho, foi utilizado o modelo adaptado da CCI, fazendo uma simples ligadura do nervo isquiático direito do roedor (Medeiros, 2019a, b, c).

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 92mg/kg (Ketamina[®]) para 0,2ml de xilasina a 9,2mg/kg (Dopaser[®]). Foram colocados sobre uma mesa com o dorso para cima e a pata posterior direita foi presa por um esparadrapo. Foi realizada tricotomia desta pata, seguida pela desinfecção com iodopolvidina. Na próxima etapa, houve realização da incisão longitudinal de 15 mm na altura da coxa, região dorso-lateral, em nível de trocáter/fêmur. O nervo isquiático foi acessado e exposto através da dissecação dos músculos, grande glúteo e bíceps femoral. Foi realizada uma ligadura com fio *Cat-gut* 4-0 cromado no nervo isquiático direito, proximal à trifurcação

isquiática. A tensão gerada nas ligaduras 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 e, 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, entretanto, com a exposição do nervo isquiático, mas sem a ligadura do mesmo (sem a CCI). O modelo de Bennett e Xie pode ser observado na figura 9, porém, foi realizado, no presente estudo, o modelo adaptado de Medeiros e colaboradores (2019a,b,c), em que induz a neuropatia periférica através de uma ligadura no nervo isquiático de roedores.

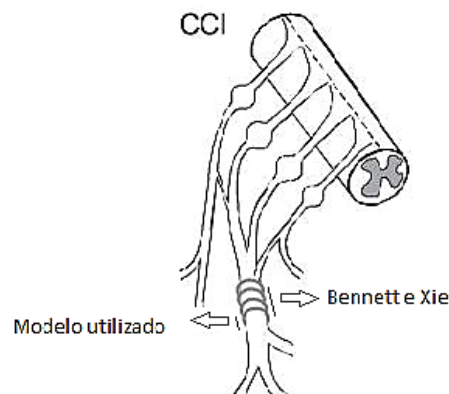


Figura 9 - Modelo de Constrição Crônica do Nervo Isquiático (CCI) proposto por Bennett e Xie (1988) com quatro ligaduras no nervo isquiático. Fonte: Joachim Scholz e cols., 2008. *Nota bene*: no presente trabalho, foi realizada apenas uma ligadura no nervo isquiático dos roedores. Esta proposta fora realizada em nosso grupo de pesquisa (Medeiros e cols., 2019a,b,c).

3.3 Teste de Von Frey

Foi utilizado o teste de filamentos de *Von Frey* (*North Coast*, EUA), para avaliar o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico (Figura 9). Consiste em conjunto de monofilamentos de nylon, de várias espessuras, que exercem diferentes graus de força quando aplicadas sobre

a superfície plantar da pata. O teste permite avaliar a quantidade de força necessária para evocar o comportamento de retirada da mesma. (CHAPLAN, 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 lesada do animal CCI (pata direita), na pata não lesada do *sham* (direita), e também na pata esquerda (contralateralmente à cirurgia de CCI), em todos os animais.

Foi realizado a linha de base 1 (antes das cirurgias de CCI), a linha de base 2 (21 dias após a CCI e antes do tratamento farmacológico ou da estimulação) e o teste 5 minutos após o tratamento farmacológico ou a estimulação do CM. O teste de *von Frey* foi realizado até 30 minutos em animais submetidos a estimulação elétrica do córtex motor e durante 60 minutos nos roedores que receberam a estimulação química do CM/M₁, como ilustrado na figura 10.



Figura 10 - Teste de von Frey, aferindo a alodinia mecânica com o filamento de von Frey (10g) em animais com dor neuropática crônica 21 dias após a CCI. Fonte: Laboratório de Neurociências da Dor & Emoções. FMRP-USP.

3.4 Cirurgia estereotáxica: implantação do eletrodo e da cânula-guia

Os animais foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1 ml de cetamina, na dose de 92mg/kg (Ketamina®), para 0,2ml de xilasina, na dose de 9,2mg/kg (Dopaser®), e fixados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, USA). A barra de fixação dos incisivos foi colocada a 3,3 mm abaixo da linha interaural, o que permitia que o crânio ficasse em uma posição horizontal entre bregma e lambda. Foi realizada a implantação unilateral de um eletrodo de estimulação elétrica ou uma cânula-guia de aço inoxidável (o.d. 0.6 mm, i.d. 0.4mm) foi implantada no córtex motor (CM) primário (M_1) no hemisfério esquerdo, contralateral à lesão do nervo isquiático, diretamente sobre a área funcionalmente associada ao membro posterior, segundo as coordenadas AP= + 1,1 mm; ML= + 1,5 mm e DV= - 1,5mm, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1998).

A fim de estudar os núcleos do sistema endógeno de modulação da dor, foi implantada uma cânula-guia na SCPdm para investigação do efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA antes da estimulação elétrica (pelo DBS) ou química (agonista NMDA) do M_1 em animais com DNC. Uma vez implantado o eletrodo de estimulação ou uma cânula-guia no M_1 , outra cânula-guia foi adicionalmente implantada unilateralmente, na SCPdm, segundo as coordenadas AP=-7,20mm, ML=0,1mm e DV=4,7mm, tomando-se o bregma como referência, estando à sutura lambdoide e bregmática em um mesmo plano horizontal, de acordo com o Atlas de Paxinos; Watson (1998).

Depois de implantados, os eletrodos e a cânula-guia foram fixados na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável que, por sua vez, fora ancorada por dois parafusos de forniture de aço inoxidável.

3.6 Teste de campo aberto (*open field*)

O aparato de campo aberto consiste em uma arena circular em acrílico cristal (97cm de diâmetro e paredes de 32,5cm de altura, topo aberto e piso dividido em 19 seções semelhantes). Cada animal foi colocado suavemente no centro do recinto e o comportamento foi filmado (Sony Handycam) durante 5 minutos. O teste verifica a exploração ambiental e a atividade locomotora geral, e permite avaliar o comportamento relacionado à ansiedade em roedores quando o mesmo estiver preferencialmente posicionado na periferia do aparato. Assim, mediu-se o tempo de permanência do centro ou na periferia da arena. Assim, mediu-se o tempo de permanência do centro ou na periferia da arena, a quantidade de levantamento e cruzamento do animal no aparato para avaliar a locomoção geral e diferenciar entre Sham e CCI. Além disso, esse aparato foi utilizado durante 20s para realização da neuroestimulação em todos os grupos.

3.7 Histologia

Após a realização dos procedimentos neurofisiológicos e neuropsicofarmacológicos, os animais foram anestesiados através da administração por via IP (Intraperitoneal), com 3 mL de solução de uretana 4%, 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 (paraformaldeído 4%) por no mínimo 24h e, em seguida, mergulhados em solução de sacarose 30%, guardados também em geladeira para preservação, por 24h. Após estes processos, foram congelados e cortados, com o auxílio de um micrótomo, em seções 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 serão assinalados em anagramas do atlas de Paxinos; Watson (1998). Somente foram incluídos na análise estatística animais com sinais de presença da extremidade final do eletrodo de estimulação e da microagulha, para microinjeção de drogas dentro do CM/M₁, da SCPdm.

3.8 Drogas

Foram utilizados salina fisiológica (NaCl 0,9%), como controle, e o agonista NMDA (Sigma), que foi microinjetado no M₁ nas concentrações de 2, 4 e 8nmol. O antagonista de receptores NMDA, o LY235959 (Sigma), foi microinjetado na dmPAG nas concentrações de 0,25, 2 e 8nmol. Todos os veículos farmacológicos e as drogas foram administrados randomicamente no volume de 200nL, e em grupos independentes de animais.

3.9 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média, \pm erro padrão da média e analisados através do método de variância multivariada (MANOVA), com medidas repetidas para a comparação dos grupos e dos tempos. Os fatores analisados foram o tempo, o tratamento e interação do tratamento *versus* tempo, seguida, quando houve diferença estatisticamente significativa para a interação *versus* tempo, pela análise de variância dupla (Two-Way-ANOVA). Ademais, foi realizado o teste *post-hoc* de Tukey, para aferir a alteração da alodinia mecânica através do teste de *von Frey* em ratos com dor neuropática crônica.

3.10 Procedimentos experimentais

3.10.1 Microinjeção e estimulação química do córtex motor primário

Para avaliação do envolvimento do CM com a ativação do sistema glutamatérgico, realizou-se, após 7 dias da cirurgia estereotáxica (implantação de cânula-guia no M₁), o pré-tratamento com salina fisiológica (NaCl 0,9%) no CM, seguida da estimulação química realizada por meio do agonista NMDA nas doses de 2, 4 e 8nmol/200nL para estimular receptores glutamatérgicos. Foi utilizada uma microagulha (*Mizzi*), conectada a uma microsseringa (Hamilton, 10 μ L) introduzida na cânula-guia, e ultrapassando a sua extremidade final em 1 mm. Um cateter de polietileno foi acoplado à microagulha para monitorar as microinjeções, que foram feitas através de uma bomba de infusão de drogas (*Stoelting*). Após esse procedimento, o animal foi levado para o aparato de *von Frey* para

aferição da alodinia mecânica e avaliado por até 60 minutos após a estimulação química do CM, em animais com e sem dor neuropática. A distribuição dos grupos utilizados nesse experimento pode ser observada na Tabela 1. O procedimento experimental pode ser observado na figura 11.

Tabela 1 Distribuição dos grupos do estudo neurofisiológico realizados no córtex motor primário.

Procedimento Cirúrgico	Tratamento Farmacológico	Número de Animais por Grupo (n)
Sham	Veículo CM	8
CCI	Veículo CM	8
CCI	EQCM NMDA - 2nmol	8
CCI	EQCM NMDA - 4nmol	8
CCI	EQCM NMDA - 8nmol	8

Procedimento Experimental

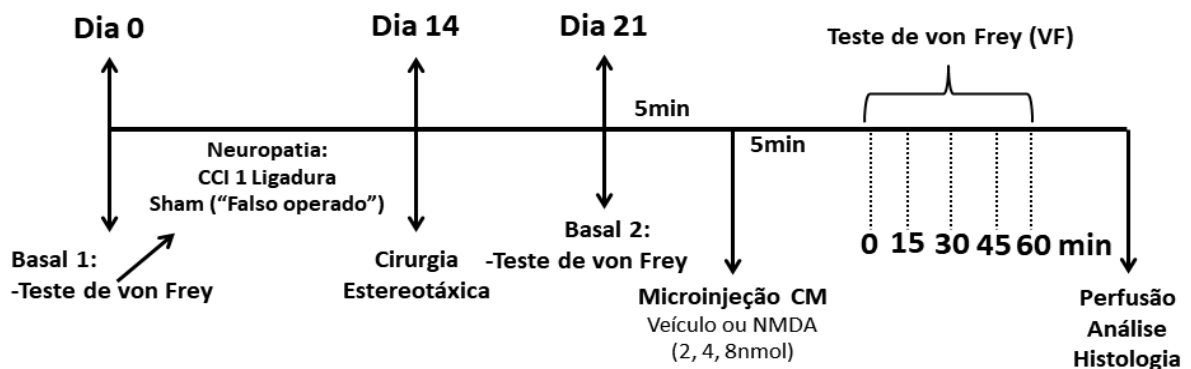


Figura 11 - Procedimento experimental da estimulação química do córtex motor primário. CCI = constrição crônica do nervo isquiático. CM = Córtex Motor, Min = minutos.

3.10.2 Estimulação elétrica do córtex motor primário

Para a avaliação do envolvimento do CM sobre a analgesia produzida em animais com dor neuropática crônica, realizou-se a eletroestimulação elétrica dessa região 21 dias após a CCI. Após uma semana da cirurgia estereotáxica (implantação do eletrodo no M₁), 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). Os animais foram colocados por um período de 5 min de habituação no teste de campo aberto. Depois, o eletrodo implantado no mesencéfalo, ligado a um gerador de estímulos (STG3008-FA, sistemas multicanal, Alemanha) (Figura 12), o que permitiu aplicar corrente de pulsos (largura de impulso de cátodo 100 μ s intervalo de pulso 100 e pulso anódico largura de 100 μ s, repetidos durante 15 segundos) (Melo; Thomas, 2015). A estimulação cerebral foi realizada na intensidade em passos de 20 μ A por 15 segundos.

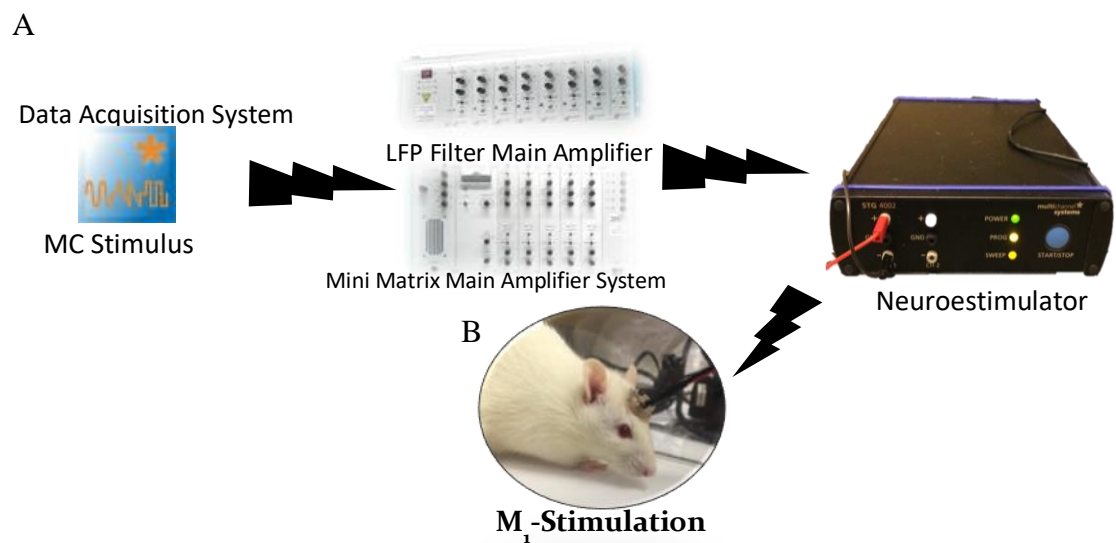


Figura 12 – Gerador de estímulos (STG3008-FA, sistemas multicanal, Alemanha) (A). Animal recebendo o estímulo elétrico no córtex motor primário e posicionado no aparato do teste de campo aberto (B). Fonte: Laboratório de Neurociências da Dor & Emoções – FMRP-USP.

Após a realização da neuroestimulação pelo sistema do DBS citados acima, o animal foi levado ao aparato de *von Frey* para aferição da alodinia mecânica. Cada animal foi utilizado e recebeu estimulação elétrica uma vez. Um grupo adicional foi testado, com a implantação do eletrodo, mas sem a estimulação do CM (0 μ A/15s). O efeito no teste de alodinia mecânica (teste de *von Frey*) em animais com DNC foi avaliado por até 30 minutos após a neuroestimulação do M₁. A distribuição dos grupos utilizados nesse experimento pode ser observada na Tabela 2. O procedimento experimental pode ser observado na figura 13.

Tabela 2 Distribuição dos grupos de estudo da estimulação elétrica do córtex motor primária (EECM) para avaliar a melhora da dor neuropática crônica.

Procedimento Cirúrgico	Tratamento de Neuroestimulação	Número de Animais por Grupo (n)
Sham	EECM 0 μ A/15s	8
Sham	EECM 20 μ A/15s	8
CCI	EECM 0 μ A/15s	8
CCI	EECM 20 μ A/15s	8

Procedimento Experimental

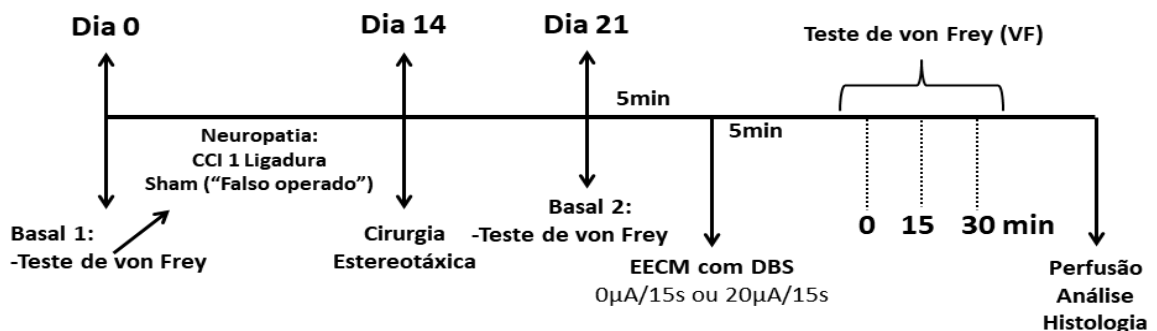


Figura 13 - Procedimento experimental da eletroestimulação pelo aparelho *Deep Brain Stimulation* no córtex motor primário. CCI = constrição crônica do nervo isquiático. CM = Córtex Motor. EECM = Eletroestimulação do Córtex Motor, DBS = *Deep Brain Stimulation*.

3.10.3 Bloqueio do receptor NMDA do sistema endógeno de inibição de dor, seguida da estimulação elétrica do córtex motor primário

Foi realizada a investigação dos possíveis mecanismos envolvidos na analgesia induzida pela estimulação elétrica do M₁ e seu envolvimento com o sistema endógeno de inibição de dor.

Uma semana após a cirurgia estereotáxica (implantação do eletrodo no CM e da cânula-guia na SCPdm), 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). Foi realizada a microinjeção de 200nl de salina ou LY235959 nas doses de 0,25, 2 e 8nmol, um antagonista seletivo para receptores glutamatérgicos do tipo NMDA na SCPdm. Após 5 minutos da microinjeção, a neuroestimulação foi realizada pelo gerador de estímulos, e o animal foi levado para o aparato de *von Frey* para aferição da alodinia mecânica, em animais com e sem DNC. A distribuição dos grupos pode ser observada na tabela 3. Cada animal foi utilizado e recebeu uma estimulação elétrica no CM. Um grupo adicional foi realizado, com a implantação do eletrodo, mas sem a estimulação do CM. O efeito no teste de alodinia mecânica (teste de *von Frey*) em animais com DN crônica foi avaliado até 30 minutos após a neuroestimulação do CM; o procedimento experimental pode ser visualizado na figura 14 e a distribuição dos grupos utilizados no experimento pode ser visualizada na tabela 3.

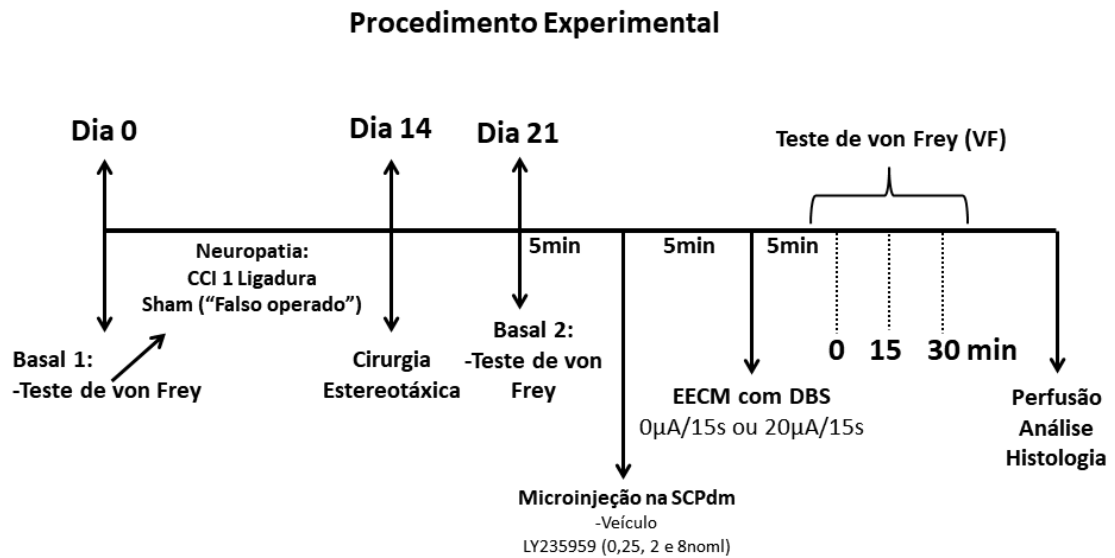


Figura 14 - Bloqueio do receptor glutamatérgico do tipo NMDA da SCPdm (um núcleo do sistema endógeno de inibição de dor), seguida pela estimulação elétrica do M_1 . Representação esquemática da sequência temporal dos experimentos envolvendo a estimulação por meio do equipamento DBS no CM após pré-tratamento da SCPdm com LY235959, um antagonista de receptores NMDA. CCI = constrição crônica do nervo isquiático. CM = Córtex Motor. SCPdm = Substância Cinzenta Periaquedutal. DBS = *Deep Brain Stimulation*.

Tabela 3 Distribuição dos grupos estudados no bloqueio do receptor NMDA do sistema endógeno de inibição de dor, seguida da estimulação elétrica do córtex motor primário.

Procedimento Cirúrgico	Tratamento	Número de Animais por Grupo (n)
CCI	Veículo SCPdm + EECM a 0 µA / 15s	8
CCI	Veículo SCPdm + EECM a 20 µA / 15s	8
CCI	LY235959 8nmol SCPdm + EECM a 0 µA / 15s	8

CCI	LY235959 0,25nmol SCPdm + EECM a 20 μ A /15s	8
CCI	LY235959 2nmol SCPdm + EECM a 20 μ A /15s	8
CCI	LY235959 8nmol SCPdm + EECM a 20 μ A /15s	8

3.10.4 Bloqueio do receptor NMDA do sistema endógeno de inibição da dor, seguido pela estimulação química do cortex motor

Após 7 dias da cirurgia estereotáxica para implantação de uma cânula-guia no CM e outra cânula na SCPdm, foi realizado o pré-tratamento da SCPdm com 200nl de salina ou LY235959 a 0,25, 2 ou 8nmol, um antagonista seletivo para receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Após 5 minutos, o sistema glutamatérgico foi ativado através da microinjeção do agonista NMDA (0,25, 1 ou 4nmol) no CM. Tanto para microinjeção na SCPdm ou no CM, uma microagulha (*Mizzi*), conectada a uma microseringa (Hamilton, 10 μ L) foi introduzida na cânula-guia, ultrapassando a sua extremidade final em 1 mm. Um catéter de polietileno foi acoplado à microagulha para monitorar as microinjeções, que foram feitas através de uma bomba de infusão de drogas (*Stoelting*). A distribuição dos grupos utilizados no estudo junto ao procedimento experimental pode ser observada abaixo na figura 15 e Tabela 4, respectivamente:

Procedimento Experimental

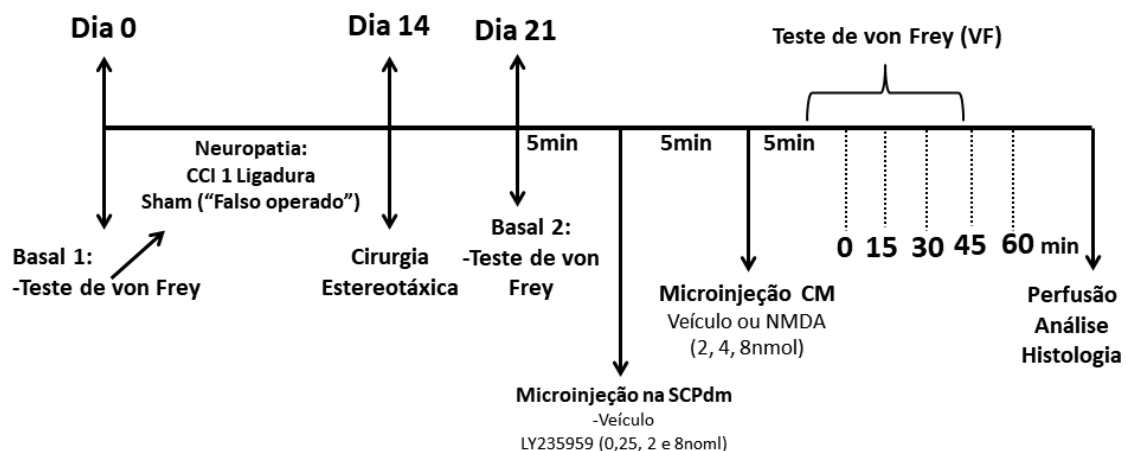


Figura 15 - Bloqueio do receptor glutamatérgico do tipo NMDA do sistema endógeno de inibição da dor, seguida pela estimulação química do CM primário. Representação esquemática da sequência temporal dos experimentos envolvendo a estimulação química do CM, por meio da microinjeção do agonista NMDA após pré-tratamento da SCPdm com o LY235959, um antagonista de receptores NMDA. CCI = constrição crônica do nervo isquiático. CM = Córtex Motor. SCPdm = Substância Cinzenta Periaquedutal. NMgR = Núcleo Magno da Rafe.

Tabela 4 Distribuição dos grupos no estudo do bloqueio do receptor NMDA no sistema endógeno de inibição da dor, seguido pela estimulação química do córtex motor.

Procedimento Cirúrgico	Tratamento	Número de Animais por Grupo (n)
Sham	Veículo SCPdm + Veículo CM	7
CCI	Veículo SCPdm + Veículo CM	7
CCI	LY235959 8nmol SCPdm + Veículo CM	7
CCI	LY235959 0,25nmol SCPdm + EQCM NMDA - 8nmol	7
CCI	LY235959 2nmol SCPdm + EQCM NMDA - 8nmol	7
CCI	LY235959 8nmol SCPdm + EQCM NMDA - 8nmol	7

3.10.5 Avaliação da atividade física sobre a dor neuropática crônica

Os métodos de treinamento na esteira foram realizados no 15º dia após o procedimento cirúrgico, contexto em que todo o procedimento foi gravado (Sony Handycam) durante o tempo de treinamento na esteira, que variou de acordo com o protocolo ilustrado na tabela 5.

Tabela 5 Protocolo do treinamento da esteira.

DIAS DE TREINAMENTO	VELOCIDADE (m/min)	TEMPO (min)
1 (Habituação e treinamento)	9	10
2	9	15
3	10	15
4	10	20
5	11	20
6	11	25
7	12	25

Os animais foram treinados por 7 dias, sendo o primeiro o período de habituação, que foi realizado durante 10 minutos antes de iniciar o treinamento. Animais que não respondiam ao treinamento da esteira foram excluídos do estudo. Após os 7 dias de treinamento, o animal poderia ou não receber a estimulação elétrica do córtex motor primário. E, após a neuroestimulação do CM, os animais foram levados para o aparato de *von Frey* para aferição da alodinia mecânica, em animais com e sem DNC. A distribuição dos grupos pode ser observada na Tabela 6. O procedimento experimental pode ser visualizado na Figura 16:

Tabela 6 Distribuição dos grupos utilizados no estudo da avaliação do exercício físico na dor neuropática crônica:

Procedimento Cirúrgico	Tratamento	Número de Animais por Grupo (n)
Sham	Sem Esteira + Sem EECM	7
Sham	Com Esteira + Sem EECM	7
Sham	Com Esteira + Com EECM	7
CCI	Sem Esteira + Sem EECM	7
CCI	Sem Esteira + Com EECM	7

CCI	Com Esteira + Com EECM	7
CCI	Com Esteira + Sem EECM	7

Procedimento Experimental

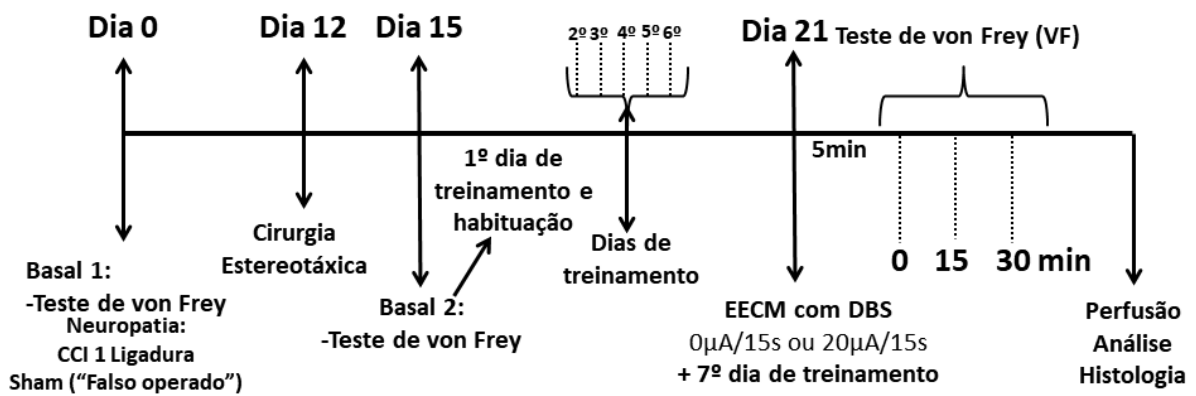


Figura 16 Avaliação da atividade física sobre a dor neuropática crônica. Representação esquemática da sequência temporal dos experimentos envolvendo treinamento da esteira nos animais com ou sem constrição crônica do nervo isquiático.

4 RESULTADOS

Foram utilizados 259 animais machos da linhagem Wistar, submetidos ao procedimento de CCI ou sham. Após os testes neurofisiológicos e neuropsicofarmacológicos, foram realizados estudos histológicos para investigarmos os locais de microinjeção de salina fisiológica (0,9% NaCl) ou NMDA no M₁ em ratos CCI ou sham, como mostrados na Figura 17. Foram ilustrados também os sítios de EECM em ratos CCI ou sham, como mostrados na Figura 18:

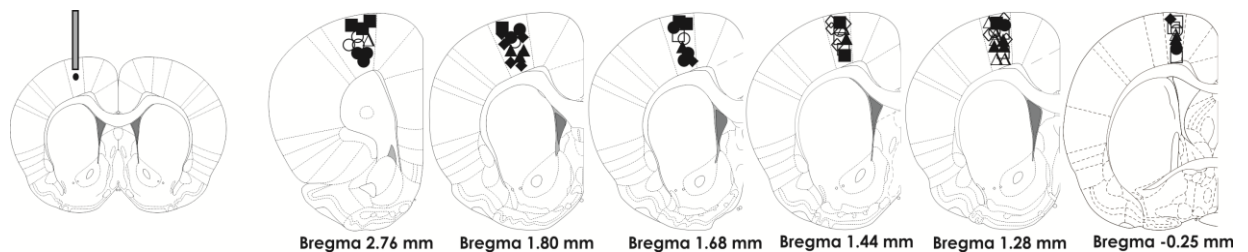


Figura 17 - Representação dos sítios de microinjeção do tratamento do córtex motor (CM) primário (M₁) histologicamente confirmados. Microinjeções de veículo / grupo CCI (○), NMDA 2 nmol / grupo CCI (●), NMDA 4 nmol / grupo CCI (□), NMDA 8 nmol / grupo CCI (■), veículo / grupo Sham (▲), NMDA 2 nmol / grupo Sham (Δ), NMDA 4 nmol / grupo Sham (◇), NMDA 8 nmol / grupo Sham (◆) realizado no hemisfério cerebral contralateral do córtex motor primário (M₁) em relação ao lado CCI ou procedimento simulado *sham*.

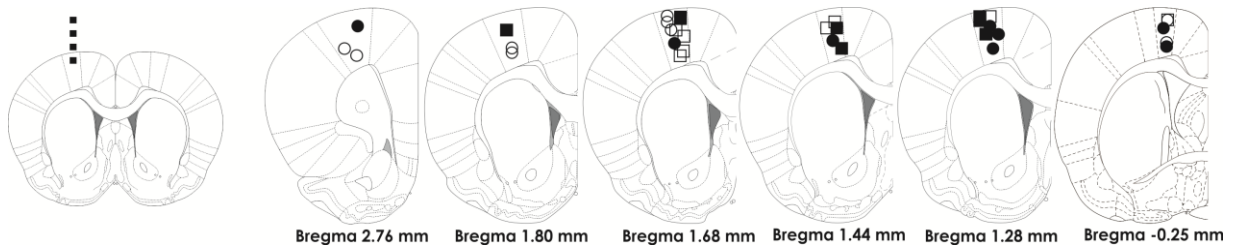


Figura 18 - Representação esquemática dos sítios de eletroestimulação do córtex motor primário histologicamente confirmados. EECM 0 μ A/15s – Sham (n: 8); EECM 20 μ A/15s – Sham (n: 8); EECM 0 μ A/15s – CCI (n: 8); EECM 20 μ A/15s – CCI (n: 8);

Também foram ilustrados os sítios de microinjeção de LY235959 a 0,25, 2 e 8 nmol, seguidos pela estimulação elétrica do M₁ (via equipamento DBS) em ratos CCI ou *sham*, como mostrados na Figura 19A. Em adição, fotomicrografias representativas de secções coronais no nível do CM/M₁ foram representadas, indicando sítio de microinjeção do antagonista LY235959 na SCPdm (Figura 19B, para a dmPAG e figura 19C, para o CM).

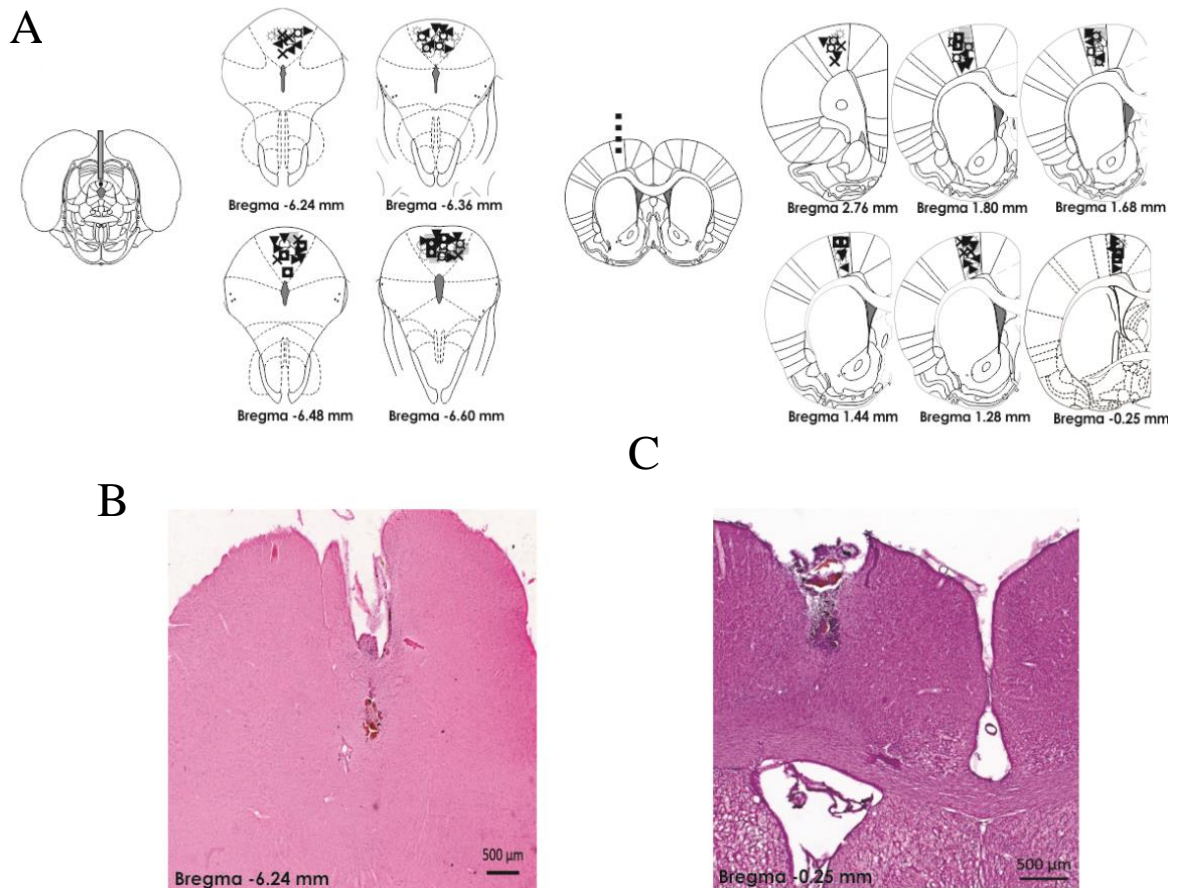


Figura 19 Representação dos sítios de microinjeção do tratamento do córtex motor (CM) primário (M₁) e da coluna dorso-medial da substância cinzenta periaquedual (SCPdm) de acordo com o atlas estereotáxico de Paxinos; Watson (1997). A: Microinjeções do veículo SCPdm / estímulo M1 / grupo CCI (o), LY235959 0,25 nmol SCPdm / estímulo M1 / grupo CCI (◀), LY235959 2 nmol SCPdm / estímulo M1 / grupo CCI (▶), LY235959 8 nmol SCPdm / estímulo Grupo M1 / CCI (▼), veículo SCPdm / sem estímulo M1 / grupo CCI (◼), LY235959 8 nmol SCPdm / sem estímulo M1 / grupo CCI. Veículo SCPdm / estímulo M1 / grupo Sham (x), LY235959 8 nmol SCPdm / estímulo M1 / grupo Sham (◊), veículo SCPdm / sem estímulo M1 / grupo Sham (⊞), LY235959 8 nmol SCPdm / sem estímulo M1 / grupo CCI (⊘). B-C: Fotomicrografias representativas de uma seção transversa do encéfalo mostrando

um local de córtex motor primário (M1) e microinjeção do córtex cerebral periaquedutal mesocromo (SCPdm), respectivamente.

4.1 Teste do campo aberto (*Open Field*)

Vinte e um dias após a CCI ou *sham*, os ratos foram testados no teste de campo aberto (*Open Field*) para avaliar o comportamento exploratório em uma arena circular. Tal ação incluiu ratos de ambos os grupos (Sham e CCI) que passaram pelo teste, e os parâmetros avaliados foram: tempo de permanência na área central e periférica, levantamento e cruzamento.

De acordo com o test t de *Student* não houve diferença estatisticamente significativa nos resultados tempo de permanência na periferia [$t(1,843) = 12$], na área central [$t(1,693) = 12$], no levantamento [$t(0,423) = 12$] e no cruzamento [$t(1,617) = 12$]. Quando comparados ambos os grupos, percebe-se que a CCI não afeta a deambulação do animal, dados que podem ser observados na Figura 20.

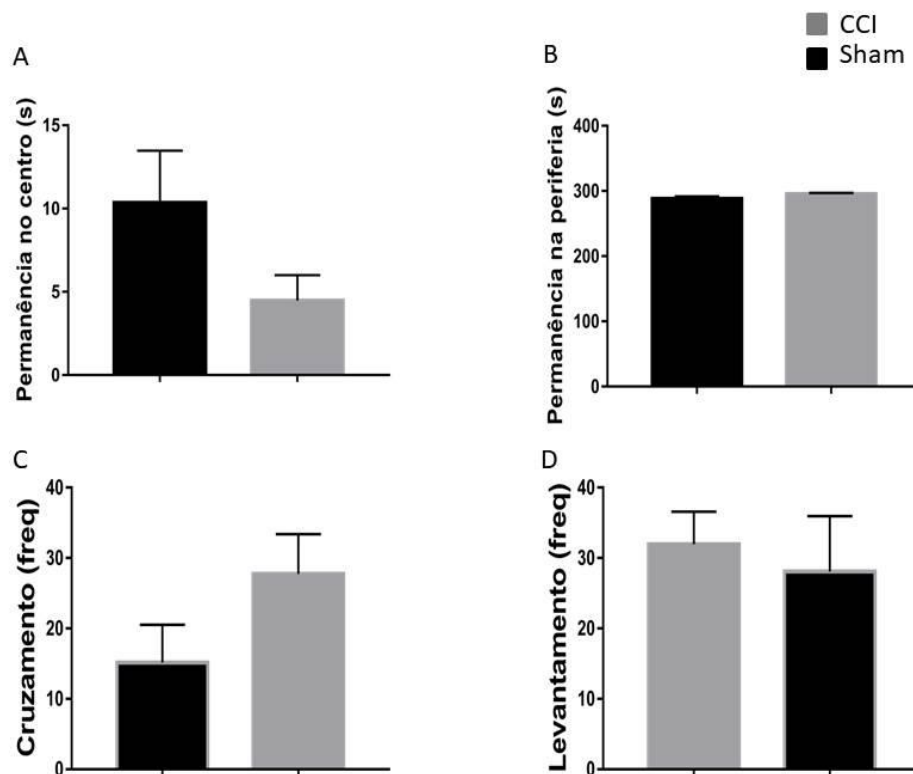


Figura 20 - Representação dos resultados do teste de campo aberto (*Open Field*) para avaliar o comportamento exploratório em uma arena circular entre animais *sham* e CCI, durante a permanência na área central (A), na periferia (B), no cruzamento (C) e no levantamento(D). Os dados foram representados pelo teste não-paramétrico *t de Student* $P > 0,05$, sem diferença entre os grupos.

4.2 Estimulação química do córtex motor (EQCM) primário (M1) atenua a dor neuropática crônica

De modo a promover a avaliação do envolvimento do sistema glutamatérgico e de receptores do tipo NMDA do CM sobre a modulação da DNC, foi realizada a microinjeção do agonista NMDA nas doses de 2, 4 e 8nmol em animais que passaram pela cirurgia de CCI ou procedimento *sham*. O limiar de von Frey fora aferido na pata ipsilateral em relação ao CCI, e

houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(18, 168) = 1.872$ $P < 0,05$], do tempo [$F(6, 168) = 33,1$ $P < 0,0001$], e da interação tratamento *versus* tempo [$F(3,28) = 6,499$ $P > 0,05$].

A análise de *post-hoc* de Tukey mostrou o aumento do limiar de von Frey em animais com DNC que receberam o NMDA (8nmol) nos tempos 15 e 30 minutos e nos animais que receberam o NMDA (2nmol) no tempo de 60 minutos em comparação ao grupo controle (Salina fisiológica) no CM ($P < 0,05$). Tais dados foram sistematizados na figura 21:

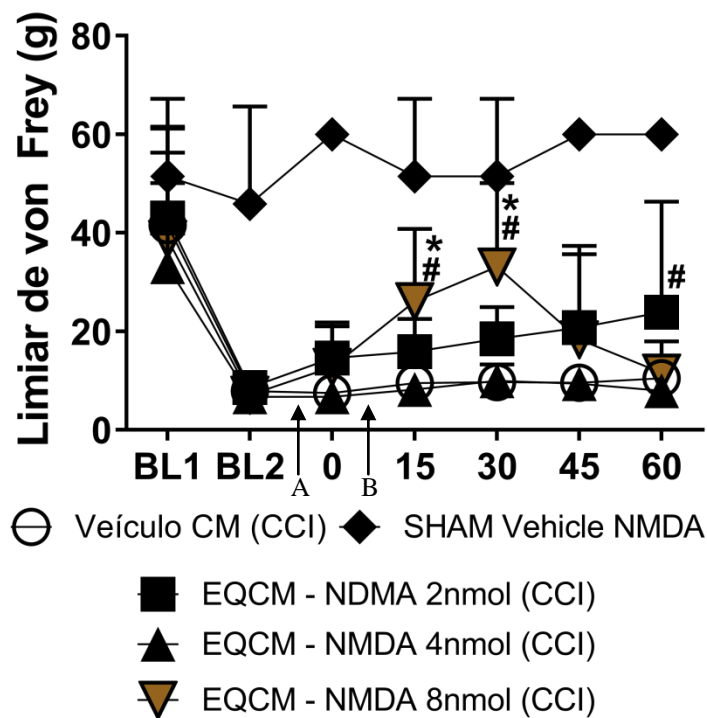


Figura 21 - Avaliação da alodinia mecânica na pata direita (ipsilateral) do animal após a estimulação química do córtex motor (EQCM) primário (M_1), através da microinjeção do agonista de NMDA sobre a DNC. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento *sham*; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI e/ou *sham*; seta B = EQCM. Grupos CCI (O) Veículo CM, (■) EQCM - NMDA 2nmol ($n = 8$), (▲) EQCM NMDA - 4nmol ($n = 8$) e (▼) EQCM NMDA - 8nmol ($n = 8$). Grupos Sham: (◆) Veículo CM ($n = 8$). * diferença entre o grupo EQCM NMDA – 8nmol e Veículo CM; # $p < 0,05$ diferença significativa entre o grupo EQCM NMDA – 4nmol, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguido pelo teste de post-hoc de Tukey.

No que se refere aos grupos de animais que receberam os tratamentos no CM e o limiar de von Frey aferido na pata contralateral (esquerda) em relação à cirurgia de CCI ou *sham*, o teste de medidas repetidas ANOVA mostrou que não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(18, 168) = 0,8499$ $P > 0,05$], do tempo [$F(6, 168) = 1,108$ $P > 0,05$] e nem da interação tratamento *versus* tempo [$F(3, 28) = 3,793$ $P < 0,05$], como pode ser visto na figura 22:

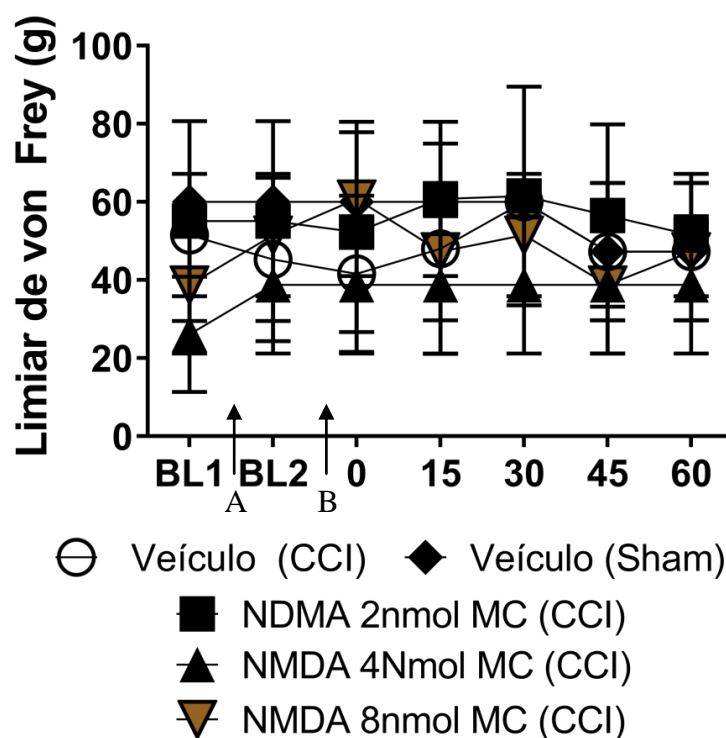


Figura 22 - Avaliação da alodinia mecânica na pata esquerda (contralateral) do animal após a EQCM primário (M_1) através da microinjeção do agonista de NMDA sobre a DNC. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI e/ou Sham; seta B = Estimulação química do córtex motor. Grupos CCI (○) Veículo CM, (■) EQCM - NMDA 2nmol ($n=8$), (▲) EQCM NMDA - 4nmol ($n=8$) e (▼) EQCM NMDA - 8nmol ($n=8$). Grupos Sham: (◆) Veículo CM ($n=8$). Não houve efeito estatisticamente

significativo, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguido pelo teste de *post-hoc* de Tukey.

.

4.3 Estimulação elétrica do córtex motor (EECM) primário (M_1) atenua a dor neuropática crônica.

Para avaliar o envolvimento do córtex motor (CM) na DNC, foi realizada a estimulação elétrica no M_1 , seguida da avaliação do limiar de alodinia mecânica através do teste de von Frey 21 dias após a CCI. A estimulação elétrica do M_1 produziu um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(12, 80) = 5.494$ $p < 0,0001$], do tempo [$F(4, 80) = 11,28$ $p < 0,0001$] e da interação tratamento *versus* tempo [$F(3, 20) = 14,17$ $p < 0,001$]. Segundo a análise do *post-hoc* de Tukey, ocorreu aumento do limiar de alodinia mecânica (*von Frey*) quando realizada na pata direita do animal, localizado ipsilateralmente em relação ao lado da cirurgia de CCI após a EECM. Foi observada a presença de alodinia mecânica em todos os tempos estudados nos animais que passaram pela CCI, em comparação aos animais *sham* ($p < 0,001$). Além disso, a EECM a $20 \mu A/15s$ em animais com DNC aumentou significativamente o limiar de retirada de pata em todos os tempos avaliados (de 0 a 30 min) após a neuroestimulação, como pode ser visto na figura 23.

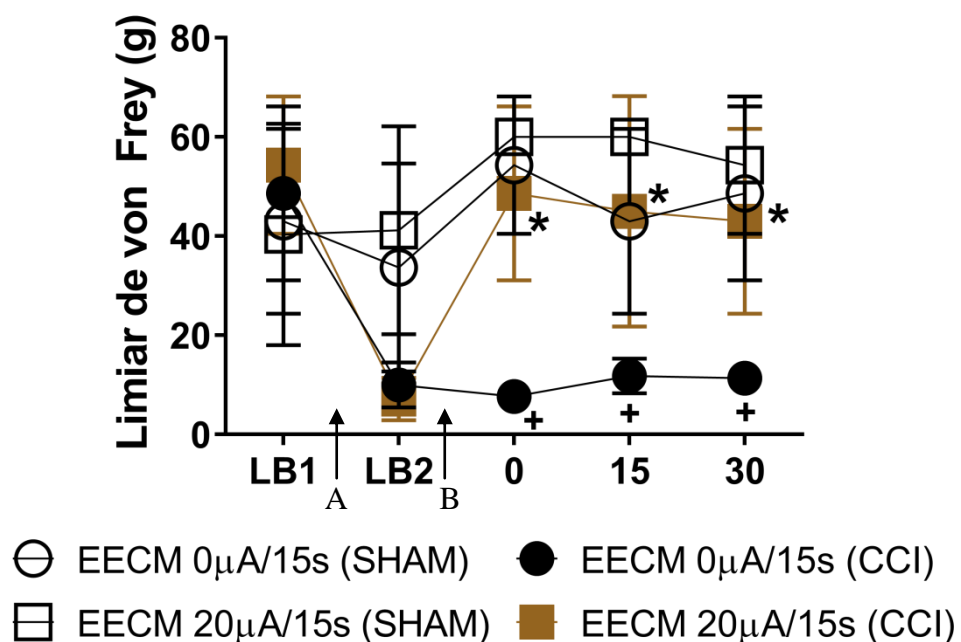


Figura 23 - Estimulação elétrica do córtex motor (M_1) atenua a dor neuropática crônica. Avaliação da alodinia mecânica na pata direita (ipsilateral) do animal após a EECM primário

(M₁) com o *Deep Brain Stimulation* (DBS) em animais *sham* ou CCI. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia CCI ou procedimento *sham*; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI ou *sham*; seta B = EECM. Grupos *sham* = “falso-operado”: (O) EECM - 0μA/15s (n=8), (□) EECM - 20 μA/15s (n = 8) (●) EECM - 0 μA/15s (n = 8), (□) EECM - 20 μA/15s (n = 8). Os dados foram apresentados como médias e erro padrão da média. + p < 0,001 em relação ao grupo EECM 0μA/15s – *Sham*; *p<0,001 em relação ao grupo EECM 0μA/15s – CCI, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey.

Segundo a análise estatística de medidas repetidas (*Two-way* ANOVA), não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [F (12, 80) = 4.161 p <0,0001], do tempo [F (4, 80) = 6,082 p <0,001], e da interação tratamento *versus* tempo [F (3, 20) = 0,6503 p > 0,05] no teste de *von Frey* realizada na pata esquerda do animal, localizada contralateralmente em relação ao lado da CCI. A análise do *post-hoc* de Tukey mostrou que não houve diferença significativa entre a EECM a 0μA/15s nos animais CCI e *sham* (p > 0,05). Quando a alodinia mecânica foi medida na pata esquerda do animal após a EECM 20μA/15s, não houve diferença estatisticamente significante entre os animais entre CCI e *sham* (p > 0,05). Os dados são mostrados na figura 24:

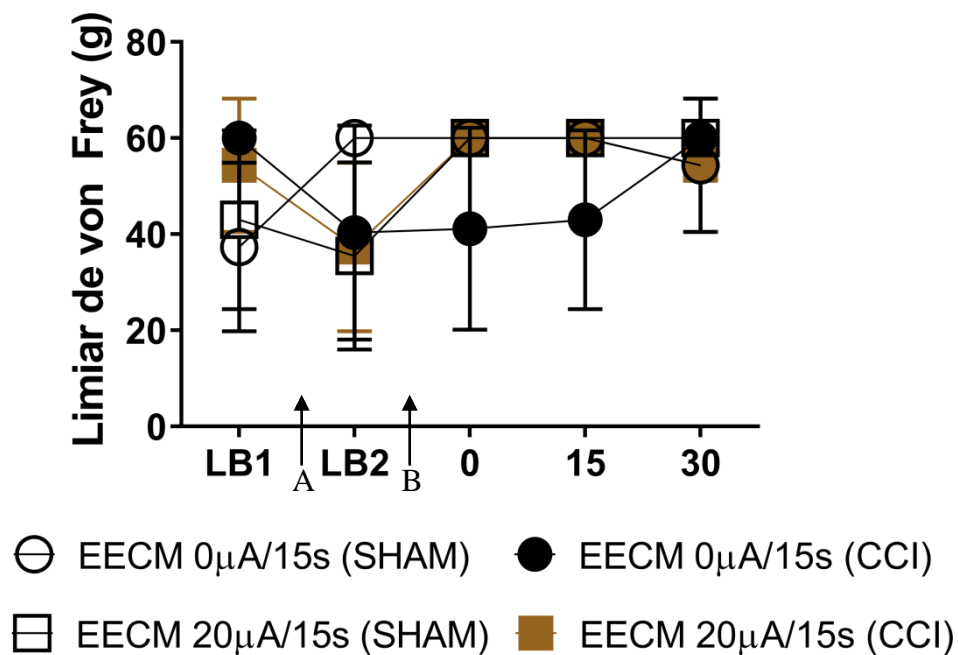


Figura 24 Avaliação da alodinia mecânica na pata esquerda (contralateral) do animal após a EECM primário (M_1) com o *Deep Brain Stimulation* (DBS) em animais sham ou CCI.. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia CCI ou procedimento sham; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI e/ou sham; seta B = EECM. Grupos sham = “falso-operado”: (○) EECM - $0\mu A/15s$ ($n = 8$), (□) EECM - $20\mu A/15s$ ($n = 8$) (●) EECM - $0\mu A/15s$ ($n = 8$), (■) EECM - $20\mu A/15s$ ($n = 8$). Os dados foram apresentados como médias e erros padrão da média. Não houve diferença estatisticamente significativa segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey.

4.4 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA da SCPdm na analgesia induzida pela EQCM

Para estudar a possível participação do sistema endógeno de inibição de dor na analgesia induzida pela estimulação química do CM, foi realizado o bloqueio dos receptores do tipo NMDA através da microinjeção de doses crescentes do antagonista LY235959 (a 0,25, 2 e 8nmol) na dmPAG, seguido da EQCM (NMDA – 8nmol) em animais com ou sem DNC.

Segundo ANOVA de medidas repetidas, (*Two-way ANOVA*), houve diferença estatística do tratamento [$F(30, 252) = 3,984$ $P < 0,001$] e do tempo [$F(6, 252) = 12,37$ $P < 0,001$], entretanto, o teste não mostrou significância a quanto à interação tratamento *versus* tempo [$F(5, 42) = 1,255$ $P = 0,3013$] no teste de alodinia mecânica realizado na pata ipsilateral em relação à CCI.

A análise *post-hoc* de Tukey mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os animais do grupo Veículo SCPdm + Veículo CM (Sham) ($P < 0,001$) em todos os tempos estudados, entretanto os demais grupos que também passaram pela CCI não mostraram diferença em relação àqueles que passaram pela CCI. Os dados são mostrados na figura 25A. Os animais que receberam o tratamento e foram avaliados pelo limiar de von Frey quando o teste foi realizado na pata esquerda do animal (contralateral ao lado do CCI) não mostraram diferença estatística significativa do tratamento [$F(6, 42) = 15,26$ $P > 0,001$], do tempo [$F(5, 35) = 1,178$ $P < P = 0,3397$], e da interação do tratamento *versus* tempo [$F(5, 42) = 1,255$ $P > P = 0,3013$]. Os dados são mostrados em 25B:

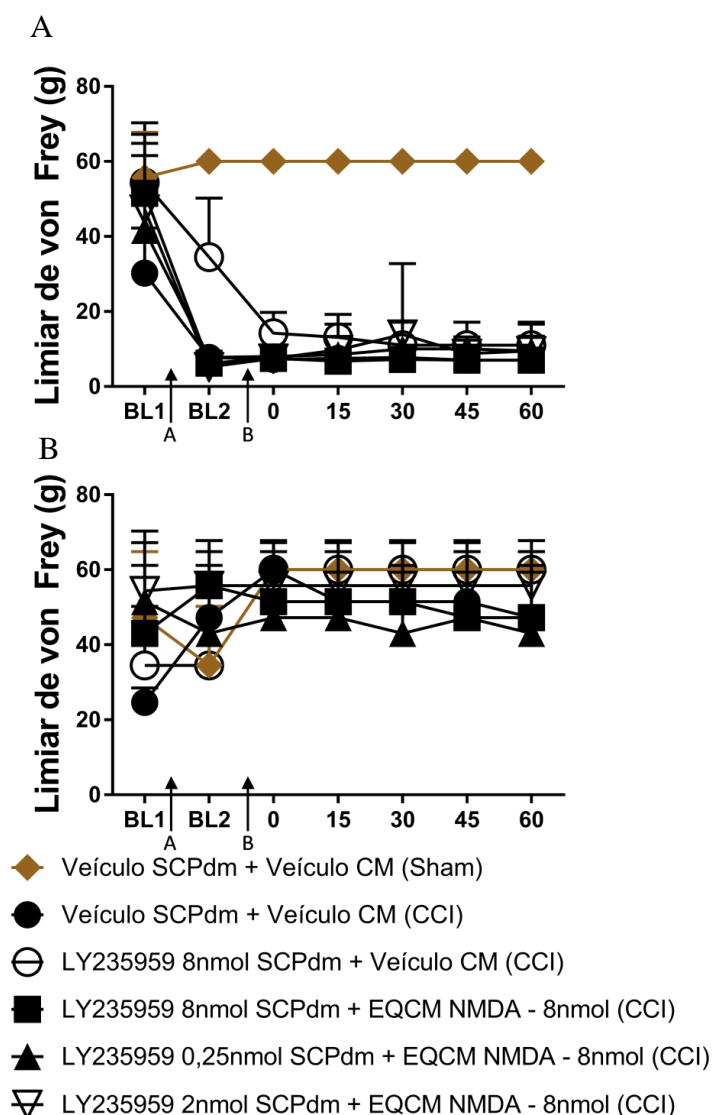


Figura 25 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA da SCPdm na analgesia induzida pela EQCM. Representação da estimulação química do córtex motor (EECM) com o bloqueio dos receptores de NMDA na SCPdm com a utilização de LY235959. Pata ipsilateral e contralateral, respectivamente. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI; seta B = Estimulação química da SCPdm seguida da estimulação química do córtex motor. : (♦) Veículo SCPdm + Veículo CM - Sham (n = 7), (●) Veículo SCPdm + Veículo CM - CCI (n = 7), (O) LY235959 8nmol SCPdm + Veículo CM - CCI (n = 7), (■) LY235959 8nmol SCPdm + EQCM NMDA - 8nmol, (▲) LY235959 0,25nmol SCPdm + EQCM NMDA - 8nmol, (▽) LY235959 2nmol SCPdm + EQCM NMDA - 8nmol, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguido pelo teste de *pos-hoc* de Tukey.

4.5 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA da SCPdm na analgesia induzida pela estimulação elétrica do córtex motor (EECM)

Para estudar a possível participação do sistema endógeno de inibição de dor na analgesia induzida pela EECM foi realizado o bloqueio dos receptores do tipo NMDA através da microinjeção de doses crescentes do antagonista LY235959 (a 0,25, 4 e 8nmol) diretamente localizados na coluna SCPdm, seguido da EECM (M1 a 20 μ A / 15s) em animais com ou sem DNC.

Segundo ANOVA de medidas repetidas, (*Two-way* ANOVA), houve diferença estatística do tratamento [F (20,120) = 3,737 P < 0,001], do tempo [F (4,120) = 35,04 P < 0,001], e da interação tratamento *versus* tempo [F (5,30) = 8,572 P < 0,001] no teste de alodinia mecânica realizado na pata ipsilateral ao CCI.

A análise de *post-hoc* de Tukey mostrou diminuição do limiar de von Frey em animais que passaram pela CCI e que receberam veículo na SCPdm + EECM a 0 μ A / 15s (P < 0,05) em todos os tempos estudados. O grupo que recebeu a microinjeção de veículo na SCPdm + EECM a 20 μ A / 15s aumentou o limiar de *von Frey* em animais com DNC (P < 0,05) em comparação aos animais que receberam veículo na SCPdm + EECM a 0 μ A / 15s, em todos

os tempos analisados. O bloqueio prévio dos receptores do tipo NMDA na SCPdm na maior dose de LY235959 (8nmol) diminuiu o limiar de von Frey induzida pela EECM a 20 μ A / 15s em animais com DNC em todos os tempos estudados ($P < 0,05$). Os dados são mostrados na figura 26:

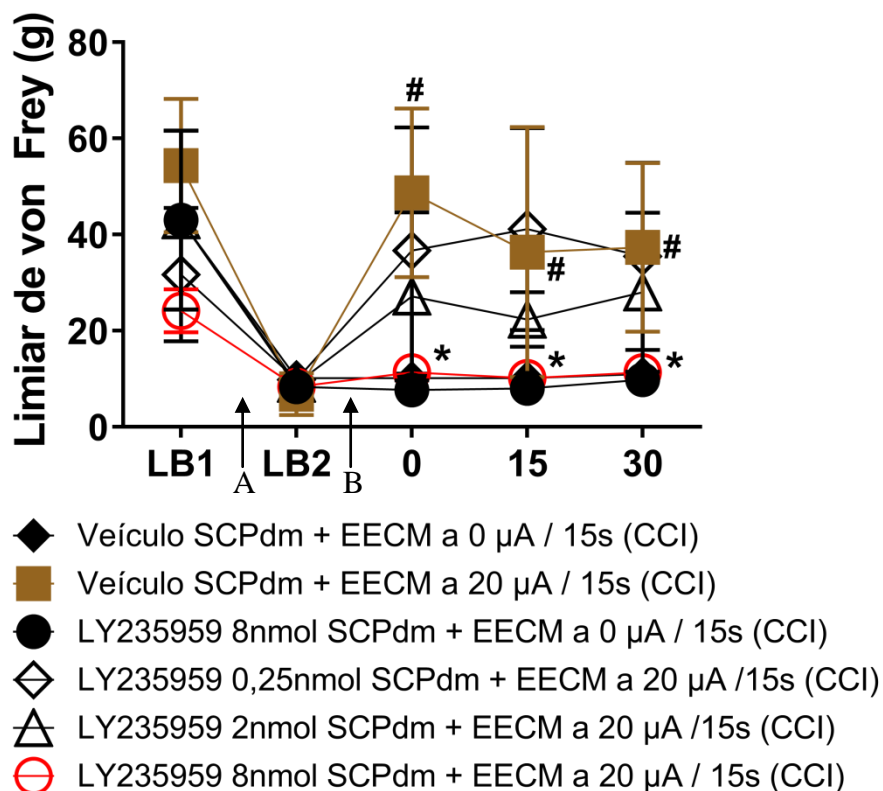


Figura 26 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA na SCPdm sobre a analgesia induzida pela EECM. Representação do bloqueio dos receptores de NMDA na SCPdm com a utilização de LY235959, seguida pela estimulação elétrica do córtex motor (EECM) sobre a alodinia mecânica avaliada na pata ipsilateral dos animais com DNC induzida pela CCI. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI; seta B = Estimulação química da SCPdm seguida da estimulação elétrica do córtex motor. CCI: (◆) Veículo SCPdm + EECM a 0 μA / 15s (n = 7), (■) Veículo SCPdm + EECM a 20 μA / 15s (n = 7), (●) LY235959 8nmol SCPdm + EECM a 0 μA / 15s (n = 7), (◇) LY235959 0,25nmol SCPdm + EECM a 20 μA / 15s (n = 7), (△) LY235959 2nmol SCPdm + EECM a 20 μA / 15s (n = 7), (⊖) LY235959 8nmol SCPdm + EECM a 20 μA / 15s (n = 7). # $p < 0,001$ em relação ao grupo Veículo SCPdm + EECM a 0 μA / 15s (CCI) * $p < 0,001$ em relação ao veículo SCPdm + EECM a 20 μA / 15s (CCI), segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey.

O grupo de animais que receberam veículo /ou LY235959 em todas as doses na dmSCP + EECM 0 ou 20 μA / 15s não mostrou diferença significativa do tratamento [$F(20,120) = 114 P > 0,001$], do tempo [$F(4,120) = 8,091 P < 0,001$] e da interação do tratamento *versus* tempo [$F(82,16) = 3,28 P > 0,05$] no limiar de von Frey quando o teste foi realizado na pata esquerda do animal (contralateral ao lado do CCI). Os dados são mostrados na figura 27:

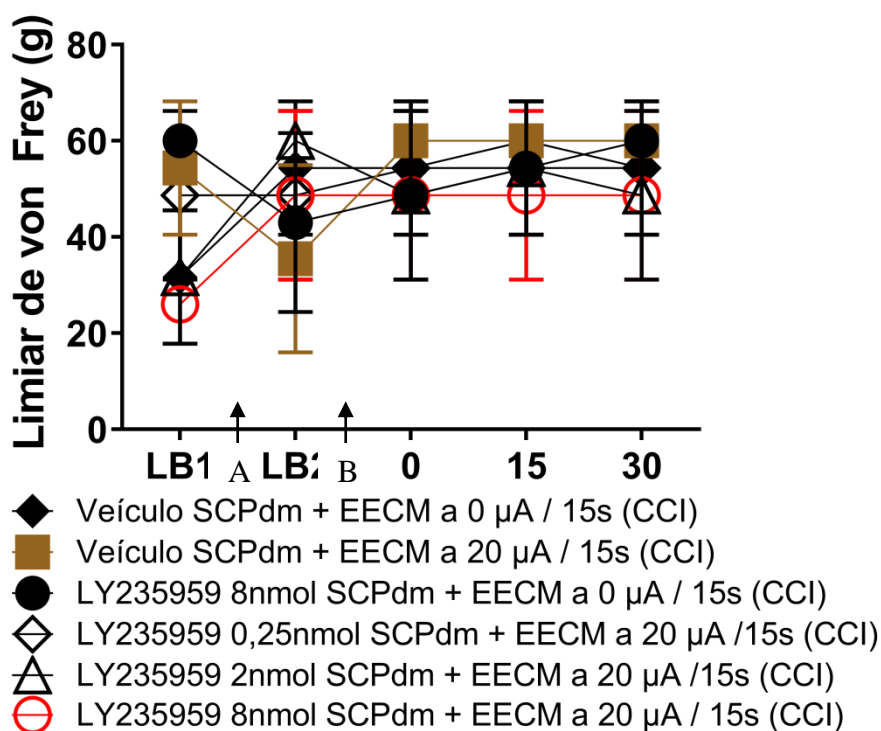


Figura 27 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA-SCP na analgesia induzida pela EECM. Representação da estimulação elétrica do córtex motor (EECM) com o bloqueio dos receptores de NMDA na SCPdm com a utilização de LY235959. Pata contralateral. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 21 dias da CCI; seta B = Estimulação química da SCPdm e estimulação elétrica do córtex motor. CCI: (◆) Veículo SCPdm + EECM a 0 μA / 15s (n = 7), (■) Veículo SCPdm + EECM a 20 μA / 15s (n = 7), (●) LY235959 8nmol SCPdm + EECM a 0 μA / 15s (n = 7), (◇) LY235959 0,25nmol SCPdm

+ EECM a 20 μA / 15s (n = 7), (Δ) LY235959 2nmol SCPdm + EECM a 20 μA / 15s (n = 7), (\circ) LY235959 8nmol SCPdm + EECM a 20 μA / 15s (n = 7), segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey.

4.6 Efeito da Atividade Física sobre a DNC

Para estudar o efeito da atividade física aeróbica em relação à atenuação da DNC, foi realizado o treinamento físico durante 7 dias em animais que passaram pela CCI ou procedimento *sham*, sendo o limiar de *von Frey* fora aferido na pata ipsilateral e contralateral em relação ao lado da CCI ou *sham*.

Segundo ANOVA de medidas repetidas, (*Two-way ANOVA*), houve diferença estatística do tratamento [$F(30, 210) = 27,61 P < 0,0001$], do tempo [$F(5, 210) = 74,69 P < 0,0001$] e da interação tratamento *versus* tempo [$F(6, 42) = 159,6 P < 0,0001$] no teste de alodinia mecânica realizado na pata ipsilateral ao CCI.

A análise de *post-hoc* de Tukey mostrou diminuição do limiar de *von Frey* em animais que passaram pela CCI e que foram submetidos a EECM (grupo Sem esteira + C/ EECM – CCI e grupo Com Esteira + C/ EECM – CCI) nos tempos 15 e 30 minutos quando comparados com os grupos *sham*, como pode ser observado na figura abaixo (Figura 28):

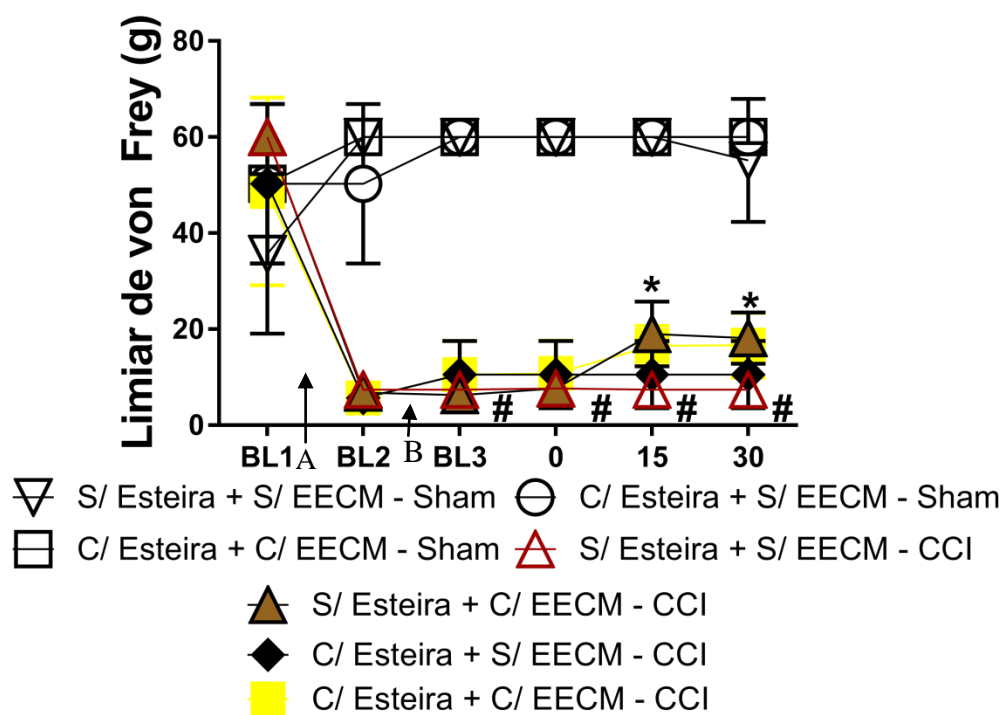


Figura 28 - Efeito da atividade física aeróbica em relação à atenuação da dor neuropática crônica, seguida pela EECM em ratos com DNC. Pata ipsilateral. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 14 dias da CCI; LB3 – Linha de base após 21 dias de CCI e 6 de treinamento seta B = Teste da esteira seguida da estimulação elétrica do córtex motor. Sham: (∇) S/ esteira + S/ EECM; (O) C/ esteira + S/ EECM; (□) C/ esteira + S/ EECM; CCI: grupo (△) S/ esteira + S/ EECM; (▲) S/ Esteira + C/ EECM; (◆) C/ Esteira + S/ EECM; (■) C/ Esteira + C/ EECM # p < 0,001 em relação aos grupos Sham, * p < 0,001 em relação ao grupo S/ esteira + S/ EECM, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey..

Os animais submetidos ao exercício físico seguido ou não pela EECM não mostraram diferença significativa do tratamento [F (5, 30) = 2,275 P=0,0723], do tempo [F (5, 210) = 3,743 P=0,0029] e da interação do tratamento *versus* tempo [F (6, 42) = 2,812 P=0,0216] no limiar de von Frey quando o teste foi realizado na pata esquerda do animal (contralateral ao lado do CCI). Os dados são mostrados na figura 29:

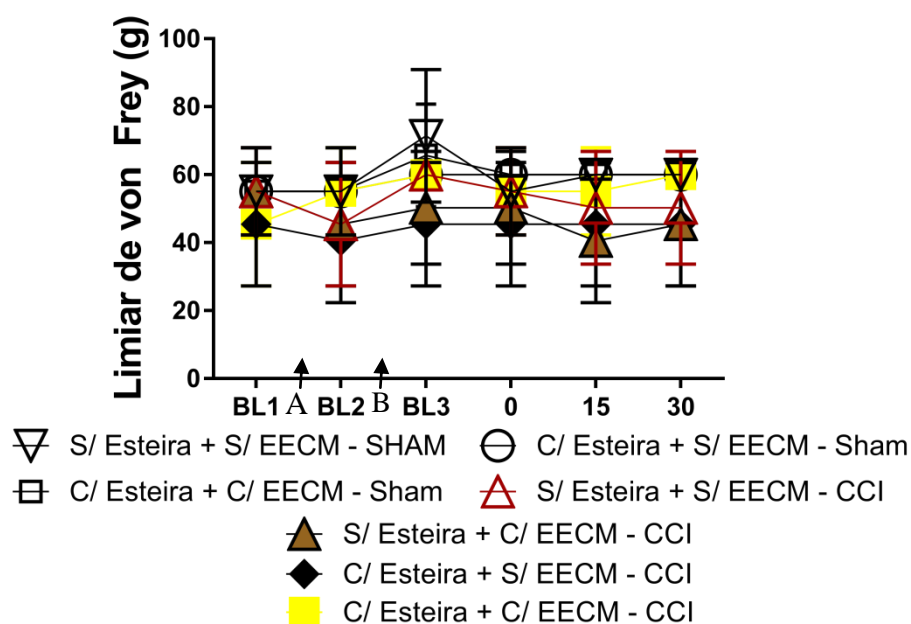


Figura 29 Efeito da atividade física aeróbica em relação à atenuação da dor neuropática crônica. Pata ipsilateral. LB1: Linha de base antes dos procedimentos; seta A = realização da cirurgia de constrição do nervo isquiático (CCI) ou procedimento Sham; LB2 – Linha de base após 14 dias da CCI; LB3 – Linha de base após 21 dias de CCI e 6 de treinamento seta B = Teste da esteira seguida da estimulação elétrica do córtex motor. Sham: (∇) S/ esteira + S/ EECM; (O) C/ esteira + S/ EECM; (□) C/ esteira + S/ EECM; CCI: grupo (Δ) S/ esteira + S/ EECM; (▲) S/ Esteira + C/ EECM; (◆) C/ Esteira + S/ EECM; (■) C/ Esteira + C/ EECM, segundo teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste de *post-hoc* de Tukey.

5 DISCUSSÃO

A estimulação química do córtex motor primário (M_1) através da microinjeção de NMDA e a estimulação elétrica do M_1 realizada através do aparelho *deep brain stimulation* (DBS) atenuaram a alodinia mecânica dos animais com dor neuropática crônica (DNC). Além disso, a presente pesquisa evidenciou a participação da SCPdm na elaboração da analgesia induzida pela estimulação química e elétrica do M_1 em animais com DNC. Mostrou-se também que animais *sham* e CCI no teste de campo aberto não apresentaram diferença na atividade locomotora. E por fim, foi possível verificar que a atividade física aeróbia realizada pelo teste de esteira não potencializou a antinocicepção induzida pela EECM. Diante destes resultados, pode-se evidenciar a relação entre as diferentes facetas da dor neuropática crônica como os tratamentos neurofarmacológicos, neurofisiológico e neuromotora.

Com o uso do teste de *von Frey*, foi possível avaliar e quantificar a força necessária para evocar o comportamento de retirada da pata ipsi (pata direita) e contralateral (pata esquerda) em relação ao lado da CCI (membro posterior direito), podendo, assim, avaliar o limiar de alodinia mecânica. Certamente, os modelos de ligadura do nervo periférico são ferramentas úteis que mimetizam os sintomas clínicos de DNC caracterizada em seres humanos por dor espontânea e alodinia. (LATREMOLIERE; WOOF, 2009).

No presente trabalho, o efeito antinociceptivo induzido pela estimulação glutamatérgica por meio da ativação dos receptores NMDA no M_1 pode ser evidenciado através do teste de *von Frey*. A analgesia evidenciada durante o teste pode ser explicada pela abertura dos canais de cálcio localizados nos neurônios pós-sinápticos no M_1 , portanto, estes, quando ativados, permanecem abertos por grande período, realizando rápida retirada de glutamato da sinapse por seus transportadores para que ocorram a neurotransmissão excitatória normal e a prevenção contra toxicidade glutamato induzida. (VALLI, 2014)

Entretanto, os mecanismos dos receptores para a sinapse e sua organização parecem depender de dois fatores principais: a fosforilação do receptor e sua interação com outras proteínas (PRYBYLOWSKI, 2004). Há mais de duas décadas a importância do receptor NMDA é reconhecida na função sináptica. Diversos estudos mostraram a eficácia de mecanismos glutamatérgicos em variadas funções, tais como desenvolvimento neural, plasticidade sináptica, aprendizado, memória e também muitas funções são associadas à ligação com o córtex somatossensorial. (HASAN, 2013; PRYBYLOWSKI, 2004)

Os resultados desta pesquisa mostraram que ambas as técnicas, *sham* e CCI, não diminuíram a mobilidade exploratória dos animais no teste de campo aberto (*open field*). Os ratos com CCI não exploraram a área central da arena, no entanto, o grupo *sham* ficou mais tempo na referida área. Como se sabe, a hesitação do animal em explorar a área central da arena é um indicativo de ansiedade em roedores (PRUT; BELZUNG, 2003). A ansiedade está fortemente associada à DC, que é considerada, por muitos autores, um evento complexo, pois além de mecanismos periféricos, envolve também mecanismos centrais. De fato, há não só o componente sensorio-discriminativo, mas também os emocionais, cognitivos, motivacionais e afetivos, com uma extensa rede cortical associada com ao seu processamento da DC (QUINTERO, 2013).

A rede cortical do processamento da DNC inclui o CM (MEDEIROS e cols., 2019a), e de acordo com o estudo neurofisiológico no presente estudo, através da microinjeção de NMDA no CM, podemos observar ligação com a melhora da alodinia mecânica em estágios crônicos após 21 dias de CCI em roedores. Parece que o CM recruta receptores do tipo NMDA para atenuar a alodinia mecânica dos animais submetidos à lesão de nervo periférico (FUNDYTUS, 2001; NEUGEBAUER, 2006). Um estudo relatou envolvimento do sistema glutamatérgico em ratos monoartríticos, pois encontraram um aumento das áreas motoras, somatossensoriais e límbicas que podem estar relacionadas a um mecanismo central que neutraliza as informações nociceptivas da pata inflamada e ao comportamento motor dos animais com dor. (NETO e cols., 2001).

Os dados desta pesquisa mostraram que a EQCM, através da microinjeção de NMDA no M₁, foi capaz de produzir analgesia através do aumento do limiar da alodinia mecânica. Com isso, em uma segunda parte do estudo, realizamos a neuroestimulação elétrica n M₁ por meio do aparelho DBS e observamos que a EECM também causa analgesia nos animais com DNC.

Atualmente, a estimulação profunda do CM é amplamente utilizada no tratamento da dor crônica refratária, mas os mecanismos analgésicos são pouco elucidados. Contudo, existem evidências mostrando que a estimulação elétrica do CM/M₁ induz à antinocicepção em ratos (GARCIA-LARREA; PEYRON, 2007; CIAMPI DE ANDRADE, 2014; JIANG, 2014). Por essa razão, esta pesquisa realizou a estimulação elétrica e química do córtex motor primário e em seguida o bloqueio da substância cinzenta periaquedutal, responsável pelo

processo de inibição descendente da dor, para que dessa forma houvesse um melhor entendimento dos mecanismos de ação da antinocicepção realizadas quando ativado o CM₁. Com isso, salientam-se nesta pesquisa que o córtex motor primário está totalmente interligado ao processo de analgesia realizado pelo sistema descendente inibitório da dor e que existe participação direta de receptores glutamatérgicos nesse sistema.

Health e Mickle (1950) introduziram a estimulação intracraniana para o controle da dor, provocando o nascimento de um amplo campo de pesquisas. A partir daí diversas áreas corticais começaram a ser estudadas para o controle da dor. A técnica terapêutica pode ser não destrutiva, ajustável e reversível, eficaz para aqueles com insucesso na terapia convencional, como fisioterapia ou farmacológica. O tratamento de neuroestimulação pode ser realizado em pacientes que apresentam síndromes crônicas centrais ou periféricas refratárias a outros tipos de tratamento, como dor pós-AVC central, incluindo dor talâmica, neuropatia facial e até mesmo dor causada por lesões do plexo espinal e braquial. (WOOLF, 2011; MONSALVE, 2012; FAGUNDES-PEREYRA, 2010).

Expandindo além das estruturas do "cérebro profundo", Tsubokawa e colaboradores observaram, em um estudo de 11 pacientes com síndrome talâmica, a melhora aguda da dor em 8 dos pacientes, sendo que com 3 deles a eficácia foi perdida em 2 anos. Desde então, a pesquisa sobre estimulação do córtex motor (ECM) expandiu-se drasticamente. Os resultados desta pesquisa corroboram com os achados anteriores visto que a EECM realizada com o DBS foi capaz de causar aumento do limiar de alodinia mecânica em estágios crônicos em animais com DNC.

Um estudo demonstrou que a ECM aumenta o limiar nociceptivo de ratos por meio da participação de opioides. Além disso, outra investigação do mesmo grupo mostrou que a estimulação transdural do córtex motor em ratos induz a inibição dos neurônios sensoriais talâmicos dos núcleos posterolaterais ventrais e do complexo centromediano-parafascicular e a desinibição de neurônios no PAG, induzindo antinocicepção (PAGANO E COLS., 2012). Um estudo diferente em ratos avaliou o efeito da EECM na dor neuropática (lesão por constrição crônica do nervo ciático), contexto em que foi relatado que a EECM reverte a dor neuropática por meio da ativação do sistema límbico e dos sistemas inibidores descendentes, incluindo o corno dorsal da medula espinhal, tálamo (núcleos lateral e medial posterior ventral), SCP, ACC e as amígdalóides central e núcleos basolateral. (PAGANO e cols., 2011).

O CM é a parte do córtex cerebral localizada no lobo frontal, no giro pré-central. As funções do CM estão relacionadas à integração sensório-motora, controle de movimentos voluntários e processamento de informações relacionadas ao sistema motor. De fato, o CM pode ter entradas corticais diretas para núcleos encefálicos que participam da modulação da dor através da ativação de uma possível via entre CM e SCP (QUINTERO, 2013; ZHUO, 2008). Os presentes dados corroboram as evidências citadas acima, visto que o bloqueio prévio do receptor NMDA na SCPdm boqueia a estimulação elétrica (via DBS) e química (via agonista NMDA) no M_1 .

A SCP está localizada no mesencéfalo e, posteriormente, envia projeções para o corno dorsal da medula espinal relacionada à modulação descendente da nocicepção, sendo os efeitos antinociceptivos mediados por neurotransmissores de serotonina, glicina, GABA entre outros. (ZHUO, 2008). Por essa razão, em uma terceira parte do estudo foram realizados o pré-tratamento da SCPdm com o antagonista de receptores do tipo NMDA LY235959 e posteriormente a EECM, com o objetivo de investigar a participação direta entre o CM e SCP no controle da dor.

Outros estudos mostraram o recrutamento de um importante núcleo do sistema descendente inibitório de modulação de dor, a SCPdm (de FREITAS, 2013; de FREITAS, 2014, 2016) pela ativação do sistema glutamatérgico. Os resultados mostraram diminuição do efeito analgésico produzido pelo EECM, sugerindo a participação direta do núcleo SCPdm na elaboração de antinocicepção induzida pela neuroestimulação elétrica no M_1 . Alguns autores propuseram que a regulação do núcleo ventro-lateral orbital (VLO) do córtex pré-frontal e da via descendente que inibe a nocicepção é mediada por células *PAG-on/off*. De fato, esses autores mostraram que os neurônios do VLO apresentaram respostas excitatórias ou inibitórias após a injeção de glutamato no núcleo intermediário. Todos esses dados sugerem que a atividade combinada do córtex VLO e da SCP podem modular entradas nociceptivas nos níveis trigeminais e medulares. (VOOGD; PAXINOS, 1995).

A EECM pelo aparelho DBS ativa a SCPdm, que incita as vias descendentes inibitórias da dor, através do RVM ou LC que, por sua vez, enviam projeções para o CDME (FONOFF, 2009; DE ANDRADE, 2019), resultando em alívio da DCN. Essas observações reforçam a hipótese de que o M_1 é uma das estruturas mais rostrais do neuroeixo relacionadas

ao sistema modulatório da dor e que a estimulação transdural induz à analgesia em situações de dor neuropática. (de ANDRADE, 2019).

Essas informações corroboram com nossos resultados, que sugerem o envolvimento do sistema glutamatérgico entre o CM e a SCPdm na modulação da DNC e que as vias têm conexão direta. Em outro estudo, quando realizamos a EQCM para avaliar o mecanismo farmacológico do CM, posteriormente o bloqueio da SCPdm com antagonista NMDA LY235959, observamos que não houve o mesmo resultado. Os animais CCI que foram estimulados não tiveram reversão do limiar de alodinia mecânica quando houve o bloqueio da SCPdm, através da microinjeção do antagonista de receptores NMDA em todos os tempos e em todas as doses durante o teste de *von Frey* nos animais. Sendo assim, esta pesquisa permite postular que a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no M₁ e na SCPdm está envolvida na elaboração da antinocicepção organizada no CM.

Em outra parte do estudo, também foi avaliada a melhora da DNC gerada pela atividade física aeróbia, para averiguar a alodinia mecânica. Contudo, no presente estudo, não se pode relatar melhora da dor neuropática nos animais submetidos ao treinamento aeróbio realizado pela esteira em nenhum dos tempos aferidos com o teste de *von Frey*. Resta acrescentar que, nesse contexto, alguns estudos mostram que o exercício aeróbico atenua a regulação da ativação das células da glia, a expressão de BDNF no corno dorsal espinal ipsilateral e o sistema opioide endógeno, gerando alívio da dor em animais submetidos a CCI. (SUMIZONO e cols., 2018).

A dor neuropática é evidenciada por sintomas neurais positivos, como formigamento, queimação e disestesia, e/ou sintomas neurais negativos, como perda de sensação. Esses sintomas podem ser avaliados usando testes sensoriais e/ou por meio do questionário *painDETECT* (KOSEK e cols., 2016). O tratamento da DNC pode ser realizado com exercício aeróbico regular, pois aumenta citocinas anti-inflamatórias e a expressão de macrófagos, que secretam essas citocinas no local da lesão (BOBINSKI e cols., 2018). Esses efeitos das citocinas e macrófagos promovem a cura e a analgesia nervosa em modelos animais de dor neuropática (BOBINSKI e cols., 2011). Em pessoas com neuropatia diabética, uma diminuição da dor está associada ao aumento do crescimento das fibras nervosas epidérmicas após um programa regular de exercícios. (KLUDING e cols., 2012)

Assim, o exercício pode ser considerado um tratamento modificador da doença em condições de dor neuropática, promovendo a cicatrização de tecidos lesionados. Por essa razão é importante a utilização de protocolos de exercícios não contínuos para a dor neuropática. A atividade física aeróbia regular pode ser utilizada, mas, em quadros álgicos, se o paciente for submetido a um treinamento extenuante, pode ser prejudicial à dor. Nesse tratamento pudemos observar que a corrida contínua durante 7 dias não teve efeito na dor do animal, por outro lado, foi possível verificar mais uma vez a EECM atenuando a dor neuropática nos animais que foram submetidos ao tratamento.

Atualmente, nosso principal empenho, considerando a pesquisa básica nos estudos da dor, está na investigação e proposição do melhor entendimento dos mecanismos por meio dos quais a dor se agrava e prejudica a vida nos aspectos biopsicossociais e comportamentais. De fato, no presente trabalho, foi possível evidenciar a participação do córtex motor primário (M1) nesse processo analgésico de inibição da dor neuropática crônica. Além disso, com este estudo se pode propor uma via funcional entre o córtex motor e núcleos descendentes moduladores da dor, como a SCPdm, na elaboração da analgesia induzida pela neuroestimulação do M1. Possivelmente, o presente trabalho virá a contribuir para o entendimento mais profundo da neurofisiologia e de tratamentos que podem ser realizados na dor neuropática crônica.

6 CONCLUSÕES

Em conclusão, a estimulação elétrica (EECM) do CM/M₁ causou analgesia em animais com DNC induzida por CCI. O possível efeito analgésico da EECM pode utilizar-se dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, visto que a microinjeção do agonista NMDA (EQCM) no M₁ produziu efeito semelhante à EECM. Mostrou-se que a analgesia produzida pela EECM também depende dos receptores NMDA localizados na SCPdm, uma vez que o bloqueio destes receptores diminuiu a analgesia induzida EECM. Assim, adicionar ao nosso conhecimento as bases neurofisiológicas e neuropsicofarmacológicas, elucidando a estimulação elétrica e química do CM/M₁ de roedores e os seus mecanismos, pode contribuir para melhorar o entendimento e manejo da dor crônica e da neuropatia.

Em relação ao exercício físico aeróbio para o tratamento da dor neuropática, sabe-se que o mesmo pode alterar o sistema de dor melhorando função e a incapacidade, entretanto, é preciso atentar aos protocolos utilizados, sendo necessárias pesquisas complementares para que possa ser exemplificado um treinamento saudável e eficaz para essa população, visando sempre a melhora da qualidade de vida do indivíduo com dor neuropática crônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVERILL L.A., PUROHIT P., AVERILL C.L., BOESL M.A., KRYSTAL J.H., ABDALLAH C.G. Glutamate dysregulation and glutamatergic therapeutics for PTSD: Evidence from human studies. *Neurosci Lett* 649:147-155, 2017.

BALDUCCI, S.; IACOBELLIS, G.; PARISI, L.; DI BIASE, N. *et al.* Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. **Journal of diabetes and its complications**, 20, n. 4, p. 216-223, 2006.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, 9, n. 8, p. 807-819, 2010.

BARKER-HALISKI M., WHITE H.S., **Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy**. Cold Spring Harb Perspect Med 5:a022863, 2015.

BARROS, M. B. D. A.; CÉSAR, C. L. G.; CARANDINA, L.; TORRE, G. D. Desigualdades sociais na prevalência de doenças crônicas no Brasil, PNAD-2003. **Ciência & Saúde Coletiva**, 11, p. 911-926, 2006.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual review of neuroscience**, 7, n. 1, p. 309-338, 1984.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, 33, n. 1, p. 87-107, Apr 1988.

BERTOLINI, G. R.; DO NASCIMENTO, C. M.; ARTIFON, E. L.; CUNHA, D. M. *et al.* Swimming training and functional assessment of sciatic nociception in rats. **Rev Bras Reumatol**, 51, n. 3, p. 249-259, 2011.

BOBINSKI, F.; MARTINS, D. F.; BRATTI, T.; MAZZARDO-MARTINS, L. *et al.* Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, 194, p. 337-348, 2011.

BOCCARD, S. G. J.; PEREIRA, E. A. C.; AZIZ, T. Z. Deep brain stimulation for chronic pain. **Journal of Clinical Neuroscience**, 22, n. 10, p. 1537-1543, 2015.

BOYCE-RUSTAY, J. M.; JARVIS, M. F. Neuropathic pain: models and mechanisms. **Current pharmaceutical design**, 15, n. 15, p. 1711-1716, 2009.

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.

CASTRO, K. V. D.; SILVA, A. L. D. S.; LIMA, J. M. M. P.; NUNES, W. J. *et al.* Fisiomotricidade e limiares de dor: efeitos de um programa de exercícios na autonomia funcional de idosas osteoporóticas. **Fisioter. mov**, 23, n. 1, p. 161-172, 2010.

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

CIAMPI DE ANDRADE, D.; MHALLA, A.; ADAM, F.; TEXEIRA, M. J. *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation induced analgesia depends on N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. **Pain**, 155, n. 3, p. 598-605, Mar 2014.

COLLOCA, L.; LUDMAN, T.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R. *et al.* Neuropathic pain. **Nat Rev Dis Primers**, 3, p. 17002, Feb 2017.

COOPER, M. A.; KLUDING, P. M.; WRIGHT, D. E. Emerging relationships between exercise, sensory nerves, and neuropathic pain. **Frontiers in neuroscience**, 10, p. 372, 2016.

COTMAN, C. W. Excitatory amino acid neurotransmission. **Psychopharmacology: The fourth generation of progress**, 75, 1994.

DE ANDRADE, E. M.; MARTINEZ, R. C. R.; PAGANO, R. L.; LOPES, P. S. S. *et al.* Neurochemical effects of motor cortex stimulation in the periaqueductal gray during neuropathic pain. **J Neurosurg**, p. 1-13, Jan 4 2019.

DE FREITAS R.L., MEDEIROS P., DA SILVA J.A., DE OLIVEIRA R.C., DE OLIVEIRA R., ULLAH F., KHAN A.U., COIMBRA N.C. The μ_1 -opioid receptor and 5-HT_{2A}- and 5HT_{2C}-serotonergic receptors of the locus coeruleus are critical in elaborating hypoalgesia induced by tonic and tonic-clonic seizures. **Neuroscience**. 2016 Nov 12; 336:133-145.

DE FREITAS, R. L.; DE OLIVEIRA, R. C.; DE OLIVEIRA, R.; PASCHOALIN-MAURIN, T. *et al.* The role of dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal gray matter and in situ 5-HT (2) A and 5-HT (2) C serotonergic receptors in post-ictal antinociception. **Synapse**, 68, n. 1, p. 16-30, Jan 2014.

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**, 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. μ 1 -Opioid receptors in the dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal grey matter are critical for the enhancement of post-ictal antinociception. **Synapse** 70:519-530, 2016.

DEYO , R. A.; WEINSTEIN , J. N. Low Back Pain. **New England Journal of Medicine**, 344, n. 5, p. 363-370, 2001.

FEATHERSTONE, D. E. Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. **ACS chemical neuroscience**, 1, n. 1, p. 4-12, 2009.

FELIPPOTTI, T. T.; DE FREITAS, R. L.; COIMBRA, N. C. Endogenous opioid peptide-mediated neurotransmission in central and pericentral nuclei of the inferior colliculus recruits μ 1-opioid receptor to modulate post-ictal antinociception. **Neuropeptides**, 46, n. 1, p. 39-47, 2012.

FELIPPOTTI, T. T.; DOS REIS FERREIRA, C. M.; DE FREITAS, R. L.; DE OLIVEIRA, R. C. *et al.* Paradoxical effect of noradrenaline-mediated neurotransmission in the antinociceptive phenomenon that accompanies tonic-clonic seizures: Role of locus coeruleus neurons and α 2-and β -noradrenergic receptors. **Epilepsy & Behavior**, 22, n. 2, p. 165-177, 2011.

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

FONOFF, E. T.; DALE, C. S.; PAGANO, R. L.; PACCOLA, C. C. *et al.* Antinociception induced by epidural motor cortex stimulation in naive conscious rats is mediated by the opioid system. **Behavioural brain research**, 196, n. 1, p. 63-70, 2009.

FREITAS, R. L.; BASSI, G. S.; DE OLIVEIRA, A. M.; COIMBRA, N. C. Serotonergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus recruits in situ 5-HT_{2A/2C} receptors to modulate the post-ictal antinociception. **Experimental neurology**, 213, n. 2, p. 410-418, 2008.

FREITAS, R. L.; DOS REIS FERREIRA, C. M.; URBINA, M. A. C.; MARIÑO, A. U. *et al.* 5-HT_{1A/1B}, 5-HT₆, and 5-HT₇ serotonergic receptors recruitment in tonic-clonic seizure-induced antinociception: role of dorsal raphe nucleus. **Experimental neurology**, 217, n. 1, p. 16-24, 2009.

FREITAS, R. L.; FERREIRA, C. M. R.; RIBEIRO, S. J.; CARVALHO, A. D. *et al.* 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**, 191, n. 2, p. 225-242, 2005.

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

GAFFURI, J.; MEIRELES, A.; ROCHA, B. P.; ROSA, C. T. *et al.* Physical exercise assessment as an analgesia factor in a sciatica experimental model. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 17, n. 2, p. 115-118, 2011.

GARCIA-LARREA, L.; PEYRON, R. Motor cortex stimulation for neuropathic pain: From phenomenology to mechanisms. **Neuroimage**, 37 Suppl 1, p. S71-79, 2007.

GAURIAU, C.; BERNARD, J. F. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. **Exp. Physiol**, 87, n. 2, p. 251-258, Mar 2002.

Gomes da Silva S, Arida RM (2015), Physical activity and brain development. **Expert Rev Neurother** 15:1041-1051.

GONÇALVES, A. L.; LUCIANO, E. Respostas inflamatórias em ratos wistar submetidos a atividade física. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, 4, n. 1, p. 39-46, 1999.

GREWER, C.; RAUEN, T. Electrogenic glutamate transporters in the CNS: molecular mechanism, pre-steady-state kinetics, and their impact on synaptic signaling. **The Journal of membrane biology**, 203, n. 1, p. 1-20, 2005.

GUASTELLA, V.; MICK, G.; LAURENT, B. Non pharmacologic treatment of neuropathic pain. **Presse medicale (Paris, France: 1983)**, 37, n. 2 Pt 2, p. 354-357, 2008.

HO, Y.-C.; CHENG, J.-K.; CHIOU, L.-C. Hypofunction of glutamatergic neurotransmission in the periaqueductal gray contributes to nerve-injury-induced neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, 33, n. 18, p. 7825-7836, 2013.

HONEY, C. M.; TRONNIER, V. M.; HONEY, C. R. Deep brain stimulation versus motor cortex stimulation for neuropathic pain: A minireview of the literature and proposal for future research. **Comput Struct Biotechnol J**, 14, p. 234-237, 2016.

HOSOBUCHI, Y.; ADAMS, J. E.; LINCHITZ, R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. **Science**, 197, n. 4299, p. 183-186, 1977.

INSTITUTE OF MEDICINE COMMITTEE ON ADVANCING PAIN RESEARCH, C. A. E. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. *In: Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research*. Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences, 2011.

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.

JIANG, L.; JI, Y.; VOULALAS, P. J.; KEASER, M. *et al.* Motor cortex stimulation suppresses cortical responses to noxious hindpaw stimulation after spinal cord lesion in rats. **Brain Stimul.**, 7, n. 2, p. 182-189, 2014 Mar-Apr 2014.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, 29, p. 355-384, 2013.

KIM, J.; RYU, S. B.; LEE, S. E.; SHIN, J. *et al.* Motor cortex stimulation and neuropathic pain: how does motor cortex stimulation affect pain-signaling pathways? **Journal of Neurosurgery**, 124, n. 3, p. 866-876, 2016.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, 50, n. 3, p. 355-363, 1992.

KLUDING, P. M.; PASNOOR, M.; SINGH, R.; JERNIGAN, S. *et al.* The effect of exercise on neuropathic symptoms, nerve function, and cutaneous innervation in people with diabetic peripheral neuropathy. **Journal of diabetes and its complications**, 26, n. 5, p. 424-429, 2012.

KOLTZENBURG, M.; SCADDING, J. Neuropathic pain. **Current opinion in neurology**, 14, n. 5, p. 641-647, 2001.

KURODA, R.; KAWABATA, A.; KAWAO, N.; UMEDA, W. *et al.* Somatosensory cortex stimulation-evoked analgesia in rats: potentiation by NO synthase inhibition. **Life sciences**, 66, n. 20, p. PL271-PL276, 2000.

KWON, M.; ALTIN, M.; DUENAS, H.; ALEV, L. The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. **Pain Practice**, 14, n. 7, p. 656-667, 2014.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **The journal of pain**, 10, n. 9, p. 895-926, 2009.

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

LEMSTRA, M.; OLSZYNSKI, W. P. The effectiveness of multidisciplinary rehabilitation in the treatment of fibromyalgia: a randomized controlled trial. **The Clinical journal of pain**, 21, n. 2, p. 166-174, 2005.

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

LÓPEZ-ÁLVAREZ, V. M.; MODOL, L.; NAVARRO, X.; COBIANCHI, S. Early increasing-intensity treadmill exercise reduces neuropathic pain by preventing nociceptor collateral sprouting and disruption of chloride cotransporters' homeostasis after peripheral nerve injury. **Pain**, 156, n. 9, p. 1812-1825, 2015.

LOCKWOOD S., DICKENSON A.H. What goes up must come down: insights from studies on descending controls acting on spinal pain processing. *J Neural Transm (Vienna)*, 2019.

MARCHAND, S.; SARAVANE, D.; GAUMOND, I. **Mental health and pain: somatic and psychiatric components of pain in mental health**. Springer, 2014. 2817804147.

MARTINS, M. A.; CAROBREZ, A. P.; TONUSSI, C. R. Activation of dorsal periaqueductal gray by glycine produces long lasting hyponociception in rats without overt defensive behaviors. **Life sciences**, 83, n. 3-4, p. 118-121, 2008.

MAYER, M. L.; WESTBROOK, G. L. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. **Prog Neurobiol**, 28, n. 3, p. 197-276, 1987.

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 Motor

Cortex Stimulation Attenuates Cold Allodynia in a Chronic Peripheral Neuropathic Pain Condition in *Rattus norvegicus*. **WJNS**> Vol.9 No.3, August 2019.

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**. 2020 Feb;98(2):338-352. doi: 10.1002/jnr.24501. Epub 2019 Aug 8.

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**. 2019 Sep;44(9):2068-2080. doi: 10.1007/s11064-019-02843-z. Epub 2019 Jul 17

MELO-THOMAS, L.; THOMAS, U. Deep brain stimulation of the inferior colliculus: A possible animal model to study paradoxical kinesia observed in some parkinsonian patients? **Behavioural brain research**, 279, p. 1-8, 2015.

MERSKEY, H. E. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain**, 1986.

MILLAN M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**. 57:1-164, 1999.

MITCHELL, J. H. Cardiovascular control during exercise: central and reflex neural mechanisms. **The American journal of cardiology**, 55, n. 10, p. D34-D41, 1985.

MOLTENI, R.; ZHENG, J.-Q.; YING, Z.; GÓMEZ-PINILLA, F. *et al.* Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101, n. 22, p. 8473-8478, 2004.

MONSALVE, G. A. Motor cortex stimulation for facial chronic neuropathic pain: A review of the literature. **Surg Neurol Int**, 3, n. Suppl 4, p. S290-311, 2012.

NETO, F. L.; SCHADRACK, J.; PLATZER, S.; ZIEGLGANSBERGER, W. *et al.* Up-regulation of metabotropic glutamate receptor 3 mRNA expression in the cerebral cortex of monoarthritic rats. **J Neurosci Res**, 63, n. 4, p. 356-367, Feb 15 2001.

NEUGEBAUER, V. Glutamate receptor ligands. *In: Analgesia*: Springer, 2006. p. 217-249.

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

PAGANO, R. L.; ASSIS, D. V.; CLARA, J. A.; ALVES, A. S. *et al.* Transdural motor cortex stimulation reverses neuropathic pain in rats: a profile of neuronal activation. **European Journal of Pain**, 15, n. 3, p. 268-e261, 2011.

PAGANO, R. L.; FONOFF, E. T.; DALE, C. S.; BALLESTER, G. *et al.* Motor cortex stimulation inhibits thalamic sensory neurons and enhances activity of PAG neurons: possible pathways for antinociception. **PAIN®**, 153, n. 12, p. 2359-2369, 2012.

PAXINOS, G.; WATSON, C. A stereotaxic atlas of the rat brain. **New York: Academic**, 1998.

PAXINOS, G.; WATSON, C. R. R.; EMSON, P. C. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. **Journal of neuroscience methods**, 3, n. 2, p. 129-149, 1980.

PINHEIRO, P. S.; MULLE, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. **Nature Reviews Neuroscience**, 9, n. 6, p. 423, 2008.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, 463, n. 1-3, p. 3-33, Feb 28 2003.

PRYBYLOWSKI, K.; WENTHOLD, R. J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. **Journal of biological chemistry**, 279, n. 11, p. 9673-9676, 2004.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. *et al.* Neurociências, 4a. Edição. Editora Artmed. São Paulo, 2010.

QASEEM, A.; WILT, T. J.; MCLEAN, R. M.; FORCIEA, M. A. Noninvasive treatments for acute, subacute, and chronic low back pain: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. **Annals of internal medicine**, 166, n. 7, p. 514-530, 2017.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature medicine**, 16, n. 11, p. 1267, 2010.

RODRÍGUEZ-MUÑOZ, M.; SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P.; VICENTE-SÁNCHEZ, A.; BERROCOSO, E. *et al.* The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG

neurons: implications in pain control. **Neuropsychopharmacology**, 37, n. 2, p. 338-349, Jan 2012.

SELTZER, Z. E.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, 43, n. 2, p. 205-218, 1990.

SENAPATI, A. K.; HUNTINGTON, P. J.; LAGRAIZE, S. C.; WILSON, H. D. *et al.* Electrical stimulation of the primary somatosensory cortex inhibits spinal dorsal horn neuron activity. **Brain research**, 1057, n. 1-2, p. 134-140, 2005.

SENAPATI, A. K.; HUNTINGTON, P. J.; PENG, Y. B. Spinal dorsal horn neuron response to mechanical stimuli is decreased by electrical stimulation of the primary motor cortex. **Brain research**, 1036, n. 1-2, p. 173-179, 2005.

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

SOUSA, A. M.; LAGES, G. V.; PEREIRA, C. L.; SLULLITEL, A. Modelos experimentais para o estudo da dor neuropática. **Revista Dor**, 2016.

STEWART, W. F.; RICCI, J. A.; CHEE, E.; MORGANSTEIN, D. *et al.* Lost productive time and cost due to common pain conditions in the US workforce. **Jama**, 290, n. 18, p. 2443-2454, Nov 12 2003.

SUMIZONO, M.; SAKAKIMA, H.; OTSUKA, S.; TERASHI, T. *et al.* The effect of exercise frequency on neuropathic pain and pain-related cellular reactions in the spinal cord and midbrain in a rat sciatic nerve injury model. **J Pain Res**, 11, p. 281-291, 2018.

TRACEY I. Neuroimaging mechanisms in pain: from discovery to translation. **Pain**. Apr;158 Suppl 1: S115-S122. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000863. Review. 2017.

TREEDE, R. D.; JENSEN, T. S.; CAMPBELL, J. N.; CRUCCU, G. *et al.* Neuropathic pain redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, 70, n. 18, p. 1630-1635, 2008.

TSUBOKAWA, T.; KATAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T.; HIRAYAMA, T. *et al.* Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain. **Acta Neurochir Suppl (Wien)**, 52, p. 137-139, 1991a.

TSUBOKAWA, T.; KATAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T.; HIRAYAMA, T. *et al.* Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain. *In: Advances in Stereotactic and Functional Neurosurgery 9*: Springer, 1991b. p. 137-139.

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

VALLI, L. G. mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, 18, n. 1, 2014.

VOOGD, J.; PAXINOS, G. The rat nervous system. **Cerebellum 2nd ed ed. San Diego: Academic Press Inc**, p. 309-350, 1995.

VOS, T.; ABAJOBIR, A. A.; ABATE, K. H.; ABBAFATI, C. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for

195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, 390, n. 10100, p. 1211-1259, 2017.

WOOLF, C. J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, 152, n. 3 Suppl, p. S2-15, 10/18 2011.

YOON, H.; THAKUR, V.; ISHAM, D.; FAYAD, M. *et al.* Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats. **Experimental neurology**, 267, p. 107-114, 2015.

ZHUO, M. Cortical excitation and chronic pain. **Trends Neurosci**, 31, n. 4, p. 199-207, Apr 2008.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **PAIN**, 16, n. 2, 1983.

APÊNDICES

Manuscrito: Submetido para a Brain Research

The primary motor cortex electrical and chemical stimulation attenuates the chronic neuropathic pain by activation of the periaqueductal gray matter: The Role of NMDA receptors

Sylmara Esther Negrini-Ferrari^{1,2}; Priscila Medeiros^{1,2}; Rafael Braghetto Malvestio^{1,2};
Mariana de Oliveira Silva^{1,2}; Norberto Cysne Coimbra^{1,2,4}; Helio Rubens Machado^{1,5},
*Renato Leonardo de Freitas^{1,2,3,4}

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.

³Biomedical Sciences Institute, Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG), Str. Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, 37130-000, Minas Gerais, Brazil.

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

⁵Brain 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.

*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.
dfreitas.rl@gmail.com

ABSTRACT

The motor cortex stimulation (MCS) is useful as a non-pharmacological therapy for patients with chronic neuropathic pain (NP). The goal of this work is to investigate the neurochemical mechanisms recruited by MCS procedure. We investigated if either the electrical (e) or chemical (c) stimulation of the primary motor cortex (M_1) modulates the chronic NP in rats and whether the possible antinociception elicited by MCS recruits the N-methyl-D-aspartic acid receptor (NMDAr) located in the periaqueductal grey matter (PAG). Male Wistar rats were submitted to von Frey's test to evaluate the mechanical allodynia after 21 days of chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve. The eMCS was done in low-frequency (20 μ A, 100 Hz) during 15s by a deep brain stimulation (DBS) device. The effect of cMCS, though M_1 -treatment with a NMDAr agonist (at 2, 4 and 8nmol), was also investigated in CCI rats. The dorsomedial column of PAG (dmPAG) was pretreated with the NMDAr antagonist LY 235959 (at 8nmol), followed by eMCS. The eMCS decreased the mechanical allodynia in rats with chronic NP. The cMCS (by M_1 treatment with a NMDAr agonist at 2 and 8 nmol) also reduced the mechanical allodynia. The antinociception evoked by eMCS was attenuated LY 235959 at 8nmol microinjections in the dmPAG. The M_1 cortex NMDA glutamatergic system is involved in the modulation of chronic NP. The analgesic effect of MCS may depend on glutamate signalling by the NMDA receptors located in the PAG neurons.

Highlights

- ✓ The adapted CCI method by one loose ligature of the *ischadicus nervus* causes neuropathic pain;
- ✓ Mechanical allodynia was evaluated at 21 days of adapted CCI surgery;
- ✓ Primary motor cortex (M_1) stimulation attenuates the mechanical allodynia in CCI rats;
- ✓ M_1 -treatment with a NMDAr agonist also decreased the mechanical allodynia in CCI rats;
- ✓ Antinociceptive effect caused by M_1 -stimulation is depend on NMDAr activation in the dorsomedial PAG.

Keywords: Motor cortex stimulation; DBS approach; NMDA glutamatergic receptors; antinociception; periaqueductal gray matter; chronic neuropathic pain.

Abbreviations

CCI - Chronic constriction injury of the ischiadicus nervus
 CETEA- Committee for Ethics in Animal Experimentation
 cMCS – Chemical motor cortex stimulation
 cMCS – Chemical stimulation of the motor cortex
 COBEA - Brazilian College of Animal Experimentation
 DBS - Deep brain stimulation
 dm - Dorsal-medial column
 dmPAG - Dorsomedial column of Periaqueductal grey matter
 eMCSS – Electrical stimulation of the motor cortex
 IASP - International Association for the Study of Pain
 M₁ - Primary motor cortex
 MCS - Motor cortex stimulation
 NMDA - N-methyl-D-aspartate
 NP - Neuropathic pain
 PAG - Periaqueductal grey matter
 stimulation

Acknowledgments

This research was supported by *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP) (Multi-user Equipment grant 2014/11869-0), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) (Grants 483763/2010-1 and 474853/2013-6). None of these funding sources had a role in the study design; the collection, analysis, and interpretation of data; the writing of the report; or the decision to submit the paper for publication. Renato Leonardo de Freitas was supported by 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 CAPES (Sc.D. fellowship grant 001). FAPESP also supported Priscila de Medeiros (Sc.D. fellowship grant 2012/25167-2; post-doctoral fellowship grant 2017/13560-5). Norberto Cysne Coimbra is a researcher (level 1A) from CNPq (processes 301905/2010-0 and 301341/2015-0).

1 Introduction

Chronic pain is a public health problem. It is important to note that, in the case of the adult population (Reitsma et al., 2012; Velly and Mohit, 2018), chronic pain is often preceded by some additional pathology and there is evidence that neuropathic pain (NP) is present in these painful syndromes in 35% of neurological patients, increasing the costs of the treatment (Costigan et al., 2009; Posso et al., 2016). The pharmacological and pathophysiological mechanisms of pain are still not fully understood (Nickel et al., 2012). It is known that the interaction between opioid and N-methyl-D-aspartic acid receptor (NMDAr) play a role in the neurochemical mechanisms of the neurophatic pain, although much still needs to be studied (Rodríguez-Muñoz et al., 2012).

Pain can also be defined as acute when self-limited and caused by a specific disease or injury, or as chronic pain, considered a disease when it exceeds a normal cure time (Grichnik and Ferrante, 1991). Neuropathic pain affects 5% of the Brazilian population (de Souza et al., 2017) with limitation in the quality of life and reducing productivity (Navarro et al., 2012). Neuropathic pain is often severe, and it can afflict patients for their entire lifetime.

Electrical stimulation of different structures of the central nervous system has been shown to induce pain relief and is now considered to be a viable form of therapy for chronic deafferentation pain (Carrol et al., 2000; Lima and Fregni, 2008). Namba and Nishimoto demonstrated that the MCS of the cerebral cortex and the internal capsule inhibited deafferentation hyperactivity provoked by Gasserian ganglionectomy in felines (Namba and Nishimoto, 1988). The electrical stimulation of the motor cortex (eMCS) has been suggested as a non-pharmacological procedure for the treatment of patients with NP. For example, Tsubokawa et al. (1991) performed epidural motor cortex stimulation (MCS) as an alternative treatment of patients with central deafferentation pain (Tsubokawa et al., 1991).

The analgesic effect induced by eMCS is not yet deeply understood, but studies have shown that the electrical stimulation of the primary (M_1) motor cortex led to analgesia in 50% of patients with NP (Garcia-Larrea and Peyron, 2007). Although it is not known which mechanism led to the generation of MCS- produced analgesia, the

inhibition of the somatosensory cortex, ventral posterolateral/medial nuclei of the dorsal thalamus and the spinothalamic tracts through reciprocal pathways between the motor cortex and the sensory cortex (Tsubokawa et al., 1993) is a putative mechanism of the hypoalgesia caused by MCS. Many pieces of evidence have corroborated the pioneering results by Tsubokawa team (Garcia-Larrea and Peyron, 2007; Monsalve, 2012), although the neurophysiopathologic bases of that analgesic phenomenon were not well established yet.

As a matter of fact, MCS is a neuromodulatory therapy used for the treatment of NP and it has shown good efficacy in the treatment of patients suffering from a pain disorder (Garcia-Larrea and Peyron, 2007; Monsalve, 2012). Based on that evidence, we investigated in the present work the effect of MCS (M_1) in rats with chronic neuropathic pain aiming to clarify the role played by the glutamatergic system, the main cortical neurochemical efferent pathways, in the mechanical allodynia threshold modulation by M_1 -electrical or chemical stimulation of rats with chronic constriction injury (CCI) of the *ischiodic nerve* (sciatic nerve).

Interestingly, it was firstly demonstrated by Reynolds (1969) that the electrical stimulation of the periaqueductal grey matter (PAG) produces antinociception in rodents. In fact, according to Pagano and her colleagues (2012) the inhibition of ventral posterolateral and centromedian-parafascicular nuclei of the dorsal thalamus and disinhibition of the PAG neurons are at least in part responsible for the motor cortex stimulation-produced antinociception in rats submitted to acute pain induced by a paw pressure test. Concerning the endogenous pain modulatory system, the PAG is a midbrain area situated in an interface between cerebral structures and the spinal cord, responsible for the elaboration the antinociceptive/analgesic phenomena in both laboratory animals (Freitas et al., 2005; de Freitas et al., 2014, 2016) and in the human beings (Tracey et al., 2002). Indeed, the antinociception induced by PAG-activation can be mediated by the activation of pain modulatory descending pathways that inhibit the synaptic neurotransmission between the first and second neurons of the ascending pain sensory-discriminative pathways located in the dorsal horn of the spinal cord or in the trigeminal sensory spinal nucleus during nociceptive stimulation (Kwon et al., 2014).

In this sense, the study of the role played by eMCS (by deep brain stimulation procedure) and chemical (c)MCS (by NMDA α agonist microinjection) and the role of PAG in the modulation of the mechanical allodynia becomes interesting because there are no reports in the literature using MCS procedure for mechanical/hypernociception control in CCI rats. The present study addresses these issues studying the effects caused by both eMCS and cMCS focused on M₁ cerebral cortex in laboratory animals submitted to an experimental neuropathy procedure. We also studied the involvement of dorsomedial division of the PAG during the eMCS on chronic NP induced by CCI in Wistar rats.

1. Experimental Procedures

2.1 Animals

Male Wistar albino rats (*Rattus norvegicus*, Rodentia, Muridae) from the animal care facility of the University of São Paulo (USP) and Ribeirão Preto Campus weighing 100g in the first day of the experiments were used. Animals were housed in Plexiglas-walled cages in groups of four and were given free access to food and water throughout the investigation. The room temperature was controlled ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), and a light-dark cycle (lights on 07:00-19:00 h) was maintained. All protocols were in compliance with the recommendations of the Committee for Ethics in Animal Experimentation (CETEA) of the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP) (proc. 036/2017), which are in accordance with the Animal Research Ethics guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and with the International Association for the Study of Pain (IASP) guidelines for pain research using laboratory animals (Andersen et al., 2004; Zimmermann, 1983). The rodents were used only in a single experimental group, and all efforts were made to minimise discomfort for the animals.

2.2 Nociceptive test: mechanical allodynia

It was used the von Frey's test (Insight Equipment, Ribeirão Preto, SP, Brazil), for the evaluating of the nociceptive threshold to mechanical stimulus. This test consists of a set of nylon monofilaments with several thicknesses that exerted different grades of

strength when applied over the paw's surface plant. Allowing then, evaluate the amount of strength needed to evoke the withdraw of the paw behaviour (Chaplan et al., 1994). The animals were individually put in acrylic boxes, measuring 23x20x18 cm, arranged on one table with steel grids floor not malleable with 5 mm² of space between the mesh. Through the floor's mesh, was applied the mechanical stimulation with the tip of each rod in the centre of the plantar surface of the hind paws of the rat, until the animal exhibited the simulated paw withdrawal response. This procedure was realised even on the lesioned paw of animals CCI or sham (right) how in the left paw of all animals.

2.3 Surgery for chronic constriction injury (CCI) of the ischiadicus nervus procedure

The model used to induce experimental neuropathy was an adaptation of Bennett and Xie NPP model (1988). The aim of the CCI procedure was a lesion of the sciatic nerve by CCI. Although the NPP model proposed by Bennett and Xie consists of placing four loose ligatures around the *ischiadicus nervus* (sciatic nerve), we placed only one loose ligature around the right sciatic nerve using chromic catgut sutures (Medeiros et al., 2019a). Our goal was to damage only one branch of the sciatic nerve by inducing swelling and then strangulation. Initially, the animals were anaesthetised through intramuscular administration of a solution consisting of 0.1 ml of ketamine at 92 mg/kg (Ketamine Agener, União Química Farmacêutica Nacional, Taboão da Serra, São Paulo, Brazil; 0.2 mL of 10% solution) and 0.2 ml of xylazine at 9.2 mg/kg (Dopaser, Hertape/Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brazil). The right hind paw was shaved, and the skin was disinfected with Poly(vinylpyrrolidone)-Iodine (Sigma/Aldrich; São Cristóvão, Rio de Janeiro, Brazil). Subsequently, a 15-mm longitudinal incision was made in the dorsolateral region of the thigh, at the level of the femur trochanter, on the right posterior limb. The sciatic nerve was exposed through dissection of the gluteus maximus muscle and biceps femoris, and a single ligature of 4-0 catgut thread was placed around the nerve, in contrast to the procedure described by Bennett & Xie (1988). Finally, the skin incision was sutured with 5-0 mononylon thread.

2.4 Stereotaxic surgery

Fourteen days after either the sham procedure or the CCI surgery for chronic neuropathy induction, the animals were anaesthetised and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, California, USA). A stainless steel guide cannula (outer diameter 0.6 mm, inner diameter 0.4 mm) was unilaterally introduced in the primary motor cortex region (M_1), using the following coordinates bregma as a reference: anteroposterior = -1.1mm; mediolateral= +1.5; and dorsoventral = -1.5mm; or electrode coordinate concerning electrode was: anteroposterior = -1.1mm; mediolateral= +1.5 and dorsoventral = -2.5mm. Additionally, another experimental group, it was unilaterally introduced the guide cannula into dorsal column (dm) of the periaqueductal grey matter (PAG), using the following coordinates bregma as a reference: anteroposterior = -7.64mm; mediolateral= +0.2mm and dorsoventral = -3.5mm; in this experimental group, an electrode was implanted into the M_1 . Once deployed, the guide cannula or the electrode into the M_1 , was fixed of a self-polymerisable acrylic prosthesis which, in turn, will be anchored by two stainless steel screws 13mm.

2.5 Chemical stimulation of primary (M_1) motor cortex (cMCS)

After 21 days after CCI and 7 days of stereotaxic surgery held to microinjection of 200nl of either sterile saline (0.9% NaCl), or NMDA (at 2, 4 and 8 nmol) into the M_1 region. The mechanical allodynia threshold was performed 5 min after drug administrations and until 60 minutes. Concerning the procedure of drug microinjection, a Mizzi-type needle, connected to a 10 μ L syringe (Hamilton, Reno, Nevada, USA) was introduced into the cannula guide and overcoming its end in 1 mm. A polyethene catheter was connected to the needle for microinjection procedure monitoring, which was made by a drug infusion pump (Stoelting).

2.6 Electrical stimulation of primary (M_1) motor cortex (eMCS)

Three weeks after the CCI or Sham surgeries and one week after stereotaxic surgery, there was performed the baseline 2 of von Frey test in the animals; after, the animals were placed in a circular arena (60 cm in diameter and 50 cm high with the floor divided into 12 sections) with the experimental compartment illuminated with a

40-W fluorescent lamp (350 lx at the arena floor level). The animals were allowed a 3 min period of habituation. Afterwards, the electrode implanted in the midbrain was connected to a stimulus generator (STG3008-FA, Multichannel Systems, Germany) which allowed to apply current pulses (cathode pulse width 100 μ s, pulse interval 100 μ s and anode pulse width 100 μ s, repeated during 15 s). M_1 stimulation was made during 15 seconds in 20 μ A, immediately followed by von Frey test for 30 min. Each animal was used only once and received only one eMCS.

2.7 Blockade of NMDA receptors into dmPAG followed by eMCS

Another experimental group, the PAG-pretreatment was made, and after 5 minutes, the eMCS. It was evaluated the effect of dmPAG-treatment with NMDA receptor antagonist LY235959 (at 0.25, 2 and 8 nmol) followed by eMCS (20 μ A/15s) and the mechanical allodynia was measured for 30 minutes. The experimental procedures can be visualized in Figure 1.

2.8 Perfusion and Histology

Upon completion of the experiments, the animals were anaesthetised with ketamine (92 mg/kg) and xylazine (9.2 mg/kg), transcardially perfused with ice-cold phosphate buffer saline (PBS), and 4% paraformaldehyde (PFA, pH 7.3) through the left cardiac ventricle using a perfusion pump (Master Flex® L/S™ peristaltic tubing pump, East Bunker Court Vernon Hills, Illinois, USA). After fixation, the brains were sectioned, and the forebrains were rinsed in 10% and 20% sucrose dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 4°C for at least 12 h per solution. Tissue pieces were diving in 2-methylbutane (Sigma), frozen on dry ice (during 30 min), embedded in Tissue-Tek O.C.T., and cut on a cryostat (HM 505 E, Microm, Zeiss, Oberkochen, Germany). Subsequently, the slices were mounted on glass slides coated with chrome alum gelatin to prevent detachment and were stained with haematoxylin-eosin in order to localise the positions of the microinjections according to Paxinos and Watson's atlas (2007) under light microscopy (AxioObserver motorised photomicroscope, Carl Zeiss Strasse, Oberkochen, Germany). Data from rats with needle or electrode tips located outside the M_1 were not included in the statistical analysis.

2.9 Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Data regarding the cold allodynia threshold were subjected to a two-way repeated measures analysis of variance (split-plot ANOVA), followed, when appropriate, by Bonferroni's post hoc test. The procedures (electrical or chemical stimulation of M_1) were considered the independent factor, and the time was considered the dependent factor. Repeated measures ANOVA uses the same conceptual framework as classical ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

3 Results

3.1 Histology

Histologically confirmed sites of eMCS (stimulation and non-stimulation) or cMCS [physiological saline (NaCl 0.9%) and NMDA microinjections] into the M_1 in CCI or sham rats are shown in Figure 2A and 2B, respectively. Histologically confirmed sites of eMCS in the M_1 and dmPAG-pretreatment of LY235959 at 0.25, 2 and 8 nmol in CCI or sham rats are shown in Figure 2C. Representative photomicrographs of transverse sections of the frontal lobe at the level of the motor cortex, indicating a drug microinjection site in the M_1 , are shown in Figure 2D.

3.2 The primary motor cortex (M_1) electrical stimulation (eMCS) attenuates the neuropathic pain (NP)

We performed the eMCS aiming to investigate the motor cortex involvement in NP, followed by evaluating the mechanical allodynia threshold in the CCI rats with chronic NP.

According to repeated measures two-way ANOVA, there was significant effects of the treatment ($F_{(12,80)} = 5.494$ $p < 0.0001$, ANOVA), of time ($F_{(4,80)} = 11.28$ $p < 0.0001$, ANOVA), and of treatment-by-time interaction ($F_{(3,20)} = 14.17$ $p < 0.001$, ANOVA). M_1 -stimulation caused a decrease in chronic NP, recorded in the mechanical allodynia test performed on the right paw of the animal, localised ipsilaterally to the CCI side (Bonferroni's post hoc test; $P < 0.001$), and the mechanical allodynia in CCI

rats was significantly higher in comparison to sham rats. Besides that, the eMCS at 20 μ A for 15 seconds in animals with NP decreased mechanical allodynia immediately after 10-min electrical stimulation of M₁ neocortex. Data shown in figure 3A.

Concerning the left hind paw, according to repeated measures tow-way ANOVA, there was significant effect of treatment ($F_{(12, 80)} = 4.161$ $p < 0.0001$, ANOVA), of time ($F_{(4, 80)} = 6.082$ $p < 0.001$, ANOVA), but not of treatment-by-time interaction ($F_{(3, 20)} = 0.6503$ $p > 0.05$, ANOVA). Despite a significant difference between groups in the second baseline, regarding the left limb paw of the animals, located contralaterally to the CCI side, there was no significant differences concerning the non-stimulated group (MCS 0 μ A/15s) in comparison to sham rats (Bonferroni's post hoc test; $p > 0.05$). Moreover, the MCS at at 20 μ A/15s did not cause mechanical allodynia in the CCI rats in comparison to sham rats ($P > 0.05$), considering the left hind paw, contralaterally situated in relation to the CCI procedure. Data hown in 3B.

3.3 The primary motor cortex (M₁) chemical stimulation (cMCS) attenuates the neuropathic pain (NP)

The involvement of the glutamatergic neurotransmission in the primary motor cortex and the role played by cerebral NMDAr in the modulation the NP, the NMDAr agonist was microinjected in the M₁ at 2, 4 and 8nmol, and it was evaluated the mechanical allodynia 21 days after CCI.

According to repeated measures two-way ANOVA, there was significant effects of treatment ($F_{(18,168)} = 1.872$ $p < 0.05$, ANOVA), of time ($F_{(6,168)} = 33.10$ $p < 0.0001$, ANOVA), and of treatment-by-time interaction ($F_{(3,28)} = 6.499$ $p < 0.01$, ANOVA). The cMCS of the M₁ through intracerebral microinjections of an NMDAr agonisst decreased the chronic NP as recorded by mechanical allodynia test performed in the right hind paw of CCI rats. There was an increase of mechanical allodynia in CCI rat treated in the the M₁ with NMDA at the highest dose (8 nmol) 15 and 30 minutes after the cortical activation (Bonferroni's post hoc test; $p < 0.05$). The lower dose of NMDA (2nmol) also decreased ($P < 0.05$) the mechanical allodynia at all times measured, for 60 minutes, as shown in figure 4A.

Considering the left hind paw, according to repeated measures two-way ANOVA, there was not significant effect of treatment ($F_{(18,168)} = 0.8499$; $p > 0.05$, ANOVA), nor of time ($F_{(6,168)} = 1.108$; $p > 0.05$, ANOVA), but there was significant effect of treatment-by-time interaction ($F_{(3,28)} = 3.793$; $p < 0.01$, ANOVA). M_1 -treatment with NMDA did not change the response to mechanical stimuli recorded by von Frey test in comparison to the control group (Bonferroni's post hoc test; $P > 0.05$) (Figure 4B).

3.4 Effect of NMDAR blockade in dmPAG on eMCS-induced antinociception

To evaluate the pharmacological mechanism of the antinociception induced by eMCS, it was performed the blockade of NMDAR located into the dorsomedial column of periaqueductal grey matter (dmPAG), through LY235959 (at 0.25, 4 and 8nmol) microinjection in the dmPAG followed by the eMCS (M_1 stimulation at $20\mu\text{A}/15\text{s}$) 21 days after CCI.

Considering the right hind paw of CCI rats, according to repeated measures two-way ANOVA, there were significant effects of treatment ($F_{(20,120)} = 3.737$; $p < 0.001$, ANOVA), of time ($F_{(4,120)} = 35.04$; $p < 0.001$, ANOVA), of treatment-by-time interaction ($F_{(5,30)} = 8.572$; $p < 0.001$, ANOVA). The mechanical allodynia increased in CCI rats in comparison with sham rats (Bonferroni's post hoc test; $P < 0.01$) and the electrical stimulation of M_1 cortex significantly decreased the allodynia (Bonferroni's post hoc test; $P < 0.05$). There was an eMCS-produced anti-allodynic effect after the dmPAG pretreatment with a NMDAR antagonist in chronic NP rats. The NMDAR blockade in the dmPAG with the higher dose of LY235959 (8nmol) decreased the eMCS-induced antinociception (M_1 -stimulation at $20\mu\text{A}/15\text{s}$) in animals submitted to 21 days of CCI (Bonferroni's post hoc test; $P < 0.05$). Data shown in Figure 5A.

Considering the left hind paw, according to the repeated measures two-way ANOVA, there were not significant effects of treatment ($F_{(20,120)} = 3.114$; $p > 0.05$, ANOVA) and of treatment-by-time interaction ($F_{(82,16)} = 3.28$; $p > 0.05$, ANOVA), but there was a significant effect of time ($F_{(4,120)} = 8.091$; $p < 0.001$, ANOVA). There was not significant differences in mechanical allodynia evaluated in the left hind paw of CCI rats not stimulated in the M_1 cortex ($0\mu\text{A}/15\text{s}$) in comparison to sham rats

(Bonferroni's post hoc test; $P > 0.05$). In addition, eMCS at 20 μ A/15s-treated group was not significantly different considering CCI- and sham procedure-treated groups when the vo Frey test was applied to the left hind paw (Bonferroni's post hoc test; $P > 0.05$). Data shown in Figure 5 B.

4 Discussion

In the present study, it was demonstrated that the electrical (eMCS) and chemical (cMCS) stimulation on the primary (M_1) motor cortex decreased the mechanical allodynia in chronic NP after 21 days of CCI procedure in rodents. The dmPAG pretreatment with a NMDAR selective antagonist attenuated the eMCS-induced antinociception. These findings suggest that the antinociceptive effect produced by eMCS involves NMDAR-signalled glutamate-dependent neural networks in the dmPAG of CCI animals.

The eMCS is now widely used in the treatment of refractory chronic pain, but little known about the analgesic mechanisms resulting from this stimulation. In fact, there is evidence showing that M_1 electrical stimulation induces antinociception in rats (Ciampi de Andrade et al., 2014; Garcia-Larrea and Peyron, 2007; Honey et al., 2016; Jiang et al., 2014) and our findings are the first evidence of glutamatergic modulation of MCS-induced antinociception in dorsal midbrain. The PAG is a mesencephalic structure situated in the descending endogenous pain modulatory system. Other studies suggest that MCS produces a robust and selective antinociceptive effect, which is mediated, at least in part, by the activation of descendent inhibitory pain pathway (França et al., 2013).

The eMCS is a non-destructive, adjustable and reversible therapeutic technique that is efficient in the treatment of patients who present chronic syndromes of central or peripheral NP refractory to other types of treatment, such as central post-stroke pain, including thalamic pain, facial neuropathy, and even pain caused by spinal and brachial plexus injuries (Fagundes-Pereyra et al., 2010; Monsalve, 2012; Woolf, 2011). In another study, we performed the chemical stimulation of M_1 (cMCS) to evaluate the pharmacological mechanism into the motor cortex in the elaboration of antinociception. The microinjection of the N-methyl-D-Aspartate receptor agonist NMDA into the M_1

cortex decreased the mechanical allodynia in animals with chronic NP after 21 days of CCI (referências!). Then, the activation of NMDA glutamatergic receptors into the M₁ is involved in the elaboration of antinociception organized by the motor cortex neural substrates.

Glutamate is considered as one of the main excitatory neurotransmitters of the central nervous system, and is directly related to neural plasticity in neurological diseases and psychiatric disorders, such as epilepsy, chronic pain, anxiety, depression and others (Galer et al., 2000; Maletic and Raison, 2009; Rosenberg and Watson, 2015). In fact, our study showed that NMDAr of the motor cortex are critical to eMCS-produced antinociception organisation, once the M₁ cortex treatment with NMDA agonist also caused anti-allodynic effect on rats with chronic NP.

The antinociceptive effect induced by glutamatergic stimulation of the motor cortex by microinjections of an NMDAr agonist into the M₁, can be explained by calcium channel opening by NMDAr activation in the postsynaptic neurons located in the M₁, thus, considering that Ca⁺⁺ channel open by a large period of time, the antinociceptive effect caused by motor cortex activation can be at least partially explaining by this neurochemical mechanism (Valli, 2014), although M₁ fugal connexions recruiting the endogenous pain modulatory descending system must be investigated, and the dmPAG is a strong candidate for that interface. NMDA receptors are abundant in both archeocortex, neocortex and in the dorsal midbrain (Greenamyre et al., 1985; Maragos et al., 1988; Perouansky and Grantyn, 1989) , and it is known that the microinjection of the excitatory amino acid analogue, N-methyl-D-aspartate in the PAG causes significant antinociception (Jacquet, 1988). Moreover, the involvement of NMDA receptors in the spinal and supraspinal levels, and the signalling of nociception control has been widely evidenced (Jacquet, 19; Fundytus, 2001; Neugebauer, 2006).

The dmPAG-pretreatment with LY235959, an NMDA receptors selective antagonist, blocked the antinociception effect induced by eMCS in CCI rats. We demonstrated that the analgesic effect caused by eMCS is at least in part due to the recruitment of that important structure of inhibitory pain descendent system, the dmPAG.

In fact, the PAG is known to be involved in the elaboration of several types of analgesia (Coimbra et al., 1992, 2006; de Freitas et al., 2014, 2016). Some studies have shown intense antinociception induced by morphine administrations in the PAG of rabbits (Tsou and Jang, 1964) while another study has produced a sustained analgesic effect by electrical stimulation of PAG in rodents (Reynolds, 1969). Even in humans, the PAG can be a critical structure to control of nociceptive perception through the descending activity of cortical structures (Tracey et al., 2002).

In summary, the M₁ electrical or chemical (by NMDA activation) stimulation caused antiallodynic effect in CCI rats. The possible antinociceptive effect of MCS may depend on the recruitment of NMDA receptors in the motor cortex. In addition, we demonstrated that eMCS-produced antinociception also depends on NMDAR of dmPAG neurons. Taking together, these findings add to our yet limited knowledge of the neuroanatomical networks and neurochemical bases of MCS-produced antinociception. Further investigation of the neural connections involved in this antiallodynic phenomenon will contribute for the improvement of the clinical treatment of chronic pain and neuropathy with cortical and deep brain stimulation.

References

Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik S, Guimarães MA, et al. (2004) Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: Departamento de Psicobiologia. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo.

Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.

Ciampi de Andrade D, Mhalla A, Adam F, Teixeira MJ, Bouhassira D (2014) Repetitive transcranial magnetic stimulation induced analgesia depends on N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Pain* 155:598-605.

Costigan M, Scholz J, Woolf CJ (2009) Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 32:1-32.

Carrol D, Joint C, Maartens N, Shlugman D, Stein J, Aziz TZ (2000) Motor cortex stimulation for chronic neuropathic pain: a preliminary study of 10 cases. *Pain* 84:431-437.

Coimbra NC, De Oliveira R, Freitas RL, Ribeiro SJ, Borelli KG, Pacagnella RC, Moreira JE, da Silva LA, et al. (2006) Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. *Exp Neurol* 197:93-112.

de Freitas RL, de Oliveira RC, de Oliveira R, Paschoalin-Maurin T, de Aguiar Corrêa FM, Coimbra NC (2014) The role of dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal gray matter and in situ 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonergic receptors in post-ictal antinociception. *Synapse* 68:16-30.

de Freitas RL, Medeiros P, Khan AU, Coimbra NC (2016) μ 1 -Opioid receptors in the dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal grey matter are critical for the enhancement of post-ictal antinociception. *Synapse* 70:519-530.

de Souza JB, Grossmann E, Perissinotti DMN, de Oliveira Junior JO, da Fonseca PRB, Posso IDP (2017) Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception, and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey. *Pain Res Manag* 4643830.

Fagundes-Pereyra WJ, Teixeira MJ, Reyns N, Touzet G, Dantas S, Laureau E, Blond S (2010) Motor cortex electric stimulation for the treatment of neuropathic pain. *Arqu Neuropsiquiatr* 68:923-929.

França NR, Toniolo EF, Franciosi AC, Alves AS, de Andrade DC, Fonoff ET, Britto

LR, Dale CS (2013) Antinociception induced by motor cortex stimulation: somatotopy of behavioral response and profile of neuronal activation. *Behav Brain Res* 250:211-221.

Freitas RL, Ferreira CM, Ribeiro SJ, Carvalho AD, Elias-Filho DH, Garcia-Cairasco N, Coimbra NC (2005) 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. *Exp Neurol* 191:225-242.

Fundytus ME (2001) Glutamate receptors and nociception. *CNS drugs* 15:29-58.

Galer BS, Gianas A, Jensen MP (2000) Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes Res Clin Pract* 47:123-128.

Garcia-Larrea L, Peyron R (2007) Motor cortex stimulation for neuropathic pain: From phenomenology to mechanisms. *Neuroimage* 37 Suppl 1:S71-79.

Greenamyre JT, Olson JM, Penney JB Jr, Young AB. Autoradiographic characterization of N-methyl-D-aspartate-, quisqualate- and kainate-sensitive glutamate binding sites. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985;233(1):254-63.

Grichnik KP, Ferrante FM (1991) The difference between acute and chronic pain. *Mt Sinai J Med* 58:217-220.

Honey CM, Tronnier VM, Honey CR (2016) Deep brain stimulation versus motor cortex stimulation for neuropathic pain: A minireview of the literature and proposal for future research. *Comput Struct Biotechnol J* 14:234-237.

Jacquet YF. The NMDA receptor: central role in pain inhibition in rat periaqueductal gray. *Eur J Pharmacol.* 1988;154(3):271-6.

Jiang L, Ji Y, Voulalas PJ, Keaser M, Xu S, Gullapalli RP, Greenspan J, Masri R (2014) Motor cortex stimulation suppresses cortical responses to noxious hindpaw stimulation after spinal cord lesion in rats. *Brain Stimul* 7:182-189.

Kwon M, Altin M, Duenas H, Alev L (2014) The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. *Pain Practice* 14:656-667.

Lima MC, Fregni F (2008) Motor cortex stimulation for chronic pain: systematic review and meta-analysis of the literature. *Neurology* 70:2329-2337.

Maletic V, Raison CL (2009) Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:5291-5338.

Maragos WF, Penney JB, Young AB. Anatomic correlation of NMDA and 3H-TCP-labeled receptors in rat brain. *J Neurosci.* 1988;8(2):493-501.

Mayer ML, Westbrook GL (1987) The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28:197-276.

Medeiros P, de Freitas RL, Boccella S, Iannotta M, Belardo C, Mazzitelli M, Romano R, De Gregorio D, Coimbra NC, 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.* 2019a. doi: 10.1002/jnr.24501.

Medeiros, P, Negrini-Ferrari, SE, Medeiros, AC, Ferreira, LL, da Silva, J.R.T., da Silva, JA, Coimbra, NC, de Freitas, RL (2019b) The primary motor cortex stimulation attenuates cold allodynia in a chronic peripheral neuropathic pain condition in *Rattus norvegicus*. *World J Neurosci* 9: 138-152.

Monsalve GA (2012) Motor cortex stimulation for facial chronic neuropathic pain: A review of the literature. *Surg Neurol Int* 3:S290-311.

Namba S, Nishimoto A (1988) Stimulation of internal capsule, thalamic sensory nucleus (VPM) and cerebral cortex inhibited deafferentation hyperactivity provoked after Gasserian ganglionectomy in cat. *Acta Neurochir* 42 (Suppl):S243-S247.

Navarro A, Saldaña MT, Pérez C, Masramón X, Rejas J (2012) Costs Health Resources Utilization Following Switching to Pregabalin in Individuals with Gabapentin-Refractory Neuropathic Pain: A post hoc Analysis. *Pain Pract* 12:382-393.

Neugebauer V (2006) Glutamate receptor ligands. In: *Analgesia*, vol., pp. 217-249. Springer.

Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihöfner C (2012) Mechanisms of neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacol* 22:81-91.

Pagano RL, Fonoff ET, Dale CS, Ballester G, Teixeira MJ, Britto LRG (2012) Motor cortex stimulation inhibits thalamic sensory neurons and enhances activity of PAG neurons: possible pathways for antinociception. *Pain* 153:2359-2369.

Paxinos, G., Watson, C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, 6.

Perouansky M, Grantyn R. Separation of quisqualate- and kainate-selective glutamate receptors in cultured neurons from the rat superior colliculus. *J Neurosci*. 1989;9(1):70-80.

Posso IdP, Palmeira CCdA, Vieira ÉBdM (2016) Epidemiology of neuropathic pain. *Revista Dor* 17:11-14.

Reitsma M, Tranmer JE, Buchanan DM, VanDenKerkhof EG (2012) The epidemiology of chronic pain in Canadian men and women between 1994 and 2007: longitudinal results of the National Population Health Survey. *Pain Res Manag* 17:166-172.

Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Vicente-Sánchez A, Berrocoso E, Garzón J (2012) The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control. *Neuropsychopharmacology* 37:338-349.

Rosenberg CJ, Watson JC (2015) Treatment of painful diabetic peripheral neuropathy. *Prosthet Orthot Int* 39:17-28.

Tracey I, Ploghaus A, Gati JS, Clare S, Smith S, Menon RS, Matthews PM (2002) Imaging attentional modulation of pain in the periaqueductal gray in humans. *J Neurosci* 22:2748-2752.

Tsou K, Jang CS (1964) Studies on the site of analgesic action of morphine by intracerebral micro-injection. *Sci sin* 13:1099-1109.

Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, Hirayama T, Koyama S (1991) Chronic motor cortex stimulation of the treatment of central pain. *Acta Neurochir* 52:137-139.

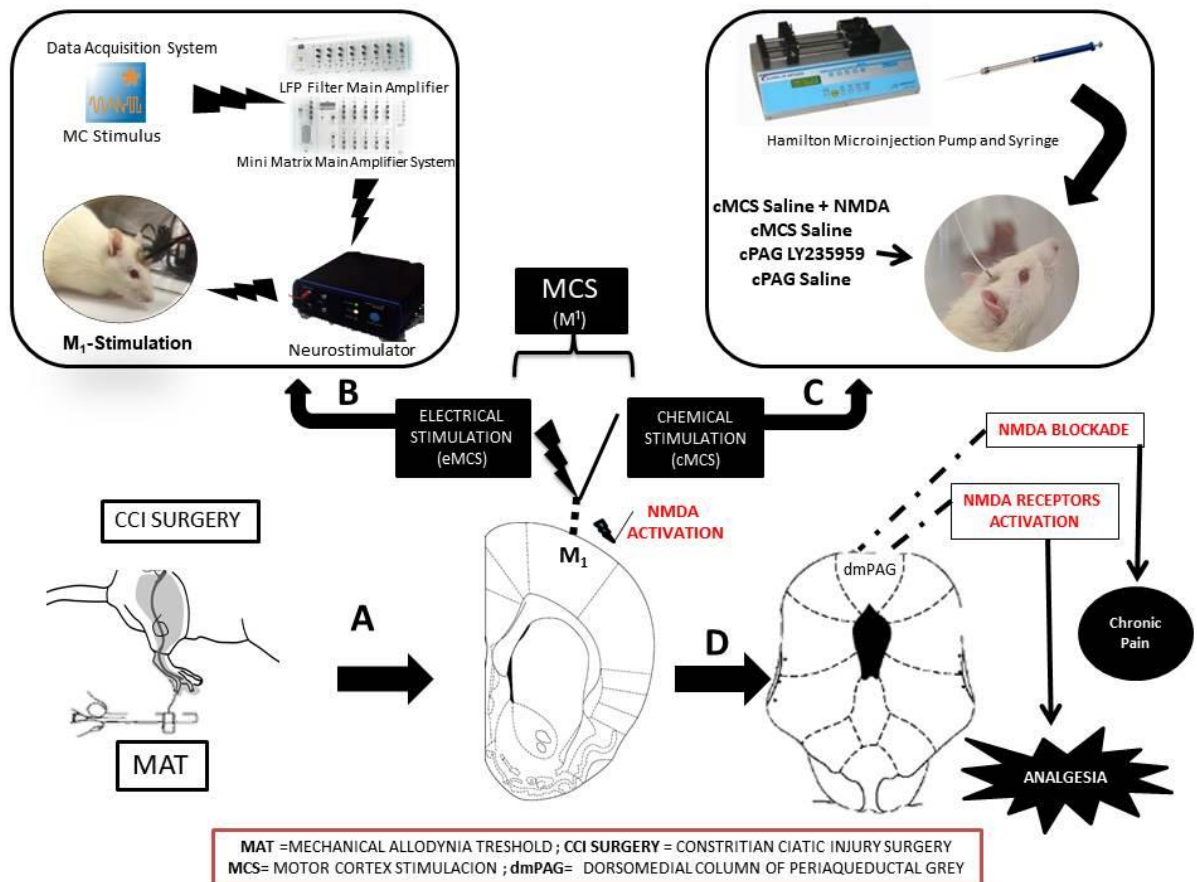
Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, Hirayama T, Koyama S (1993) Chronic motor cortex stimulation in patients with thalamic pain. *J Neurosurg* 78:393-401.

Valli LG (2014) Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. *Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria* 18.

Velly AM, Mohit S (2018) Epidemiology of pain and relation to psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 87:159-167.

Wolf CJ (2011) Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 152:S2-15.

Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16.



ANEXOS

Anexo 1

Artigo publicado: Neurochemical Research.

Neurochemical Research

N-methyl-D-aspartate receptors in the prelimbic cortex are critical for the maintenance of neuropathic pain

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	NERE-D-18-00550R2
Full Title:	N-methyl-D-aspartate receptors in the prelimbic cortex are critical for the maintenance of neuropathic pain
Article Type:	Original
Keywords:	sciatic nerve chronic constriction injury; neuropathic pain; prelimbic cortex; medial prefrontal cortex; cobalt chloride; NMDA glutamatergic receptor
Corresponding Author:	Norberto Cysne Coimbra, M.D., M.Sc., Sc.D. Ribeirão Preto Medical School of the University of são Paulo Ribeirão Preto, São Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Ribeirão Preto Medical School of the University of são Paulo
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Priscila Medeiros, M.Sc., Sc.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Priscila Medeiros, M.Sc., Sc.D.
	Sylmara Esther Negrini-Ferrari, Ms.
	Enza Palazzo, Ph.D.
	Sabatino Maione, Ph.D.
	Sérgio Henrique Ferreira, M.D., M.Sc., Sc.D.
	Norberto Cysne Coimbra, M.D., M.Sc., Sc.D.
	Renato Leonardo de Freitas, M.Sc., Sc.D.

Anexo 2

Artigo publicado: World Journal of Neuroscience



World Journal of Neuroscience, 2019, 9, 138-152
<http://www.scirp.org/journal/wjns>
 ISSN Online: 2162-2019
 ISSN Print: 2162-2000

The Primary Motor Cortex Stimulation Attenuates Cold Allodynia in a Chronic Peripheral Neuropathic Pain Condition in *Rattus norvegicus*

Priscila Medeiros^{1,2*}, Sylmara Esther Negrini-Ferrari^{1*}, Ana Carolina Medeiros^{1,2*},
 Lais Leite Ferreira^{3,4,5}, Josie Resende Torres da Silva^{4,5}, José Aparecido da Silva^{6,7},
 Norberto Cysne Coimbra^{2,8}, Renato Leonardo de Freitas^{1,2,3,5,9*}

¹Neurosciences laboratory of Pain & Emotions and Multi-User Centre of Neuroelectrophysiology, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, 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), Ribeirão Preto (SP), Brazil
³Biomedical Sciences Institute, Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG), Alfenas, Minas Gerais (MG), Brazil
⁴Motricity Sciences Institute, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil
⁵Post-Graduate Program of Biosciences Applied to Health (PPGB), UNIFAL, Biomedical Sciences Institute, Alfenas, MG, Brazil
⁶Department of Psychology, Ribeirão Preto School of Philosophy, Sciences and Literature of the University of São Paulo (FCLRP-USP), Ribeirão Preto, Brazil
⁷Department of Psychology, Federal University of Juiz de Fora (UFJF-MG), Juiz de Fora (MG), Brazil
⁸Behavioural Neurosciences Institute (INeC), Ribeirão Preto (SP), Brazil
 Email: *defreitas.rl@gmail.com

How to cite this paper: Medeiros, P., Negrini-Ferrari, S.E., Medeiros, A.C., Ferreira, L.L., da Silva, J.R.T., da Silva, J.A., Coimbra, N.C. and de Freitas, R.L. (2019) The Primary Motor Cortex Stimulation Attenuates Cold Allodynia in a Chronic Peripheral Neuropathic Pain Condition in *Rattus norvegicus*. *World Journal of Neuroscience*, 9, 138-152.
<https://doi.org/10.4236/wjns.2019.93009>

Received: April 12, 2019
 Accepted: July 29, 2019
 Published: August 1, 2019

Copyright © 2019 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc.
 This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Abstract

Background: The primary motor cortex (M₁) stimulation (MCS) is a useful tool for attenuation of the peripheral neuropathic pain in patients with pharmacologically refractory pain. Furthermore, that neurological procedure may also cause antinociception in rodents with neuropathic pain. Cold allodynia is a frequent clinical finding in patients with neuropathic pain, then, we evaluated if an adapted model of neuropathy induced by chronic constriction injury (CCI) of the *ischialikus nervus* (sciatic nerve) produces cold allodynia in an animal model of chronic pain. In addition, we also investigated the effect of the electrical stimulation of the M₁ on chronic neuropathic pain condition in laboratory animals. **Methods:** Male Wistar rats were used. An adapted model of peripheral mononeuropathy induced by CCI was carried out by placing a single loose ligature around the right sciatic nerve. The acetone test was used to evaluate the cold allodynia in CCI or Sham (without ligature) rats. The MCS (M₁) was performed at low-frequency (20 μ A, 100 Hz) during

*These authors equally contributed to this work.

Anexo 3

Artigo Publicado: Journal of Neuroscience Research



Cannabidiol in the prelimbic cortex modulates the comorbid conditions of chronic neuropathic pain-induced depressive-like behaviour in rats

Journal:	<i>Journal of Neuroscience Research</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Malvestio, Rafael; Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Surgery and Anatomy Medeiros, Priscila; Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Pharmacology Negrini-Ferrari, Sylmara; Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Surgery and Anatomy Oliveira-Silva, Mariana; Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Surgery and Anatomy Medeiros, Ana; Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Surgery and Anatomy Padovan, Cláudia; School of Philosophy, Science and Literature of Ribeirão Preto of the University of São Paulo, Department of Psychology Luongo, Livio; Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Department of Experimental Medicine, Division of Pharmacology Maione, Sabatino; Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Department of Experimental Medicine, Division of Pharmacology Coimbra, Norberto; Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Pharmacology de Freltas, Renato Leonardo; Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Surgery and Anatomy; Federal University of Alfenas (UNIFAL-MG), Biomedical Sciences Institute
Topic Terms:	disorder psychiatric, perception, sensory pain, synaptic transmission
Topic Terms (free text entry):	Cobalt chloride, cannabidiol, depression-associated behaviours, forced swim test, medial prefrontal cortex, prelimbic cortex, chronic neuropathic pain, mechanical allodynia, von Frey test

