

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ELIZAMARA SANTOS GONÇALVES

**ENVOLVIMENTO DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL,
MEDULA ESPINAL E CÉLULAS DA GLIA NA ANALGESIA INDUZIDA POR
ESTIMULAÇÃO INSULAR EM RATOS COM NEUROPATIA PERIFÉRICA
EXPERIMENTAL**

São Paulo

2020

ELIZAMARA SANTOS GONÇALVES

**ENVOLVIMENTO DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL,
MEDULA ESPINAL E CÉLULAS DA GLIA NA ANALGESIA INDUZIDA POR
ESTIMULAÇÃO INSULAR EM RATOS COM NEUROPATIA PERIFÉRICA
EXPERIMENTAL**

Versão Original

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia Morfofuncional

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

São Paulo
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elizamara Santos Gonçalves

Título da Dissertação:

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a) Camila Squarzoni Dale

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, de
Mestrado realizada em / / , considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Santos Gonçalves, Elizamara
ENVOLVIMENTO DA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL, MEDULA ESPINAL E CÉLULAS DA GLIA NA
ANALGESIA INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO INSULAR EM RATOS
COM NEUROPATIA PERIFÉRICA EXPERIMENTAL / Elizamara
Santos Gonçalves; orientadora Camila Squarzoni Dale.
-- São Paulo, 2021.
80 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Dor Neuropática. 2. glia na dor. 3. cortex
insular. 4. estimulação elétrica. 5. PAG. I.
Squarzoni Dale, Camila, orientador. II. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Envolvimento da substância cinzenta periqueductal, medula espinal e células da glia na analgesia induzida por estimulação elétrica do córtex insular de ratos com neuropatia periférica experimental", protocolada sob o CEUA nº 5874130618, sob a responsabilidade de **Camila Squarzoni Dale e equipe; Elizamara Santos Gonçalves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 17/08/2018.

We certify that the proposal "Involvement of periqueductal gray matter, spinal cord and glial cells in analgesia induced by electrical stimulation of the insular cortex of rats with experimental peripheral neuropathy", utilizing 128 Heterogenics rats (128 males), protocol number CEUA 5874130618, under the responsibility of **Camila Squarzoni Dale and team; Elizamara Santos Gonçalves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 08/17/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **24 meses**

Depto/Setor: **Anatomia**

Origem: **Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **280 a 340 g**

Linhagem: **Sprague Dowley**

N amostral: 128

São Paulo, 10 de novembro de 2020



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Camila Squarzoni Dale
Área: Anatomia

Título da proposta: "Envolvimento da substância cinzenta periquedutal, medula espinal e células da glia na analgesia induzida por estimulação elétrica do córtex insular de ratos com neuropatia periférica experimental□".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 001150)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 29/outubro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram cumpridos? Sim 2. Todas as amostras obtidas foram utilizadas? Em caso negativo, informe quais amostras permanecem armazenadas. Sim. 3. O estudo, ou parte dele, já foi apresentado em congresso, publicado na forma de monografia, dissertação, tese e/ou periódico científico ou gerou alguma patente? Se afirmativo, anexar cópia da primeira página das publicações ou número de patentes derivadas do projeto aprovado pela CEUA. Sim. 1) VIII Congresso Intrdisciplinar de dor da USP- CINDOR, realizado em julho de 2018(Certificado anexo); 2)IX Simposio da Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais- USP, realizado em outubro de 2018 (certificado em anexo); 4) XLII Reunião Anual da SBNeC, realizado em outubro de 2019 (certificado em anexo); 5) I Simposio da Pós-Graduação em Biologia de Sistemas-USP, realizado em outubro de 2019 (certificado em anexo). 4. Ocorreram problemas relativos ao uso de animais durante a execução do projeto? Em caso afirmativo, descreva o acontecimento e informe quais as providências tomadas para evitar que haja reincidência do problema. Não, não ocorreram problemas. 5. Algum aluno declarou escusa de consciência à experimentação animal, como previsto no artigo 39 da Lei Estadual nº 11.977/2005, durante a vigência do projeto? Em caso afirmativo, anexar documentação comprobatória do pedido e a atividade alternativa. Não, nenhum aluno declarou escusa de consciência 6. O estudo envolve organismos geneticamente modificados? Anexar documentação comprobatória da extensão do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) para atividades de pesquisa em regime de contenção com OGM da classe de risco indicada na proposta, caso a documentação não tenha sido anexada na proposta original. Não. 7. Cite as principais conclusões obtidas com o projeto, destacando sua contribuição para a saúde, bem-estar humano/animal, melhoria da qualidade de vida ou melhoria do meio ambiente (máximo de 100 palavras). A EECI de animais com neuropatia periférica em diferentes frequências de EECI 10, 60, 80 e 100Hz são capazes de alterar os limiares mecânicos e térmicos de animais com CCI. Ainda, pode-se concluir que a EECI não gerou efeitos adversos sobre a atividade locomotora e alterou a ativação de astrócitos na Medula espinal de ratos com CCI, alterando também a ativação de micróglia na PAG neste mesmo modelo. Esses dados reforçam a aplicabilidade da EECI como potencial tratamento para dor neuropática."

Comentário da CEUA: "".



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dedico este trabalho a Prof. Dra. Camila Squarzoni Dale, minha orientadora de mestrado e também grande amiga. Obrigada, Camis, pela paciência e por ensinar-me, não apenas as ciências, mas também a superação diante de cada dificuldade, sempre de cabeça erguida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois a fé é a ponte que nos leva a todas as nossas conquistas.

Agradeço a minha mãe, Maria de Fátima, mulher guerreira, que com toda sua simplicidade e humildade é meu maior exemplo de luta, superação e amor. A senhora é um ser de luz. Obrigada mãe, por todas as vezes que a senhora me disse “ *se te faz feliz, vai atrás*”, eu continuo indo!

Ao meu querido pai Misael (*in memorian*), que apesar da distância devido as circunstâncias da vida, sempre que tinha oportunidade nunca deixou de dizer “ *filha, o pai tem orgulho de você*”, “*Menina inteligente, puxou o pai*”. Guardo no meu coração só o que foi bom, a infância embalada ao som do seu violão, cada palavra, a lembrança de seu olhar terno em nossos últimos encontros. Obrigada pai, espero que ai de cima esteja orgulhoso de mim. Saudade eterna!

Agradeço minhas irmãs, Priscila, Patrícia e Helem por dividirem comigo todos os momentos da vida. As memórias de infância, ainda sinto o cheiro da terra molhada da fazenda, o gosto da manga no pé e a doçura da cana de açúcar, só tenho lindas lembranças. Obrigada por serem quem são, mulheres incríveis! Obrigada por torcerem por mim sempre e por me darem sobrinhas maravilhosas que enchem nossa vida de alegria, Greici, Emely, Bia, Dri, Manu e Isa. Amo vocês!

Ao meu irmão Jeferson (*In memorian*), que foi embora cedo demais e deixou saudades. Deixou saudade do seu sorriso, da sua alegria, saudades de receber suas mensagens que sempre começavam dizendo “*Ola irmãzinha linda*”. Acredito que esteja junto com pai e acredito que um dia estaremos todos juntos novamente. Deus cuide de você ai em cima! Saudade eterna!

Ao meu irmão Juninho, que me tirou o trono de filha caçula! Nossa convivência é muito pequena, mas o laço de sangue que nos une é muito forte e cada dia te vejo mais parecido comigo! Você é um garoto muito bacana e a mana sempre estará aqui para o que precisar!

Agradeço infinitamente meu marido, companheiro e amigo Ricardo, por ser meu maior incentivador, por estar ao meu lado me apoiando em todos os momentos. Agradeço a Deus todos os dias pela família que formamos e pela felicidade que é dividir a vida com você. Sem você eu não teria chegado nem na metade do caminho. Te amo, te amo!

À minha amada filha, Rafaela, gratidão por existir, por ser tão maravilhosa. Minha grande companheira, a luz da minha vida que faz tudo valer à pena. Não tenho palavras para descrever o quão importante você é e o quanto me encoraja todos os dias a levantar e buscar ser uma pessoa melhor.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas, todos os funcionários professores e amigos da pós-graduação e do Instituto de Ciências Biomédicas.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa de Mestrado, e que me possibilitou vivenciar esta experiência como uma oportunidade enriquecedora.

Agradeço as minhas irmãs de coração Vick, Inaeh e Helo, por simplesmente serem quem são. Não tenho adjetivos para expressar o quanto vocês são importantes na minha vida. Obrigada por serem presentes, obrigada por serem um presente!

Agradeço a meus amigos do Laboratório de Neuromodulação da Dor, Victória, Heloísa, Inaeh, João, Victhor, Elaine, Bia, Giancarlo, Elia, pela ajuda, parceria, companheirismo, discussões e amizade, que permite que a convivência no laboratório além da pós-graduação seja especial.

Agradeço à minha orientadora, Professora Camila Squarzoni Dale, pelas oportunidades, lições e aprendizados que me fizeram crescer, me orientando tanto dentro quanto fora do laboratório.

Aos demais que não estão nomeados, amigos e minha família, que fazem parte desta jornada e permitiram que cada dia fosse especial.

Muito Obrigada!

“Não importa o que aconteça, continue a nadar”
(Procurando Nemo; Walters Graham)

RESUMO

GONÇALVES, E.S. **Envolvimento da substância cinzenta periaquedutal, medula espinal e células da glia na analgesia induzida por estimulação insular em ratos com neuropatia periférica experimental.** 2020. PGS 90 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas- Área de Concentração: Biologia Morfofuncional) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Diferentes modalidades terapêuticas ainda falham no tratamento da dor em pacientes com neuropatias, sendo que metade dos pacientes permanecem refratários, independentemente do tipo de tratamento utilizado. Assim, alternativas terapêuticas como a estimulação elétrica encefálica, que tem mostrado grande potencial no tratamento de diferentes doenças, deve ter seu estudo aprofundado e aprimorado. Neste sentido, o modelo experimental de Estimulação Elétrica do Córtex Insular (EECI), desenvolvido por nosso grupo, apresentou resultados promissores no que se refere à reversão de dor em ratos com neuropatia periférica dolorosa, reforçando o potencial da neuroestimulação insular como alternativa terapêutica. No entanto, para que sua aplicabilidade clínica seja confirmada, ainda se faz necessário compreender os mecanismos pelos quais a EECI induz analgesia, bem quais os melhores parâmetros capazes de induzir este efeito. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes frequências de EECI na sensibilidade dolorosa mecânica e térmica e na atividade locomotora de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo isquiático (CCI). Ainda, o efeito da EECI sobre a ativação de astrócitos e microglia na substância cinzenta periaquedutal (PAG) e medula espinal, também foi avaliado. Para tanto, ratos Sprague Dawley machos (CEUA 5874130618), com constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na coxa direita foram submetidos a EECI no córtex insular posterior esquerdo (uma estimulação diária, por 5 dias consecutivos; 15 min por sessão, a 10, 60, 80 ou 100 Hz, 210 μ s, 1V), sendo avaliados no modelo de pressão de patas, filamentos de von Frey, placa quente e no teste de campo aberto. A ativação de astrócitos e microglia foi avaliada por imuno-histoquímica para GFAP e IBA. Os resultados aqui obtidos demonstram que as diferentes frequências de EECI (10, 60, 80 e 100Hz) foram capazes de alterar a sensibilidade mecânica e térmica de animais com CCI, sendo que a EECI a 60Hz se mostrou mais eficaz em induzir analgesia em animais com dor neuropática quando comparada as outras frequências. Nenhuma das frequências avaliadas interferiu na atividade locomotora geral dos animais. A EECI 60Hz ainda inibiu a ativação da

imunomarcção para astrócitos e micróglia na PAG e ativou a imunomarcção de astrócitos na medula espinal, não sendo capaz de alterar a imunomarcção de microglia na medula espinal. Os dados em conjunto demonstram que a EECI inibe dor neuropática em modelo experimental, sendo essa resposta acompanhada por inibição da ativação glial na PAG e medula espinal. Esses dados reforçam o potencial terapêutico da EECI no tratamento de pacientes com dor neuropática refratários a terapias convencionais.

Palavras-chave: Dor neuropática. Antinocicepção. Córtex insular. Glia. PAG. Estimulação. Neuroestimulação.

ABSTRACT

GONÇALVES, E.S. **Envolvimento da substância cinzenta periaquedutal, medula espinal e células da glia na analgesia induzida por estimulação insular em ratos com neuropatia periférica experimental.** 2020. PGS 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas- Área de Concentração: Biologia Morfofuncional) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Different therapeutic modalities still fail to treat pain in patients with neuropathies, with half of the patients remaining refractory, regardless of the type of treatment used. Thus, therapeutic alternatives such as electrical brain stimulation, which has shown great potential in treating different diseases, must be further studied. In this context, the Electrical Stimulation of the Insular Cortex (ESI) model developed by our group, presented promising results regarding the reversal of pain in rats with painful peripheral neuropathy, reinforcing the potential of ESI as a therapeutic alternative. However, for its clinical applicability to be confirmed, it is still necessary to understand the mechanisms by which ESI induces analgesia, as well as the best parameters capable of inducing this effect. In this context, this study aimed to evaluate the effect of different frequencies of ESI on the painful mechanical and thermal sensitivity and general locomotor activity of rats submitted to a model of neuropathic pain induced by chronic sciatic nerve constriction (ICC). Also, the effect of ESI on the activation of microglia and astrocytes in the periaqueductal gray matter (PAG) and spinal cord, was also evaluated. For that, male Sprague Dawley rats (CEUA 5874130618), submitted to chronic constriction injury (CCI) in the right thigh, they underwent EECI in the left posterior insular cortex (a daily stimulation for 5 consecutive days; 15 min per session, at 10, 60, 80 or 100 Hz, 210 μ s, 1V), being evaluated in the paw pressure model, von Frey filaments, hot plate and in the open field test. The activation of astrocytes and microglia was assessed by immunohistochemistry for GFAP and IBA. The results obtained here demonstrate that the different frequencies of EECI (10, 60, 80 and 100Hz) were able to alter the mechanical and thermal sensitivity of animals with ICC, with EECI at 60Hz being more effective in inducing analgesia in animals with neuropathic pain when compared to other frequencies. None of the evaluated frequencies interfered with the animals' general locomotor activity. EECI 60Hz also inhibited the activation of immunomarking for astrocytes and microglia in PAG and activated the immunostaining of astrocytes in the spinal cord, not being able to alter the immunomarking of microglia in the spinal cord. The combined data demonstrate that EECI inhibits neuropathic pain in an experimental model, and this

response is accompanied by inhibition of glial activation in PAG and spinal cord. These data reinforce the therapeutic potential of EECI in the treatment of patients with neuropathic pain refractory to conventional therapies.

Keywords: Pain. Neuropathic pain. Antinociception. Insular cortex. Glia. Stimulation. PAG. Neurostimulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Protocolo.....	31
Figura 2- Analgesímetro Randall-Selito.....	32
Figura 3- Imagem ilustrativa da aplicação do teste de von Frey.....	33
Figura 4- Placa quente.....	34
Figura 5- Arena do Campo Aberto.....	35
Figura 6- Cirurgia de Contrição Crônica do Nervo Isquiático.....	36
Figura 7- Implante de eletrodo concêntrico no córtex insular.....	38
Figura 8- Efeito de cinco sessões de EECI em diferentes frequências, sobre a sensibilidade dolorosa mecânica de ratos avaliados no modelo de pressão de pata.....	42
Figura 9- Efeito de cinco sessões de diferentes frequências EECI sobre a alodínia mecânica de ratos com CCI avaliados por filamentos de von Frey.....	44
Figura 10- Efeito de cinco sessões de diferentes frequências EECI sobre a sensibilidade dolorosa térmica.....	46
Figura 11- Efeito de cinco sessões de diferentes frequências EECI sobre a atividade locomotora de ratos com CCI.....	47
Figura 12- Representação de imuno-histoquímica para GFAP da PAG.....	49
Figura 13- Efeito de cinco sessões de EECI sobre a imunomarcção de GFAP na PAG.....	50
Figura 14- Representação de imuno-histoquímica para IBA da PAG.....	52
Figura 15- Efeito de cinco sessões de EECI sobre a imunomarcção de IBA na PAG.	53

Figura 16- Representação de imuno-histoquímica para GFAP na Medula.....	55
Figura 17- Efeito de cinco sessões de EECI sobre a imunomarcção de GFAP na Medula.....	56
Figura 18- Representação de imuno-histoquímica para IBA na Medula.....	58
Figura 19- Efeito de cinco sessões de EECI sobre a imunomarcção de IBA na Medula.....	59

LISTA DE SÍMBOLOS

%- porcentagem

°C- graus Celsius

α - Alpha

β - Beta

δ - Delta

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC- córtex do cíngulo anterior

ANOVA- Análise de Variância

ATP- adenosina trifosfato

CB1- Canabinóide tipo 1

CCI- *Chronic Constriction Injury* (constrição crônica do nervo isquiático)

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CGRP- Peptídeo Relacionado com o Gene da Calcitonina

cm- centímetro

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPME- Coluna Posterior da Medula Espinal

CPME_d- Coluna Posterior da Medula Espinal direita

CPME_e- Coluna Posterior da Medula Espinal esquerda

dlPAG- PAG dorsolateral

dmPAG- PAG dorsomedial

e.p.m- erro padrão da média

ECM- Estimulação do Córtex Motor

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

EECI- Estimulação Elétrica do Córtex Insular

EMT- Estimulação Magnética Transcraniana

ESI- *electrical stimulation of the insular cortex*

GFAP- *Glial Fibrillary Acidic Protein*

HIV- *Human Immunodeficiency Virus* (vírus da imunodeficiência humana)

Hz- hertz

IA- Ínsula Agranular

ICB- Instituto de Ciências Biomédicas

ID- Ínsula Disgranular

IG- Ínsula Granular

IPAG- PAG lateral

LTP- *long-term potentiation* (potenciação de longo prazo)

MCC- córtex do cíngulo medial

mL- mililitro

mm- milímetro

n- número de animais

NMDA- N-metil D-Aspartato

NO- Óxido Nítrico

PAG- Substância Cinzenta Periaquedutal

PB- Tampão fosfato

PFA- Paraformaldeído

RVM- Rostral Ventromedial Medulla (bulbo rostral ventromedial)

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervo Periférico

SP- Substância P

ug- micrograma

ul- microlitro

us- microssegundos

USP- Universidade de São Paulo

V- Voltagem

vIPAG- PAG ventrolateral

VPL- ventral póstero-lateral

VPM- ventral póstero-medial

vs- versus

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
1.1 DOR E O PROCESSO NOCICEPTIVO	22
1.2 SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL E A VIA DESCENDENTE INIBITÓRIA DE DOR	23
1.3 DOR NEUROPÁTICA E CÉLULAS DA GLIA	25
1.4 CÓRTEX INSULAR	27
1.5 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA ENCEFÁLICA.....	28
2. HIPÓTESE.....	30
3. OBJETIVO GERAL	30
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	30
5.2 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS	32
5.3 TESTE DE PRESSÃO DE PATA	32
5.4 TESTE DE SENSIBILIDADE MECÂNICA POR FILAMENTOS DE VON FREY	33
5.5 TESTE DE PLACA QUENTE.....	34
5.6 TESTE DE CAMPO ABERTO	35
5.7 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA: LESÃO POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO ISQUIÁTICO (CCI).....	35
5.8 IMPLANTE DO ELETRODO CONCÊNTRICO	36
5.9 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO CÓRTEX INSULAR (EECI)	39
5.10 COLETA DE AMOSTRAS.....	39
5.11 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA GFAP E IBA.....	39
5.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS.....	40
6. RESULTADOS	41
6.1 EFEITO DE CINCO SESSÕES DE DIFERENTES FREQUÊNCIAS DE EECI (10, 60, 80 E 100Hz) SOBRE A SENSIBILIDADE DOLOROSA MECÂNICA AVALIADA PELO TESTE DE PRESSÃO DE PATA EM RATOS COM CCI.....	41
6.2 EFEITO DE CINCO SESSÕES DE DIFERENTES FREQUÊNCIAS DE EECI (10, 60, 80 E 100Hz) SOBRE A ALODÍNEA MECÂNICA AVALIADA POR FILAMENTOS DE VON FREY EM RATOS COM CCI	43

6.3 EFEITO DE CINCO SESSÕES DE DIFERENTES FREQUÊNCIAS DE EECI (10, 60, 80 E 100HZ) SOBRE A SENSIBILIDADE DOLOROSA TÉRMICA AVALIADA NO TESTE DE PLACA QUENTE EM RATOS COM CCI.	45
6.4 EFEITO DE CINCO SESSÕES DE DIFERENTES FREQUÊNCIAS DE EECI (10, 60, 80 E 100HZ) SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA AVALIADA NO TESTE DE CAMPO ABERTO EM RATOS COM CCI.	47
6.5 EFEITO DE CINCO SESSÕES DE EECI A 60HZ SOBRE A IMUNOMARCAÇÃO DE ASTRÓCITOS NA PAG DE RATOS COM CCI.....	48
6.6 EFEITO DE CINCO SESSÕES DE EECI A 60HZ SOBRE A IMUNOMARCAÇÃO DE MICROGLIA NA PAG DE RATOS COM CCI.....	51
6.7 EFEITO DE CINCO SESSÕES DE EECI A 60HZ SOBRE A IMUNOMARCAÇÃO DE ASTRÓCITOS NA MEDULA ESPINAL DE RATOS COM CCI.....	54
6.8 EFEITO DE CINCO SESSÕES DE EECI A 60HZ SOBRE A IMUNOMARCAÇÃO DE MICROGLIA NA MEDULA ESPINAL DE RATOS COM CCI.....	57
7. DISCUSSÃO.....	60
8. CONCLUSÕES.....	66
APÊNDICES*.....	67
APÊNDICE A.....	67
REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor e o processo nociceptivo

A mais recente definição de dor publicada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, (IASP), descreve a dor como “Uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (RAJA, SRINIVASA N. et al, 2020, De Santana et al., 2020). Dor advém subjetivamente da nocicepção, sendo postulado que a nocicepção refere-se a manifestação neurofisiológica gerada por estímulos nocivos, enquanto que a dor envolve também a percepção subjetiva do estímulo aversivo (MILLAN, 1999; SCHAIBLE; RICHTER, 2004), e pode ser dividida em categorias distintas, assim compreendidas: fisiológica ou nociceptiva; inflamatória e patológica, na qual se insere a dor neuropática.

A dor fisiológica tem função de alerta, fornecendo informações sobre ocorrência ou perigo de lesões, é um sinal característico dos mecanismos de proteção do organismo contra danos teciduais (RAJA ET al., 1999). A dor inflamatória é gerada pela estimulação inespecífica da inervação sensitiva e pela ação de mediadores químicos liberados durante um processo inflamatório. A dor neuropática apresenta características crônicas, principalmente devido à existência de plasticidade neuronal no processo de percepção de dor, caracterizado como sensibilização periférica e central, sendo resultante de lesões no sistema nervoso periférico (SNP), medula espinal e/ou encéfalo, que geram alodínia (dor em resposta a estímulos não lesivos), dor espontânea e hiperalgesia (dor exacerbada em resposta a estímulos lesivos) (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Na nocicepção há codificação dos estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos para impulsos elétricos no sistema nervoso pelos nociceptores, as terminações nervosas livres especializadas de fibras aferentes primárias do tipo fibras C, amielínicas, e fibras A δ , mielinizadas, de alto limiar de ativação, que atingem principalmente as lâminas I e II da coluna posterior da medula espinal (CPME) (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; KUNER, FLOR, 2016), fazendo sinapses com neurônios de projeção que levam a informação para centros superiores do sistema nervoso central (JESSEL; KELLY, 1991; KUNER, FLOR, 2016). O trato espinotalâmico é uma das principais projeções supraespinhais para condução da informação nociceptiva (JESSEL; KELLY, 1991). Em

núcleos específicos do tálamo, tais como, núcleo ventral póstero-lateral (VPL) e ventral póstero-medial (VPM) se relaciona o componente discriminativo da dor, já os componentes afetivos da dor, estão relacionados ao núcleo lateral central e complexo intralaminar, onde ocorre a recepção, integração e transferência da informação nociceptiva para regiões do córtex encefálico como córtex sensitivo primário e secundário, córtex do cíngulo anterior, córtex parietal posterior e córtex insular posterior, de forma que a informação é somatotopicamente organizada e ocorre percepção, discriminação e consciência da dor (CRAIG; DOSTROVSKY, 1999).

O processamento e a percepção da dor fisiológica e patológica podem ser regulados em diferentes áreas da via nociceptiva, pela ação de diversos neurotransmissores e neuropeptídios (KUNER, FLOR, 2018). De acordo com a Teoria de Comporta de Melzack e Wall, acerca da regulação da informação nociceptiva na medula espinal, interneurônios inibitórios nas lâminas I e II da CPME, quando ativados por fibras A β , geram inibição pré-sináptica em neurônios presentes na medula espinal, regulando os potenciais de ação nociceptivos que ascendem pelo trato espinotalâmico (MELZACK; WALL, 1965; BEAR, 2008).

A modulação da transmissão nociceptiva envolve importantes estruturas corticais, evidenciando circuitos inibitórios descendentes que se originam de áreas como tálamo, córtex do cíngulo anterior (ACC) e PAG, RVM, seguindo para medula espinal para induzir analgesia, inclusive nos casos de dor crônica (RAINOV et al., 1997; GARCIA-LARREA et al., 1999; NGUYEN et al. 2000; SENAPATI et al., 2005a; SENAPATI et al., 2005b; FAGUNDES- PEREYRA et al., 2010; OSSIPOV et al., 2010; QUINTERO, 2013; WANG et al., 2011; NAMKUNG et al., 2017).

1.2 Substância cinzenta periaquedutal e a via descendente inibitória de dor

A PAG é uma região do mesencéfalo que circunda o aqueduto cerebral. Sua porção rostral da região ventromedial do bulbo (RVM) localiza-se juntamente com a comissura posterior e sua região caudal está situada ao nível do núcleo tegumentar dorsal (BEHBEHANI, 1995; FAULL, OLIVIA K. et al, 2019). A conexão entre a PAG e RVM desempenha um papel fundamental no sistema descendente inibitório de dor endógeno (BASBAUM AND FIELDS, 1978; FIELDS E BASBAUM, 1978; SHAIKLE, 2004; COULOMBE et al., 2016), sendo um sistema crítico para modulação da transmissão

nociceptiva na medula espinal que envolve principalmente opióides e canabinóides endógenos, serotonina e noradrenalina (OSSIPOV et al., 2010).

Sua localização estratégica permite modular entradas nociceptivas e percepção da dor através de suas interações e projeções ascendentes e decedentes uma vez que recebe aferências de diferentes origens, tais como tálamo, córtex frontal, córtex insular, amígdala, locus coeruleus e formação reticular, (BASBAUM, 1991) projetando-se para o RVM e CPME (SANDKUHLER, 1996, KIM, JONG-HYUN et al. 2018; LIU, JIAO et al, 2019), sugerindo que o estado de atenção e expectativas e contexto emocional podem alterar as interações entre essas estruturas modulatórias da experiência dolorosa facilitando ou inibindo a dor (DE FELICE, OSSIPOV, 2016).

Embora a modulação descendente inibitória de dor tenha sido definida mais claramente que outras respostas comportamentais, a PAG está envolvida em uma série de funções primitivas que desempenham defesa homeostática da resposta do indivíduo, integrando informações periféricas e centrais, sendo essas funções segregadas dentro da PAG como por exemplo, ansiedade e dor (WALL and MELZACK, 1999; PAXINOS E MAI, 2004; MENDES GOMES et. al, 2011).

Com base no entendimento de suas subdivisões anatômicas a PAG é organizada em quatro colunas longitudinais paralelas ao aqueduto (CARRIVE, 1993; FAULL, OLIVIA K. et al, 2019). As quatro colunas são denominadas dorsomedial (dmPAG), dorsolateral (dlPAG), lateral (lPAG) e ventrolateral (vlPAG). Todos, exceto a dlPAG, se projetam diretamente para o tronco encefálico inferior. Aferências do córtex pré-frontal medial projetam-se para dlPAG, córtex dorsomedial e córtex do cíngulo, principalmente para a vlPAG (CLAS LINNMAN et al 2012).

Muitos estudos com animais evidenciam que essas conexões fazem com que a PAG esteja de fato envolvida em várias funções neurobiológicas como controle da ansiedade, medo, vocalização, lordose, função cardiovascular, comportamento reprodutivo e modulação da dor (BEHBEHANI, 1995).

A lPAG coordena ativamente analgesia não opióide, comportamentos defensivos e tem efeito hipertensivo. Já a vlPAG coordena analgesia opióide, comportamento defensivo passivo e tem efeito hipotensor. A estimulação da dlPAG de ratos evoca estratégias de enfretamento, como comportamento de luta e fuga, taquicardia, analgesia não mediada por opióides e hipertensão. Por outro lado, a estimulação da vlPAG evoca

comportamento de enfrentamento passivo como hipotensão, quiescência, bradicardia e analgesia mediada por opióides (BANDLER et al. 2000; BEHBEHANI 1995).

Embora a modulação descendente inibitória de dor tenha sido definida mais claramente que outras respostas comportamentais, todas essas funções primitivas desempenham defesa homeostática da resposta do indivíduo, integrando informações periféricas e centrais, sendo essas funções segregadas dentro da PAG como por exemplo, ansiedade e dor (WALL and MELZACK, 1999; PAXINOS E MAI, 2004; MENDES GOMES et. al, 2011).

1.3 Dor Neuropática e células da glia

A dor neuropática é desenvolvida pela “lesão primária ou doença do sistema nervoso somatossensorial”, onde a dor perde seu caráter fisiológico, adquirindo características crônicas (IASP, 1986; BACKONJA, 2003; KUNER FLOR, 2018), e pode decorrer de traumas mecânicos, síndromes metabólicas como diabetes, ou mesmo de doenças infecciosas, bacterianas e pelo vírus HIV, sendo o desenvolvimento da neuropatia periférica crônica influenciado por polimorfismos genéticos, gênero, idade ou infecções (COSTIGAN et al., 2009; YAN et al., 2017).

A lesão persistente modifica estruturalmente o sistema nervoso (COSTIGAN et al., 2009), induzindo sensibilização periférica e central (DWORKIN et al., 2003), possibilitando o aumento ou diminuição da facilitação e inibição da transmissão sináptica, potenciais ectópicos e reestruturação da circuitaria sináptica (COSTIGAN et al., 2009). A sensibilização periférica ocorre em virtude de processo inflamatório intenso que ocorre após estímulo nociceptivo intenso ou repetitivo e leva a uma redução do limiar de ativação dos nociceptores e aumento da resposta a estímulos nocivos. A sensibilização central ocorre em resposta a inflamação periférica e envolve o aumento da função neuronal individual (celular) e dos circuitos nociceptivos (multicelulares, neuronais e gliais) causados por aumento da excitabilidade da membrana, eficácia sináptica e também pela diminuição da inibição do sistema nervoso somatossensorial e plasticidade (WOOLF 1983; WALL and MELZACK’S, 2013; ASHMAWI, HAZEM ADEL et al., 2016) alterando a percepção da dor, resultando em fenótipos complexos de neuropatia que irão se manifestar pela ocorrência de dor espontânea, alodínia e hiperalgesia (COSTIGAN ET AL., 2009; YAN et al., 2017; ALVES, LIN, 2018), característicos da dor neuropática.

Essas mudanças incluem a ativação de células gliais endógenas do SNC, como microglia (STREIT ET AL., 1999; HANISCH E KETTENMANN, 2007; GRAEBER E STREIT, 2010) e astrócitos (RIDET et al., 1997; PEKNY E NILSSON, 2005 ; SOFRONIEW E VINTERS, 2010; ANDERSON et al., 2014; PEKNY E PEKNA, 2014). As células gliais ativadas facilitam a neurotransmissão da dor e induzem a sensibilização central dos neurônios espinhais localizados na CPME devido a liberação de gliotransmissores e controle sináptico. Embora se evidencie que os neurônios são essenciais para as funções do sistema nervoso, reconhece-se que as células gliais são componentes de sinalização dinâmica com potencial para modular a ação neuronal (GOSSELIN et al., 2010; HAYDON, 2001; VALLEJO et al., 2010; WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001).

Vários mecanismos pelos quais as células gliais são ativadas têm sido sugeridos, incluindo-se mediadores químicos, tais como, substância P (SP), peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), óxido nítrico (NO), agentes purinérgicos (ATP-adenosina trifosfato), glutamato e peptídeos endógenos opióides, que são liberados no momento da lesão e estão presentes em casos de dor neuropática (HAYDON, 2001; GOSSELIN et al., 2010; YOON et al., 2012).

Astrócitos são as células mais presentes no sistema nervoso e sabe-se que tem papel importante na formação de sinapses, regulação e homeostase das células neuronais e assim como células microgliais, são ativados frente diferentes estímulos, inclusive em casos de dor crônica (REN, 2010; ETO et al., 2017), conferindo alterações celulares, morfológicas e de metabolismo dos astrócitos na via nociceptiva, que pode decorrer de sinais neuronais mediados por neurotransmissores e neuropeptídios, tais como glutamato e SP, sendo essa ativação necessária para indução e manutenção da dor crônica (WIESELER-FRANK et al., 2004; GOSSELIN et al., 2010).

Estudos em modelos animais de constrição crônica do nervo isquiático já identificaram a ativação de astrócitos na CPME (GARRISON et al., 1994; REN, 2010) sendo essa ativação relacionada à patogênese da alodínea mecânica associada a dor neuropática (KIM et al., 2016).

Estima-se que as dores com características neuropáticas afetem cerca de 7 à 10% população mundial (VAN HECKE et al., 2014), número que chama a atenção, principalmente frente à ineficácia de grande parte dos tratamentos para este tipo de dor, incluindo analgésicos, opióides, antidepressivos, anticonvulsivantes, antagonistas de

receptores NMDA e anti-inflamatórios não-esteroidais (COLLINS et al., 2010; YAN et al., 2017). Neste caso, vale salientar que novas terapêuticas se fazem necessárias, uma vez que 40% dos pacientes são refratários aos tratamentos disponíveis na clínica médica (HANSSON et al., 2009)

1.4 Córtex insular

O córtex insular é dividido em ínsula anterior (agranular) e posterior (granular) pelo sulco central da ínsula (NAMKUNG et al., 2017). A ínsula anterior se projeta reciprocamente com córtex do cíngulo anterior (ACC), amígdala e córtex pré-frontal medial; e a ínsula posterior com córtex do cíngulo medial (MCC) áreas sensoriais como tálamo áreas corticais (TAN et al., 2016; NAMKUNG et al., 2017).

Em humanos foram demonstradas ligações do córtex insular com estruturas cerebrais envolvidas na via descendente analgésica (TRACEY; MANTYH, 2007), sendo essa região a mais frequentemente ativada, em estudos de neuroimagem funcional, em humanos saudáveis e em pacientes com dor neuropática (PEYRON et al., 2000; GARCIA-LARREA, 2013). Essas conexões extensivas explicam porque córtex insular tem sido implicado em uma gama diversificada de funções, incluindo o processamento doloroso (NIEUWENHUYS, RUDOLF, 2012).

O córtex insular desempenha um papel importante em vários aspectos da sensação dolorosa, mediando a modulação das dimensões sensitivo-discriminativa, cognitivo-avaliativa e afetivo-motivacional da dor (WYNFORD-THOMAS; POWELL, 2017), constituindo a matriz da dor que é ativada por estímulos nociceptivos (HURLEY et al., 1991; SHI; CASSELL, 1998b; BECHARA et al., 2005; OSSIPOV et al., 2010; STARR et al., 2009; MORAGA-AMARO; STEHBERG et al., 2012 GARCIA-LARREA; PEYRON, 2013).

A literatura sugere que as respostas de dor podem ser somatotopicamente organizadas na ínsula (MAZZOLA et al., 2009), de forma que diferentes regiões possuam diferentes funções: a região da ínsula anterior agranular é indicada como uma interface entre redes de dor sensoriais e límbicas (MESULAM; MUFSON, 1982; CRAIG, 2003b), na qual está envolvida com os aspectos afetivos do processo nociceptivo por receber principalmente, aferências do núcleo medial talâmico (LU et al., 2016). Enquanto que a parte posterior da ínsula, que corresponde ao córtex insular granular, recebe aferentes diretos dos núcleos talâmicos posteriores e está envolvido no processamento sensorial

discriminativo da dor (MAZZOLA et al., 2009; MAZZOLA, L.; MAUGUIERE, F.; ISNARD 2019). A região posterior é indicada como fundamental na manutenção da dor crônica, pois possui vias de *feedback* positivo que envolvem a medula espinal e podem afetar os processos de sensibilização central (LU et al., 2016). Da mesma forma, a dor crônica é capaz de gerar alterações anatômicas e funcionais na ínsula posterior, fato que é correlacionado com diferentes desordens cognitivas e afetivas (LU et al., 2016). Além disso, postula-se que a percepção dolorosa é fortemente modulada pelo estado de atividade do córtex insular: a literatura mostra que ocorre a ativação da ínsula após diferentes tipos de estímulos dolorosos (JASMIN et al., 2003; ISNARD et al., 2010; ZHUO et al. 2008), e de diferentes intensidades (STARR et al., 2009). O aumento da atividade da ínsula frente à dor está relacionado a um intenso processo de plasticidade sináptica induzido pela dor neuropática que se assemelha aos processos de sinalização observados na potenciação de longo prazo (LTP), pela potenciação de receptores AMPA, regulação de receptores NMDA (NMDAR) dentre outros (QIU et al., 2013; ZHUO, 2016) e que é correlacionado com a ativação de áreas pró-nociceptivas ou inibição do sistema descendente inibitório de dor (JASMIN et al., 2003).

As subdivisões anatômicas mais aceitas do córtex insular de ratos, com base na citoarquitetura do plano ventro-dorsal, incluem três regiões: o córtex insular agranular (IA), o córtex insular disgranular (ID) e o córtex insular granular (IG) (CECHETO; SAPER, 1987, GOGOLLA, 2017), sendo sua porção posterior fortemente relacionada a funções sensoriais, incluindo a dor (GAURIAU; BERNARD, 2004; RODGERS et al., 2008). Todas as subdivisões possuem interconexões, tanto nos planos rostro-caudal, quanto dorso-ventral (GOGOLLA, 2017) e apresentam projeções para regiões corticais, como ACC (LU et al., 2016) e estruturas do tronco encefálico que são fundamentais na modulação do processo nociceptivo, como o bulbo rostral ventro-medial (RVM) e a PAG (SATO et al., 2012).

1.5 Estimulação elétrica encefálica

O conceito de que a dor pode ser alterada por modulação cortical é confirmada por muitos procedimentos experimentais e da clínica médica (TSUBOKAWAE ET AL., 1991; RAINOV et al., 1997; GARCIA-LARREA et al., 1999; NGUYEN et al., 2000; SENAPATI et al., 2005A; SENAPATI et al., 2005B; FAGUNDES-PEREYRA et al.,

2010). Foi demonstrado que a estimulação elétrica do córtex motor (ECM) induz antinocicepção em ratos submetidos a um modelo de dor neuropática induzida por CCI, devido à inibição de neurônios sensitivos talâmicos e a desinibição de neurônios da PAG (PAGANO et al., 2011). Ainda, outros métodos não invasivos têm gerado resultados satisfatórios no controle da dor, como a estimulação magnética transcraniana (EMT) (GARCIA-LARREA ET AL., 1999) e a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC), tanto em pessoas (FONTAINE et al., 2009; SOLER et al. 2010; GALHARDONI et al., 2015), como em animais (SPEZIA ADACHI et al., 2012, SILVA et al., 2015).

Mais recentemente, os estudos de neuroestimulação se voltaram para áreas corticais e límbicas (MOORE, 2014), levando em consideração as diferentes dimensões sensitivo-discriminativa, cognitivo-avaliativa e afetivo-emocional da dor (TSUBOKAWA et al., 1991; FAGUNDES-PEREYRA et al., 2010; JUNG et al., 2016; FONTAINE et al., 2009; GALHARDONI et al., 2015). Diferentes tratamentos neuroestimulatórios também influenciam o estado de atividade de células gliais, sejam astrócitos ou microglia, na medula espinal, PAG e em regiões encefálicas, o que se relaciona às alterações plásticas observadas em modelos de dor, doença de Parkinson e outras condições (SILVA et al., 2015; MONAI et al 2016; CACACE et al., 2017).

Neste cenário, da busca contínua por novos e eficazes alvos corticais para controle da dor o córtex insular surgiu como alvo potencial para neuroestimulação. A inocuidade da EMT da ínsula posterior superior em voluntários saudáveis já foi demonstrada e mostrou-se segura e bem tolerada (CIAMPI de ANDRADE et al, 2012). Em um estudo desenvolvido por nosso grupo pode-se observar que uma única sessão de Estimulação Elétrica do Córtex Insular (EECI) posterior de ratos com dor neuropática na frequência de 60Hz induz analgesia mecânica, sendo esse feito dependente de receptores opióides e canabinóides do tipo I (DIMOV et al., 2018). Em nosso mais recente trabalho avaliamos a eficácia de um protocolo de cinco sessões de EECI para o tratamento de dor neuropática em ratos, sendo uma sessão diária durante cinco dias, onde demonstramos que a antinocicepção gerada pela EECI perdura de forma sustentada durante o período experimental avaliado, demonstrando ainda um envolvimento parcial da sinalização GABAérgica no SNC (ALONSO-MATIELO et al., 2021).

Os dados apresentados até aqui reforçam a eficácia e aplicabilidade da EECI na dor neuropática, no entanto, a continuação da investigação dos mecanismos envolvidos nesse processo se faz necessário para uma melhor compreensão dos efeitos observados.

2. Hipótese

Frente ao exposto, esse trabalho teve por hipótese que diferentes frequências de Estimulação Elétrica do Córtex Insular (EECI) induz analgesia em ratos submetidos a um modelo de dor neuropática por meio de ativação/inibição de células da glia presentes na PAG e medula espinal.

3. Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico de diferentes frequências de EECI no modelo de contração crônica do nervo isquiático (CCI) em ratos, ainda, avaliar alterações neuropáticas microgliais e astrocitárias na PAG e medula espinal neste efeito.

4. Objetivos específicos

- i)* Avaliar o efeito de cinco sessões de EECI sob diferentes frequências de estimulação (10Hz, 60Hz, 80hz e 100Hz) na sensibilidade dolorosa mecânica de ratos com CCI, avaliados pelo teste de pressão de pata e filamentos de von Frey;
- ii)* Avaliar o efeito de cinco sessões de EECI sob diferentes frequências de estimulação (10Hz, 60Hz, 80hz e 100Hz) na sensibilidade térmica de ratos com CCI, avaliados pelo teste de placa quente;
- iii)* Avaliar o efeito de cinco sessões de EECI sob diferentes frequências de estimulação (10Hz, 60Hz, 80hz e 100Hz) na atividade locomotora geral de ratos submetidos ao modelo de CCI, avaliados no campo aberto;
- iv)* Avaliar o efeito de cinco sessões de EECI (60Hz) sobre a imunomarcagem de astrócitos e microglia na PAG e medula espinal, por ensaio de imuno-histoquímica.

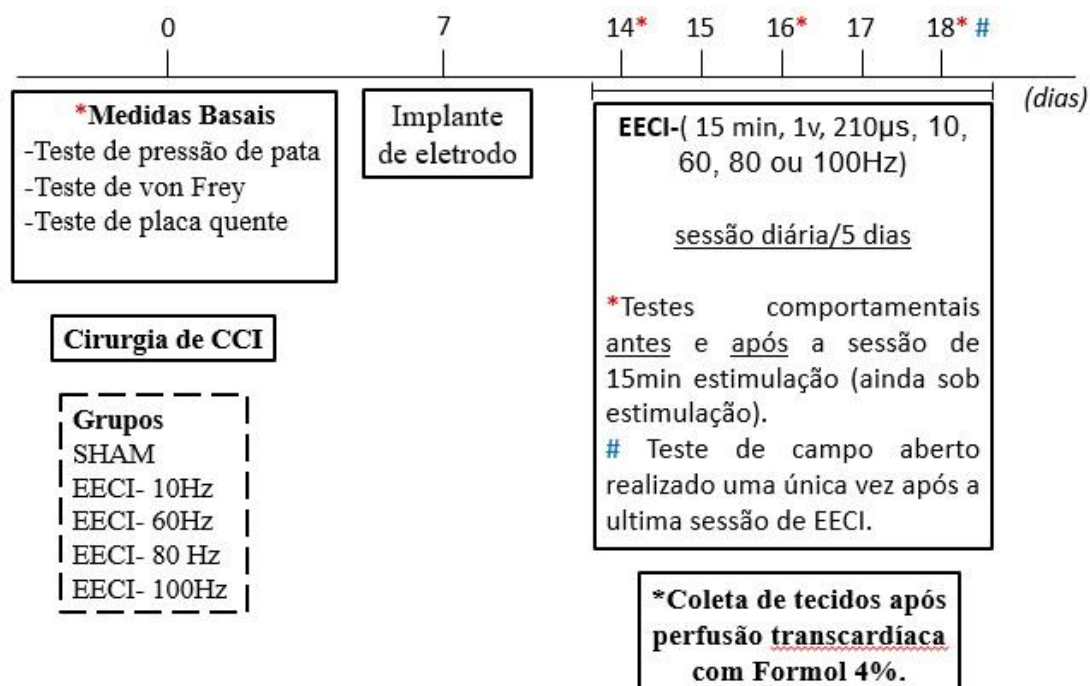
5. Materiais e Métodos

5.1 Planejamento Experimental

No protocolo experimental, os animais foram mantidos em ambiente de laboratório experimental por 7 dias antes da realização de qualquer manipulação e foram habituados para os testes de pressão da pata, filamentos de von Frey e placa quente no dia anterior ao início dos experimentos. Não foi realizada habituação para o teste de campo aberto, que avalia o comportamento animal diante da exploração em ambientes novos (TERRY, 1979; TATEM et al., 2014). Foram então realizadas medidas basais de

sensibilidade dolorosa mecânica no teste de pressão da pata, teste de sensibilidade mecânica cutânea no teste com filamentos de von Frey e sensibilidade térmica no teste de placa quente, seguindo-se à realização da cirurgia de CCI na coxa direita dos animais. Após sete dias, um eletrodo foi implantado no córtex insular posterior agranular esquerdo dos animais (contralateral ao CCI) seguindo coordenadas estabelecidas (DIMOV et al., 2018). Após 14 dias da indução do modelo de CCI, os animais foram submetidos à uma sessão diária, por cinco dias consecutivos, de EECI (parâmetros de estimulação por sessão: 15min, 210 μ s, 1 V, sendo utilizadas quatro frequências de estimulação diferentes: 10Hz, 60Hz, 80Hz ou 100Hz), sendo os animais submetidos ao teste de pressão de pata, placa quente e filamentos de von Frey ao primeiro, terceiro e quinto dia de EECI, antes e após cada sessão de estimulação, com os animais ainda sob estimulação. O teste de campo aberto foi realizado após a última sessão de estimulação para avaliação da atividade locomotora geral dos animais. Animais controle (SHAM) foram submetidos ao CCI e tiveram o eletrodo implantado no córtex insular esquerdo, porem durante os testes permaneceram com estimulador desligado e não sofreram qualquer tipo de estimulação (Figura 1).

Figura 1. Protocolo experimental. A figura mostra um delineamento experimental em dias, dos procedimentos realizados, conforme se segue.



Fonte: autor (2020)

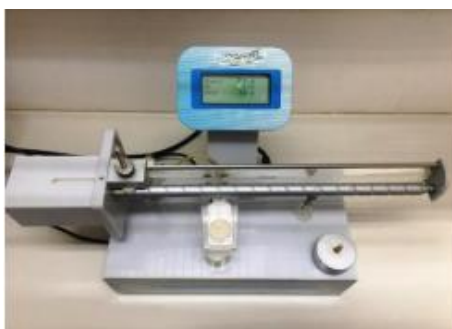
5.2 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados 41 ratos, Sprague-Dawley machos, com peso entre 280g e 340g provenientes do Biotério de Produção de Ratos (ICB, Rede USP de Biotérios), mantidos em condições ideais de biotério, com ciclo claro/escuro de 12h/12h, água e ração à vontade, alocados em número de 3 a 4 animais por caixa, mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Neuromodulação da Dor do ICB-USP e utilizados de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB (Nº 5874130618 - APÊNDICE A) e normas estabelecidas pelo CONCEA. O uso de animais neste trabalho é imprescindível pela não existência de possíveis métodos alternativos ou sistemas biológicos *in vitro* que reproduzam a complexidade dos fenômenos biológicos e fisiopatológicos aqui investigados.

5.3 Teste de pressão de Pata

O analgesímetro Randall e Sellito foi utilizado para avaliar a sensibilidade mecânica conforme estabelecido por Randall e Sellito (1957), em que a região dorsal das patas é posicionada no dispositivo (Analgesímetro Randall-Selito, Insight®; Figura 2) e aplica-se uma pressão medida em gramas sobre a pata (16 g/s) até que se observe a resposta comportamental de retirada do membro posterior e obtém-se a sensibilidade nociceptiva mecânica em gramas da retirada da pata. Os animais foram avaliados em uma medida inicial anterior a qualquer procedimento (BASAL), e antes (PRÉ) e após (PÓS) as estimulações da ínsula ao primeiro (EECI 1) e quinto (EECI 5) dia de estimulação.

Figura 2. Analgesímetro Randall-Selito. A imagem ilustra o equipamento para avaliação da sensibilidade nociceptiva mecânica em ratos (Insight®) conforme protocolo descrito inicialmente por Randall e Sellito (1957) e reproduzido neste trabalho.



Fonte: Alonso-Matielo, H. (2020)

5.4 Teste de sensibilidade mecânica por filamentos de von Frey

Antes do início do teste os animais permaneceram em uma caixa acrílica sob uma tela de metal por 10 minutos para fins de habituação. O teste foi realizado na pata posterior através da aplicação de monofilamentos de von Frey na superfície plantar, segundo método descrito por Chaplan (CHAPLAN, et al. 1994). Neste teste foram usados 9 filamentos (3.22, 3.61, 3.84, 4.08, 4.31, 4.56, 4.93, 5.18, 5.46), sendo que o teste se iniciou com aplicação do filamento intermediário. Quando o animal respondeu ao estímulo aplicado passou-se ao filamento de menor calibre. Ao obter-se uma sequência de respostas negativas seguida de resposta positiva iniciou-se a contagem de 6 respostas que serviram como parte do cálculo do limiar. O limiar foi calculado através da fórmula $g = 10^{[Xf + K \cdot \delta]}$, onde Xf é o valor do último filamento aplicado, K é o valor referente a sequência das 6 respostas registradas e δ é a medida das diferenças (em log) dos filamentos utilizados (0.28 para sequência utilizada).

Figura 3. Imagem ilustrativa da aplicação do teste de von Frey. A imagem ilustra o equipamento para avaliação da sensibilidade nociceptiva mecânica em ratos. Animais com as patas estabilizadas sobre a grade, recebem a estimulação por filamentos de von Frey na porção plantar da pata conforme protocolo descrito inicialmente Chaplan (1994) e reproduzido neste trabalho.

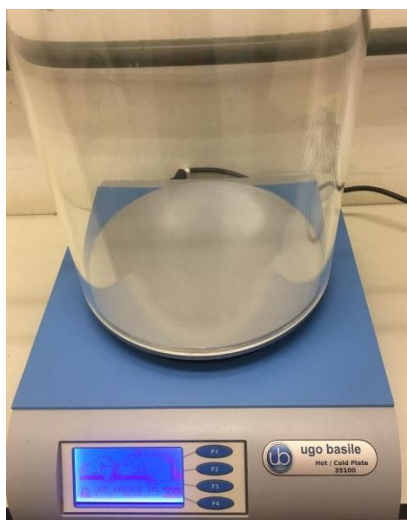


Fonte: Autor (2020)

5.5 Teste de Placa quente

A sensibilidade dolorosa térmica foi avaliada utilizando-se o teste da placa quente (JACOB & RAMABADRAN, 1978). Os animais foram colocados, individualmente, sobre a placa de metal a princípio desligada, por cinco minutos para fins de habituação. No momento do teste, os animais foram colocados sobre a placa de metal aquecida a uma temperatura constante 51,5 °C. Foi cronometrado o tempo em que os animais apresentem resposta ao estímulo térmico (Tempo de Reação), caracterizada por lambe as patas posteriores. A placa foi limpa com solução etanol a 5%, após a medida de cada animal, com o intuito de minimizar os efeitos estressantes causados pelos odores de urina e fezes dos próprios animais. O tempo limite (corte) para a resposta da medida inicial foi de 15 segundos e os animais que não responderam neste intervalo de tempo foram descartados do experimento. Para análise dos resultados, foram comparadas a latência de resposta das medidas iniciais e finais, obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 4. Placa quente. A imagem ilustra o equipamento para avaliação da sensibilidade nociceptiva térmica em ratos (Insight®) conforme protocolo descrito inicialmente Jacob & Ramabadran (1978) e reproduzido neste trabalho.

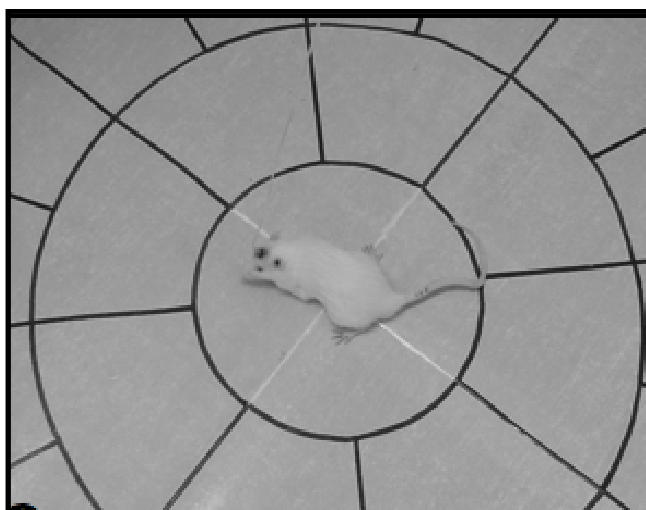


Fonte: Autor (2020)

5.6 Teste de campo aberto

Ratos foram avaliados separadamente em uma arena circular fechada com medidas de 95 cm de diâmetro x 45 cm de altura (Figura 5) e dividida em quadrantes, onde permaneceram por três minutos para realização do teste. Foram avaliados os parâmetros de frequência de locomoção (entrada do animal com as quatro patas no quadrante) e de levantar (posição bípede) (DE LIMA et al., 2005). Os animais foram avaliados uma única vez após a quinta EECI.

Figura 5. Imagem ilustrativa da arena de Campo Aberto. A imagem mostra a área da arena de campo aberto separada em quadrantes. Dimensões padronizadas: 95 cm de diâmetro x 45 cm de altura. Número total de quadrantes: 28.



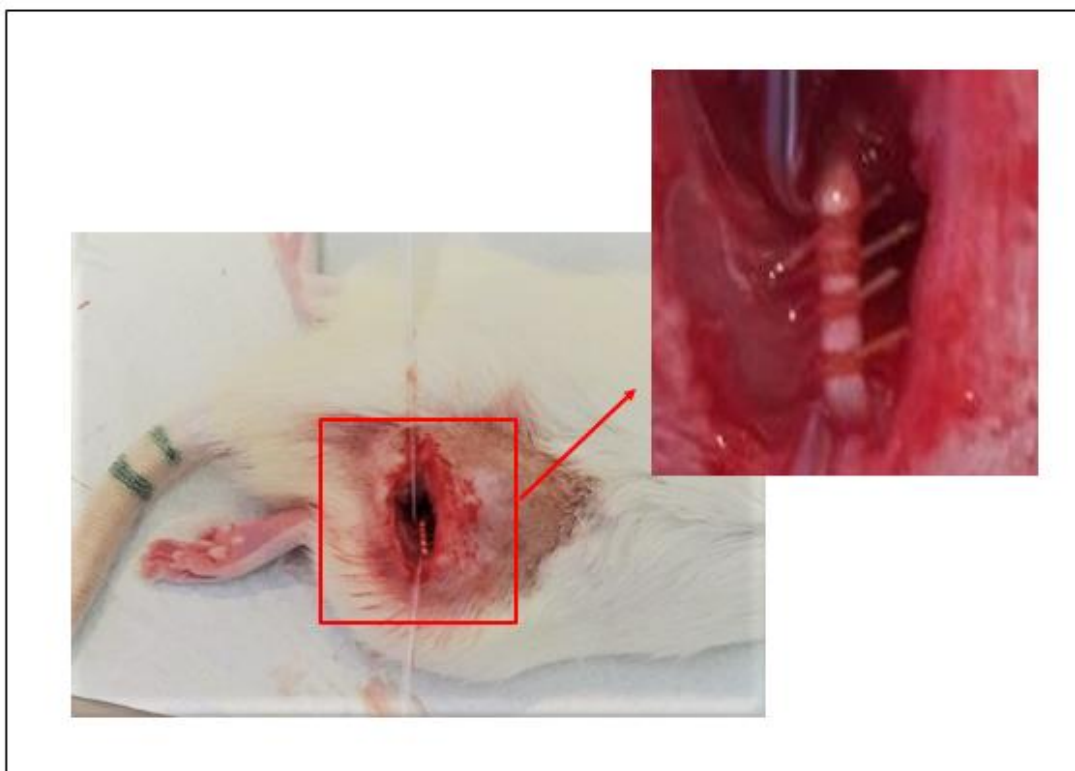
Fonte: Autor (2020)

5.7 Modelo de dor neuropática: Lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

A CCI foi realizada de acordo com o protocolo de Bennet e Xie (1988). Animais anestesiados com isoflurano 2,5% (Isoforine[®], Cristália) tiveram o nervo isquiático do membro posterior direito exposto ao nível da coxa por dissecação na região proximal à trifurcação do nervo. Cerca de 7 mm do nervo foram soltos do tecido adjacente e 4 nós frouxos foram amarrados com fio de sutura categute cromado 5.0 (Ethicon[®]) ao redor do nervo, distando 1 mm entre eles. Este modelo gera, no membro correspondente, sintomas

de hipersensibilidade térmica e mecânica e dor espontânea, que se iniciam entre o primeiro e o quinto dia após a indução da lesão e se estendem por, pelo menos, dois meses (BENNETT; XIE, 1988; AUSTIN et al., 2012).

Figura 6. Cirurgia de contração crônica do nervo isquiático. A imagem demonstra quatro amarraduras frouxas feitas com fio de sutura categut cromado 5.0 ao redor do nervo isquiático da coxa direita do rato.



Fonte: Autor, (2020); Alonso-Matielo, H. (2020)

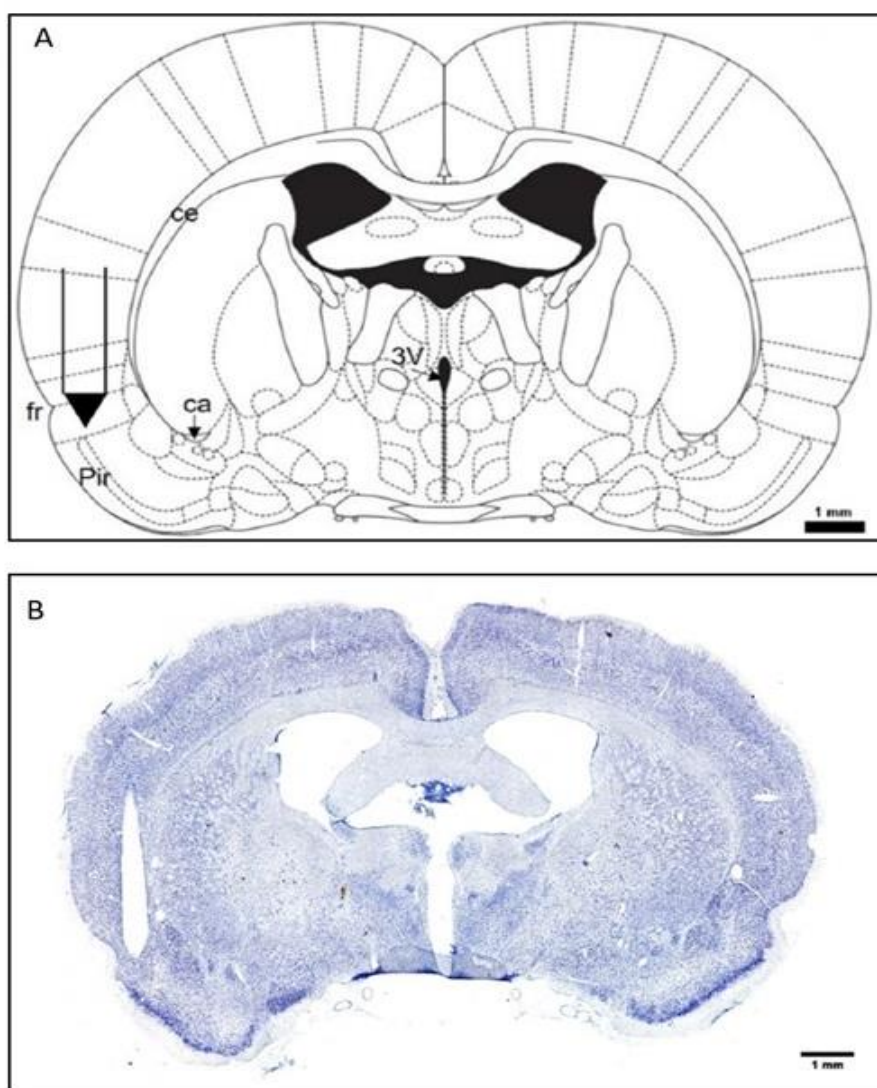
5.8 Implante do eletrodo concêntrico

Um eletrodo concêntrico (D039035408 Spes Medica[®]) foi posicionado no córtex insular esquerdo contralateral ao nervo lesado dos animais seguindo o protocolo já estabelecido (DIMOV et al., 2018). Brevemente, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica sob pré-anestesia com acepromazina (2,75 mg/kg, Acepram[®], Vetnil) via intraperitoneal, seguido por anestesia com cloridato de cetamina (82 mg/kg,

Dopalen[®], Sespo), cloridrato de xilazina (7,5 mg/kg, Anasedan[®], Sespo) via intraperitoneal e anestesia local na área do escalpo com cloridrato de mepivacaína 3% (100µL/ animal, MEPISV[®], DFL). O crânio foi fixado no estereotáxico e um orifício foi trepanado na área superficial do crânio próximo ao local do implante para inserção do eletrodo concêntrico seguindo as coordenadas do atlas de encéfalo de ratos para referência do córtex insular posterior agranular (Figura 7; 1.0 mm caudal ao bregma; 5.8 mm de lateralidade à esquerda da linha média e 7.1 mm de profundidade) (PAXINOS; WATSON, 2005). Dois parafusos foram utilizados lateralmente ao eletrodo para fixação e ancoragem ancoragem, posicionados entre 4 e 6 mm de distância do eletrodo, e o escalpo vedado com resina acrílica (Jet[®] Clássico). Ao término da cirurgia os animais receberam antibiótico amoxicilina triidratada (100 mg/kg via subcutânea, Agemoxi L.A., Agener União) e foram acompanhados em recuperação pós- cirúrgica por 7 dias. (Figura 7)

Figura 7- Implante do eletrodo

Em (A), esquema coronal de encéfalo de rato (modificado de Paxinos e Watson, 2005) onde se representa o posicionamento do implante na ínsula posterior agranular. A demarcação representa o eletrodo concêntrico implantado na ínsula posterior de acordo com as coordenadas descritas (1.0 mm caudal ao bregma; 5.8 mm de lateralidade à esquerda da linha média e 7.1 mm de profundidade. Em (B), histologia em corte coronal de encéfalo de rato submetido à coloração de Nissl. Régua representativas 1mm. Abreviações: 3V, terceiro ventrículo; ca, comissura anterior; ce, cápsula externa; fr, fissura final; Pir, córtex piriforme. (Figura 7)



Fonte: Adaptado de Paxinos e Watson (2015); Luiz Fábio Dimov (2017); Alonso-Matielo (2020)

5.9 Estimulação Elétrica do Córtex Insular (EECI)

Animais estimulados (EECI) tiveram seus eletrodos ligados ao estimulador (Medtronic® Model 3625 Test Stimulator) e cada sessão de estimulação perdurou por 15 minutos (amplitude de 1.0V; frequências de 10Hz, 60Hz, 80Hz ou 100 Hz e duração de pulso de 210 µs). Animais SHAM foram conectados ao estimulador desligado, sem sofrer qualquer tipo de estimulação elétrica.

5.10 Coleta de amostras

Ao término dos experimentos, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico (combinação de cetamina- Dopalen[®] Sespo, na dose de 240 mg/kg; e cloridrato de xilazina- Anasedan[®], Sespo, na dose de 22,5mg/Kg) e perfundidos com solução salina 0,9% (150ml/animal) e formol 4% (300ml/animal), dissolvidos em tampão fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4), e amostras de encéfalo e medula espinal foram coletadas. As amostras foram pós-fixadas em formol 4% por 6 horas e mantidas em sacarose 30%, para crioproteção em temperatura de 4°C até serem processadas por imuno-histoquímica.

5.11 Imuno-histoquímica para GFAP e IBA

Amostras de encéfalo e medula, foram cortadas em micrótomo deslizante de congelamento, com espessura do corte de 30µm. Os cortes foram coletados em placa de cultivo de 6 unidades contendo solução anti-freenzing (PB 0.05M, sacarose e etilenoglicol) e mantidos sob refrigeração, a -20°C, até o momento da realização do ensaio. Para os experimentos, os cortes foram lavados 3 vezes por 10 minutos em PB 0.1M, e em seguida incubados overnight a 4°C sob agitação em anticorpo primário específico GFAP (marcador de astrócitos) diluído 1:500 (Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein, clone GA5 MAB360) e/ou IBA (marcador microglial). Posteriormente, os cortes foram lavados novamente em PB 0.1M (3 vezes por 10 minutos) e então incubados por 2h com o anticorpo secundário biotilado em diluição 1:200 (Jackson Immuno Research Laboratories, INC.) Em seguida, foram incubados com kit avidina 1:100 e biotina 1:100 por 2h, sendo revelados com peróxido de hidrogênio utilizando-se diaminobenzidina como cromógeno.

Os cortes histológicos foram montados sobre lâminas de vidro gelatinizadas, as quais foram submetidas à desidratação em temperatura ambiente, proteção com meio de montagem à base de glicerol e cobertura por lamínulas. A imunorreatividade foi analisada em microscópio ótico e a densidade óptica na PAG e medula foi realizada com o programa Image J, com base nas estruturas descritas no atlas “The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates” (PAXINOS; WATSON, 2009).

5.12 Análise dos resultados obtidos

Os resultados comportamentais são apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m). As análises estatísticas dos dados foram geradas usando o GraphPad Prism, versão 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni foi usada para comparações de mais de dois grupos. Teste t paramétrico pareado ou não pareado foi utilizado para a análise entre dois grupos. Em todos os casos, $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Para análise dos ensaios de imuno-histoquímica foram obtidas três imagens referentes a PAG, considerando respectivas divisões colunas (dmPAG, dIPAG, IPAG, vlPAG) e três imagens referentes a medula espinal, considerando respectivas divisões em coluna posterior direita e esquerda. Foi quantificada a densidade óptica através do programa Image J. Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e foram estatisticamente analisados por Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas vias e/ou Teste t paramétrico não pareado. O teste de Bonferroni foi utilizado para detectar as diferenças das médias após ANOVA quando assim necessário. O índice de significância considerado foi de $p < 0,05$, calculados com Software GraphPadInstatTM/GraphPad Software V6.01[©], 1992-2012.

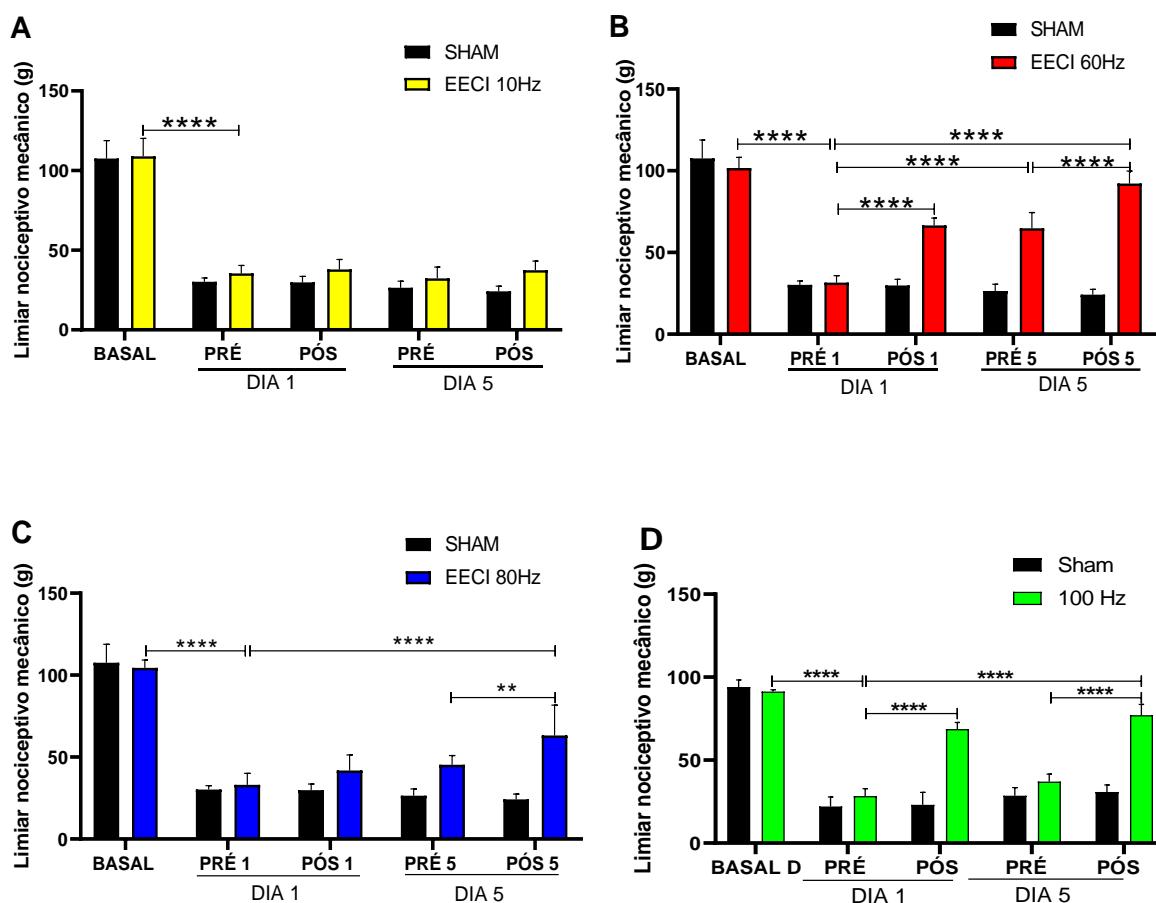
6. RESULTADOS

6.1 Efeito de cinco sessões de diferentes frequências de EECI (10, 60, 80 e 100Hz) sobre a sensibilidade dolorosa mecânica avaliada pelo teste de pressão de pata em ratos com CCI

Os resultados obtidos demonstram que em todos os grupos avaliados submetidos ao CCI apresentaram diminuição da sensibilidade dolorosa mecânica característica do modelo de CCI. No que se refere ao efeito da EECI, os dados demonstram que a frequência de 10 Hz não foi capaz de interferir com a sensibilidade dolorosa dos animais em nenhum dos tempos avaliados (Figura 8A). Na figura 8B é possível observar que a frequência de 60 Hz foi capaz de reverter a hipersensibilidade observada em todos os tempos avaliados (uma e cinco sessões de EECI). Ainda, foi possível observar que com esta frequência de estimulação, a antinocicepção se manteve de forma sustentada até o quinto dia de avaliação (**EECI PRÉ DIA 1= 31,57±4,2 vs EECI PÓS DIA 1= 66,57±4,47** $p<0.0001$; **EECI PRÉ DIA 5= 64,857±9,616** $p<0.0001$; **EECI PÓS DIA 5= 92,143±67,625** $p<0.0001$; Figura 8B). Por outro lado, quando a frequência de 80 Hz foi aplicada, o efeito antinociceptivo foi observado apenas após cinco sessões (**EECI PRÉ DIA 1= 33,0±7,1 vs EECI PÓS DIA 1= 41,85±9,5** $p=0,6814$; **EECI PRÉ DIA 5= 45,3±5,7; EECI PÓS DIA 5 = 63,14±18,6** $p=0.0045$) (Figura 8C). Por fim, a frequência de 100Hz foi capaz de reverter parcialmente a hiperalgesia em todos os tempos avaliados, porém não manteve esse efeito de uma sessão para outra (**EECI PRÉ DIA 1= 28,33±7,1 vs EECI PÓS DIA 1= 68,67±9,5** $p=0.0001$; **EECI PRÉ DIA 5= 37,00±5,7; EECI PÓS DIA 5 = 77,14±18,6** $p=0.0001$; **EECI PRÉ DIA 1= 28,3±5,7; EECI PÓS DIA 5 = 77,00±18,6** $p=0.0045$) (Figura 8D).

Figura 8- Efeito de cinco sessões de EECI em diferentes frequências, sobre a sensibilidade nociceptiva mecânica de ratos avaliados no modelo de pressão de pata.

(A) EECI 10Hz (n=4), (B) EECI 60Hz (n=8), (C) EECI 80Hz (n=8), (D) EECI 100Hz (n=5) e SHAM (n=4). Dados apresentados como Média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. (A) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1, ****p< 0.0001. (B) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 1; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PRÉ DIA 5; PRÉ DIA1 vs PÓS DIA 5, ****P<0.0001. Em (C) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1; **** p<0.0001; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 5, p<0.0001; EECI PRÉ DIA 5 vs EECI PÓS DIA 5; ** p=0.0045. Em (D) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1, **** p<0.0001; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 1, **** p<0.0001; EECI PRÉ DIA 5 vs EECI PÓS DIA 5; **** p=0.0045; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 5; **** p=0,0045 medida EECI (Figura 8).



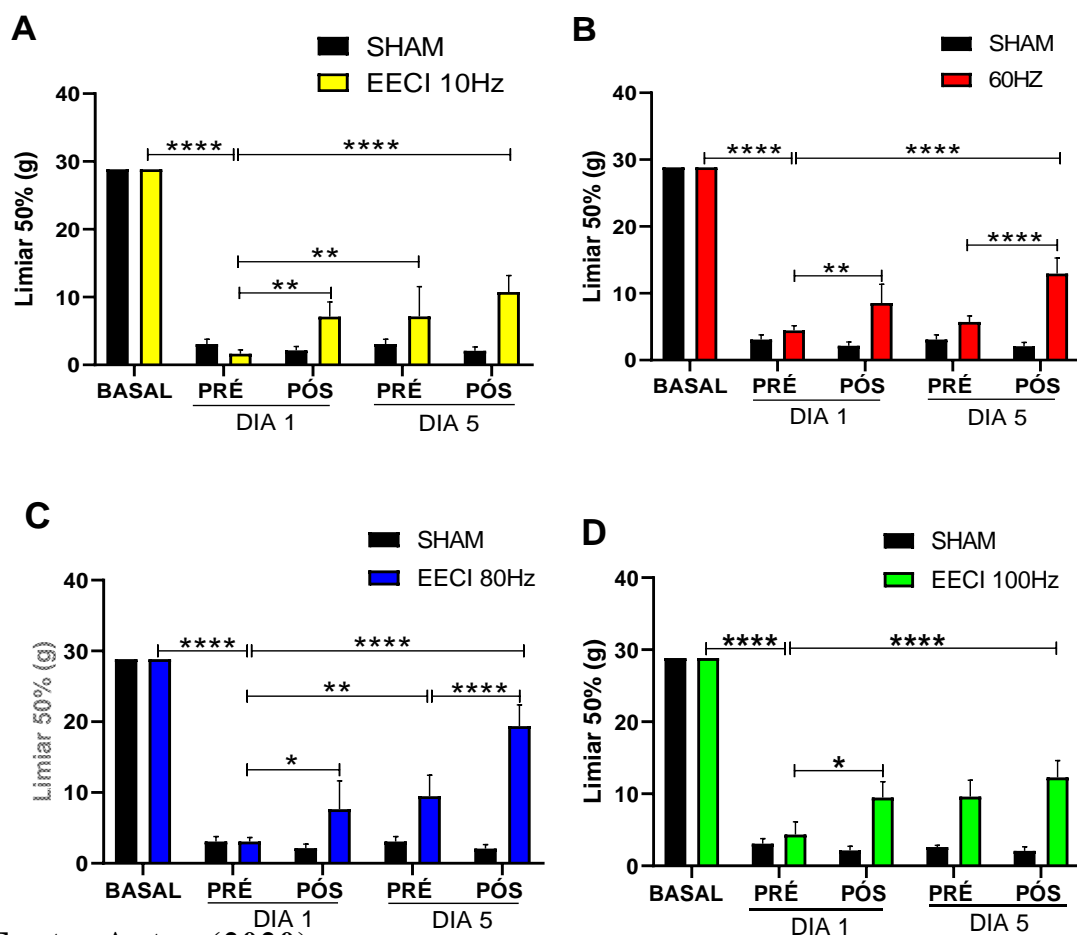
Fonte: Autor (2020)

6.2 Efeito de cinco sessões de diferentes frequências de EECI (10, 60, 80 e 100Hz) sobre a alodínea mecânica avaliada por filamentos de von Frey em ratos com CCI

Os resultados obtidos demonstram que em todos os grupos avaliados os animais submetidos ao CCI apresentaram diminuição da sensibilidade dolorosa caracterizada pela alodínia do modelo experimental de dor neuropática pelo CCI (Figura 3). No que se refere ao efeito da EECI, os dados demonstram que a frequência de 10 Hz foi capaz de reverter parcialmente a alodínia observada após uma sessão (EECI PRÉ DIA1= $2,580 \pm 2,282$ vs EECI PÓS DIA 1= $15,481 \pm 3,713$). Esta reversão parcial se manteve de forma sustentada durante cinco sessões (EECI PRÉ DIA1= $2,580 \pm 2,282$ vs EECI PRÉ DIA 5= $4,884 \pm 3,885$; vs EECI PÓS DIA5= $4,884 \pm 3,885$) (Figura 9A). Quando a frequência de 60Hz foi utilizada, os resultados demonstraram uma reversão parcial da alodínea mecânica após uma sessão (EECI PRÉ DIA1= $3,727 \pm 2,20$ vs EECI PÓS DIA1= $8,269 \pm 3,15$) e após cinco sessões (EECI PRÉ DIA 5= $4,884 \pm 3,885$ vs EECI PÓS DIA 5= $3,497 \pm 0,698$). A mesma reversão parcial da alodínia pode ser observada quando comparamos o primeiro dia antes de uma sessão de EECI ao quinto dia após a última sessão (EECI PRÉ DIA1= $3,727 \pm 2,20$ vs EECI PÓS DIA5= $15,481 \pm 3,713$), no entanto, é possível observar que essa reversão não permanece de maneira sustentada entre as sessões (Figura 9B). A frequência de 80Hz apresentou uma reversão parcial da alodínea em todos os tempos avaliados e a reversão ocorreu de forma sustentada após cinco sessões (EECI PRÉ DIA1= $4,346 \pm 2,89$ vs EECI PÓS DIA1= $7,465 \pm 4,02$; EECI PRÉ DIA1 $4,346 \pm 2,89$ vs EECI PRÉ DIA5= $9,47 \pm 2,99$; vs EECI PÓS DIA5= $0,753 \pm 0,624$) (Figura 9C). Referente a frequência de 100Hz a reversão também acontece parcialmente logo após uma sessão de EECI (EECI PRÉ DIA1= $4,346 \pm 2,89$ vs EECI PÓS DIA1= $7,465 \pm 4,02$) e permanece sem grandes oscilações até o último dia de EECI (EECI PRÉ DIA1 $4,346 \pm 2,89$ vs EECI PÓS DIA5= $15,481 \pm 3,713$) (Figura 9D).

Figura 9- Efeito de cinco sessões de diferentes frequências EECI sobre a alodínia mecânica de ratos com CCI avaliados por filamentos de von Frey.

Grupos (A) EECI 10Hz (n=5), (B) EECI 60Hz (n=5), (C) EECI 80Hz (n=5), (D) EECI 100Hz (n=5) e SHAM (n=4). Dados apresentados como Média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. (A) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1, ****p= 0,0001; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 1, **p= 0,0019; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PRÉ DIA 5, **p= 0,0018; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 5, ****p= 0.0001. (B) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1, ****p= 0.0001; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 1, **p= 0.0025; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 5, ****p= 0.0001. Em (C) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1; **** p= 0.0001; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 1, *p= 0.0045; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PRÉ DIA 5; ** p= 0.0019; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 5; ****p= 0.0001; EECI PRÉ DIA 5 vs EECI PÓS DIA 5; ****p=0.0001. Em (D) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1; **** p= 0.0001; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 1, *p= 0.0106; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 5; ****p= 0.0001, medida EECI.



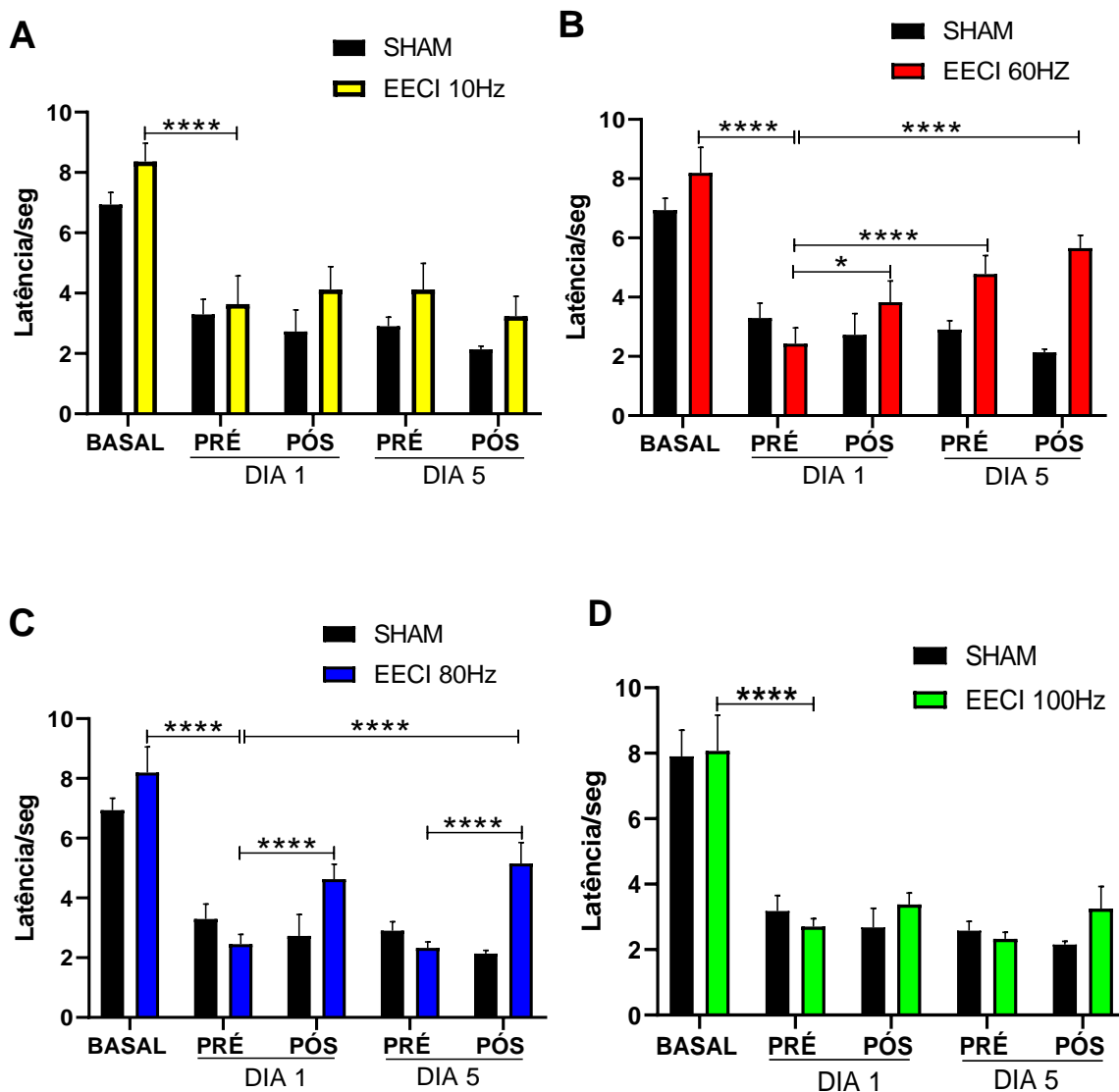
Fonte: Autor (2020)

6.3 Efeito de cinco sessões de diferentes frequências de EECI (10, 60, 80 e 100Hz) sobre a sensibilidade dolorosa térmica avaliada no teste de placa quente em ratos com CCI.

Os resultados obtidos demonstram que em todos os grupos avaliados os animais submetidos ao CCI apresentaram aumento da sensibilidade dolorosa característica de hipersensibilidade térmica (BASAL= $7,90 \pm 4,72$ $p < 0.0001$ vs EECI PRÉ DIA 1= $3,17 \pm 0,39$ $p < 0.0001$) (Figura 3). No que se refere ao efeito da EECI, os dados demonstram que a frequência de 10 Hz não foi capaz de interferir com a sensibilidade térmica dos animais em nenhum dos tempos avaliados (Figura 10A). Quando a frequência de 60Hz foi utilizada, observou-se reversão parcial da hipersensibilidade térmica, em todos os períodos de avaliação, demonstrando mais uma vez que nesta frequência a antinocicepção manteve um efeito sustentado (EECI PRÉ DIA1= $3,727 \pm 2,20$ vs EECI PÓS DIA1= $3,825 \pm 0,72$; $p = 0.0219$ vs EECI PRÉ DIA5= $4,775 \pm 0,63$; $p < 0.0001$ vs EECI PÓS DIA5= $5,650 \pm 0,436$; $p < 0.0001$) (Figura 10B). A frequência de 80Hz foi capaz de reverter parcialmente a hiperalgesia térmica induzida pelo CCI após a primeira sessão de estimulação, no entanto, este efeito não se manteve de forma sustentada, sendo restaurado após cinco sessões de estimulação (EECI PRÉ DIA1= $2,450 \pm 0,332$ vs EECI PÓS DIA1= $4,625 \pm 0,506$; $p < 0.0001$ vs EECI PRÉ DIA5= $2,325 \pm 0,20$; vs EECI PÓS DIA5= $5,150 \pm 0,705$; $p < 0.0001$) (Figura 10C). Os animais submetidos ao teste de placa quente após estimulação com frequência de 100Hz não tiveram aumento no limiar térmico em nenhum dos tempos avaliados (D).

Figura 10- Efeito de cinco sessões de diferentes frequências EECI sobre a sensibilidade dolorosa térmica.

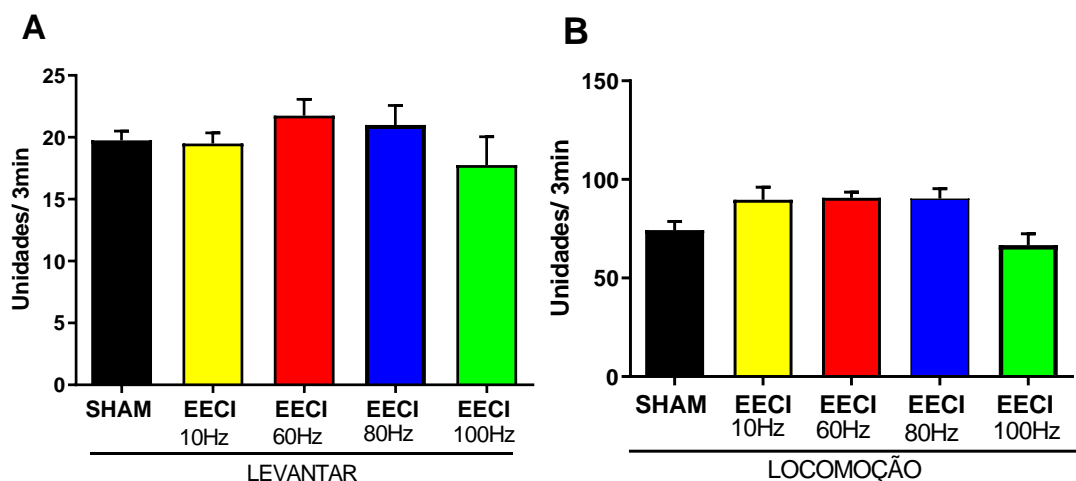
Grupos, EECI 10Hz (n=5), EECI 60Hz (n=5), EECI 80Hz (n=5), EECI 100 Hz (n=5) e SHAM (n=4). Dados apresentados como Média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. (A) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1, ****p< 0.0001. (B) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1, ****p< 0.0001; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 1, *p=0.0219; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 5, ****p<0.0001; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PRÉ DIA 5, ****P<0.0001. Em (C) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1; **** p<0.0001; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 1, ****p<0.0001; EECI PRÉ DIA 5 vs EECI PÓS DIA 5, <****0.0001; EECI PRÉ DIA 1 vs EECI PÓS DIA 5, p<****0.0001. Em (D) BASAL vs EECI PRÉ DIA 1, ****p< 0.0001, medida EECI. (Figura 10)



Fonte: Autor (2020)

6.4 Efeito de cinco sessões de diferentes frequências de EECI (10, 60, 80 e 100Hz) sobre a atividade locomotora avaliada no teste de Campo aberto em ratos com CCI. Os animais submetidos as diferentes frequências de EECI, foram avaliados tanto no aspecto de locomoção quanto de levantar. A EECI não interferiu na atividade locomotora quando avaliados os aspectos de locomoção (SHAM, n=5: 94.25 ± 6.419 ; EECI 10Hz, n=5: $89,11 \pm 5,184$; EECI 60Hz, n=5: $63,50 \pm 1,50$; EECI 80Hz, n=5: $71,00 \pm 6,042$ $p > 0,05$; EECI 100Hz, n=5: $66,67 \pm 7,143$; Figura 11A), quanto de levantar (SHAM, n=5: $19,75 \pm 0,250$; EECI 10Hz, n=5: $19,50 \pm 2,076$; EECI 60Hz, n=5: $21,75 \pm 2,076$; EECI 80Hz, n=5: $21,00 \pm 6,042$; EECI 100Hz, n=5: $17,75 \pm 2,076$; Figura 11B).

Figura 11- Efeito de cinco sessões de diferentes frequências EECI sobre a atividade locomotora de ratos com CCI. A atividade locomotora de animais foi aferida no teste de Campo Aberto em uma única avaliação realizada ao quinto dia após cinco sessões de EECI por três minutos, para avaliação dos parâmetros de frequência de **Levantar (A)** (ato do animal permanecer apoiado somente nas duas patas posteriores e de **Locomoção (B)** ato de o animal entrar, com as 4 patas, em um dos quadrantes. Dados apresentados como Média \pm e.p.m. Anova de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni.



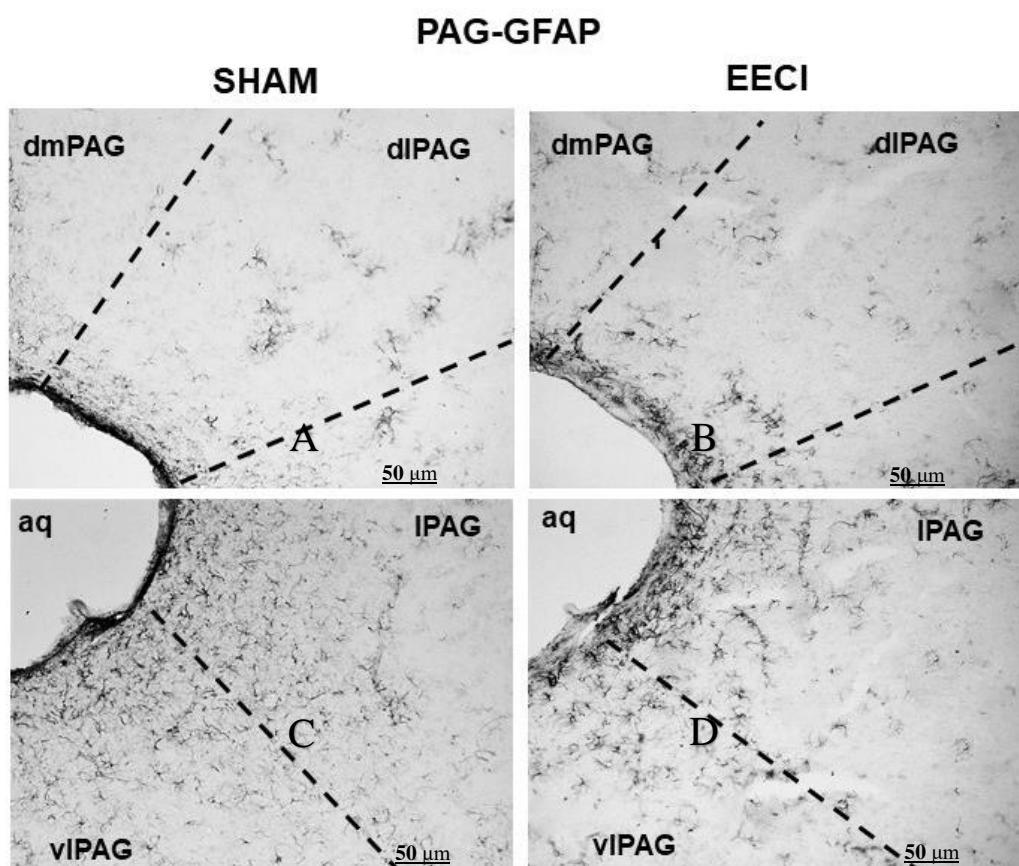
Fonte: Autor (2020)

6.5 Efeito de cinco sessões de EECI a 60Hz sobre a imunomarcação de astrócitos na PAG de ratos com CCI

A imunorreatividade para GFAP foi analisada em cortes submetidos a imunohistoquímica na PAG total, e suas respectivas subdivisões em colunas (dmPAG, dlPAG, lPAG, vlPAG), de animais EECI (n=3) e SHAM (n=3) submetidos a cinco sessões de EECI.

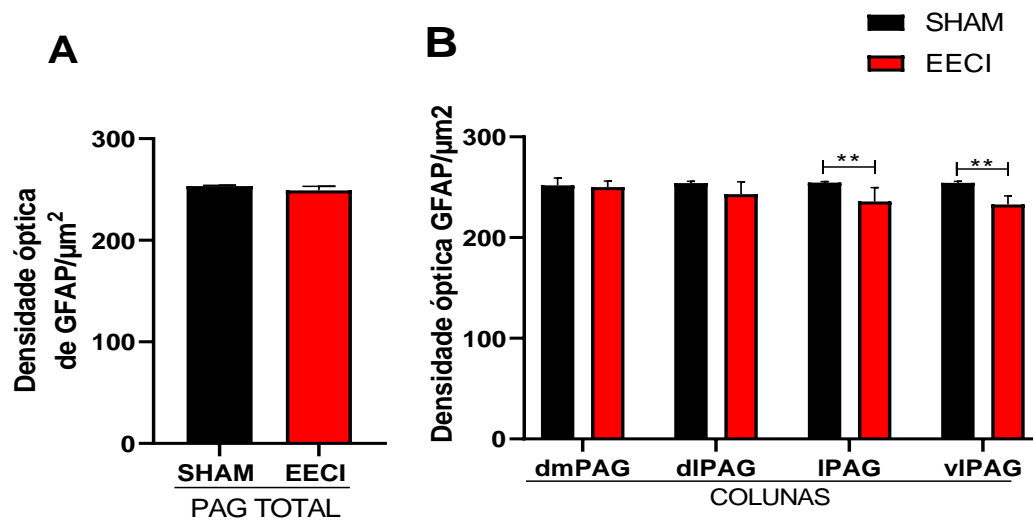
Imagens de cortes coronais de encéfalo de rato representativas das regiões de interesse estão representados na Figura 12 em A, B, C e D. A análise quantitativa da densidade óptica demonstrou que cinco sessões de EECI 60Hz não influenciaram na imunomarcação de astrócitos considerando PAG total representada na (Figura 12A); porém quando feita a análise quantitativa na colunas podemos observar que a EECI influenciou na diminuição da imunomarcação de astrócitos das colunas lPAG e vlPAG, de animais estimulados (EECI), quando comparados ao grupo controle (SHAM) representados na (Figura 12B).

Figura 12- Representação de imuno-histoquímica para GFAP da PAG. Cortes coronais de encéfalos de rato SHAM (n=3) e EECI (n=3) foram submetidos a imuno-histoquímica para a proteína GFAP. Imagens obtidas em microscópio óptico e analisadas no programa ImageJ. Réguas representativas de 50 μ m. Em **A** e **B** tracejado preto delimita as regiões de colunas da PAG dorso-medial (dmPAG), dorso-lateral (dlPAG). Em **C** e **D** tracejado preto delimita as regiões de colunas lateral (lPAG) e ventro-lateral (vlPAG); (coordenadas de referência: bregma -2.56 mm até bregma 0.00 mm). Abreviaturas: Aq: aqueduto.



Fonte: Autor (2020)

Figura 13- Efeito de cinco sessões de EECI sobre a imunomarcção de GFAP na PAG. Cortes coronais de encéfalos EECI (n=3) e SHAM (n=3) foram submetidos a ensaio de imuno-histoquímica para GFAP. Imagens obtidas em microscópio óptico e a densidade óptica foi quantificada utilizando-se o programa ImageJ. Em (A) teste T paramétrico não-pareado. Em (B), Anova de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.



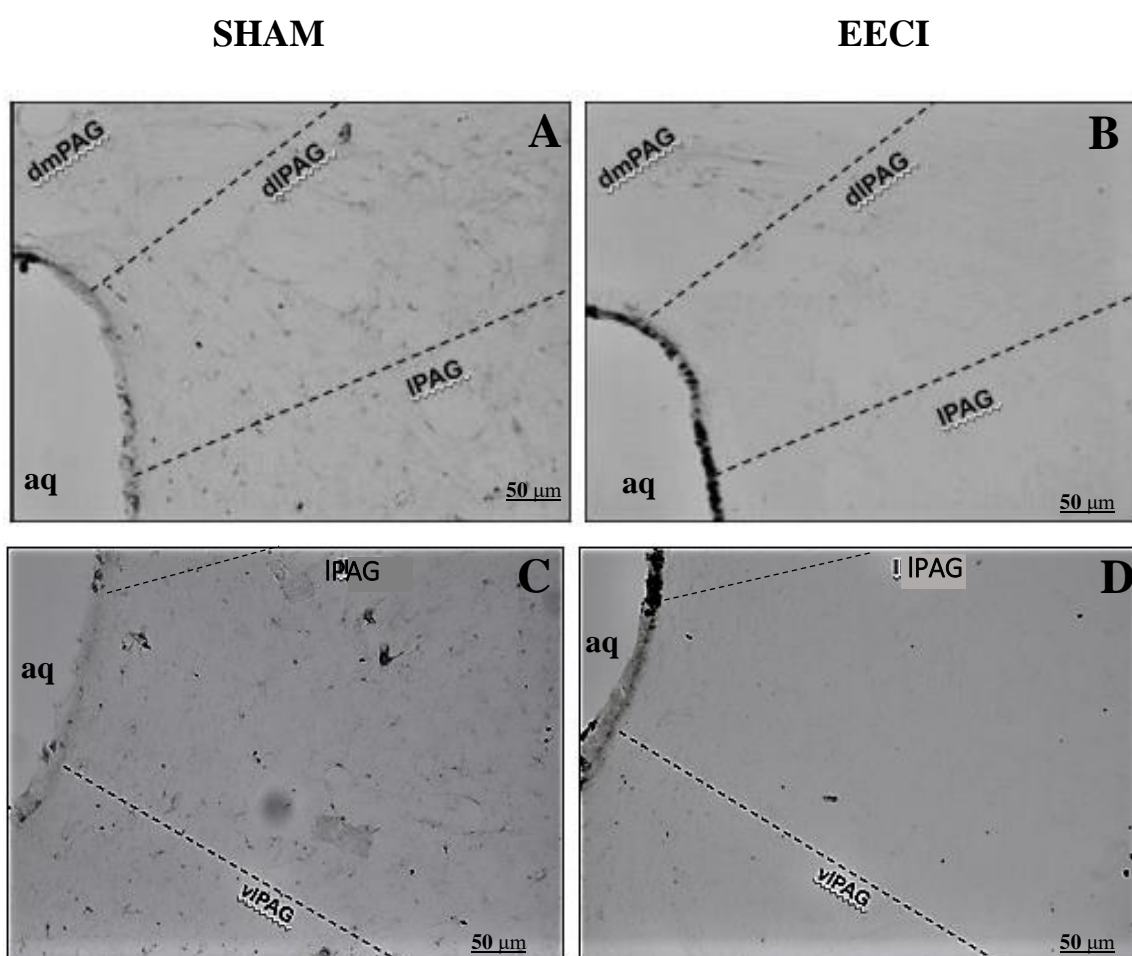
Fonte: Autor (2020)

6.6 Efeito de cinco sessões de EECI a 60Hz sobre a imunomarcção de microglia na PAG de ratos com CCI

A imunorreatividade para IBA foi analisada em cortes submetidos a imunohistoquímica na PAG total, em suas respectivas subdivisões em colunas (dmPAG, dlPAG, lPAG, vlPAG), de animais EECI (n=3) e SHAM (n=3) submetidos a cinco sessões de EECI.

Imagens de cortes coronais de encéfalo de rato representativas das regiões de interesse estão representados na Figura 14 em A, B, C e D. A análise quantitativa da densidade óptica demonstrou que cinco sessões de EECI 60Hz influenciaram na imunomarcção de microglia considerando PAG total representada na Figura 14A; e suas respectivas colunas (lPAG e vlPAG) representados na Figura 14B. Foram observadas alterações na imunomarcção de microglia na PAG total e colunas.

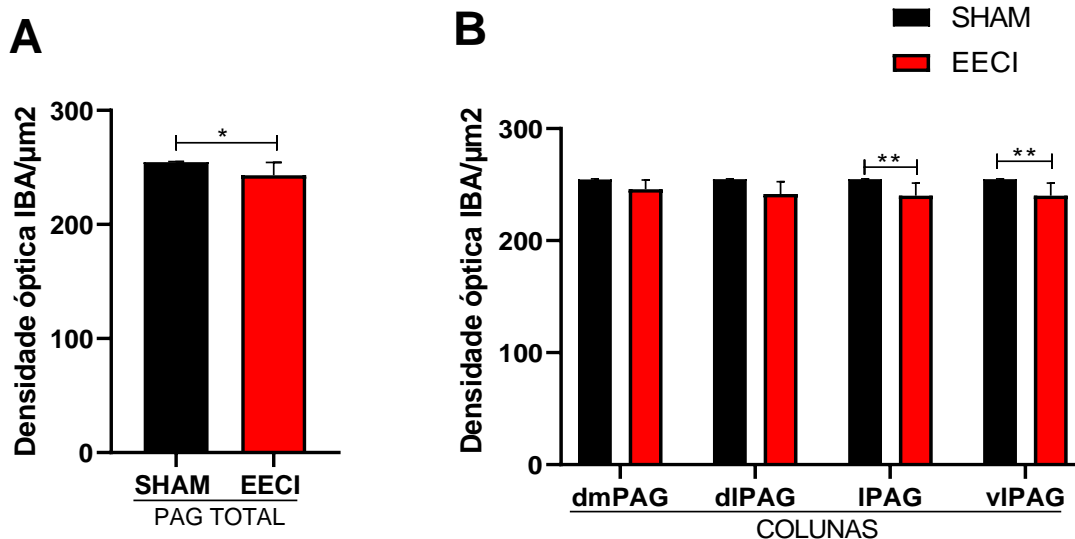
Figura 14- Representação de imuno-histoquímica para IBA da PAG. Cortes coronais de encéfalos SHAM (n=3) e EECI (n=3) foram submetidos a imuno-histoquímica para a proteína IBA. Imagens obtidas em microscópio óptico e analisadas no programa ImageJ. Régua representativas de 50 μ m. Em **A** e **B** tracejado preto delimita as regiões de colunas da PAG dorso-medial (dmPAG), dorso-lateral (dlPAG). Em **C** e **D** tracejado preto delimita as regiões de colunas lateral (lPAG) e ventro-lateral (vlPAG); (coordenadas de referência: bregma -2.56 mm até bregma 0.00 mm). Abreviaturas: Aq: aqueduto.



Fonte: Autor (2020)

Figura 15- Efeito de cinco sessões de EECI sobre a imunomarcção de IBA na PAG.

Cortes coronais de encéfalos EECI (n=3) e SHAM (n=3) foram submetidos a ensaio de imuno-histoquímica para IBA. Imagens obtidas em microscópio óptico de densidade óptica e quantificadas utilizando-se o programa ImageJ na PAG total, e considerando-se suas subdivisões em colunas dorso-medial (dmPAG), dorso-lateral (dlPAG), lateral (lPAG) e ventro-lateral (vlPAG). Dados estão apresentados como média \pm e.p.m. Teste t não pareado ou ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. Em (A) *p=0.0305 SHAM vs EECI PAG total. (B) **p=0.0068 EECI vs SHAM lPAG; **p=0.0068 EECI vs vlPAG. (Figura 15)



Fonte: Autor (2020)

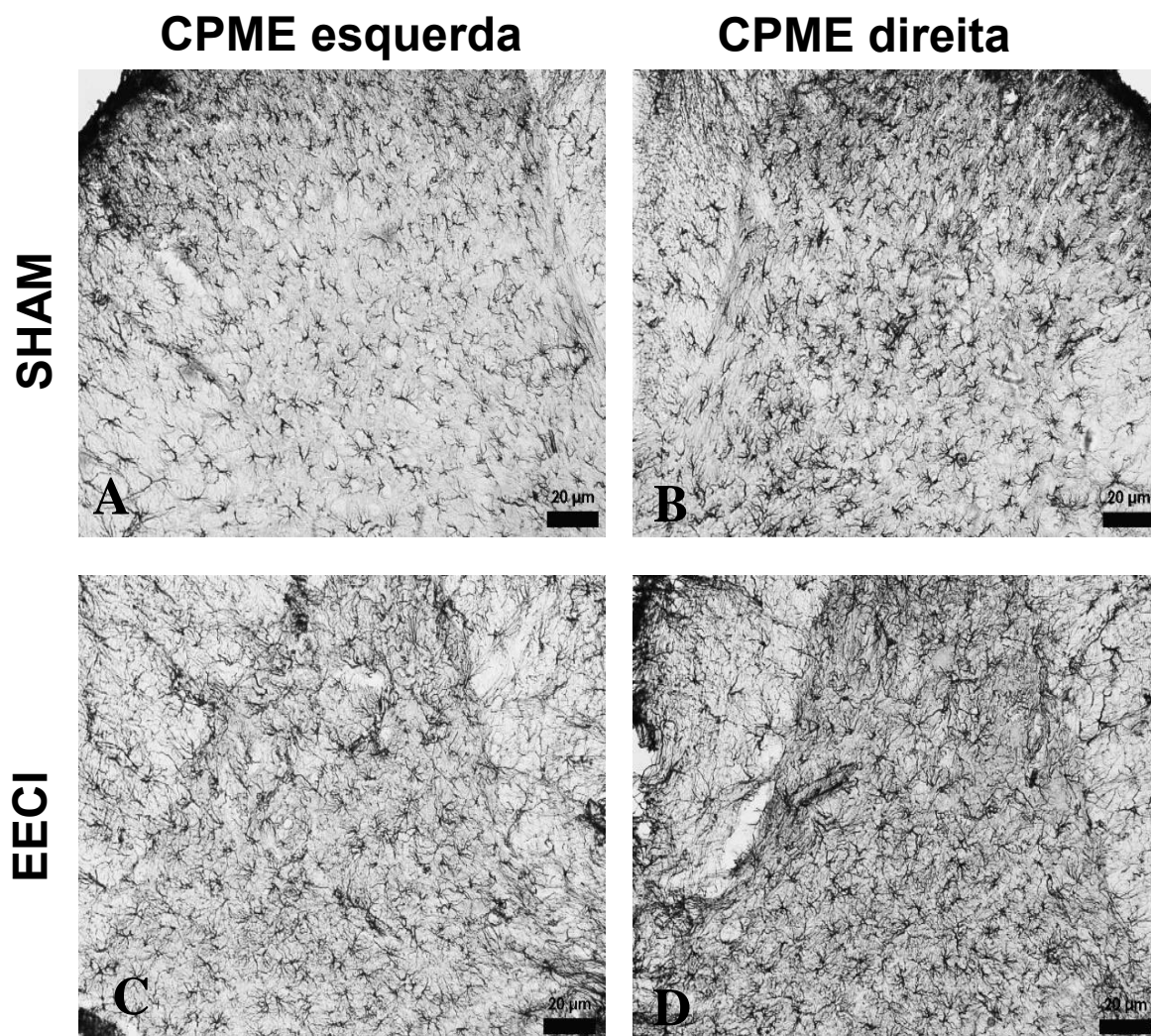
6.7 Efeito de cinco sessões de EECI a 60Hz sobre a imunomarcação de astrócitos na medula espinal de ratos com CCI

A imunorreatividade para GFAP foi analisada em cortes submetidos a imunohistoquímica da medula espinal. Imagens de cortes coronais de medula de rato representativas das regiões de interesse estão representados na Figura 16 em A, B, C e D.

A análise quantitativa da densidade óptica demonstrou que cinco sessões de EECI 60Hz aumentaram a imunomarcação de astrócitos na coluna posterior da medula espinal direita (CPME D); Figura 16 (coluna dorsal direita **SHAM**= $195,0 \pm 14,1$ vs **EECI**= $215,4 \pm 20,4$) quando comparados ao SHAM. (Figura 16).

Figura 16- Representação de imuno-histoquímica para GFAP na medula. Cortes coronais de medula SHAM (n=4) vs EECI (n=5) foram submetidos a imuno-histoquímica para a proteína GFAP. Imagens representativas da coluna posterior da medula espinal esquerda (A) e direita (B) de animais SHAM e esquerda (C) e direita (D) de animais EECI. Imagens obtidas em microscópio óptico e analisadas no programa ImageJ. Régua representativas de 20 μ m.

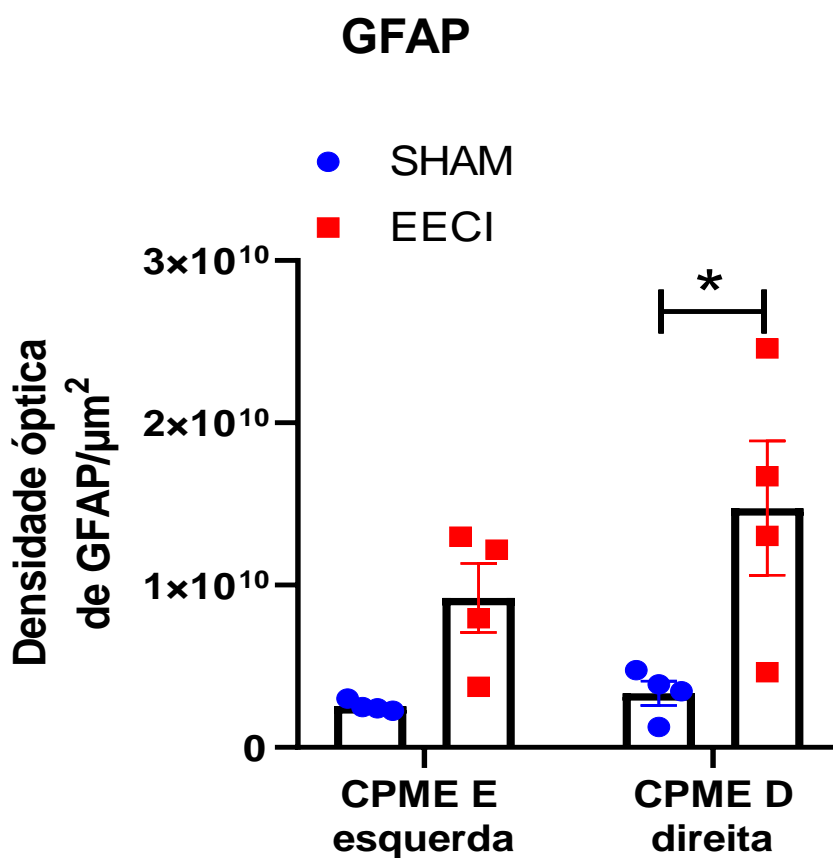
GFAP



Fonte: Autor (2020); Alonso-Matielo, H. (2020)

Figura 17- Efeito de cinco sessões de EECI sobre a imunomarcção de GFAP na medula.

Cortes coronais de medula EECI (n=4) e SHAM (n=5) foram submetidos a ensaio de imuno-histoquímica para GFAP. Imagens obtidas em microscópio óptico e a densidade óptica na medula foi quantificada utilizando-se o programa ImageJ, considerando-se suas divisões em CPME esquerda (CPME E) e direita (CPME D). Densidade óptica GFAP *p=0.0024 SHAM vs EECI (CPME D). Dados estão apresentados como média \pm e.p.m. Teste t não pareado ou ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni.



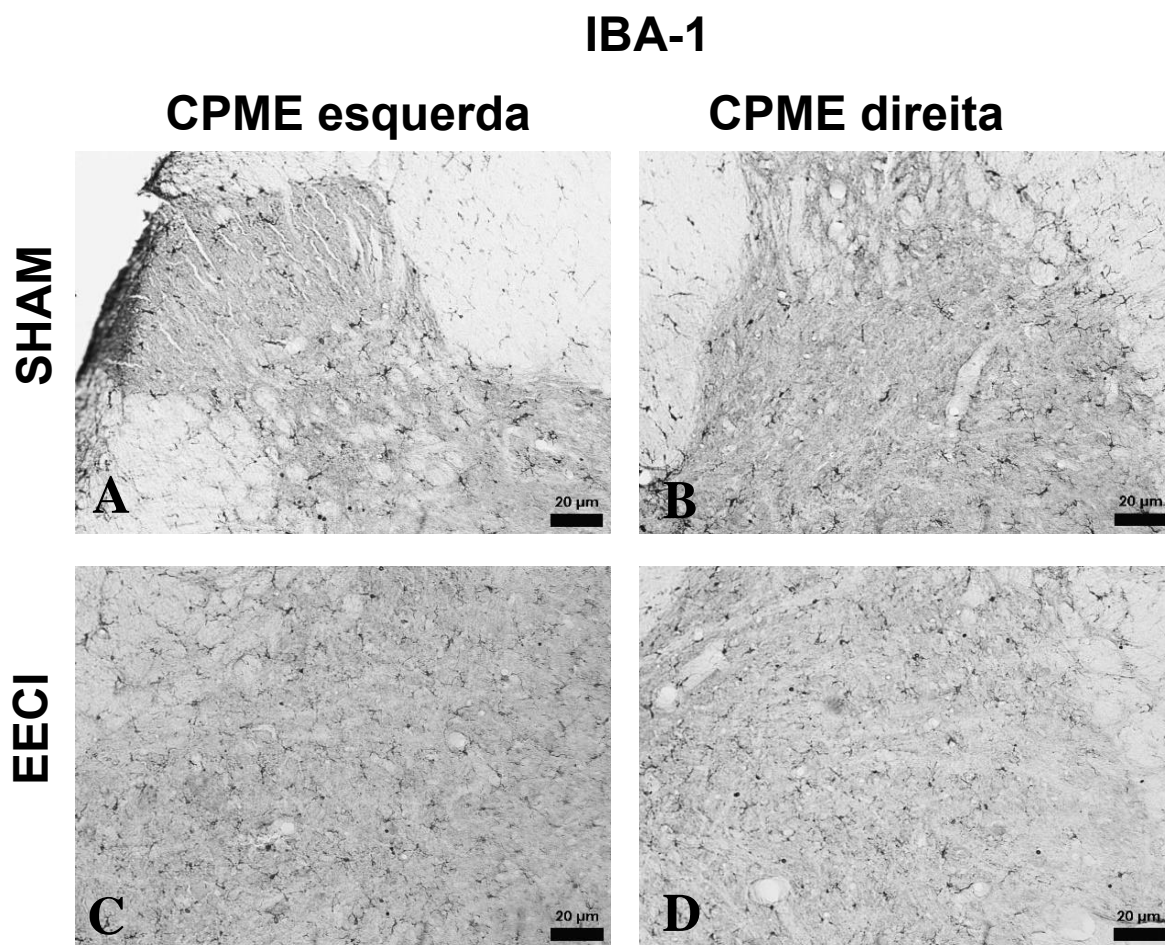
Fonte: Autor (2020); Alonso-Matielo, H. (2020)

6.8 Efeito de cinco sessões de EECI a 60Hz sobre a imunomarcção de microglia na medula espinal de ratos com CCI

A imunorreatividade para IBA foi analisada em cortes submetidos a imuno-histoquímica da medula espinal. Imagens de cortes coronais de medula de rato representativas das regiões de interesse estão representados na Figura 18 em A, B, C e D.

A análise quantitativa da densidade óptica demonstrou que cinco sessões de EECI 60Hz não influenciaram na imunomarcção de microglia na medula espinal em nenhum dos grupos avaliados. (Figura 18).

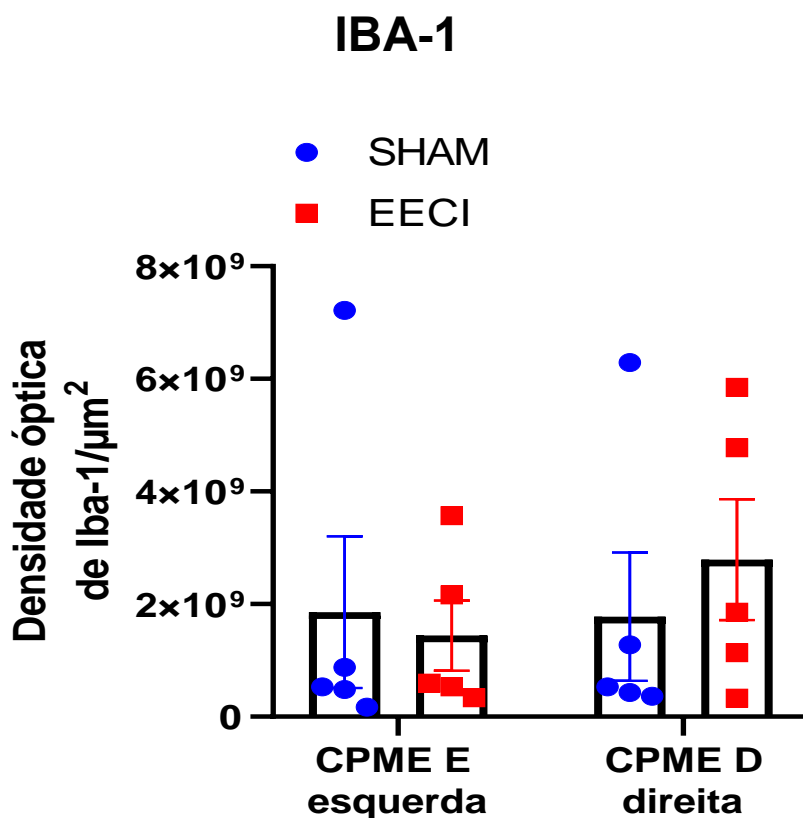
Figura 18- Representação de imuno-histoquímica para IBA na medula. Representação de imuno-histoquímica para IBA. Cortes coronais de medula. SHAM (n=3), EECI (n=3) foram submetidos a imuno-histoquímica para a proteína IBA. Imagens representativas da CPME esquerda (A) e CPME direita (B) de animais SHAM e CPME esquerda (C) e CPME direita (D) de animais EECI. Imagens obtidas em microscópio óptico e analisadas no programa ImageJ. Régua representativas de 20 µm.



Fonte: Autor (2020) Alonso-Matielo, H. (2020)

Figura 19- Efeito de cinco sessões de EECI sobre a imunomarcação de IBA na medula.

Cortes coronais de medula EECI (n=5) e SHAM (n=5) foram submetidos a ensaio de imuno-histoquímica para IBA. Imagens obtidas em microscópio óptico e a densidade óptica da medula foi realizada utilizando-se o programa ImageJ, considerando-se suas divisões em CPME esquerda (CPME E) e direita (CPME D). Dados apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni.



Fonte: Autor (2020); Alonso-Matielo, H. (2020)

7. Discussão

Estima-se que a dor crônica afete cerca 7 a 10% da população mundial (DE SOUZA, J.B. et al 2017). Apesar de haver progresso na compreensão de seus mecanismos básicos, poucos fármacos altamente eficazes foram descobertos nos últimos anos, o que resultou, em um uso excessivo de medicamentos opióides para tratamento de dores crônicas (VOLKOW, N.D. & MCLELLAN, 2016). Nesse contexto, o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas se faz necessário, sendo as técnicas de neuroestimulação bastante promissoras como um método de tratamento não farmacológico da dor. As técnicas de neuroestimulação na clínica médica têm provado ser eficientes no tratamento de diferentes tipos de dores crônicas que não respondem a métodos terapêuticos convencionais. Porém, considerando-se os alvos de estimulação atualmente empregados, córtex motor, PAG, núcleos talâmicos, substância cinzenta periventricular (PVG) e ACC (MO et al., 2019; MOISSET; LEFAUCHEUR, 2019), existe ainda uma parte dos pacientes tratados que não respondem nem mesmo a esse tipo de tratamentos, sendo que apenas uma parcela é beneficiada com o alívio da dor (CIAMP de ANDRADE et al.2012; GALHARDONI et al., 2015). Desta forma, sabendo da eficiência da neuroestimulação, torna-se crucial explorar novos alvos, bem como diferentes parâmetros de estimulação para o aprimoramento destas técnicas na clínica médica.

Nesse sentido a inocuidade da EMT da ínsula foi demonstrada quando aplicada em voluntários saudáveis, demonstrando que a ínsula é um alvo seguro para neuroestimulação no tratamento de dor (CIAMPI de ANDRADE et al, 2012).

O córtex insular vem sendo estudado com muito empenho pelo nosso grupo como alvo potencial para neuroestimulação, uma vez que possui conexões cerebrais recíprocas com áreas límbicas e áreas corticais associativas envolvidas na via descendente de dor (TRACEY; MANTYH 2007; LU et al., 2016;). Já foi demonstrado que uma sessão de estimulação elétrica do córtex insular (EECI) de ratos com CCI, aplicada na frequência de 60Hz por um período de 15 min, reverte a hipersensibilidade mecânica, sendo esse efeito dependente de receptores opióides e canabinóides do tipo 1 (DIMOV et al., 2018).

Neste trabalho avaliamos o efeito de diferentes frequências de estimulação sobre a sensibilidade dolorosa de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática afim de avaliar se a alteração de frequência poderia modificar o efeito antinociceptivo já observado. O primeiro passo para desenvolvimento deste projeto foi definir as frequências, mantendo os parâmetros de voltagem (1.0V), duração de pulso (210 μ s) e

tempo de estimulação (15min). Foram escolhidas as frequências de 10, 80 e 100 Hz além da frequência de 60 Hz que já apresenta resultados conhecidos. Os dados aqui obtidos demonstram que todas as frequências utilizadas foram capazes, de alguma forma, de modificar o perfil de sensibilidade dos animais.

No que se refere a frequência de 10 Hz, nossos resultados demonstraram reversão parcial da alodínia mecânica, sem nenhuma interferência na hiperalgesia mecânica ou térmica. Esses dados corroboram com dados da literatura que demonstram reversão parcial de alodínia mecânica, frente à estimulação do córtex pré-frontal de ratos submetidos a um modelo de dor crônica. Esses estudos demonstraram que frequências baixas, na faixa de 2Hz foram capazes de reverter a alodínia nos animais (ZHOU, HAOCHENG et al. 2019) e que estimulações abaixo de 50Hz são consideradas baixas (GEE LUCY et al, 2015; ZHOU, HAOCHENG et al. 2019), o que valida os resultados observados nesse trabalho em relação a reversão parcial da alodínia após aplicação de EECI 10Hz.

Em relação a frequência de 60Hz, os resultados demonstram que cinco sessões de EECI reverteram, de forma sustentada tanto a hiperalgesia mecânica quanto a hiperalgesia térmica observada nos animais com CCI. Menos eficaz, mas ainda positivo foi seu efeito sobre a alodínia mecânica, onde a frequência de 60Hz reverteu a alodínia observada, mas este efeito não se manteve por todo o período de avaliação, sendo necessária nova sessão de estimulação para que o efeito retornasse. A frequência de 60 Hz vem sendo utilizada por nosso grupo desde os ensaios iniciais de estimulação do córtex motor, em animais com CCI, sendo esta frequência segura para induzir analgesia sem induzir alterações motoras nos animais (FONOFF et al., 2009). Ainda, esta frequência já havia demonstrado eficácia também na estimulação do córtex motor em ratos com CCI (PAGANO et al., 2011). A eficácia da estimulação nessa frequência também já foi demonstrada em outro estudo, tendo como alvo a estimulação cerebral profunda de núcleos subtalâmicos, em pacientes com doença de Parkinson, onde foi possível observar uma melhora da função motora desses pacientes após a estimulação nessa frequência (MOREAU et al., 2008; KHOO 2014), o que demonstra que a estimulação cerebral na frequência de 60Hz vem sendo amplamente utilizada para diferentes finalidades, principalmente para induzir analgesia em casos de dores crônicas.

Na estimulação aplicada na frequência de 80Hz, foi possível observar que embora a mesma tenha interferido com todos comportamentos nociceptivos avaliados, a eficácia

não foi duradoura entre as sessões de estimulação. Por exemplo, alguns trabalhos sugerem que estimulações acima de 50Hz são consideradas altas frequências, sendo portando a frequência de 80Hz considerada alta frequência, porém as eficácias entre frequências diferentes podem variar muito de acordo com ajustes de parâmetros de voltagem e largura de pulso (ZHOU, HAOCHENG et al. 2019). Isso explica o que possa ter gerado essa variação, uma vez que só foram modificadas as frequências (Hz) de estimulação, enquanto os outros parâmetros permaneceram iguais aos utilizados e bem estabelecidos na EECI 60Hz.

Tem sido demonstrado, em modelos experimentais de estimulação cerebral que frequências mais elevadas como 100 e 150 Hz são eficazes na modulação de sensibilidade dolorosa térmica e mecânica em ratos submetidos a um modelo experimental de doença de Parkinson (GEE, LUCY E. et al 2015), nesse sentido nós submetemos os animais a um protocolo de EECI 100Hz e avaliamos as respostas comportamentais nos testes propostos no protocolo experimental e como resultado houve uma reversão pontual da hiperalgesia mecânica após cada sessão de EECI, havendo a diminuição desses limiares novamente antes da próxima sessão. A avaliação da alodínia demonstrou uma reversão parcial discreta em relação as outras frequências avaliadas, mas que se manteve durante todos os períodos avaliados. Em contrapartida, quando avaliados no teste de sensibilidade térmica, não ocorreu aumento nos limiares em nenhuma das avaliações.

Após a lesão do nervo periférico, ocorrem alterações em toda via de processamento de dor que contribuem para o desenvolvimento de hiperalgesia, alodínia e dor espontânea no decurso da dor neuropática (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; KUNER, FLOR, 2016). Observando os resultados acima demonstrados, independente da frequência utilizada e tempo de duração do efeito de cada uma, a EECI inibiu a hiperalgesia e alodínia, que são características da dor neuropática demonstrando que essa técnica interfere com esse tipo de dor.

De forma geral, podemos observar que diferentes frequências de EECI interferiram com a nocicepção dos animais, com eficácias variáveis, sendo evidente que os mecanismos que levaram a esses resultados precisam ser melhor investigados. É também importante considerar que a estimulação de estruturas encefálicas pode desencadear efeitos colaterais que não estejam relacionados com processo de modulação da nocicepção dos animais submetidos ao CCI, sendo assim, um outro objetivo deste trabalho consistiu em avaliar possíveis interferências das diferentes frequências de EECI

sobre a atividade locomotora dos animais submetidos ao modelo de CCI. Neste caso, a EECI à 10, 60, 80 ou 100Hz não interferiu nos parâmetros de levantar e locomoção avaliados no teste de campo aberto. Analisando os resultados observados até o momento, é interessante considerarmos que a EECI 60Hz parece ser a mais indicada, por induzir analgesia de forma sustentada em todos os períodos avaliados.

Para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nestes efeitos, analisamos através do ensaio de imuno-histoquímica a imunoreatividade de células gliais (astrócitos e microglia) presentes na PAG e medula espinal de ratos com CCI submetidos à EECI 60Hz.

Astrócitos e a microglia são ativados por sinais neuronais, incluindo a substância P, glutamato dentre outros. A ativação da glia por essas substâncias leva à liberação de mediadores químicos, incluindo citocinas pró-inflamatórias que são mediadores críticos da dor exacerbada (WIESELER-FRANK, J. et al, 2004), levando a sensibilização do SNC em diferentes níveis, evento que contribui para o desenvolvimento e manutenção de dor crônica após lesões no nervo periférico (SUZUKI et al., 2004; CHU, HAICHEN et al., 2012). Grande parte dos estudos experimentais relacionados a contribuição da ativação glial na indução e manutenção de dor neuropática foram investigados na medula espinal (BLACKBEARD et al., 2007; MILLIGAN e WATKINS, 2009). Os processos neuroplásticos na medula espinal facilitam a geração e condução de potenciais de ação pelas vias ascendentes até as estruturas supraespinhais, contribuindo para alterações sensoriais e comportamentais da dor.

A ativação das células gliais também já foi demonstrada na PAG de ratos após CCI (MOR et al., 2010, 2011). Atualmente é reconhecido que a PAG é um componente central na modulação descendente de dor, e projeta-se para o RVM e medula espinal (NI, HUA-DONG et al, 2016; FIELDS HL and BASBAUM AI 1978; BEHBEHANI MM and FIELDS HL;1979) sendo parte integrante do processo inibitório e facilitador dos sinais dolorosos principalmente em casos de dores crônicas (SAADE, NAYEF E.; JABBUR, SUHAYL J., 2008).

Para investigar a influência da EECI 60Hz sobre células gliais, especificamente astrócitos e microglia, a imunoreatividade de GFAP, um marcador astrocitário e IBA um marcador microglial, foram testados na PAG e medula de ratos com CCI através do teste de imuno-histoquímica.

Ao analisar a imunoreatividade para GFAP, não identificamos diferenças

significativas em relação a imunomarcção de astrócitos na PAG total. Em relação as análises das colunas da PAG podemos identificar uma diferença na imunoreatividade de GFAP nas colunas IPAG e vIPAG de animais submetidos a EECI quando comparados os grupos de animais SHAM, pontuando uma diminuição da imunoreatividade de GFAP nessas colunas.

Em contraste com os astrócitos, a diminuição da ativação das células microgliais avaliadas através da imunoreatividade de IBA-1 foi semelhante na IPAG e vIPAG de animais submetidos a EECI, sendo possível observar esse mesmo efeito na análise da PAG total quando comparados o grupo de animais submetidos a EECI e o grupo controle SHAM.

A ativação de astrócitos e microglia, principalmente nas colunas dIPAG e vIPAG de ratos após lesão do nervo isquiático por CCI, já estão bem estabelecidos na literatura quando comparados a ratos controle ou animais falso operados (LANE et al., 2004; LOVICK e BANDLER, 2005; MOR et al., 2010).

O vIPAG tem um papel importante no controle descendente da dor através de sua ligação a projeção espinhal do nervo ciático e conexão com RVM. Além do controle descendente, a coluna vIPAG têm projeções para muitas estruturas do SNC. É importante ressaltar que a vIPAG e suas projeções descendentes para RVM participam de um circuito neural para analgesia mediada por opioides (EIDSON e MURPHY, 2013 ; WILSON-POE et al., 2013).

Em nosso trabalho é possível observar que ocorre uma diminuição na imunomarcção das células gliais avaliadas após EECI nas colunas vIPAG e IPAG. A IPAG diferentemente da vIPAG coordena ativamente analgesia não opióide, comportamentos defensivos e tem efeito hipertensivo (BEHBEHANI 1995; BANDLER et al. 2000). Tomados em conjunto, esses dados corroboram com dados publicados na literatura evidenciando que células gliais ativadas da PAG tem um papel importante no processo de facilitação da dor descendente mediada pela dor neuropática (NI et al., 2016; DUBOVÝ, PETR et al., 2018; NI, HUA-DONG et al., 2019) e nossos resultados sugerem que a EECI esteja de fato interferindo na ativação de astrócitos e microglia na PAG.

A ativação de células da glia nos processos de dor neuropática induzem a sensibilização central dos neurônios espinhais localizados na CPME (OMANA-ZAPATA et al., 1997; WOOLF e MANNION, 1999; LIU et al., 2000; SCHAIBLE, 2007). Diante disso, outro objetivo desse trabalho foi analisar a imunoreatividade de

GFAP e IBA na medula espinal, considerando Coluna Posterior da Medula Espinal direita (CPMEd) e Coluna Posterior da Medula Espinal esquerda (CPMEe).

Diferente dos efeitos observados na PAG em relação a diminuição da imunomarcção de astrócitos e microglia, a EECI ocasionou aumento da imunoreatividade de GFAP na CPMEd do grupo estimulado em relação ao grupo controle SHAM não estimulado, sem interferir imunoreatividade de GFAP referente a CPMEe.

Em decorrência do aumento da expressão astrocitária nessa região frente a analgesia induzida pela EECI, estudos demonstram que a estimulação de alta frequência (HFS) pode ativar astrócitos e levar à liberação de gliotransmissores, que podem regular os neurônios circundantes na sinapse e que astrócitos ativados modulam a atividade sináptica, aumentando a ativação axonal através de redes neuronais, contribuindo para efeitos observados induzidos por estimulação cerebral profunda (DBS) (FENOY, Albert J. et al., 2014).

Esses dados podem ajudar a explicar os efeitos discrepantes observados em decorrência do aumento da ativação astrocitária na medula espinal de ratos com CCI ao mesmo tempo que ocorre uma inibição da ativação de astrócitos na PAG após a EECI. Postula-se ainda que astrócitos contribuem para a plasticidade sináptica por meio da potenciação de longo prazo (LTP) e diminuição (LTD), possivelmente ajudando a mediar os efeitos de longo prazo da DBS (HUBBLE, J. P. et al., 1996; FENOY, Albert J. et al., 2014), aumentando assim a atividade de receptores delta-opiíide em astrocitos e conferindo neuroproteção juntas (FENOY, Albert J. et al., 2014).

Os efeitos analgésicos induzidos pela EECI podem estar relacionados a essas mudanças plásticas nas interações gliais-neuronais em toda a rede por meio da inibição/ativação astrocitária observadas na PAG e medula espinal advindas da EECI

Diferentemente, não foi possível detectar alterações na imunomarcção para microglia nas CPMEd e CPMEe nos grupos SHAM e EECI submetidos a imunoreatividade de IBA, demonstrando não houve interferência da EECI na imunomarcção de micróglia na medula.

Assim, apesar dos dados disponíveis sobre alterações neuroplásticas em estruturas supraespinhais associadas à dor patológica induzida por lesão do sistema nervoso (BOADAS-VAELLO et al., 2017), os processos celulares e moleculares que ocorrem nessas estruturas como consequência de lesão de nervos periféricos ainda não são totalmente compreendidas. Para tanto, o presente trabalho foi desenhado para estudar a

influência de diferentes parâmetros de estimulação na analgesia induzida pela EECI, em ratos com lesão por CCI, bem como a modulação da ativação glial na PAG e medula espinal. Em conjunto os resultados apresentados reforçam a influência da ínsula na modulação da dor e seu potencial como alvo para abordagens de neuroestimulação em pesquisas básicas e clínicas no tratamento da dor neuropática.

Em suma, os resultados obtidos demonstraram que diferentes frequências de EECI 10, 60, 80 e 100Hz são capazes de influenciar a sensibilidade mecânica e térmica de animais com CCI, sendo que esses resultados também reforçam que a EECI 60Hz se mostrou mais eficaz induzir antinocicepção no modelo de dor neuropática quando comparada as outras frequências. Ainda, a EECI não gerou efeitos adversos sobre a atividade locomotora geral dos animais. Ainda, a EECI interferiu na ativação de astrócitos presentes na PAG, em especial IPAG e vIPAG na medula espinal de ratos com CCI, alterando também a ativação de micróglia na PAG neste mesmo modelo.

Esses dados reforçam a aplicabilidade da EECI como potencial tratamento para dor neuropática, mostrando o córtex insular posterior como área importante na dor neuropática.

8. Conclusões

A estimulação elétrica do córtex insular induz antinocicepção em ratos com CCI, sem afetar a atividade locomotora geral dos animais, por mecanismos que envolvem a inibição da ativação astrocitária e microglial na PAG e induz da ativação astrocitária na medula espectral.

APÊNDICES*

APÊNDICE A- Aprovação da CEUA 5874130618 do ICB/USP São Paulo, SP,
Brasil

Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Envolvimento da substância cinzenta periquedutal, de seus sistemas opióide, canabinoide e de células da glia na analgesia induzida pela estimulação elétrica do córtex insular de ratos com neuropatia periférica experimental", protocolada sob o CEUA nº 5874130618, sob a responsabilidade de **Camila Squarzon Dale e equipe; Elizamara Santos Gonçalves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 17/08/2018.

We certify that the proposal "Involvement of the periqueductal gray matter of its opioid, cannabinoid and glia cell systems in insular cortex stimulation-induced analgesia of rats with experimental peripheral neuropathy", utilizing 128 Heterogenics rats (128 males), protocol number CEUA 5874130618, under the responsibility of **Camila Squarzon Dale and team; Elizamara Santos Gonçalves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 08/17/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **24 meses**

Depto/Setor: **Anatomia**

Origem: **Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **280 a 340 g**

Linhagem: **Sprague Dowley**

N amostral: 128

São Paulo, 16 de setembro de 2019

Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 27/06/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/07/2020

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMA5897-2/2	Seminários Avançados do Programa de Ciências Morfofuncionais - Tópico VII	07/08/2018	19/11/2018	15	1	100	A	N	Concluída
BTC5751-4/8	Seminários em Biotecnologia II (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	15/08/2018	27/11/2018	30	2	100	A	N	Concluída
BMB5795-5/2	Neurociência Básica	13/09/2018	22/11/2018	120	8	100	A	N	Concluída
BMA5890-3/1	Tópicos Avançados em Biologia Morfofuncional I	12/03/2019	24/06/2019	15	1	100	A	N	Concluída
MNE5763-3/1	Avaliação Instrumentalizada em Dor: Uma Visão Crítica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	13/05/2019	02/08/2019	90	6	100	A	N	Concluída
BMH5767-3/3	Conceitos, Métodos e Diagnósticos em Biologia Tecidual	06/08/2019	18/11/2019	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCP5871-3/2	Tratamento de Dados em Estudo Científico (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	12/08/2019	18/08/2019	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
MCM5899-3/2	Fundamentos da Pesquisa Clínica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	02/09/2019	13/10/2019	60	4	91	A	N	Concluída
BMA5894-3/1	Neuromodulação da Dor	17/09/2019	15/10/2019	60	4	90	A	N	Concluída
MCP5884-1/3	Método Científico Aplicado à Pesquisa Clínica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	25/11/2019	01/12/2019	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
DPG5001-1/2	Atividades de Cultura e Extensão Universitária na Pós-Graduação (Pró-Reitoria de Pós-Graduação - Universidade de São Paulo)	02/03/2020	26/06/2020	30	2	100	A	N	Concluída

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMH5747-9/4	Tópicos Avançados em Biologia Celular e Tecidual I	04/03/2020	13/05/2020	60	4	100	A	N	Concluída

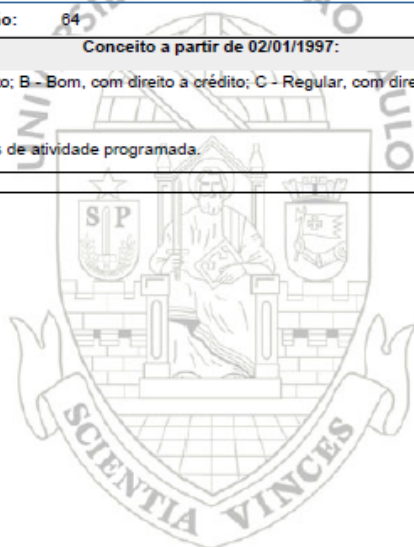
	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	14	32	32
Estágios:			
Total:	14	32	32

Créditos Atribuídos à Dissertação: 64

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.



Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo: <https://uspdigital.usp.br/iddigital>

Documento emitido às 23:58:49 horas do dia 14/11/2020 (hora e data de Brasília)

Código de controle: PI7T-EHYN-S6FV-EDYY

Código de controle válido até: 14/12/2020

Referências

ALVES, J. M.; LIN, K. Neuropathic Pain: A Review of Interneuronal Disinhibition. **Archives of Neuroscience**, v. 5, n. 1, 2018.

Alonso-Matielo, H., Gonçalves, ES, Campos, M., Oliveira, VR, Toniolo, EF, Alves, AS, ... & Dale, CS (2021). A estimulação elétrica da ínsula posterior induz analgesia mecânica em um modelo de roedor de dor neuropática por meio da modulação da sinalização gabaérgica e da atividade no circuito da dor. *Brain Research* , 1754 , 147237..

ADACHI, LAUREN NAOMI SPEZIA et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. **Brain research**, v. 1489, p. 17-26, 2012.

AUSTIN, P.J. et al. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 61, 2012.

BACKONJA, M. M. Defining neuropathic pain. **Anesthesia and Analgesia**, v. 97, n. 3, p. 785–790, 2003.

BANDLER, Richard et al. Circuitos centrais que medeiam a atividade autonômica padronizada durante o enfrentamento emocional ativo vs. passivo. **Boletim de pesquisa do cérebro**, v. 53, n. 1, pág. 95-104, 2000.

BASBAUM, A. I. et al. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. **Pain**, v. 47, n. 3, p. 359-367, 1991.

BEAR, M. F. et al. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. **Artmed Editora**, 2008

BECHARA, A.; DAMASIO, A. The somatic marker hypothesis: a neural theory of economic decision. **Games and Economic Behavior**, v. 52, p. 336-372, 2005.

BEHBEHANI, Michael M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in neurobiology**, v. 46, n. 6, p. 575-605, 1995.

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

BLACKBEARD, J. et al. Quantificação da resposta microglial espinhal de rato à lesão de nervo periférico, conforme revelado por análise de imagem imunohistoquímica e citometria de fluxo. **Journal of Neuroscience Methods** , v. 164, n. 2, pág. 207-217, 2007

BOADAS - VAELLO, Pere et al. Neuroplasticidade das estruturas supraespinhais associadas à dor patológica. **The Anatomical Record** , v. 300, n. 8, pág. 1481-1501, 2017.

BONICA, John J. et al. **Textbook of pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

- CACACE, F. et al. Intermittent theta-burst stimulation rescues dopamine-dependent corticostriatal synaptic plasticity and motor behavior in experimental parkinsonism: Possible role of glial activity. **Movement Disorders**, v. 32, n. 7, p. 1035-1046, 2017.
- CARRIVE, Pascal. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1-2, p. 27-47, 1993.
- CECHETTO, D. F.; SAPER, C. B. Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 262, p. 27-45, 1987.
- CHAPLAN, Sandra R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of neuroscience methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.
- CHOUCHOU, Florian et al. How the insula speaks to the heart: Cardiac responses to insular stimulation in humans. **Human Brain Mapping**, v. 40, n. 9, p. 2611-2622, 2019.
- CHU, Haichen et al. Efeito do receptor de melanocortina 4 cinza periaqueductal na facilitação da dor e ativação glial em modelo de rato de lesão por constrição crônica. **Pesquisa neurológica**, v. 34, n. 9, pág. 871-888, 2012.
- CIAMPI de ANDRADE, D. et al. Into the Island: A new technique of non-invasive cortical stimulation of the insula. **Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology**, v. 42, n. 6, p. 363-368, 2012.
- COGGESHALL, Richard E.; CARLTON, Susan M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Research Reviews**, v. 24, n. 1, p. 28-66, 1997.
- COLLINS, S. et al. NMDA Receptor Antagonists for the Treatment of Neuropathic Pain. **Pain medicine**, v. 11, n. 11, 2010
- COMOLI, Eliane et al. A direct projection from superior colliculus to substantia nigra for detecting salient visual events. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 974, 2003.
- COSTIGAN, M. et al. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual review of neuroscience**, v. 32, p. 1, 2009
- CRAIG, A. D.; DOSTROVSKY J. O. Medulla to thalamus. In: P.D.M. Wall, (Ed.), **Textbook of Pain**, London: Churchill Livingstone. p. 183-214. 1999.
- CRAIG, Cora L. et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. **Medicine & science in sports & exercise**, v. 35, n. 8, p. 1381-1395, 2003.
- CRUCCU, G. et al. EFNS guidelines on neurostimulation therapy for neuropathic pain. **European Journal of Neurology**, v. 14, n. 9, p. 952-970, 2007

DALE, Jahrane et al. Scaling up cortical control inhibits pain. **Cell reports**, v. 23, n. 5, p. 1301-1313, 2018.

DE LIMA, M. N. M. et al. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. **Experimental gerontology**, v. 40, n. 6, p. 506-511, 2005.

DIMOV, L.F. et al. Electrical stimulation of the insular cortex as a novel target for the relief of refractory pain: An experimental approach in rodents **Behavioural Brain Research**, v. 346, p. 86-95, 2018.

DUBOVÝ, Petr et al. Ativação de astrócitos e células microgлияis e suprarregulação CCL2 / CCR2 nos núcleos dorsolateral e ventrolateral da medula ventromedial cinza periaquedutal e rostral após diferentes tipos de lesão do nervo ciático. **Fronteiras em neurociência celular**, v. 12, p. 40, 2018.

EIDSON, Lori N.; MURPHY, Anne Z. A inflamação periférica persistente atenua a ativação das células gliais cinzentas periaquedutais induzida pela morfina e a tolerância analgésica em ratos machos. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 4, pág. 393-404, 2013.

FAGUNDES-PEREYRA, W. J. et al. Motor cortex electric stimulation for the treatment of neuropathic pain. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 68, n. 6, p. 923-929, 2010.

FAULL, Olivia K. et al. The midbrain periaqueductal gray as an integrative and interoceptive neural structure for breathing. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2019.

FONOFF, Erich Talamoni et al. Antinociception induced by epidural motor cortex stimulation in naive conscious rats is mediated by the opioid system. **Behavioural brain research**, v. 196, n. 1, p. 63-70, 2009.

FONTAINE, D. et al. Efficacy and safety of motor cortex stimulation for chronic neuropathic pain: critical review of the literature. **Journal of Neurosurgery**, v. 110, p. 251-256, 2009.

Ni H-D, Yao M, Huang B, Xu L-S, Zheng Y, Chu Y-X, Wang H-Q, Liu M-J, Xu S-J and Li H-B. Glial activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation of neuropathic pain through the p38 MAPK signaling pathway. *Journal of Neuroscience Research* 2016; 94: 50-61. DOI: 10.1002/jnr.23672.

GALHARDONI R. et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation in chronic pain: a review of the literature. **Arch Phys Med Rehabil**. 96(4):S156-72. 2015.

GARCIA-LARREA L. et al. Electrical stimulation of motor cortex for pain control: a combined PET-scan and electrophysiological study. **Pain**. 83: 259–73. 1999.

GARCIA-LARREA, L.; PEYRON, R. Pain matrices and neuropathic pain matrices: a review. **Pain**, v. 154, p. S29-S43, 2013.

GARRISON, et al. GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. **Experimental neurology**, v. 129, n. 2, p. 237-243, 1994.

GAURIAU, C.; BERNARD, J.-F. Posterior triangular thalamic neurons convey nociceptive messages to the secondary somatosensory and insular cortices in the rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 752-761, 2004.

GEE, Lucy E. et al. The effects of subthalamic deep brain stimulation on mechanical and thermal thresholds in 6 OHDA-lesioned rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 42, n. 4, p. 2061-2069, 2015.

GOGOLLA, N. The insular cortex. **Current Biology**, v. 27, n. 12, p. R580-R586, 2017.

GOSSELIN, Romain-Daniel et al. Glial cells and chronic pain. **The Neuroscientist**, v. 16, n. 5, p. 519-531, 2010.

HANSSON P. T. et al. Toward a definition of pharmacoresistant neuropathic pain. **Eur J Pain**.13(5):439-40. 2009.

HAYDON, Philip G. GLIA: listening and talking to the synapse. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 185, 2001.

HEAD, Henry; HOLMES, Gordon. Sensory disturbances from cerebral lesions. **Brain**, v. 34, n. 2-3, p. 102-254, 1911.

HUBBLE, JP et al. Estimulação cerebral profunda para tremores essenciais. **Neurology**, v. 46, n. 4, pág. 1150-1153, 1996.

HURLEY, K. M. et al. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 308, n. 2, p. 249-276, 1991.

IASP (International Association for the Study of Pain). IASP Taxonomy – Introduction to the 1986 list.(1986). Disponível em: <**IASP** 1986 [http://www.iasppain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResourceLinks/PainDefinitions/# Peripheralneuropathicpain](http://www.iasppain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResourceLinks/PainDefinitions/#Peripheralneuropathicpain)> Acesso em: 30.janeiro.2019

ISNARD, J. et al. Does the insula tell our brain that we are in pain? **Pain**.152(4):946-51. 2011.

JACOB, J. J. C.; RAMABADRAN, K. Enhancement of a nociceptive reaction by opioid antagonists in mice. **British journal of pharmacology**, v. 64, n. 1, p. 91-98, 1978.

JASMIN, L. et al. Analgesia and hyperalgesia from GABA mediated modulation of the cerebral cortex. **Nature**, v. 424, p. 316-320, 2003.

JASMIN, L.; WU, M.; OHARA, P. GABA puts a stop to pain. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**, v. 3, p. 487–505, 2004

JESSEL, T. M.; KELLY, D. D. Pain and Analgesia. In: KANDELL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. (Ed.) **Principles of Neural Science**, New York: Elsevier. p. 385-399. 1991.

JUNG, H.H. et al. Rostral Agranular Insular Cortex Lesion with Motor Cortex Stimulation Enhances Pain Modulation Effect on Neuropathic Pain Model. **Neural plasticity**, v. 2016, 2016.

KIM, Jong-Hyun et al. Yin-and-yang bifurcation of opioidergic circuits for descending analgesia at the midbrain of the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 43, p. 11078-11083, 2018.

KIM, S. K. et al. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. *The Journal of clinical investigation*, v. 126, n. 5, p. 1983-1997, 2016.

KLAUMANN, Paulo Roberto; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, Thiago. Patofisiologia da dor. **Archives of veterinary science**, v. 13, n. 1, 2008.

KLIT, H. et al. Central post-stroke pain : clinical characteristics, pathophysiology, and management. **Lancet Neurol.** 8, 857–868. 2009.

KUHAR, Michael J.; PERT, Candace B.; SNYDER, Solomon H. Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. **Nature**, 1973.

KUNER, R.; FLOR, H. Neural Circuits of Chronic Pain. **Neuroscience**, v. 387, p. 1–3, 2018

KUNER, Rohini; FLOR, Herta. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 20, 2017.

LAZORTHES, Y. et al. Motor cortex stimulation for neuropathic pain. In: *Operative Neuromodulation*. **Springer Vienna**. p. 37-44. 2007.

LEWIS, Vahn A.; GEBHART, G. F. Evaluation of the periaqueductal central gray (PAG) as a morphine-specific locus of action and examination of morphine-induced and stimulation-produced analgesia at coincident PAG loci. **Brain research**, v. 124, n. 2, p. 283-303, 1977.

LINNMAN, Clas et al. Neuroimaging of the periaqueductal gray: state of the field. **Neuroimage**, v. 60, n. 1, p. 505-522, 2012.

LIU, Jiao et al. Global DNA 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine contents are decreased in the early stage of hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 69, n. 1, p. 196-208, 2019.

LOVICK, Thelma; BANDLER, Richard. A organização do mesencéfalo cinza periaqueductal e a integração dos comportamentos de dor. In: **A neurobiologia da dor** . Oxford University Press, 2005.

LU, C. et al. Insular Cortex is Critical for the Perception, Modulation, and Chronification of Pain. **Neuroscience bulletin**, v. 32, n. 2, p. 191-201, 2016.

MA, Z. et al. Neuromodulators signal through astrocytes to alter neural circuit activity and behaviour. *Nature*, v. 539, n. 7629, p. 428, 2016.

MACHADO, A. G. et al. Cerebral stimulation for the affective component of neuropathic pain. *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface*, v. 16, n. 6, p. 514-518, 2013.

MACHELSKA, Halina; CELIK, Melih Ö. Recent advances in understanding neuropathic pain: glia, sex differences, and epigenetics. **F1000Research**, v. 5, 2016.

MANSOUR, Alfred et al. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 350, n. 3, p. 412-438, 1994.

MAZZOLA, L. et al., Somatotopic organization of pain responses to direct electrical stimulation of the human insular cortex. **Pain**, v. 146, n. 1, p. 99-104, 2009.

MAZZOLA, Laure et al. Vestibular responses to direct stimulation of the human insular cortex. **Annals of neurology**, v. 76, n. 4, p. 609-619, 2014.

MELZACK, R. et al. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-979, 1965.

MESULAM, M.-Marsel; MUFSON, Elliott J. Insula of the old world monkey. III: Efferent cortical output and comments on function. **Journal of Comparative Neurology**, v. 212, n. 1, p. 38-52, 1982.

MILLAN, Mark J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MILLIGAN, Erin D.; WATKINS, Linda R. Papéis patológicos e protetores da glia na dor crônica. **Nature reviews neurcience**, v. 10, n. 1, pág. 23-36, 2009.

MONAI, H. et al. Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. **Nature communications**, v. 7, p. 11100, 2016.

MOISSET, Xavier; LEFAUCHEUR, J.-P. Non pharmacological treatment for neuropathic pain: Invasive and non-invasive cortical stimulation. **Revue neurologique**, v. 175, n. 1-2, p. 51-58, 2019.

MOORE, N. Z. et al. Central neuromodulation for refractory pain. **Neurosurgery Clinics**, v. 25, n. 1, p. 77-83, 2014.

MORAGA-AMARO, R.; STEHBERG, J. The Insular Cortex and the Amygdala: Shared Functions and Interactions. In: FERRY, B. (Ed.). **The Amygdala – A Discrete Multitasking Manager**. Rijeka: InTech. p. 231-256. 2012.

NAMKUNG, H.O. et al. The Insula: An Underestimated Brain Area in Clinical Neuroscience, Psychiatry, and Neurology. **Trends in Neurosciences**, 2017.

NGUYEN, J.P. et al. Motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic pain. **Archives of Medical Research**, v. 31, n. 3, p., 263-265, 2000.

NI, H. et al. Glial activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation of neuropathic pain through the p38 MAPK signaling pathway. **Journal of neuroscience research**, v. 94, n. 1, p. 50-61, 2016.

NIEUWENHUYIS, Rudolf. **Chemoarchitecture of the Brain**. Springer Science & Business Media, 2012.

NORTH, R. ALAN; EGAN, TERRY M. Actions and distributions of opioid peptides in peripheral tissues. **British medical bulletin**, v. 39, n. 1, p. 71-75, 1983.

OSSIPOV, M.H. et al. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779-3787, 2010.

OMANA-ZAPATA, Imelda et al. A tetrodotoxina inibe a atividade ectópica neuropática em neuromas, gânglios da raiz dorsal e neurônios do corno dorsal. **Pain**, v. 72, n. 1-2, pág. 41-49, 1997.

PAGANO, Rosana L. et al. Transdural motor cortex stimulation reverses neuropathic pain in rats: a profile of neuronal activation. **European Journal of Pain**, v. 15, n. 3, p. 268. e1-268. e14, 2011.

PALAZZO, Enza et al. Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. **Molecular pain**, v. 6, n. 1, p. 66, 2010.

PAXINOS, G. W.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: **Academic Press**, 2005.

PEYRON, R. et al. Functional imaging of brain responses to pain. A review and metaanalysis. **NeurophysiolClin**, v. 30, p. 263-288, 2000.

QIU, S. et al. An increase in synaptic NMDA receptors in the insular cortex contributes to neuropathic pain. **Sci. Signal.**, v. 6, n. 275, p. ra34-ra34, 2013.

QUINTERO, G. C. Advances in cortical modulation of pain. **Journal of pain research**, v. 6, p. 713, 2013.

RAINOV, N.G. et al. Epidural electrical stimulation of the motor cortex in patients with facial neuralgia. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 99, n. 3, p. 205-209, 1997.

RAJA, Srinivasa N. Peripheral mechanisms of nociception. **Text book of Pain**, p. 11-57, 1999. RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity

on inflamed tissue. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 111, n. 4, p. 409-419, 1957.

RAJA, Srinivasa N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, 2020

REINECKE, Holger et al. Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence. **European heart journal**, v. 36, n. 15, p. 932-938, 2015.

REN, K. Emerging role of astroglia in pain hypersensitivity. **Japanese Dental Science Review**, v. 46, n. 1, p. 86-92, 2010.

REYNOLDS, David V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, n. 3878, p. 444-445, 1969.

RODGERS, K.M et al. Auditory, somatosensory, and multisensory insular cortex in the rat. **Cerebral Cortex**, v. 18, p. 2941- 2951, 2008.

SAADE, Nayef E.; JABBUR, Suhayl J. Comportamento nociceptivo em modelos animais para neuropatia periférica: mecanismos espinhais e supraespinhais. **Progress in neurobiology** , v. 86, n. 1, pág. 22-47, 2008.

SANDKÜHLER, J. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. **Progress in neurobiology**, v. 50, n. 1, p. 49-81, 1996.

SATO, F.A. et al. Projections from the insular cortex to pain-receptive trigeminal caudal subnucleus (medullary dorsal horn) and other lower brainstem areas in rats. **Neuroscience**, v. 233, p. 9-27, 2013.

SCHAIBLE, Hans-Georg; RICHTER, Frank. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's archives of surgery**, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SENAPATI, C.J. et al. Electrical stimulation of the primary somatosensory cortex inhibits spinal dorsal horn neuron activity. **Brain Research**, v. 1057, n. 1, p. 134-140, 2005a.

SENAPATI, C.J. et al. Spinal dorsal horn neuron response to mechanical stimuli is decreased by electrical stimulation of the primary motor cortex. **Brain Research**, v. 1036, p. 173-9, 2005b.

SHI, C.; CASSELL, M. Cascade projections from somatosensory cortex to the rat basolateral amygdala via the parietal insular cortex. **Journal of Comparative Neurology**, v. 399, p. 469-491, 1998b.

SILVA, G.D. et al. The spinal anti-inflammatory mechanism of motor cortex stimulation: cause of success and refractoriness in neuropathic pain? **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 10, 2015.

SOLER, Maria Dolors et al. Effectiveness of transcranial direct current stimulation and visual illusion on neuropathic pain in spinal cord injury. **Brain**, v. 133, n. 9, p. 2565-2577, 2010.

SOUZA, Juliana Barcellos de et al. Prevalence of chronic pain, treatments, perception, and interference on life activities: Brazilian population-based survey. **Pain Research and Management**, v. 2017, 2017.

SUZUKI, Mitsuo et al. As atividades no córtex frontal e o desempenho da marcha são modulados pela preparação. Um estudo fNIRS. **Neuroimage**, v. 39, n. 2, pág. 600-607, 2008.

STAROWICZ, Katarzyna; FINN, David P. Cannabinoids and pain: sites and mechanisms of action. In: **Advances in Pharmacology**. Academic Press, 2017. p. 437-475.

STARR, C.J. et al. Roles of the insular cortex in the modulation of pain: insights from brain lesions. **The Journal of Neuroscience**, v.29, n. 9, p. 2684-2694, 2009.

STEHBERG, J. et al. The visceral sector of the thalamic reticular nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 106, p. 745-755.39. 2001.

TAN, L. L. et al. A pathway from midcingulate cortex to posterior insula gates nociceptive hypersensitivity. **Nature neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 1591, 2017.

TATEM, K. S. et al. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 91, 2014.

TERRY, W. S. Habituation and dishabituation of rats' exploration of a novel environment. **Animal Learning & Behavior**, v. 7, n. 4, p. 525-536, 1979.

TOBALDINI, Glaucia et al. Dopaminergic mechanisms in periaqueductal gray-mediated antinociception. **Behavioural pharmacology**, v. 29, n. 2, p. 225-233, 2018.

TRACEY, Irene; MANTYH, Patrick W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 377-391, 2007.

TREEDE, Rolf-Detlef. The International Association for the Study of Pain definition of pain: as valid in 2018 as in 1979, but in need of regularly updated footnotes. **Pain reports**, v. 3, n. 2, 2018.

TRIPPE, J. et al. Theta burst and conventional low-frequency rTMS differentially affect GABAergic neurotransmission in the rat cortex. **Experimental brain research**, v. 199, n. 34, p. 411, 2009.

TSUBOKAWA et al. Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain. **Acta Neurochirurgica**, v. 52, 1991.

VAN HECKE, O. et al. Torrance, N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. **PAIN®**, v. 155, n. 4, p. 654-662, 2014.

VOLKOW, Nora D.; MCLELLAN, A. Thomas. Opioid abuse in chronic pain—misconceptions and mitigation strategies. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 13, p. 1253-1263, 2016.

WANG, H. et al. Identification of an adenylyl cyclase inhibitor for treating neuropathic and inflammatory pain. **Science translational medicine**, v. 3, n. 65, p. 65ra3-65ra3, 2011.

WATKINS, Linda R.; MILLIGAN, Erin D.; MAIER, Steven F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends in neurosciences**, v. 24, n. 8, p. 450-455, 2001.

WIESELER-FRANK, J. et al. Glial activation and pathological pain. **Neurochemistry international**, v. 45, n. 2-3, p. 389-395, 2004.

WILSON-POE, Adrienne R. et al. The periaqueductal gray contributes to bidirectional enhancement of antinociception between morphine and cannabinoids. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 3, p. 444-449, 2013.

WOOLF, Clifford J.; MANNION, Richard J. Dor neuropática: etiología, síntomas, mecanismos e manejo. **A lanceta**, v. 353, n. 9168, pág. 1959-1964, 1999.

WYNFORD-THOMAS, R.; POWELL, R. Navigating the Island of Reil: how to understand the insular cortex. 2017

YAKSH, Tony L. et al. The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 7680-7686, 1999.

YAMASHITA, Akira et al. Astrocytic activation in the anterior cingulate cortex is critical for sleep disorder under neuropathic pain. **Synapse**, v. 68, n. 6, p. 235-247, 2014.

YAN, Y. YI et al. Research progress of mechanisms and drug therapy for neuropathic pain. **Life Sciences**, v. 190, n. September, p. 68–77, 2017.

YIN, Q. et al. Spinal NF- κ B and chemokine ligand 5 expression during spinal glial cell activation in a neuropathic pain model. **PloS one**, v. 10, n. 1, p. e0115120, 2015.

YOON, B. E.; WOO, J.; LEE, C. J. Astrocytes as GABA-ergic and GABA-ceptive cells. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 11, p. 2474–2479, 2012.

ZHOU, Haocheng et al. A novel neuromodulation strategy to enhance the prefrontal control to treat pain. **Molecular pain**, v. 15, p. 1744806919845739, 2019.

ZHUO, M. Contribution of synaptic plasticity in the insular cortex to chronic pain. **Neuroscience**, v. 338, p. 220–229, 2016.

ZHUO, M. Cortical excitation and chronic pain. **Trends in neurosciences**, v. 31, n. 4, p. 199207, 2008.

----- *De acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.