

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

HELOÍSA ALONSO MATIELO

**ESTUDO DA MODULAÇÃO GABAÉRGICA NA CIRCUITARIA
ENVOLVIDA NA ANALGESIA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA DO CÓRTEX INSULAR**

São Paulo

2020

HELOÍSA ALONSO MATIELO

**ESTUDO DA MODULAÇÃO GABAÉRGICA NA CIRCUITARIA
ENVOLVIDA NA ANALGESIA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA DO CÓRTEX INSULAR**

Versão Corrigida

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto

São Paulo

2020

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)

Alonso Matielo , Heloisa
ESTUDO DA MODULAÇÃO GABAÉRGICA NA CIRCUITARIA
ENVOLVIDA NA ANALGESIA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO
ELÉTRICA DO CÓRTEX INSULAR / Heloisa Alonso Matielo ;
orientador Camila Squarzoni Dale ; coorientador
Luiz Roberto Giorgetti de Britto . -- São Paulo,
2020.

146 p.

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

1. Dor neuropática. 2. Córtex Insular . 3.
Estimulação elétrica . 4. GABA . 5. Optogenética .
I. Squarzoni Dale , Camila , orientador. II.
Roberto Giorgetti de Britto , Luiz , coorientador.
III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Heloísa Alonso Matielo

Título da Dissertação: Estudo da modulação GABAérgica na circuitaria envolvida na analgesia induzida pela estimulação elétrica do córtex insular

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:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da modulação gabaérgica na circuitaria envolvida na analgesia induzida pela estimulação elétrica do córtex insular", protocolada sob o CEUA nº 3447131117, sob a responsabilidade de **Camila Squarzoni Dale e equipe; Heloísa Alonso Matielo** - 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 do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 05/12/2017.

We certify that the proposal "Study of the gabaergic circuitry involved on insular cortex stimulation-induced analgesia", utilizing 144 Heterogenics rats (144 males), protocol number CEUA 3447131117, under the responsibility of **Camila Squarzoni Dale and team; Heloísa Alonso Matielo** - 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 12/05/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: 30 meses

Depto/Setor: Anatomia

Origem: [Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP](#) □ [Prof. Dra. Zuleica Bruno Fortes](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade ou peso: [280 a 340 g](#)

Linhagem: [Sprague-Dawley](#)

N amostral: [144](#)

São Paulo, 05 de dezembro de 2017



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-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: "Estudo da modulação gabaérgica na circuitaria envolvida na analgesia induzida pela estimulação elétrica do córtex insular".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 000386)

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** a Emenda (versão de 04/setembro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Emenda ao projeto CEUA 3447131117 para certificar experimentos de estágio BEPE-Fapesp. Neste projeto BEPE, adicionalmente, temos por objetivo avaliar a presença de projeções gabaérgicas; parvalbumina (PV +); e glutamatérgicas da ínsula posterior ao ACC, bem como sua ativação e excitabilidade neuronal em um modelo de dor neuropática, além de analisar a influência da manipulação optogenética de tais projeções na nocicepção mecânica e dor espontânea de animais submetidos ao modelo de lesão parcial do nervo isquiático (Spared Nerve Injury- SNI). Camundongos machos, 7-8 semanas de idade geneticamente modificados Cre, GAD2-cre: Gad2tm2(cre)Zjh/J; PV-cre: B6;129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J; Vglut2-cre:368 Slc17a6 tm2(cre)Lowl/J (obtidos de Jackson Laboratories) serão cruzados com camundongos carregando o gene repórter tdTomato Ai9: B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze 369/J para marcação dos neurônios gabaérgicos (GAD2-cre x Ai9), parvalbumina (PV-cre x Ai9) e glutamatérgicos (Vglut2-cre x Ai9) e submetidos à cirurgia de SNI e traçador toxina colérica subunidade b (CTB488-Thermo Fisher Scientific) será injetada no ACC para marcação retrógrada de projeções entre a ínsula posterior e ACC. Cortes coronais da ínsula posterior submetidas a ensaio de imunofluorescência para c-Fos e analisadas em microscopia confocal. Cortes coronais da ínsula de animais PV-cre x Ai9, serão submetidos ainda processados para registro eletrofisiológico in vitro. Para análise optogenética, animais GAD2-cre, PV-cre e Vglut2-cre submetidos ao SNI receberão injeção de títulos virais para a expressão de opsinas na ínsula posterior direita, e/ou no ACC direito, e uma fibra óptica (Thorlabs) será implantada no córtex insular direito ou ACC direito. 5 a 8 semanas após a injeção de vírus, animais serão submetidos a optoestimulação (DPSS lasers- azul 472 nm, 5mW, 10Hz e/ou 40Hz ou amarelo 589 nm, 5mW, 10Hz. Laserglow Technologies, Ontario) e avaliados nos testes de sensibilidade mecânica (anestesiômetro digital plantar- Digital Plantar Anesthesiometer -DPA) e teste de preferência condicionada ao lugar (Conditioned Place Preference- CPP). Amostras de encéfalo serão coletadas após perfusão transcardíaca para análise de expressão viral em microscopia confocal. "

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



Date: Wednesday, June 26, 2019 1:19:18 PM

Print

Close

View: SF - Identification & Key Personnel

Getting Started - Identification & Key Personnel

If you need help, refer to the "?".

As you complete this form, you can save your work, exit and come back at any time. Please save your work often.

BE AWARE that while some navigation features in this form will prompt you to save, if you click the '**Back**' Button either in this form or in your web-browser before saving your work, you will lose any changes you have made to that page.

People named on this application will be able to access the application and can assist in its completion. However, only the Primary Applicant named in item 4.0 can submit.

NOTE: by listing people on this first page, you will be providing them with the ability to see limited information about your personal contact information, your training and experience, and any project funding records you have registered under your name with Research Services.

(* indicates a required field)

1.0 * Purpose of Application:
Fourth year electronic Resubmission only

1.1 Electronic Application Id: AC12-0198

2.0 * Short (abbreviated) Title:
Prefrontal and related brain circuits of pain

3.0 * Formal Title: (This title will appear on official documentation)
Optogenetic interrogation of prefrontal and related brain circuits in Modulation of pain

(NOTE: For *Research Protocols* tied to funding managed by Research Services, keeping this title consistent with the title used in funding applications greatly assists in post-approval management.)

4.0 * Primary Applicant:
Gerald Zamponi

Dedico este trabalho ao Dr. Zizhen Zhang, co-orientador do meu mestrado sanduíche na Universidade de Calgary, Canadá, um mestre e um grande amigo. Obrigada, Zizhen, por ensinar-me, não apenas as ciências, mas também que com foco e humildade, tudo em que acreditamos podemos fazer acontecer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ricardo e Adriana, por estarem ao meu lado em cada momento deste caminho, entendendo e me aconselhando naqueles mais difíceis, e comemorando naqueles vitoriosos. Por sempre me incentivar, dar todo suporte, e me lembrar de que querer é poder.

Agradeço a Deus e a meu anjo da guarda, por estarem ao meu lado, me guiando até meus sonhos, me garantindo ter coragem e fé para alcançá-los no momento certo.

Agradeço às minhas amigas Larissa, Fernanda e Pamela, por cada mensagem de carinho.

Agradeço a meus amigos Rogério e Fernanda pelo apoio, por acreditarem e confiarem em mim e por fazerem da vida mais leve e divertida.

Agradeço às minhas amigas que guardo no coração desde a graduação, Karina, Thaís, Juliana, Carol, Suzane e Marina. Obrigada pelo apoio e por acreditarem em mim sempre. Vocês são únicas e 100% eficientes.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder dois meses de bolsa de Mestrado, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), em colaboração com a CAPES, pela bolsa de Mestrado outorgada. Agradeço à FAPESP e à CAPES pela bolsa BEPE de estágio no exterior (Universidade de Calgary, Canadá) que me possibilitou vivenciar uma oportunidade enriquecedora.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas, todos os funcionários e professores e amigos da pós-graduação e do Instituto de Ciências Biomédicas, em especial dos Departamentos de Anatomia e de Fisiologia e Biofísica, que durante meu mestrado prestaram todo o apoio necessário nas atividades da pós-graduação.

Agradeço aos professores que de diversas formas colaboraram para a realização de experimentos deste trabalho: Professora Renata Giorgi (Instituto Butantan), Professor Ivo Lebrun (Instituto Butantan) e Professora Helenice de Souza Spinosa (Faculdade de Medicina Veterinária da USP).

Agradeço a meu amigo Adilson, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/USP, pelo seu tempo, ajuda em experimentos, conversas, risadas e amizade. Agradeço à Aninha, também do Departamento, por sua amizade contagiante.

Agradeço a meus amigos do Laboratório de Neuromodulação da Dor, Victória, Elizamara, Inaeh, João, Victhor, Elaine, Bia, Giancarlo, Elia, pela ajuda, parceria, companheirismo, discussões afins e, pela amizade, que permite que o laboratório e a pós-graduação sejam tão especiais e únicos quanto devam ser.

Agradeço imensamente a meu orientador do mestrado sanduíche na Universidade de Calgary, Canadá, Professor Gerald Zamponi, meu co-orientador Dr. Zizhen Zhang e todos do laboratório, Eder, Ale, Ivana, Junting, Lina, Shuo, Charlie, e minha colega Reese, por me acolherem e ensinarem com tanto empenho e carinho. Sou grata e honrada por ter tido a oportunidade de estar com vocês.

Agradeço a meu co-orientador, Professor Luiz Roberto G. de Britto, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/USP, por prontamente aceitar em co-orientar e colaborar na realização deste trabalho de mestrado. Por acreditar no meu trabalho e apoiar-me desde a graduação e abrir as portas de seu laboratório para a realização dos experimentos.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Professora Camila Squarzoni Dale, pelas oportunidades infinitas. Por cada lição, paciência e encorajamento que me fizeram crescer. Por sempre estar disponível para me orientar com sabedoria e alegria neste caminho, desde a graduação, me ajudando e me permitindo construir minha própria carreira.

A todos os demais que não estão aqui nomeados, meus amigos e minha família, que fizeram e fazem parte desta jornada, e permitem que cada dia seja especial.

Obrigada!

“I only hope that we never lose sight of one thing - that it was all started by a mouse”.

(Walt Disney)

RESUMO

ALONSO-MATIELO, H. **Estudo da modulação GABAérgica na circuitaria envolvida na analgesia induzida pela estimulação elétrica do córtex insular**. 2020. 146 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas- Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A dor neuropática apresenta-se como uma das condições mais difíceis ao tratamento antálgico, por ganhar um caráter crônico e implicar na qualidade de vida geral, o que faz necessário novos tratamentos eficazes. A neuroestimulação é capaz de alterar a atividade das vias modulatórias de dor, potencialmente promovendo analgesia. A Estimulação Elétrica do Córtex Insular (EECI) induz antinocicepção e influencia a atividade neuronal de áreas encefálicas, indicando o córtex insular como alvo iminente para modulação da dor. Este trabalho teve por objetivo avaliar a participação da transmissão GABAérgica na antinocicepção promovida pela EECI repetitiva, avaliar alterações neuroplásticas e em células astrocíticas, bem como avaliar a presença e participação de projeções excitatórias e inibitórias entre o córtex insular posterior e o córtex do cíngulo anterior (ACC) modulatórias de dor. Ratos machos, Sprague Dawley (280-340g; CEUA 3447131117), submetidos à constrição crônica do nervo isquiático direito (CCI) receberam um eletrodo concêntrico no córtex insular posterior esquerdo (1.0 mm caudal ao bregma, 5.8 mm de lateralidade, 7.1 mm de profundidade) e foram submetidos a cinco estimulações consecutivas, diárias (15 min, 60 Hz, 210 μ s, 1V). Metiodeto de bicuculina, antagonista de receptores GABA_A, (0.1 μ g, i.t) administrado 1 h antes do teste de pressão de pata induziu reversão da antinocicepção induzida pela EECI, sem alterar a atividade geral no teste de campo aberto. Aumento de GAD65 no córtex insular posterior após EECI foi observado por imunofluorescência, sem alterações de GFAP, sinaptofisina e tirosina-hidroxilase (TH) o córtex insular posterior, hipocampo, cíngulo anterior e medial, Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) e Bulbo Rostral Ventromedial (RVM). A análise por western blotting não revelou alterações de GAD65 após EECI. Níveis de GABA, glutamato e glicina analisados por cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatograph*- HPLC) não se alteraram após EECI no córtex insular posterior. Em colaboração com a Universidade de Calgary, camundongos GAD2CrexAi9, PVCrexAi9, Vglut2CrexAi9 foram submetidos à lesão parcial do nervo isquiático esquerdo (*Spared Nerve Injury*- SNI) e à injeção de traçador toxina colérica (CTB488). Foi demonstrado a presença de projeções GABAérgicas,

parvalbumina positivas (PV+) e glutamatérgicas entre o córtex insular posterior e o ACC, as quais não se apresentaram ativadas por c-Fos em ensaio de imunofluorescência. Camundongos GAD2Cre, PVCre, e Vglut2Cre receberam títulos com vetor viral para expressão de opsina (pAAV9-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-eYFP) no córtex insular posterior direito e uma fibra óptica foi implantada no córtex insular posterior (0.5 mm posterior ao bregma, 0.375 de lateralidade, 4.0 mm de profundidade) ou ACC direitos (1.055 mm anterior ao bregma, 0.255 mm de lateralidade, 1.522 mm de profundidade). Animais foram submetidos ao SNI e 6 ou 8 semanas após a injeção do vírus, à optostimulação (laser azul DPSS 472 nm, 5mW, 10Hz ou 40Hz). A ativação optogenética de neurônios PV+ induziu preferência condicionada ao lugar, sem alterar o limiar mecânico no teste de sensibilidade mecânica (anestesiômetro digital plantar- *Digital Plantar Anesthesiometer* –DPA). Os resultados salientam que a sinalização GABAérgica participa parcialmente da analgesia induzida pela EECI bem como demonstram a presença de projeções GABAérgicas, PV+ e glutamatérgicas entre o córtex insular posterior e o ACC, e sua influência sobre a modulação da dor em modelos de dor neuropática.

Palavras- chave: Dor neuropática. Córtex insular. Estimulação elétrica. GABA.Optogenética.

ABSTRACT

ALONSO-MATIELO, H. **Estudo da modulação GABAérgica na circuitaria envolvida na analgesia induzida pela estimulação elétrica do córtex insular.** 2020. 146 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas- Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Neuropathic pain presents itself as one of the most difficult conditions for antalgic treatment, as it has a chronic character and impairs the general quality of life, which requires brandnew effective treatments. Neurostimulation has the ability to alter the activity of pain modulatory pathways, potentially promoting analgesia. In this context, it has been demonstrated that electrical stimulation of the insular cortex (ESI) induces antinociception as well as it influences neuronal activity of brain areas, pointing insular cortex as an imminente target for pain modulation. Herein, we aimed to evaluate the participation of GABAergic neurotransmission in repetitive ESI antinociceptive effects, to evaluate neuroplasticity and astrocytic cell alterations, as well as assess the presence and participation of excitatory and inhibitory projections between the insular cortex and the anterior cingulate cortex (ACC). Male Sprague Dawley rats (280-340g; CEUA 3447131117) submitted to chronic constriction of the sciatic nerve in the right side (CCI) received a concentric electrode on the left posterior insular cortex (1.0 mm caudal to bregma, 5.8 mm laterality, 7.1 mm deep) and underwent five consecutive daily stimulations (15 min, 60 Hz, 210 μ s, 1V). GABA_A receptor antagonist, bicuculline methiodide, (0.1 μ g, i.t) administered 1h prior to the paw pressure test, induced reversion of the ESI-induced antinociception, without altering the general activity in the open field test. Increase of GAD65 in the insula after ESI was observed by immunofluorescence, without changes of GFAP, synaptophysin and/or tyrosine hydroxylase (TH) in posterior insular cortex, hippocampus, anterior and mid cingulate cortex, Periaqueductal Gray (PAG) and rostral ventromedial medulla (RVM). Western blotting analysis, revealed no changes in GAD65 after ESI. GABA, glutamate and glycine levels analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) did not change after ESI in posterior insular cortex. In collaboration with the University of Calgary, GAD2^{Cre} Ai9, PV^{Cre} Ai9, Vglut2^{Cre} Ai9 mice underwent Spared Nerve Injury (SNI) and injection of tract tracer choleric toxin (CTB488). It has been demonstrated the presence of GABAergic, parvalbumin positive (PV+) and glutamatergic projections between the insula and the ACC, which were not activated by

c-Fos in an immunofluorescence assay. GAD2-cre, PV-cre, and Vglut2-cre mice received adeno-associated viral titers for opsin expression (pAAV9-EF1a-DIO-hChR2 (H134R) - eYFP) in posterior insular cortex and a fiberoptic cannula was implanted in right posterior insular cortex (0.5 mm posterior to the bregma, 0.375 laterality, 4.0 mm deep) or right ACC (1.055 mm anterior to the bregma, 0.255 mm laterality, 1.522 mm deep). The animals underwent SNI surgery on the left sciatic nerve. 6 or 8 weeks after virus injection, animals were subjected to optostimulation (DPSS blue lasers 472 nm, 5 mW, 10 Hz or 40 Hz). Only the optogenetic activation of PV + neurons induced conditioned place preference, without changing the mechanical threshold in the Digital Plantar Anesthesiometer (DPA). The results obtained point out that GABAergic signaling partially participates in ESI-induced antinociception, as well as demonstrates the presence of GABAergic, PV + and glutamatergic projections between the posterior insular cortex and the ACC, and their influence on pain modulation in neuropathic pain models.

Keywords: Neuropathic Pain. Insular Cortex. Electrical stimulation. GABA Optogenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Planejamento experimental I.....	40
Figura 2-	Planejamento experimental II.....	41
Figura 3-	Planejamento experimental III.....	42
Figura 4-	Analgesímetro Randall- Selito.....	43
Figura 5-	Arena do Campo Aberto.....	44
Figura 6-	Implante do eletrodo concêntrico no córtex insular posterior agranular.....	46
Figura 7-	Anestesiômetro digital plantar.....	53
Figura 8-	Caixa de CPP.....	55
Figura 9-	Desenho experimental CPP.....	55
Figura 10-	Fibra óptica implantável para estimulação optogenética.....	58
Figura 11-	mBIC reverte a antinocicepção induzida por EECI em ratos com dor neuropática.....	62
Figura 12-	Efeito da EECI e da administração de mBIC na atividade locomotora geral de ratos com dor neuropática.....	64
Figura 13-	Imunofluorescência para GAD65 e GFAP no CIp.....	66
Figura 14-	Efeito de cinco EECI sobre a imunomarcção para GAD65.....	67
Figura 15-	Imunofluorescência para GAD65 e GFAP na PAG.....	68
Figura 16-	Efeito de EECI sobre a imunomarcção para GAD65 e GFAP na PAG.....	69
Figura 17-	Imunofluorescência para GAD65 e GFAP no hipocampo.....	70
Figura 18-	Efeito de cinco EECI sobre a imunomarcção para GAD65 e GFAP no hipocampo.....	71
Figura 19-	Imunofluorescência para GAD65 e GFAP no córtex do cíngulo.....	72
Figura 20-	Efeito de cinco EECI sobre a imunomarcção para GAD65 e GFAP no Cíngulo.....	73
Figura 21-	Imunofluorescência para GAD65 e GFAP no RVM.....	74
Figura 22-	Efeito de cinco EECI sobre a imunomarcção para GAD65 e GFAP no ^{RVM}	75
Figura 23-	Efeito de cinco EECI sobre os níveis de GAD65.....	
Figura 24-	Efeito de cinco EECI sobre os níveis de neurotransmissores no CIp.....	81
Figura 25-	Imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase no CIp.....	83
Figura 26-	Análise imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase no CIp.....	84
Figura 27-	Imunofluorescência para sinaptofisina no CIp.....	86

Figura 28-	Efeito de cinco EECI na imunomarcção de sinaptofisina no CIp.....	87
Figura 29-	Representação do local de injeção de CTB488 no ACC.	88
Figura 30-	Células GABAérgicas CTB488-positivas do CIp projetando-se para o ACC.....	91
Figura 31-	Quantificação de células GABAérgicas CTB488 positivas do CIp projetando-se para o ACC em camundongos GAD2CrexAi9.....	92
Figura 32-	Células PV+ CTB488-positivas do CIp projetando-se para o ACC	94
Figura 33-	Quantificação de células PV+ CTB488 positivas do CIp projetando-se para o ACC em camundongos PVCrexAi9.....	95
Figura 34-	Quantificação de células glutamatérgicas CTB488 positivas do CIp projetando-se para o ACC em camundongos Vglut2CrexAi9.....	97
Figura 35-	Quantificação de células glutamatérgicas CTB488 positivas do CIp projetando-se para o ACC em camundongos Vglut2CrexAi9.....	98
Figura 36-	SNI induz hipersensibilidade mecânica em camundongos PVCrexAi9 e Vglut2CrexAi9.....	100
Figura 37-	Imunofluorescência para c-Fos no CIp de camundongos GAD2CrexAi9, PVCrexAi9 e Vglut2Cre com dor neuropática.....	102
Figura 38-	Imunofluorescência para c-Fos no CIp de camundongos GAD2CrexAi9, PVCrexAi9 e Vglut2Cre com dor neuropática.....	103
Figura 39-	Imagens representativas do CIp direito de camundongos GAD2Cre, PVCre e Vglut2Cre expressando vetor viral AAV-DIO-ChR2 marcados por EYFP (verde).....	105
Figura 40-	Representação de implante de fibra óptica no ACC direito e CIp direito de camundongos GAD2Cre.....	106
Figura 41-	Efeito da ativação optogenética <i>in vivo</i> de ChR2 em células neuronais GABAérgicas, PV+ e glutamatérgicas do CIp no limiar mecânico.....	108
Figura 42-	Efeito da ativação optogenética <i>in vivo</i> de ChR2 em células GABAérgicas no CIp de camundongos com dor neuropática	110
Figura 43-	Efeito da ativação optogenética <i>in vivo</i> de ChR2 em células PV+ no CIp de camundongos com dor neuropática.....	112
Figura 44-	Efeito da ativação optogenética <i>in vivo</i> de ChR2 em células glutamatérgicas no CIp de camundongos com dor neuropática.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Imunorreatividade para GAD65..... 76

Tabela 2- Imunorreatividade para GFAP..... 77

LISTA DE SÍMBOLOS

%- porcentagem

°C- graus Celsius

μ- micro

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 5HT3R**- receptor ionotrópico de serotonina do tipo 3
- ACC**- córtex do cíngulo anterior
- ANOVA**- Análise de Variância
- aq**- aqueduto
- AAV**- adenovírus associado
- AVE** - Acidente Vascular Encefálico
- BEPE**- Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior
- BIC**- bicuculina
- CAPES**- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
- CCI**- *Chronic Constriction Injury* (constrição crônica do nervo isquiático)
- CIp** – córtex insular posterior
- CEUA**- Comissão de Ética no Uso de Animais
- Cg**- cíngulo
- ChR2**- *channelrhodopsin* (opsina)
- Cl**- íons cloreto
- cm**- centímetro
- CONCEA**- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CPP**- *conditioned place preference paradigm* (teste de preferência condicionada a lugar)
- CTB488**- *cholera toxin subunit B 488* (toxina colérica subunidade B 488)
- DIF**- Densidade Integrada de Fluorescência
- DIO**- *Double Floxed Inverted ORF (Open Reading Frame)*
- dlPAG**- Substância Cinzenta Periaquedutal dorso-lateral
- dmPAG**- Substância Cinzenta Periaquedutal dorso-medial
- DPA**- *Digital Plantar Anesthesiometer* (Anestesiômetro- teste de sensibilidade mecânica)
- e.p.m**- erro padrão da média
- EDTA**- ácido etilenodiamino tetra-acético
- EECI**- Estimulação Elétrica do Córtex Insular
- ESI**- *electrical stimulation of the insular cortex*
- FAPESP**- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- fr**- fissura rinal
- g** – grama

GABA_A – receptor GABAérgico do tipo A

GABA_B - receptor GABAérgico do tipo B

GABA_C - receptor GABAérgico do tipo C

GAD65 - enzima glutamato descarboxilase- isoforma II ou 65

GAD67- enzima glutamato descarboxilase- isoforma I ou 67

GFAP- *Glial Fibrillary Acidic Protein*

GiA- núcleo reticular gigantocelular

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

HPLC- *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Performance)

HSARC- *University of Calgary Health Sciences Resource Centre*

Hz- hertz

ICB- Instituto de Ciências Biomédicas

IQR- intervalo interquartil

kg – kilograma

LED – *light emitting diode* (fonte de luz LED)

IPAG - Substância Cinzenta Periaquedutal lateral

LPGiA- núcleo paragigantocelular lateral alpha

LPGiE- núcleo paragigantocelular lateral externo

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

M- Molaridade

mBIC- metiodeto de bicuculina

MCC- *mid-cingulate cortex* (córtex do cíngulo medial)

mg - miligrama

min- minuto

mL- mililitro

mm- milímetro

n- número de animais

NA- *numerical aperture* (abertura numérica)

NIH- *National Institutes of Health*

nm- nanômetro

NMDA- N-metil D-Aspartato

pACC- *posterior anterior cingulate cortex* (córtex do cíngulo anterior- porção posterior)

PAG- *periaqueductal gray* (Substância Cinzenta Periaquedutal)

PB- tampão fosfato

PBS- tampão fosfato-salino

PDA- *photo diode array* (detector luz UV)

PEA- *place/escape avoidance test* (teste de esquiva)

PFA- paraformaldeído

PV- proteína ligadora de Ca²⁺ parvalbumina

PVG- substância cinzenta periventricular

py- trato piramidal

rACC- *rostral anterior cingulate cortex* (córtex do cíngulo anterior- porção rostral)

RMg- núcleo magno da raphe

rpm- rotações por minuto

RVM- rostral ventromedial medulla (bulbo rostral ventromedial)

seg- segundo

SNI- *Spared Nerve Injury* (lesão parcial do nervo isquiático)

SST- somatostatina

SYP- *synaptophysin* (sinaptofisina)

TH- tirosina hidroxilase (*tyrosine hydroxylase*)

UFLC- cromatografia líquida ultra-rápida

ug- micrograma

ul- microlitro

us- microssegundos

USP- Universidade de São Paulo

UV- luz ultravioleta

V- Voltagem

vIPAG- Substância Cinzenta Periaquedutal ventro-lateral

VPL - ventral póstero-lateral

VPM - ventral póstero-medial

vs- *versus*

SUMÁRIO

1.Introdução	25
1.1 Dor e dor neuropática.....	25
1.2 As vias do processo nociceptivo	26
1.3 O córtex insular.....	29
1.4 Transmissão GABAérgica na dor	30
1.5 Células gliais	31
1.6 Estimulação elétrica encefálica	33
1.7 Estimulação optogenética	35
2.Hipótese	36
3.Objetivo geral	37
4.Objetivos específicos	37
5.Materiais e métodos	38
5.1 Protocolos experimentais	38
Protocolo experimental I	42
5.2 Animais e aspectos éticos: Ratos Sprague-Dawley	42
5.3 Avaliação comportamental	43
5.3.1 Teste de pressão de pata	43
5.3.2 Teste de campo aberto	44
5.4 Modelo de dor neuropática: Constrição crônica do nervo isquiático (CCI)	44
5.5 Implante de eletrodo concêntrico na ínsula posterior de ratos	45
5.6 Estimulação Elétrica do Córtex Insular (EECI) em ratos com dor neuropática	47
5.7 Tratamento farmacológico	47
5.8 Coleta de amostras	47
5.9 Imuno-histoquímica e imunofluorescência	48
5.9.1 Imunofluorescência de dupla marcação para GAD65 e GFAP	48
5.9.2 Imunohistoquímica para tirosina- hidroxilase	49
5.9.3 Imunofluorescência para sinaptofisina	49
5.10 Extração de aminoácidos	50
5.11 Ensaio de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	50
5.12 Ensaio de Western Blotting para GAD65	51
5.13 Análise estatística dos resultados obtidos	51
Protocolos experimentais II e III.....	52

5.14 Animais: Camundongos geneticamente modificados	52
5.15 Avaliação comportamental	53
5.15.1 Anestesiômetro digital plantar (DPA)	53
5.15.2 Teste de preferência condicionada ao lugar (CPP)	54
5.16 Modelo de dor neuropática: Lesão parcial do nervo isquiático (<i>Spared Nerve Injury-SNI</i>)	56
5.17 Procedimentos cirúrgicos para implante e injeção	56
5.17.1 Injeção de traçador CTB488	56
5.17.2 Injeção de vírus	57
5.17.3 Implante de fibra óptica	57
5.18 Estimulação optogenética em camundongos com dor neuropática	58
5.19 Coleta de amostras	59
5.20 Imunofluorescência para c-Fos	59
5.21 Análise de expressão de vírus em camundongos	59
5.22 Análise estatística dos resultados obtidos	60
6.Resultados	61
6.1 mBIC reverte a antinocicepção induzida por EECI em ratos com dor neuropática	61
6.2 EECI e a transmissão GABAérgica central não alteram a atividade locomotora geral de ratos com dor neuropática	63
6.3 EECI aumenta a imunomarcção de GAD65 no CIp sem alterar a presença de GFAP nas demais regiões da circuitaria central de dor	65
6.4 EECI não altera a proteína total GAD65 no CIp, hipocampo e ACC	78
6.5 EECI não altera os níveis de GABA, glutamato e glicina no CIp	80
6.6 EECI não altera a imunomarcção de tirosina hidroxilase na ínsula posterior	82
6.7 EECI não altera a imunomarcção de sinaptofisina no CIp	85
6.8 Análise histológica confirma área de injeção de CTB488 no ACC em camundongos GAD2CrexAi9, PVCrexAi9 e Vglut2CrexAi9	88
6.9 A análise de traçador retrógrado CTB488 revelou a presença de projeções GABAérgicas, PV ⁺ e glutamatérgicas entre o CIp e o ACC	90
6.10 SNI induziu hipersensibilidade mecânica em camundongos PVCrexAi9 e Vglut2CrexAi9	99
6.11 A análise c-Fos não mostra a ativação de projeções GABAérgicas, PV ⁺ e glutamatérgicas do CIp para o ACC	101

6.12 Padronização do local de injeção do vetor viral AAV e do implante de cânula de fibra óptica n ACC e CIp camundongos GAD2Cre, PVCre e Vglut2Cre	104
6.13 Ativação optogenética de ChR2 em neurônios GABAérgicos, PV+ e glutamatérgicos do CIp não reverte a hipersensibilidade mecânica de camundongos com dor neuropática ..	107
6.14 Ativação optogenética de ChR2 em neurônios GABAérgicos não induz preferência condicionada ao lugar camundongos com dor neuropática.....	109
6.15 Ativação optogenética de ChR2 em neurônios PV+ induz preferência condicionada ao lugar camundongos com dor neuropática	111
6.16 Ativação optogenética de ChR2 em neurônios glutamatérgicos não induz preferência condicionada ao lugar camundongos com dor neuropática	113
7.Discussão	115
8.Conclusões	124
9.Colaborações neste trabalho	125
APÊNDICES	126
Referências	135

1. Introdução

1.1 Dor e dor neuropática

A definição de dor a descreve como uma “experiência angustiante associada a danos reais ou potenciais aos tecidos, com componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais” (WILLIAMS; CRAIG, 2016). Dor é resultado subjetivo da nocicepção, sendo esta a codificação e o processamento dos estímulos nociceptivos pelo sistema nervoso, enquanto que a dor envolve também a percepção subjetiva do estímulo aversivo (MILLAN, 1999; SCHAIBLE; RICHTER, 2004). A dor tem caráter evolutivo e protetor essencial à manutenção da vida, posto que é uma das principais manifestações de doenças (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

A dor neuropática atinge os sistemas nervoso periférico e central e ocorre sob condições de doença ou desregulação das funções fisiológicas, a partir de uma “lesão primária ou disfunção do sistema nervoso somatossensorial”, onde a dor fisiológica se torna mal adaptativa e patológica e adquire características crônicas, perdurando temporalmente por mais de três meses (IASP, 1986; BACKONJA, 2003; KUNER; FLOR, 2018; TREEDE et al., 2015; WOOLF, 2010).

Lesões centrais decorrem de doenças neurodegenerativas, acidente vascular encefálico (AVE), lesões na medula espinal dentre outros (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009), enquanto a lesão nos nervos periféricos pode ter origem de trauma mecânico, síndromes metabólicas, crescimento tumoral, ou mesmo em decorrência de doenças infecciosas virais, que incluem o vírus HIV e herpes vírus, por exemplo, sendo o desenvolvimento da neuropatia periférica crônica influenciado por polimorfismos genéticos, gênero e idade (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; JOHNSON; RICE, 2014; BRIZZI; LYONS, 2015; YAN et al., 2017).

Embora alguns considerem a dor crônica uma progressão temporal da dor aguda, outros achados da literatura garantem que a dor crônica tem seus mecanismos moleculares e celulares intrínsecos, promovendo a reorganização estrutural e funcional dos circuitos coordenados temporalmente (KUNER; FLOR, 2016) e alterações no nível de interação da rede neural. O córtex insular é uma região sujeita a tais alterações especialmente em quadros de dor neuropática. A persistência da lesão no sistema nervoso altera a estrutura e função do sistema somatossensorial (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009), induzindo sensibilização nervosa, periférica e central (DWORKIN et al., 2003), que inclui facilitação e inibição da transmissão sináptica, geração ectópica de potenciais de ação, formação de novos circuitos sinápticos, dentre outros. Esta plasticidade no circuito altera a percepção da dor, resultando

em fenótipos complexos de neuropatia que irão se manifestar pela ocorrência de dor espontânea- originada de potenciais de ação ectópicos em diferentes pontos anatômicos das vias de dor - , alodínia - uma resposta verbalizada ou interpretada como dor diante daqueles estímulos inócuos, não caracterizados como passíveis de induzir respostas dolorosas -, e hiperalgesia e hipersensibilidade - a resposta verbalizada ou interpretada exacerbada de dor após estímulo nocivo (ALVES; LIN, 2018; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; YAN et al., 2017), característicos da dor neuropática.

Devido a uma população heterogênea, e formas de diagnóstico e tratamento diferentes, se torna difícil uma exata e acurada epidemiologia da dor crônica e neuropática. A dor crônica afeta de 30% a 50% da população mundial, e no Brasil este valor pode atingir em torno de 40% entre homens e mulheres (SOUZA et al., 2017). Já a prevalência da população geral que apresenta dores com características neuropáticas varia entre 6,9% e 10% (VAN HECKE et al., 2014).

Grande parte dos tratamentos de dor crônica constituem analgésicos, opióides, antidepressivos, anticonvulsivantes, antagonistas de receptores NMDA e anti-inflamatórios não-esteroidais (COLLINS et al., 2010; YAN et al., 2017). Na clínica, 40% dos pacientes são refratários independente da terapia utilizada (HANSSON et al., 2009), além de efeitos adversos e tolerância serem relatos frequentes que dificultam e requerem manobras de adequação do tratamento constantes (MOISSET; LEFAUCHEUR, 2019), ressaltando a incapacidade dos métodos em se tratar a dor e a importância da combinação de múltiplas terapias, incluindo técnicas promissoras como a neuroestimulação.

1.2 As vias do processo nociceptivo

O processo nociceptivo é a codificação do estímulo nocivo em impulsos elétricos para processamento pelo sistema nervoso: nociceptores, terminações nervosas livres especializadas, de fibras aferentes primárias ou neurônios de primeira ordem, (fibras C-amielínicas, e A δ - mielinizadas) tem alto limiar de ativação e iniciam potenciais de ação a partir de estímulos mecânicos, térmicos ou químicos de alta intensidade, que serão conduzidos principalmente para as lâminas I e II, da coluna posterior da medula espinal (CPME) (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; KUNER, FLOR, 2016). Na CPME, neurônios de projeção, ou de segunda ordem, levam a informação nociceptiva para centros superiores do sistema nervoso central por meio de tratos anatômicos (JESSEL; KELLY, 1991; KUNER, FLOR, 2016). Neste ponto, cabe ressaltar que a perda de segregação existente entre os locais de sinapse de fibras aferentes primárias nociceptivas em lâminas superficiais, e fibras A β , que

conduzem estímulos mecânicos, em lâminas profundas da CPME, é mecanismo chave para a geração de alodínia (KUNER, FLOR, 2016).

O sistema ântero-lateral agrupa os tratos espinotalâmico, espinomesencefálico, espinoreticular, espinobulbar e espinohipotálâmio para transmissão da informação somatossensorial até regiões supraespinais (WARREN et al., 2002). Especialmente em relação ao trato espinotalâmico este é uma das principais projeções supraespinais para condução da informação nociceptiva (JESSEL; KELLY, 1991). É no tálamo, em núcleos específicos, tais como, núcleo ventral pósterolateral (VPL) e ventral pósteromedial (VPM), que se relaciona o componente discriminativo da dor, e em núcleos inespecíficos, como núcleo lateral central e complexo intralaminar, que estão relacionados os componentes afetivos da dor, onde ocorre a recepção, integração e transferência da informação nociceptiva, via neurônios de terceira ordem, para o córtex encefálico, onde a informação é somatotopicamente organizada (CRAIG; DOSTROVSKY, 1999). Os córtices insular e somatossensorial são os principais alvos de aferências de núcleos específicos talâmicos no córtex em primatas e roedores (GAURIAU; BERNARD, 2004) e processam informações relacionadas à localização, intensidade e persistência da informação nociceptiva (GAMBETA; CHICHORRO; ZAMPONI, 2020).

Além disso, a informação nociceptiva pode ser regulada em diferentes pontos anatômicos da via nociceptiva, pela ação de diversos neurotransmissores e neuropeptídeos (KUNER, FLOR, 2018). Um exemplo chave é a Teoria da Comporta, elaborada por Melzack e Wall (1965), na qual interneurônios inibitórios na substância gelatinosa da CPME, quando ativados por fibras A β (de mecanorreceptores), 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).

Por outro lado, vias descendentes se iniciam em áreas centrais em direção à medula com o objetivo de regular a dor e constituem um ponto extensivamente explorado na literatura. Vias inibitórias descendentes se originam de áreas como córtex do cíngulo anterior (ACC), tálamo e Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG), em direção ao bulbo rostral ventromedial (RVM) e medula espinal para induzir analgesia (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).

A PAG exerce controle tanto inibitório quanto excitatório sobre a excitabilidade e transmissão nociceptiva na CPME (BENARROCH, 2012), projeções oriundas dos córtices

frontal e insular, amígdala, formação reticular e CPME (BASBAUM, 1991) chegam à PAG, a qual irá se conectar com núcleos no bulbo, especificamente no RVM (GEBHART, 2004) os quais, por sua vez, projetam-se direta e indiretamente para a medula espinal, onde podem aumentar ou diminuir a condução nociceptiva (QUINTERO et al., 2013). Esta conexão entre a PAG e o bulbo é fundamental para a regulação da dor, sendo considerada o sítio de ação central de agentes analgésicos (HEINRICHER et al., 2009). Neurônios no RVM, por sua vez, se projetam em direção à medula espinal são também capazes de inibir células GABAérgicas e neurônios Penk+ (correspondente ao gene da preproencefalina) da CPME, integrando a informação dolorosa e gerando hipersensibilidade mecânica (FRANÇOIS et al., 2017).

O hipocampo é uma região límbica conhecida por suas funções associadas à memória, ansiedade e depressão e mais recentemente, mudanças de conectividade cortico-hipocampais e intra-hipocampais são observadas em casos de dor crônica (THOMPSON; NEUGEBAUER, 2019). Pacientes com dor orofacial possuem aumento da conectividade funcional entre o hipocampo e regiões da PAG, ACC e RVM (MILLS et al., 2018). Além disso, o córtex insular posterior possui conexões funcionais simétricas a ambos hemisférios hipocampais segundo estudos de neuroimagem (GHAZIRI et al., 2018). Neste contexto, a literatura propõe que a neuroplasticidade no hipocampo é capaz de influenciar conexões afetivo-motivacionais e de memória da dor crônica (THOMPSON; NEUGEBAUER, 2019).

Duas outras estruturas corticais importantes para a percepção e modulação de dor, o córtex insular e o córtex do cíngulo influenciam as múltiplas dimensões sensitivo-discriminativa, cognitivo-avaliativa e afetivo-motivacional da dor. O córtex insular está estrategicamente localizado e constitui 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).

Em relação ao córtex do cíngulo, postula-se que é uma das regiões corticais mais relacionadas com a percepção dolorosa, uma vez que especialmente o cíngulo anterior (ACC) possui projeções para a PAG, contribuindo para o controle descendente de impulsos nociceptivos na medula espinal (CALEJESAN et al., 2000; ZHUO et al., 2007; ZHUO et al., 2008). Ele pode ser dividido em uma região anterior (ACC), na qual aparecem uma porção anterior-rostral (rACC) e uma porção anterior-posterior (pACC); uma região medial (MCC) também dividida em porções anterior e dorsal; e uma região posterior (DROSSMAN, 2005). A literatura mostra que ocorre desinibição do ACC, em decorrência da lesão periférica de nervos (BLOM et al., 2014). Ademais, a ativação de astrócitos no cíngulo, é relacionado ao

comportamento aversivo associado ao componente afetivo-motivacional da dor em ratos (QUINTERO et al., 2013). Por sua vez, o cíngulo medial (MCC) tem especial participação na indução de hipersensibilidade dolorosa em camundongos por meio de conexões com o córtex insular posterior (TAN et al., 2017).

1.3 O córtex insular

O córtex insular teve sua primeira descrição como sendo a “ilha do córtex” por Johann-Christian Reil, em 1796. Em humanos, o córtex insular se localiza bilateralmente abaixo do sulco lateral (WYNFORD-THOMAS; POWELL, 2017), dividido em córtex insular anterior (agranular) e posterior (granular) pelo sulco central da ínsula (NAMKUNG et al., 2017). A porção anterior possui projeções recíprocas com áreas límbicas como ACC, amígdala e córtex pré-frontal medial; enquanto que a porção posterior possui conexões com MCC e recebe preferencialmente projeções ascendentes sensoriais do tálamo e outras áreas corticais (TAN et al., 2017; NAMKUNG et al., 2017).

Nas demais espécies, incluindo roedores, as principais subdivisões do córtex insular baseiam-se em sua citoarquitetura de divisões das camadas corticais: agranular, disgranular e granular (CECHETTO; SAPER, 1987; GOGOLLA, 2017). Todas as subdivisões possuem interconexões, tanto nos planos rostro-caudal, quanto dorso-ventral (GOGOLLA, 2017), e apresentam projeções para estruturas do tronco encefálico, como RVM e PAG (SATO et al., 2013), e para regiões corticais, como ACC (LU et al., 2016). Inclusive em ratos, sua porção mais posterior está fortemente relacionada a funções sensoriais, incluindo a dor (GAURIAU; BERNARD, 2004; RODGERS et al., 2008).

O córtex insular é uma região de grande interesse por sua influência e por ser afetado estruturalmente e funcionalmente em diversas desordens neurológicas e psiquiátricas desde ansiedade, esquizofrenia, doença de Alzheimer e Huntington, esclerose múltipla, e notadamente a dor crônica (GOGOLLA et al., 2017; NAMKUNG et al., 2017; Lu et al., 2016). No campo da dor, a informação nociceptiva pode ser somatotopicamente organizada no córtex insular (MAZZOLA et al., 2009). Por exemplo, sua porção posterior granular é descrita como preferencialmente envolvida com o processamento sensorial-discriminativo, em função de aferências do núcleos posteriores do tálamo (MAZZOLA et al., 2009) enquanto sua porção anterior, é indicada como uma interface entre redes de dor sensoriais e límbicas (CRAIG, 2003; MESULAM; MUFSON, 1982), na qual sua porção agranular está envolvida com os aspectos afetivos do processo nociceptivo por, receber, principalmente, aferências do núcleo medial talâmico (LU et al., 2016) e se conectar a amígdala (MORAGA-AMARO;

STEHBERG, 2012). Ainda, via circuitos de *feedback* positivo que envolvem a medula espinal, o córtex insular contribui para a manutenção da dor crônica, sendo que, da mesma forma, esta é capaz de gerar alterações funcionais no córtex insular (LU et al., 2016).

A percepção dolorosa também é fortemente influenciada 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 é ainda relacionada a um intenso processo de plasticidade sináptica induzida 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 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).

É de consenso que os córtices insular e do cíngulo constituem áreas conectadas com a rede sensorial central e coordenam a informação dolorosa para modulá-la, se tornando alvos importantes para estudo e tratamentos de dor como a neuroestimulação, que tem a capacidade de regular o funcionamento das vias modulatórias de dor, potencialmente promovendo analgesia.

1.4 Transmissão GABAérgica na dor

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é sintetizado a partir do glutamato por duas isoformas distintas da enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD), sendo elas GAD-65, principalmente associada à membrana de vesículas sinápticas, e GAD-67, citoplasmática (TRIPPE et al., 2009). GABA é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central, e, em áreas corticais, interneurônios GABAérgicos correspondem a cerca de 20% do total de neurônios (JASMIN et al., 2004), compreendendo três tipos principais classificados de acordo com a expressão de um marcador específico: proteína ligadora de Ca^{2+} parvalbubina (PV), o neuropeptídeo somatostatina (SST), e o receptor ionotrópico de serotonina 5HT_{3a} (5HT_{3aR}) (RUDY et al., 2011).

A ação do GABA é mediada por receptores ionotrópicos, GABA_A e GABA_C, e metabotrópico, GABA_B. O receptor GABA_C tem sua localização mais restrita, por exemplo, em regiões como a retina. Já receptores GABA_A e GABA_B tem uma distribuição ampla no sistema nervoso central e periférico, em células neuronais e não-neuronais, como astrócitos, micróglia ativada dentre outros. Receptores do tipo GABA_A são responsáveis pela sinalização inibitória pela abertura do canal de Cl^- , e contém sítios de ligação para barbitúricos e

benzodiazepínicos, e receptores do tipo GABA_B produzem a inibição de longa duração (JASMIN et al., 2004).

As enzimas GAD65 e GAD67, por sua vez, tem função primordial na transmissão sináptica inibitória e no metabolismo celular de GABA, respectivamente. Ambas dependem, com diferentes afinidades, do co-fator piridoxal fosfato para máxima atividade enzimática e estão presentes na maioria das classes de neurônios GABAérgicos (BEHRSTOCK et al., 2000; ESCLAPEZ et al., 1994). Ambas possuem identidade de 95% na sequência de aminoácidos entre ratos, camundongos, gatos e seres humanos, sendo, portanto, altamente conservadas em vertebrados (ESCLAPEZ et al., 1994). Em regiões como núcleo magno da rafe, a dor crônica controla epigeneticamente a transcrição do gene *Gad2*, pela acetilação de histonas via sinalização de BDNF-TrkB, prejudicando sinapses GABAérgicas e contribuindo para o quadro doloroso (TAO et al. 2015).

Nas vias de dor, interneurônios GABAérgicos regulam a transmissão da informação ao induzir nocicepção e antinocicepção de acordo com a área em que estão presentes. Na medula espinal, seus efeitos predominam para a geração de respostas analgésicas a partir de sinapses inibitórias (VAYSSE et al., 2011), enquanto que na PAG e RVM, ocorre a indução de nocicepção após ativação de receptores GABA_A (JASMIN et al., 2004). Em relação ao hipocampo, o aumento da sinalização GABA acompanha os déficits no aprendizado espacial (SAFFARPOUR et al., 2017). No córtex do cíngulo o grande número de terminações GABAérgicas estaria envolvido com a inibição da dor e com respostas comportamentais associadas ao aspecto afetivo-motivacional avaliado no teste *place/escape avoidance* (JASMIN et al., 2004; LaGRAIZE, FUCHS, 2007). Na ínsula, GABA é diretamente relacionado a processos de plasticidade e regulação da dor (JASMIN et al., 2003; ZHUO et al., 2008), posto que níveis reduzidos de GABA no córtex insular se relacionam ao comportamento hiperalgésico em animais (WATSON, 2016). É importante citar ainda, que a modulação opioidérgica de receptores GABA_A pode controlar a atividade do córtex insular, ainda que este não seja o único mecanismo envolvido com tal controle (YOKOTA et al., 2016). Neurônios GABAérgicos no córtex insular também recebem projeções dopaminérgicas oriundas da área tegmental ventral (VTA) responsáveis por mediar a sinalização inibitória eferente para regiões como a amígdala (OHARA et al., 2003).

1.5 Células gliais

A glia representa células do sistema imune no sistema nervoso central e periférico (MACHELSKA, CELIK, 2016). Dentre a glia presente no sistema nervoso central,

especificamente astrócitos constituem a macroglia responsável por auxiliar em muitos dos aspectos do metabolismo e funcionamento de neurônios e do sistema nervoso em geral. Astrócitos se interconectam e se comunicam através de junções *gap* da membrana citoplasmática, e possuem longos processos que mantêm contato com as células endoteliais de vasos sanguíneos, dando base a algumas de suas principais funções como controlar a funcionalidade, os transportes e a permeabilidade da barreira hemato-encefálica, regulando a concentração de íons, além de apresentar outras funções (HAYDON, 2001; REN, 2010, YOON et al., 2012).

A literatura tem ampliado seus conhecimentos no que se refere à glia, reiterando cada vez mais novas funções que extrapolam apenas aquelas associadas ao suporte neuronal. Hoje, sabe-se que astrócitos controlam as sinapses neuronais, capazes de serem influenciados e de influenciarem diretamente a neurotransmissão e alterar a atividade de circuitos neurais (MAZHIGUO, STORK TOBIAS, BERGLES DWIGHT E., 2016), no que é também referido como “sinapse tripartida” (PEREA et al., 2009), onde a proximidade citoestrutural de astrócitos e neurônios os permite responder à atividade sináptica e regular intimamente a transmissão de informações nas sinapses, através da capacidade de liberar e absorver neurotransmissores, os chamados gliotransmissores, e a presença de receptores e transportadores na membrana citoplasmática para tal regulação (HAYDON, 2001; GOSSELIN et al., 2010; YOON et al., 2012).

Seu papel na manutenção da homeostase neuronal e na regulação sináptica é também cada vez mais estudado em casos de desordens neurológicas, patológicas e de dor neuropática. Em resposta à dor neuropática ocorre a ativação de astrócitos, fenômeno também referido como astrocitose reativa (REN, 2010), que abrange alterações de fenótipo celular, morfológico e de metabolismo, em diferentes regiões da via nociceptiva, que pode decorrer de sinais neuronais mediados por neurotransmissores e neuropeptídios, tais como glutamato e substância P, e sendo essa ativação necessária para indução e manutenção da dor crônica (WIESELER-FRANK et al., 2004; GOSSELIN et al., 2010). Com a lesão de nervos periféricos, astrócitos se proliferam e passam a produzir citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e metaloproteinases de matriz, o que contribui para a sensibilização e o quadro de hipersensibilidade presente na dor neuropática (MACHELSKA, CELIK, 2016).

A ativação de astrócitos na coluna posterior da medula espinal foi identificada em modelos animais de constrição crônica de nervos periféricos (GARRISON et al., 1994; REN, 2010) e está relacionada à patogênese da alodínea mecânica associada a dor neuropática (KIM et al., 2016). Comparavelmente, a ativação de receptores GABA_B em células satélites gliais de

gânglio trigeminal desencadeia vias de sinalização responsáveis por induzir analgesia em modelos de dor orofacial (Liu et al., 2019). Por outro lado, na circuitaria central de dor o perfil reativo astrocitário foi identificado em regiões corticais como córtex somatossensorial I e ACC em modelos de lesão periférica do nervo isquiático e associado à sinalização glutamatérgica e formação de novas sinapses nessas regiões (YAMASHITA et al., 2014; KIM et al., 2016).

1.6 Estimulação elétrica encefálica

O termo neuromodulação corresponde a terapias farmacológicas e não farmacológicas que potencializam ou inibem a excitabilidade (GALHARDONI et al., 2015), tendo assim o potencial de influenciar a sensibilidade dolorosa. Sabe-se que tratamentos farmacológicos trazem apenas 50% de alívio da dor somente 30% de pacientes com dor neuropática (FINNERUP et al., 2015; MOISSET; LEFAUCHEUR, 2019) e muitos permanecem refratários à terapia farmacológica, sugerindo que mais de uma abordagem é de fato necessária ao conjunto de terapêuticas oferecidas ao paciente com dor. Neste quadro, técnicas neuromodulatórias como a neuroestimulação encefálica têm sido utilizadas não só para o estudo da neuromatriz da dor (MACHADO et al., 2013), que se constitui de uma rede de interação para processamento da informação nociceptiva (GARCIA-LARREA, PEYRON, 2013), mas também como forma de tratamento para diferentes síndromes dolorosas, como dor central pós-acidente vascular encefálico (AVE), avulsão de plexo braquial, dor no membro fantasma, neuralgia pós-herpética, dor visceral e neuropatias periféricas em geral (BOCCARD; PEREIRA; AZIZ, 2015; MEKHAIL et al., 2010).

Estudos que incluem a estimulação elétrica profunda remontam à década de 50 e tem como foco regiões como a PAG e núcleos talâmicos. Já na década de 1990, estimulação epidural do córtex motor começou a ser utilizada experimentalmente e aplicada na clínica (TSUBOKAWA et al., 1991; CRUCCU et al., 2007; LAZORTHES et al., 2007; FAGUNDES-PEREYRA et al., 2010; JUNG et al., 2016), utilizando-se frequências entre 20-65 Hz (MOISSET; LEFAUCHEUR, 2019), e apresentando desde então resultados variáveis sobre a taxa de controle da dor tanto em pacientes, em que apenas dois terços dos pacientes com dor crônica intratável têm benefícios (BOCCARD; PEREIRA; AZIZ, 2015; GALHARDONI et al., 2015; LEVY; DEER; HENDERSON, 2010) quanto em animais, os quais também podem apresentar refratoriedade possivelmente associada à menor ativação de receptores canabinóides na medula espinal (SILVA et al., 2015).

Mais recentemente, a neuroestimulação tem como alvo outras áreas corticais e límbicas (MOORE, 2014), com o objetivo de se modular as diferentes dimensões sensitivo-discriminativa e afetivo-emocional da percepção dolorosa. A estimulação cerebral profunda (*Deep Brain Stimulation- DBS*) é uma alternativa indicada para casos de dor neuropática refratária, sendo considerada segura, tanto quando aplicada experimentalmente em animais quanto em humanos, porém com relevantes ponderações sobre sua eficiência. Contra-indicações compreendem pacientes com histórico de doenças psiquiátricas, coagulopatias e ventriculomegalias, e efeitos adversos decorrentes do procedimento como convulsões, dor de cabeça e infecções podem ocorrer em até 9% dos casos (CRUCCU et al., 2016). Seus principais alvos de estimulação compreendem a PAG, a substância cinzenta periventricular (PVG), tálamo e o ACC (BOCCARD; PEREIRA; AZIZ, 2015; CRUCCU et al., 2016), e parâmetros de estimulação variam de acordo com o alvo, a exemplo, a estimulação a 130 Hz por uma semana ou mais, bilateralmente no ACC é eficiente para indução de analgesia, ao mesmo tempo em que a utilização de frequências de estimulação menores que 50 Hz em núcleos talâmicos induz analgesia, acima de 70Hz é capaz de exacerbar a sensação dolorosa em humanos (BOCCARD; PEREIRA; AZIZ, 2015).

Outros exemplos importantes de intervenção neuroestimulatória, a estimulação magnética transcraniana (*repetitive transcranial magnetic stimulation- rTMS*), que gera um pulso magnético a partir de bobinas corretamente posicionadas ao redor do escalpo (MOISSET; LEFAUCHEUR, 2019) e a estimulação transcraniana por corrente contínua (*transcranial direct current stimulation-tDCS*), a qual promove uma estimulação de baixa intensidade entre 1 a 2 mA por períodos prolongados (MOISSET; LEFAUCHEUR, 2019), constituem abordagens não invasivas de estimulação, seguras e amplamente aplicadas não apenas para tratamento de dor crônica, mas também de transtornos psiquiátricos como depressão (aplicada ao córtex pré-frontal) e sintomas motores da doença de Parkinson (aplicada ao giro pré-central) (HANOĞLU et al., 2020; MOISSET; LEFAUCHEUR, 2019).

Diante da necessidade de garantir a eficácia de tratamento e a grande variabilidade de respostas diante das abordagens atualmente empregadas, a busca por novos alvos corticais para neuroestimulação mostrou o córtex insular como candidato potencial. Sabe-se que a regulação de neurotransmissores no córtex insular posterior é diretamente relacionado à geração de hipersensibilidade em roedores (WATSON et al., 2016), bem como é a região mais frequentemente ativada em estudos de neuroimagem funcional em humanos saudáveis e em pacientes com dor neuropática (PEYRON et al., 2000; GARCIA-LARREA, 2013), e está

diretamente relacionada a diferentes síndromes de dor crônica, por exemplo dor central pós-AVC (GARCIA-LARREA, 2013; ISNARD et al., 2011; KLIT et al., 2009).

A Estimulação Magnética Transcraniana da ínsula posterior superior foi testada em voluntários saudáveis e provocou alterações de percepção a estímulos frios (CIAMPI de ANDRADE et al, 2012). Ainda, foi demonstrado que a estimulação magnética transcraniana profunda desta porção da ínsula modula diferentemente a sensibilidade dolorosa em comparação ao mesmo tratamento aplicado ao ACC em uma condição de dor neuropática central em humanos (GALHARDONI et al., 2019). Comparavelmente em animais, a Estimulação Elétrica do Córtex Insular (EECI) posterior agranular desenvolvido por nosso grupo demonstrou a capacidade da neuroestimulação do córtex insular em induzir antinocicepção mecânica nos animais com dor neuropática, após uma estimulação a 60 Hz (DIMOV et al., 2018). Resultados posteriores também demonstraram a ativação neuronal marcada por c-Fos aumentada no córtex insular após estimulação, e diminuição em áreas como córtex do cíngulo, PAG e hipocampo (ALONSO-MATIELO et al., *submitted*). Demais mecanismos envolvidos neste tipo de tratamento foram alvos de estudo deste trabalho.

Cabe ressaltar os mecanismos de atuação das diversas modalidades de estimulação encefálica dependem de características do tipo de estimulação, parâmetros e protocolos, alvo e traços intrínsecos do indivíduo. Algumas formas de estimulação também têm a capacidade de modificar a excitabilidade neuronal (TRIPPE et al., 2009; JASMIN et al., 2003), além de provocar diminuição e aumento, respectivamente, nos níveis de GAD65 e GAD67 no córtex, fato que pode estar relacionado à indução de plasticidade sináptica de curto ou longo prazo, como é o caso de diferentes protocolos de Estimulação Magnética Transcraniana repetida aplicada ao córtex motor, frontal, visual e somatossensorial (TRIPPE et al., 2009). Diferentes tratamentos neuroestimulatórios também influenciam a ativação de células gliais, sejam astrócitos ou micróglia, na medula espinal e em regiões encefálicas, o que se relaciona às alterações plásticas observadas em modelos animais de dor crônica, doença de Parkinson e outras condições (MONAI et al 2016; CACACE et al., 2017).

1.7 Estimulação optogenética

A optogenética se utiliza de técnicas celulares, moleculares e de engenharia genética para promover manipular opticamente a ativação e inibição de opsinas expressas na membrana celular de neurônios, com precisão em ambos aspectos, da seletividade celular e da escala temporal, de até milissegundos (DEISSEROTH, 2011).

Para a manipulação optogenética, opsinas de origem microbiana responsivas à luz são expressas na membrana celular neuronal, em geral, e transduzem o estímulo luminoso em potenciais de ação e efetores celulares (GRADINARU et al., 2010). Como consequência, é promovido o ganho e/ou perda de função o que permite o estudo de eventos específicos dentro da célula especialmente em experimentos *in vivo* (DEISSEROTH, 2011). A despolarização da membrana celular pode ser produzida pela expressão e ativação optogenética de opsinas que funcionam como canais catiônicos como Volvox channelrhodopsin-1 (VChr1) e Chlamydomonas channelrhodopsin-2 (ChR2) (BOYDEN et al., 2005; GRADINARU et al., 2010; TYE; DEISSEROTH, 2012; ZHANG et al., 2007). Por outro lado, Halorhodopsinas promovem a hiperpolarização celular por funcionarem como bombas de íons cloreto, assim como opsinas que funcionam como bombas de prótons (TYE; DEISSEROTH, 2012).

A transdução viral utilizando-se lentivírus e vírus adeno-associados é uma das formas mais comuns de promover a expressão restrita de opsinas no sítio-alvo, além de possibilitar a estimulação de fibras e estudos de circuitarias pelo transporte neuronal anterógrado e/ou retrógrado conferido aos tipos de vírus utilizados (TYE; DEISSEROTH, 2012). O uso de sistemas Cre-dependentes, em que vírus carregam opsinas expressas de forma dependente da presença da recombinase Cre em animais geneticamente modificados, também tem conferido maior especificidade aos estudos de optogenética (DEISSEROTH, 2011).

É de fato incomparável que, com tal tecnologia, uma gama de possibilidades permitiu o estudo detalhado de eventos biológicos complexos e comportamentos associados a doenças mimetizadas em modelos animais de ansiedade, depressão, medo, desordens psiquiátricas, doenças do espectro autista, doença de Parkinson dentre outras (TYE; DEISSEROTH, 2012). No que se refere ao estudo do comportamento doloroso, foi demonstrada através da manipulação de circuitos neurais a identificação de circuitos neurais que integram a amígdala, córtex pré-frontal, PAG e a medula espinal diretamente relacionados a geração de hipersensibilidade mecânica e térmica e essenciais à percepção de dor em modelo de dor neuropática (HUANG et al., 2019).

Dentre os objetivos abordados neste trabalho, utilizamos a estimulação optogenética de células neuronais e fibras de projeção no córtex insular e ACC para avaliar em detalhes como tais tipos celulares seriam capazes de influenciar a sensibilidade dolorosa na dor neuropática, complementando os resultados obtidos no projeto.

2. Hipótese

A partir do exposto, este trabalho teve por hipótese que a EECI induz antinocicepção em modelos de dor neuropática de forma dependente da transmissão GABAérgica na circuitaria de processamento e modulação da informação nociceptiva, especialmente no que se refere à conexão do córtex insular posterior e do córtex do cíngulo anterior, além de ser capaz de influenciar a plasticidade no sistema nervoso central.

3. Objetivo geral

Avaliar a participação da sinalização inibitória GABAérgica na circuitaria que envolve o córtex insular posterior, córtex do cíngulo, PAG, RVM, e hipocampo na antinocicepção induzida pela Estimulação Elétrica do Córtex Insular (EECI) em um modelo de dor neuropática por constrição crônica do nervo isquiático (CCI) em ratos, avaliando alterações neuroplásticas e em células astrocíticas induzidas pelo modelo. Além disso, objetivamos avaliar a presença e ativação de projeções GABAérgicas, PV+ e glutamatérgicas entre o córtex insular posterior e o córtex do cíngulo anterior (ACC) em um modelo de dor neuropática por lesão parcial do nervo isquiático (*Spared Nerve Injury*- SNI) em camundongos geneticamente modificados bem como sua influência para o desenvolvimento de hipersensibilidade e dor espontânea.

4. Objetivos específicos

Frente ao exposto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- i.* Avaliar a participação da sinalização inibitória GABAérgica no efeito antinociceptivo induzido por uma e cinco EECI em ratos com CCI, pela administração de metiodeto de bicuculina (mBIC), antagonista de receptores GABA_A, e avaliados no teste de pressão de pata.
- ii.* Avaliar a participação da sinalização inibitória GABAérgica na atividade locomotora geral dos animais submetidos ao CCI e a cinco EECI, pela administração de mBIC e avaliados no teste de campo aberto.
- iii.* Avaliar a influência de cinco EECI sobre a imunomarcagem de GAD65 e GFAP e sua co-localização no córtex insular posterior (CIp), ACC, MCC, PAG, RVM e hipocampo de animais com CCI por imunofluorescência.

- iv. Avaliar a influência de cinco EECI sobre os níveis de GAD65 no CIp, hipocampo e ACC de animais com CCI por *western blotting*.
- v. Avaliar a influência de cinco EECI sobre os níveis dos neurotransmissores GABA, glutamato e glicina no CIp de animais com CCI por cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatograph- HPLC*).
- vi. Avaliar a influência de cinco sessões de EECI sobre a imunorreatividade de tirosina-hidroxilase (TH) no CIp de animais submetidos ao CCI por imuno-histoquímica.
- vii. Avaliar a influência de cinco EECI sobre a imunomarcação de Sinaptofisina (SIP) no CIp de animais com CCI por imunofluorescência.
- viii. Avaliar a presença de projeções GABAérgicas, parvalbumina positivas (PV+) e glutamatérgicas específicas do CIp para o ACC por meio da injeção de traçador toxina colérica subunidade B (CTB488) em camundongos GAD2CrexAi9, PVCrexAi9, Vglut2CrexAi9.
- ix. Avaliar o padrão de ativação neuronal marcado por c-Fos das projeções GABAérgicas, PV+ e glutamatérgicas no CIp de camundongos GAD2CrexAi9, PVCrexAi9, Vglut2CrexAi9, submetidos ao SNI, por imunofluorescência.
- x. Avaliar o efeito da ativação optogenética de *Channelrhodopsin* (ChR2) em projeções específicas GABAérgicas e PV+ entre o CIp e o ACC, bem como células glutamatérgicas do CIp, sobre a sensibilidade mecânica de camundongos GAD2Cre, PVCre, e Vglut2Cre, submetidos ao SNI, através do teste de sensibilidade mecânica (anestesiômetro digital plantar- *Digital Plantar Anesthesiometer – DPA*).
- xi. Avaliar o efeito da ativação optogenética de ChR2 em projeções GABAérgicas e PV+ entre o CIp e o ACC, e células glutamatérgicas do CIp, sobre o comportamento de dor espontânea em camundongos GAD2Cre, PVCre, e Vglut2Cre, submetidos ao SNI, utilizando o paradigma de preferência condicionada ao lugar (*Conditioned Place Preference - CPP*).

5. Materiais e métodos

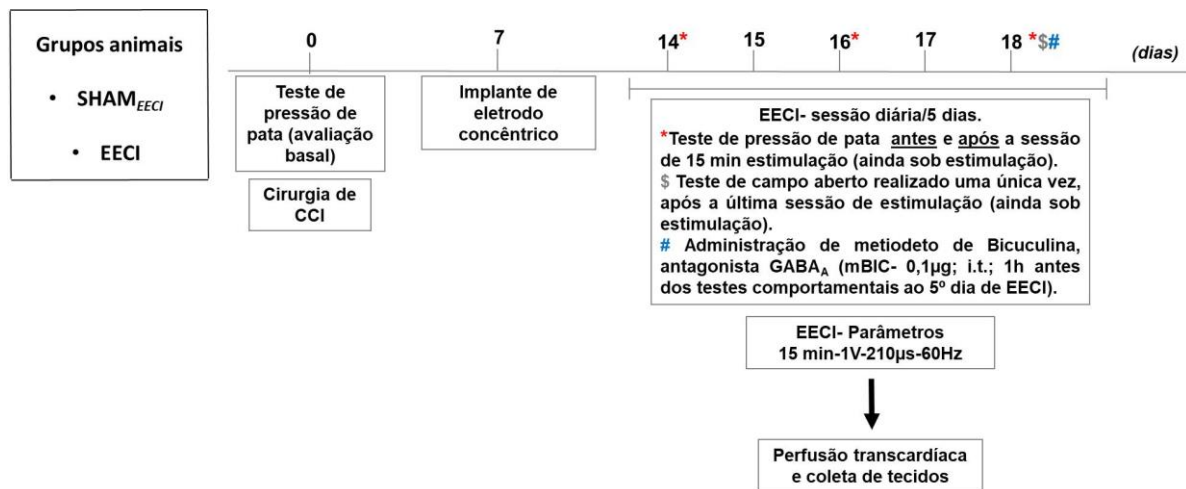
5.1 Protocolos experimentais

Foram delimitados três protocolos experimentais (I, II, III) como se segue abaixo descrito:

O *Protocolo Experimental I* (**Figura 1**) consistiu na utilização de ratos machos, Sprague-Dawley, que foram mantidos em ambiente de experimentação por 7 dias antes da realização de qualquer manipulação para fins de ambientação. No dia anterior ao início dos experimentos, os animais foram habituados para o teste de pressão da pata, não sendo realizada habituação para o teste de campo aberto, em função da finalidade deste teste em se avaliar a atividade locomotora voluntária dos animais frente a um ambiente novo (TERRY, 1979; TATEM et al., 2014). Foram aferidas medidas basais de sensibilidade dolorosa mecânica no teste de pressão da pata, seguindo-se à realização da cirurgia de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na coxa direita dos animais. Após sete dias deste procedimento, um eletrodo foi implantado no C1p agranular do hemisfério esquerdo dos animais (contralateral ao nervo isquiático lesado) seguindo coordenadas já padronizadas (DIMOV et al., 2018). Após 14 dias da indução do modelo de CCI, os animais foram submetidos à sessão única (**EECI 1**) ou diária, por cinco dias consecutivos (**EECI 5**) de estimulação (parâmetros de estimulação: 60 Hz, 210 μ s e 1 V- (DIMOV et al., 2018), sendo submetidos ao teste de pressão de pata ao primeiro e quinto dia de EECI, antes e após cada estimulação, com os animais ainda sob estimulação. O teste de campo aberto foi realizado após a última estimulação para avaliação da atividade locomotora geral dos animais. Animais controle (**SHAM_{EECI}**) foram submetidos ao CCI e tiveram o eletrodo implantado no C1p esquerda, porém não sofreram qualquer tipo de estimulação (estimulador desligado). Metiodeto de bicuculina (mBIC; 0,1 μ g; i.t.), antagonista seletivo de receptores GABA_A, foi administrado uma hora antes da realização dos testes comportamentais (LIM et al., 2010; HARA et al., 2013), ao primeiro ou último dia de estimulação. Amostras de encéfalo foram coletadas ao final do protocolo experimental, após perfusão transcardíaca com PFA 4% ou à fresco para posterior processamento e análise através de ensaios de imunofluorescência e imuno-histoquímica, *western blotting* e HPLC.

Os experimentos comportamentais, procedimentos cirúrgicos e/ou análises nos demais ensaios aqui realizados não foram realizados de forma cega devido à característica intrínseca do procedimento em determinação do grupo experimental. A administração de mBIC foi realizada por experimentador de forma cega para o grupo experimental, bem como a realização da avaliação comportamental pós administração de mBIC.

Figura 1. Protocolo experimental I. A figura mostra, em dias, os procedimentos realizados no protocolo experimental I conforme se segue.

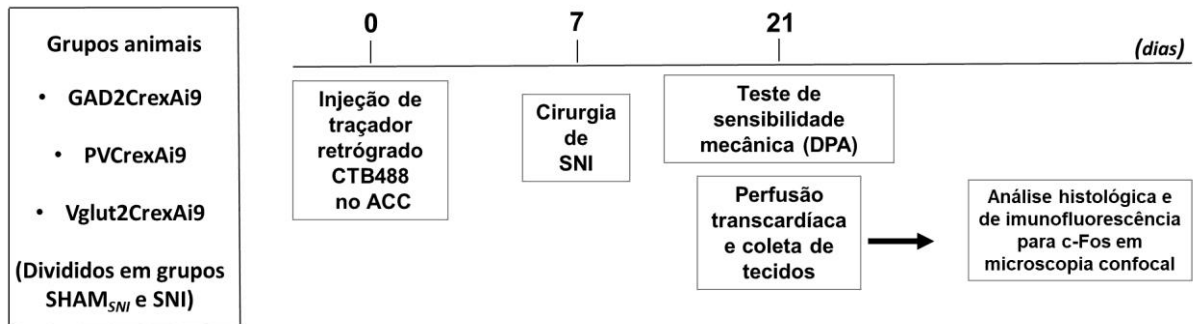


Fonte: Autor (2020)

O *Protocolo Experimental II* (Figura 2) consistiu no uso de camundongos geneticamente modificados **GAD2Cre**: $Gad2^{tm2 (cre) Zjh/J}$; **PVCre**: B6; 129P2-Pvalb^{tm1 (cre)} Arbr/J; **Vglut2Cre**: 368 Slc17a6^{tm2 (cre) Lowl/J} (Jackson Laboratories) cruzados com camundongos portadores do gene repórter **tdTomato Ai9**: B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sor^{tm9 (CAG-tdTomato)} Hze 369/J, para marcação de células GABAérgicas (**GAD2CrexAi9**), parvalbumina positivas (PV+; **PVCrexAi9**) e glutamatérgicas (**Vglut2CrexAi9**), respectivamente. Os camundongos **GAD2CrexAi9**, **PVCrexAi9** e **Vglut2CrexAi9** (6-8 semanas de idade) receberam injeção de toxina colérica subunidade b (CTB488 0,1% peso / volume; 400-450 nl / animal- Thermo Fisher Scientific, EUA) no ACC direito seguindo as coordenadas estereotáxicas: 1.055 mm anteriores ao bregma; lateralidade de 0.255 mm e profundidade de 1.622 mm. A lesão parcial do nervo isquiático (SNI) foi realizada no nervo isquiático esquerdo (contralateral a injeção do traçador) uma semana depois. 14 dias após o SNI, os animais foram submetidos a testes de sensibilidade mecânica (DPA) e submetidos a perfusão transcardíaca com PFA 4%. Amostras de encéfalo foram coletadas e lâminas histológicas foram usadas para identificação de projeções entre o CIp e o ACC. As lâminas também foram submetidas a ensaio de imunofluorescência para c-Fos para análise da ativação celular.

Neste protocolo, os procedimentos cirúrgicos e análises comportamentais e imunohistoquímicas não foram realizadas de forma cega pela característica intrínseca do procedimento na separação do grupo experimental.

Figura 2. Protocolo experimental II. A figura esquematiza, em dias, os procedimentos realizados referentes ao protocolo experimental II conforme se segue.



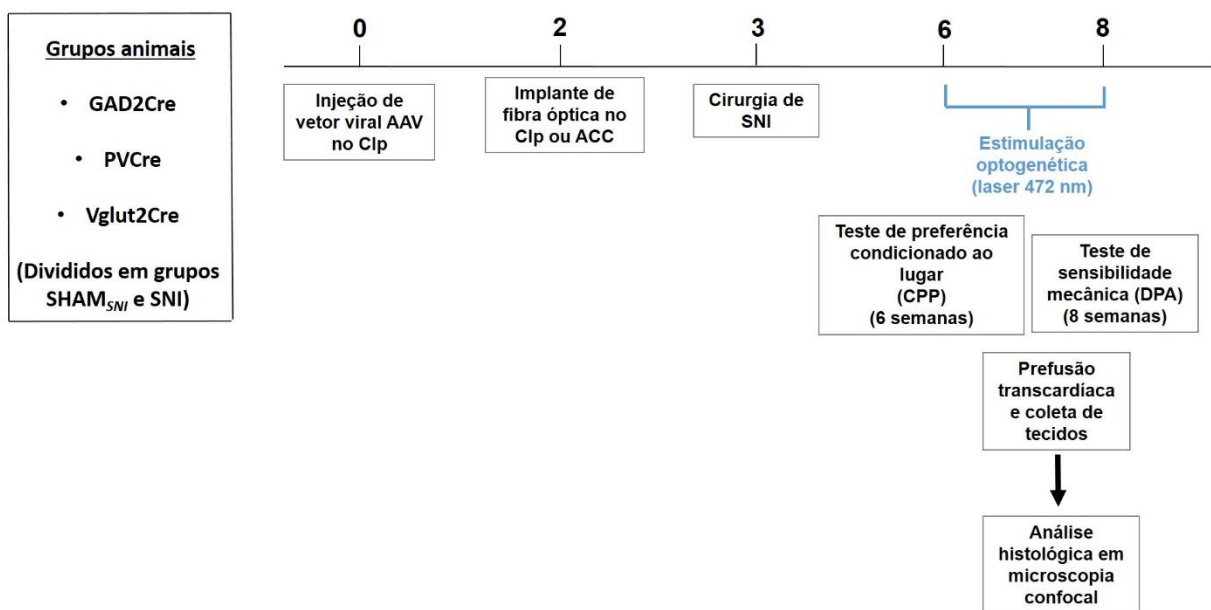
Fonte: Autor (2020)

O *Protocolo Experimental III* (Figura 3) incluiu o uso de camundongos geneticamente modificados **GAD2Cre**: $Gad2^{tm2 (cre) Zjh/J}$; **PVCre**: B6; 129P2-Pvalb^{tm1 (cre)} Arbr/J; **Vglut2Cre**: 368 Slc17a6^{tm2 (cre) Lowl /J} (Jackson Laboratories, EUA) (machos, 6-8 semanas de idade) que receberam injeção de títulos virais como vetores para a expressão seletiva da opsina *Channelrhodopsin* (ChR2) nos neurônios: pAAV9-EF1a-DIO-hChR2 (H134R) - EYFP (12×10^{13} partículas / ml; 100-200 nl / animal; Addgene), no CIp direito, de acordo com as coordenadas estereotáxicas: 0.5 mm posterior ao bregma, lateralidade de 0.375 mm e 4.1 mm de profundidade. Duas semanas depois, uma fibra óptica (2.5 mm de ponteira de cerâmica, 2.0 mm de comprimento para o ACC e 4.0 mm para o implante no CIp; Thorlabs, EUA) foi implantada no ACC posterior direito (1.055 mm anterior ao bregma; 0.255 mm lateral à linha média e 1.522 mm de profundidade) de camundongos **GAD2Cre** e **PVCre**; ou implantado no CIp direito (0.5 mm posterior ao bregma, lateralidade de 0.375 mm e profundidade de 4.0 mm) de camundongos **Vglut2Cre**. Uma semana após esse procedimento, os animais foram submetidos à cirurgia **SNI** ou **SHAM_{SNI}** no nervo isquiático esquerdo (contralateral ao implante). 6 e 8 semanas após a injeção do vírus, os camundongos foram submetidos à estimulação optogenética de ChR2 com laser (laser DPSS, ajustado para 472 nm, luz azul, Laserglow Technologies, Ontario) com potência de 5 mW medida na ponta da fibra (sensor de potência S130C, Thorlabs, EUA), laser pulsado de 40Hz para estimulação de células GABAérgicas e laser pulsado de 10 Hz para estimulação de células glutamatérgicas, e avaliados nos testes de sensibilidade mecânica (DPA) e de preferência condicionado ao lugar (CPP). Ao final das avaliações comportamentais, os animais foram

eutanaziados e as amostras de encéfalo coletadas após perfusão transcardíaca com PFA 4% para analisar da expressão viral e confirmação do implante de cânula.

Por sua vez, os procedimentos cirúrgicos, teste de sensibilidade mecânica e análise histológica não foram realizadas de forma cega pela característica intrínseca do procedimento na separação do grupo experimental pelo experimentador. A avaliação no teste de CPP foi realizada de forma cega para o grupo experimental em toda sua realização.

Figura 3. Protocolo experimental III. A figura abaixo ilustra, em semanas, os procedimentos realizados no protocolo experimental III.



Fonte: Autor (2020)

Detalhamento

Protocolo Experimental I

5.2 Animais e aspectos éticos: Ratos Sprague-Dawley

Foram utilizados ao todo 62 ratos machos, Sprague-Dawley, 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 *ad libitum*, alocados em número de 3 a 4 animais por caixa, mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Neuromodulação da Dor do Instituto de Ciências Biomédicas e utilizados de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB (Nº 3447131117- APÊNDICE A) e normas

estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). A emenda do protocolo CEUA ICB pode ser conferida no APÊNDICE B deste documento.

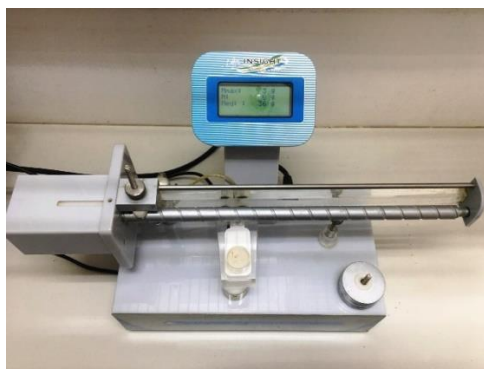
O uso de animais neste estudo foi imprescindível devido à não existência de métodos alternativos que incluem simulações computadorizadas, ou sistemas biológicos construídos *in vitro* para reproduzir a complexidade dos fenômenos biológicos e fisiopatológicos investigados. Os modelos animais aqui compreendidos tinham por objetivo refletir os processos biológicos, celulares e moleculares estudados, bem como permitir a análise comportamental dos animais em relação às diferentes dimensões sensitivo-discriminativa e afetiva-motivacional da dor, e assim auxiliar na compreensão da complexidade da dor neuropática observada em pacientes na clínica médica.

5.3 Avaliação comportamental

5.3.1 Teste de pressão de pata

O teste de pressão da pata foi utilizado para avaliação da hipersensibilidade mecânica em ratos conforme descrito por Randall e Sellito (1957), em que o dorso da pata do animal foi posicionado no dispositivo (Analgesímetro Randall-Selito, Insight[®]; **Figura 4**) e o acionamento de um pedal inicia o aumento crescente da pressão aplicada sobre a pata (16 g/s) até que o animal execute a retirada do membro. Como resultado é obtida a sensibilidade nociceptiva mecânica expressa em gramas para a 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 4. 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.

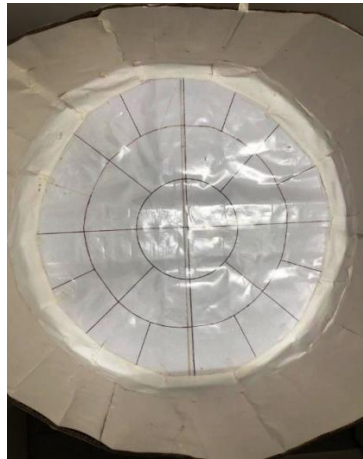


Fonte: Autor (2020)

5.3.2 Teste de campo aberto

Para a avaliação da atividade locomotora geral em ratos, os animais foram colocados individualmente em uma arena circular fechada (95 cm de diâmetro x 45 cm de altura; **Figura 5**) e dividida em quadrantes, onde permaneceram por três minutos. Foram avaliados os parâmetros de frequência de locomoção (ato de o animal entrar, com as quatro patas, em um dos quadrantes) e de levantar (ato de o animal permanecer em posição bípede) (DE LIMA et al., 2005). Os animais foram avaliados uma única vez, ao final do protocolo de EECI (DIMOV et al., 2018), após a quinta estimulação.

Figura 5. Arena do Campo Aberto. A imagem ilustra a arena de teste do campo aberto para avaliação dos parâmetros de locomoção e levantar em ratos. Dimensões: 95 cm de diâmetro x 45 cm de altura. Número total de quadrantes: 28.



Fonte: Autor (2020)

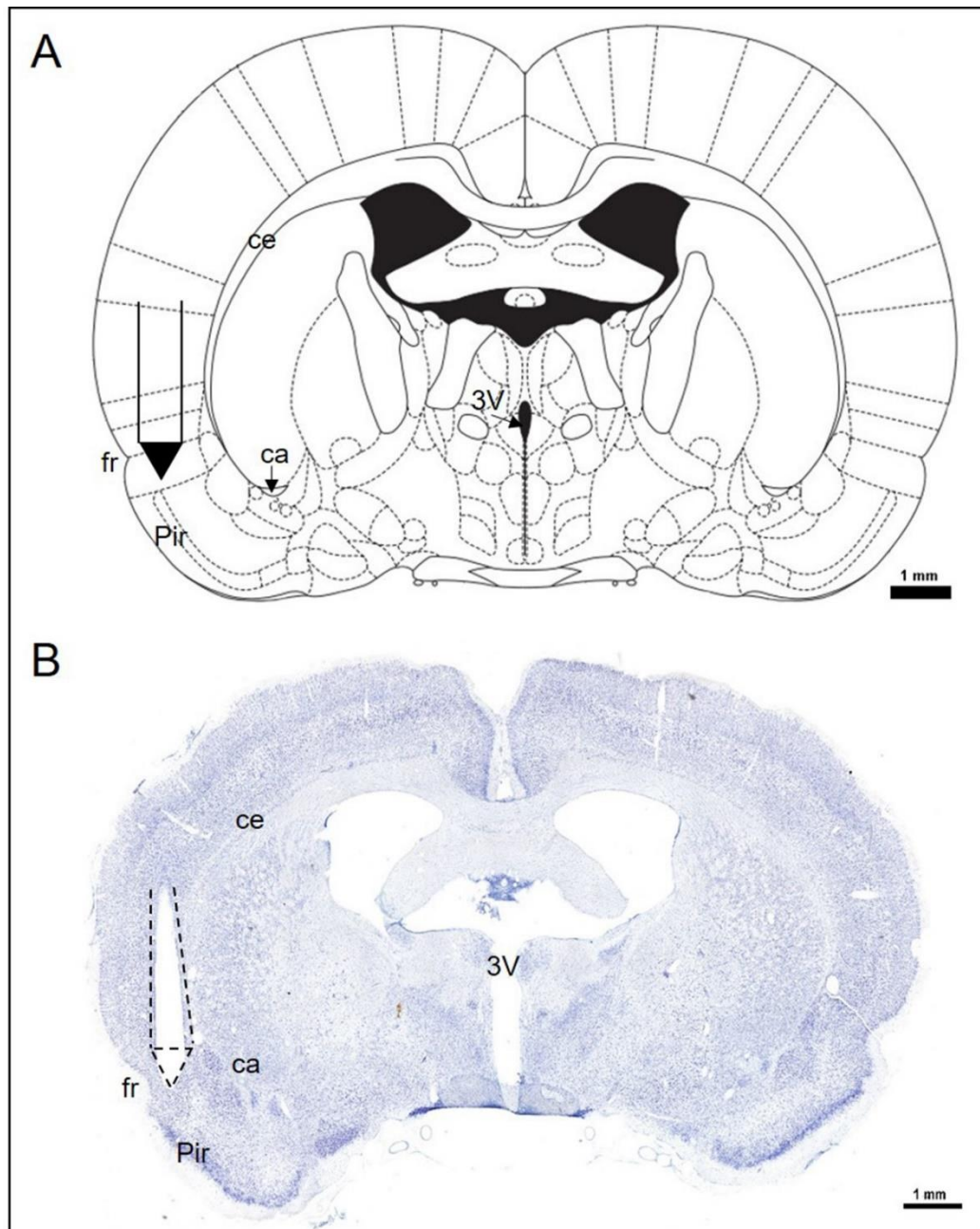
5.4. Modelo de dor neuropática: Constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

O modelo experimental de dor neuropática por Constrição Crônica do Nervo Isquiático (CCI) foi realizado em ratos conforme Bennet e Xie (1988). Os animais foram anestesiados com isoflurano 2,5% (Isoforine[®], Cristália) e o nervo isquiático do membro posterior direito foi 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, hipersensibilidade mecânica e dor espontânea, que se iniciam entre o primeiro e o quinto dia após a indução da lesão que persistem por, pelo menos, dois meses (BENNETT; XIE, 1988; AUSTIN et al., 2012).

5.5 Implante de eletrodo concêntrico na ínsula posterior de ratos

Um eletrodo concêntrico (eletrodo em agulha concêntrica de aço inoxidável e isolamento de polietersulfona, polo negativo interno e polo positivo externo; contato de superfície de $29,452 \mu\text{m}^2$; Spes Medica® D039035408 Spes Medica®) foi implantado no CIP agranular esquerdo de ratos, contralateral à cirurgia de CCI, conforme descrito por DIMOV et al., (2018). Os animais receberam pré-anestesia com acepromazina (2,75 mg/kg, Aceprom® , Vetnil) via intraperitoneal, seguido por anestesia com combinação de cloridrato de cetamina (82 mg/kg, Dopalen®, Sespo), cloridrato de xilazina (7,5 mg/kg, Anasedan®, Sespo) via intraperitoneal e anestesia local no escalpo com cloridrato de mepivacaína 3% (100 μL /animal, MEPISV®, DFL). O crânio foi fixado no estereotáxico, um orifício foi trepanado no mesmo e o eletrodo concêntrico foi posicionado de acordo com as coordenadas para implante no córtex insular posterior agranular previamente estabelecidas a partir do atlas de referência, conforme observado na **Figura 6**, painel (A) e confirmado pela coloração de Nissl (painel B) (1.0 mm caudal ao bregma; 5.8 mm de lateralidade à esquerda da linha média e 7.1 mm de profundidade; **Figura 6**) (PAXINOS; WATSON, 2005; DIMOV et al., 2018). Dois parafusos foram posicionados entre 4 e 6 mm de distância do eletrodo, servindo de ancoragem para 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 mantidos em recuperação pós- cirúrgica por 7 dias.

Figura 6- Implante do eletrodo concêntrico no córtex insular posterior agranular. 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. Em (B), histologia em corte coronal de encéfalo de rato submetido à coloração de Nissl. A demarcação pontilhada 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). Régua representativas 1mm. Abreviações: 3V, terceiro ventrículo; ca, comissura anterior; ce, cápsula externa; fr, fissura final; Pir, córtex piriforme.



Fonte (s): Adaptado de Paxinos e Watson (2015); Luiz Fábio Dimov (2017)

5.6 Estimulação Elétrica do Córtex Insular (EECI) em ratos com dor neuropática

Animais estimulados (**EECI**) tiveram seus eletrodos ligados ao estimulador (Medtronic® Model 3625 Test Stimulator) através de cabos e cada sessão de estimulação teve duração de 15 minutos seguindo os parâmetros: amplitude de 1.0 V; frequência de 60 Hz e duração de pulso de 210 μ s. Estes parâmetros se mostraram seguros e eficazes para estimulação do córtex insular conforme já descrito (DIMOV et al., 2018). A corrente associada a essa voltagem foi verificada com os eletrodos colocados em solução salina 0,9%. Ainda que a resistência nessas condições seja menor do que no meio implantado (encéfalo), a corrente medida foi de 100 μ A. Animais controle (**SHAM_{EECI}**) foram submetidos ao mesmo ambiente experimental de animais **EECI**, sendo conectados ao estimulador, porém desligado, sem sofrer qualquer tipo de estimulação elétrica.

5.7 Tratamento farmacológico

Tratamento farmacológico com metiodeto de bicuculina (mBIC), antagonista seletivo de receptores GABA_A (Tocris[®] - 0.1 μ g, diluído em DMSO 20%, este diluído em salina 0,9%; i.t., administrado 60 min antes do teste de sensibilidade mecânica, (LIM et al., 2010; HARA et al., 2013), ao primeiro ou quinto dia de estimulação, foi utilizado para avaliar a participação da transmissão GABAérgica no efeito antinociceptivo induzido pela EECI.

Para a administração do mBIC via intratecal, os animais foram rapidamente anestesiados com Halotano 1% (Tanohalo®, Cristália) (YAMAMOTO, YAKSH, 1993), submetidos à tricotomia da região dorsal e uma agulha de seringa (24G) foi inserida verticalmente no espaço subaracnóideo entre as vértebras lombares L4 e L5 para injeção de 20 μ l de volume de solução. O reflexo na cauda do animal foi usado para verificar o correto posicionamento da agulha no espaço subaracnóideo.

5.8 Coleta de amostras

Ao término dos experimentos comportamentais, grupos de 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 22,5 mg/Kg) e perfundidos com solução salina 0,9% (150 ml/animal) e PFA 4% (300 ml/animal), ambos dissolvidos em tampão fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4), para coleta de amostras de encéfalo. As amostras foram pós-fixadas em PFA 4% durante 6 h e mantidas sob refrigeração 4°C em solução de sacarose

30%, dissolvida em tampão fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4) para crioproteção, até serem processadas e utilizadas nos ensaios de imunohistoquímica e imunofluorescência.

Para a coleta de material a fresco, os animais foram anestesiados com Halotano 1% (Tanohalo®, Cristália) (YAMAMOTO, YAKSH, 1993) e eutanasiados com auxílio de guilhotina. Amostras do CIp, ACC, PAG e hipocampo foram coletadas rapidamente, com auxílio de matriz de corte sob resfriamento utilizando-se *punchs* de 2 mm de diâmetro, não ultrapassando o tempo máximo de 3 min desde o resfriamento da amostra até seu acondicionamento em tubos 1,5 ml em gelo seco. O tempo total de coleta desde a eutanásia dos animais até o armazenamento das amostras não ultrapassou 10 min. Posteriormente, todas as amostras foram pesadas e mantidas em freezer -80°C por até 30 dias.

5.9 Imunohistoquímica e imunofluorescência

5.9.1 Imunofluorescência de dupla marcação para GAD65 e GFAP

Amostras de encéfalo fixadas foram cortadas em micrótomo de congelamento na espessura de 30 µm e armazenadas à temperatura de -20 °C em solução anti-freezing (sacarose 15%, etilenoglicol 30% em PB 0,1 M). Para o ensaio de imunofluorescência foi utilizado o seguinte protocolo: **a)** 3 lavagens de 10 min cada, em tampão fosfato (PB 0,1 M; pH 7,4); **b)** pré-bloqueio de uma hora com solução contendo 5% de soro de cabra (NGS) e Triton X-100 0,3%; **c)** incubação overnight (cerca de 19 h) em temperatura ambiente com anticorpos primários específicos *mouse* anti-GAD65 (1/500; SAB4200232, clone N-GAD65, Sigma-Aldrich®) e *Rabbit* anti-GFAP (1/1000; AB5804, Chemicon®), acrescido de 5% de NGS, diluídos em Triton X-100 0,3% ; **d)** três lavagens de 10 min cada, em PB 0,1 M; **e)** incubação durante 2 h com os anticorpos secundários fluorescentes *anti-mouse Goat* TRITC (1/100; para marcação de GAD65 em vermelho) e *anti-Rabbit Goat* FITC (1/100; marcação de GFAP em verde) diluídos em Triton X-100 0,3%; **f)** 3 lavagens em PB 0,1 M; **g)** montagem sobre lâminas gelatinizadas; **h)** proteção com meio de montagem à base de glicerol e vedação com lamínulas e esmalte. Os cortes foram mantidos em geladeira a 4° C por período limite de um a três meses e a imunorreatividade foi capturada em microscópio de fluorescência (Aristoplan, Leitz). Foram capturadas imagens de três cortes para cada área de interesse de três a cinco animais, e a densidade integrada corrigida de fluorescência foi obtida descontando a média da fluorescência do fundo na área selecionada, da densidade integrada total da imagem obtida no ImageJ. Após a análise, as imagens aqui representadas foram

processadas para aprimorar apenas o contraste e o brilho usando o Adobe Photoshop (Adobe Systems, CA, EUA).

5.9.2 Imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase

Cortes coronais de encéfalo (30 μ m) obtidos em micrótomo de congelamento foram submetidos ao seguinte protocolo experimental: **a)** 10 lavagens de 10 min em tampão fosfato (PB 0,1 M; ph 7.4); **b)** incubação em solução de bloqueio (Triton X-100 0,03% e NGS a 5%) por 1 h em temperatura ambiente; **c)** incubação *overnight* (totalizando cerca de 19h), em temperatura ambiente sob agitação, com anticorpo primário anti- tirosina hidroxilase (1: 1000; c-Fos sc-52; Santa Cruz Biotechnology, Inc, EUA) diluído em solução contendo Triton X-100 0,3% e NGS 5%; **d)** 3 lavagens de 10 min em PB 0,1 M; **e)** incubação por 2 h com anticorpo secundário biotilado *anti-Rabbit* (1: 200 *anti-Rabbit*; IgG Goat; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., EUA); **f)** posteriormente eles foram incubados em solução avidina 1: 100 e de biotina 1: 100 por 2 h e visualizados usando uma mistura de 0,05% de diaminobenzidina e 0,01% de peróxido de hidrogênio; **g)** os cortes foram lavados em PB de 0,1 M, e **h)** montados em lâminas gelatinizadas utilizando meio de montagem à base de glicerol; **i)** após 48 h de secagem em estufa 37°C, as lâminas foram desidratadas em bateria de soluções de etanol graduadas seguidas de xilol; e **j)** por fim cobertas com lamínula utilizando-se olução Permout (Fisher Scientific, EUA). A imunorreatividade de TH foi observada usando microscópio óptico (Nikon Eclipse E800 e uma câmera FDX35) em cortes do CIp (n=2 a 3 animais por grupo), com base nas coordenadas descritas no atlas de referência (Paxinos GW, 2005) para análise da densidade integrada de TH. As imagens foram otimizadas para contraste e brilho usando o Adobe Photoshop (Adobe Systems, CA, EUA).

5.9.3 Imunofluorescência para sinaptofisina

O mesmo protocolo experimental de imunofluorescência apresentado anteriormente para dupla marcação de GAD65 e GFAP foi utilizado para a realização da imunofluorescência de Sinaptofisina. Neste ensaio, porém, houve única marcação, utilizando em **c)** o anticorpo primário *Rabbit SYP* (1/100; (H-93): sc-9116, Santa Cruz Biotechnology, INC.), diluído em 5% de NGS e Triton X-100 a 0,03%; e utilizando em **e)** o anticorpo secundário *anti-Rabbit Goat FITC* (1/50, marcação de sinaptofisina em verde), diluído em Triton X-100 0,03%. Imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência logo após a realização do ensaio dentro do período limite de um mês (Aristoplan, Leitz) relativas a três cortes para a área de interesse (CIp) de cinco animais, e a densidade integrada corrigida de fluorescência foi obtida

descontando a média da fluorescência do fundo na área selecionada, da densidade integrada total da imagem obtida no ImageJ. As imagens apresentadas foram processadas para aprimorar contraste e brilho usando o Adobe Photoshop (Adobe Systems, CA, EUA).

5.10 Extração de aminoácidos

Para a extração de aminoácidos, amostras de CIP coletadas a fresco foram homogeneizadas em solução contendo ácido perclórico 0,1 M (ClHO_4), 0,02% de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) e EDTA dissódico diluídos em água MilliQ. O volume de solução para homogeneização adicionado em cada amostra corresponde, em ml, a 15 vezes o peso em gramas de cada amostra. Foi utilizada caneta sonicadora de alta frequência durante 2 min para a homogeneização de cada amostra separadamente. Posteriormente, o material foi deixado sob refrigeração a 4°C overnight para precipitação de proteínas e ácidos nucleicos. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 rpm, 4°C por 30 min e o sobrenadante coletado, armazenado em tubos de 1,5 ml em freezer -80°C até a quantificação analítica dos neurotransmissores por HPLC.

5.11 Ensaio de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Os níveis de GABA, glutamato e glicina, foram avaliados utilizando-se a cromatografia líquida ultra-rápida (UFLC- Shimadzu), constituída por um sistema de fase reversa em gradiente com duas bombas de injeção e uma coluna carbônica C18 (ACE 3 C18-300M[®], 150 mm x 4.6 mm). Inicialmente, foi realizada reação de derivatização dos aminoácidos com solução contendo fenilisotiocianato de potássio, trietilamina, etanol e água Milli-Q e, em seguida, a identificação dos três aminoácidos foi realizada por HPLC em leitura feita por um detector PDA (*photo diodo array*) ajustado para análise em luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda 254 nm. A fase móvel A constituiu de uma solução tampão com 6% de acetonitrila, enquanto a fase B foi composta de 80% de acetonitrila, 20% água Milli-Q e 0,02% de EDTA. O tempo de corrida correspondeu a 46 minutos, em fluxo de 0,3 mL/min, na proporção de 94% de fase móvel A e 6% de fase móvel B. A faixa de detecção dos aminoácidos foi da ordem de picograma. Os resultados foram analisados através da comparação das curvas dos três aminoácidos GABA, glutamato e glicina de cada amostra com a curva de calibração obtida pela análise do padrão.

5.12 Ensaio de Western Blotting para GAD65

Amostras do CIP esquerdo, hipocampo total e ACC de ratos **SHAM** e **EECI** foram lisadas em tampão de extração (cloreto de sódio 274 mM; Igepal 2%; desoxicolato 0,5%; glicerol 20%; Tris 40 mM, pH 8,0), adicionando-se inibidores de fosfatase e protease com um sonicador. O ensaio para leitura de proteína DC (BioRad, EUA) determinou a quantidade de proteína total de cada amostra. 30 µg de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE), sendo posteriormente transferida para uma membrana de nitrocelulose, incubada em solução de bloqueio contendo tampão Tris-Tween 20 (TBS-T) (0,05% Tween 20) e albumina sérica bovina (BSA) a 3% por 1 h em temperatura ambiente e incubada com o anticorpo primário mouse anti-GAD65 (1: 500; SAB4200232, clone N-GAD65, Sigma-Aldrich®) e mouse β-actina (1:5000; A 5316; Sigma-Aldrich, EUA) overnight a 4°C. Os anticorpos secundários (1:5000 leitura infravermelha - 790 nm; IgG antimouse) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., EUA) foram incubados por 1 h à temperatura ambiente em solução de TBS-T (0,05% Tween 20). As análises densitométricas foram realizadas utilizando-se o software ImageJ.

5.13 Análise estatística dos resultados obtidos

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (e.p.m). As análises estatísticas de todos os dados foram geradas usando o GraphPad Prism, versão 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste não paramétrico (teste de Wilcoxon) ou teste t paramétrico pareado / não pareado foi utilizado para a análise entre dois grupos. A análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni foi usada para a comparação de mais de dois grupos. ANOVA usando correção de Geisser-Greenhouse foi usada quando a esfericidade não foi assumida. Em todos os casos, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Protocolos Experimentais II e III

5.14 Animais: Camundongos geneticamente modificados

Foram utilizados ao todo 64 camundongos, entre machos e fêmeas, distribuídos em sete grupos distintos de camundongos geneticamente modificados (enumerados abaixo) para a execução deste trabalho. Os animais, com idade entre 6 e 8 semanas, foram obtidos do Jackson Laboratories ® e mantidos sob condições ideais de biotério, ciclo claro/escuro de 12h/12h, água e ração *ad libitum* e alojados em número máximo de 5 animais por caixa, mantidos no Centro de Recursos Animais das Ciências da Saúde (*Health Sciences Animal Resources Centre -HSARC*) na **Cumming School of Medicine** da Universidade de Calgary, Alberta, Canadá. Todos os protocolos experimentais aplicados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Cuidados Animais da Universidade de Calgary (AC16-0191- APÊNDICE C) e aprovado pela CEUA ICB (Emenda CEUA aplicada ao projeto N° 3447131117- APÊNDICE B).

Os grupos de camundongos separam-se como se segue:

- **GAD2Cre:** $Gad2^{tm2(cre)Zjh}/J$ (Jackson Laboratories): n=9 machos
- **PVCre:** $B6;129P2-Pvalb^{tm1(cre)Arbr}/J$ (Jackson Laboratories): n=10 machos
- **Vglut2Cre:** $368 Slc17a6^{tm2(cre)Lowl}/J$ (Jackson Laboratories): n=15 machos
- **GAD2CrexAi9:** n=9 machos
- **PVCrexAi9:** n=11 machos
- **Vglut2CrexAi9:** n=10 machos
- **tdTomato Ai9:** $B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze} 369/J$ (Jackson Laboratories): máximo n=10 para acasalamento com camundongos machos GAD2-cre, PV-cre, Vglut2-cre e obtenção de animais Ai9.

Protocolos experimentais aqui utilizados seguiram as normas estabelecidas pelo CONCEA e estão de acordo com as diretrizes do *National Institutes of Health* (NIH) para o cuidado e uso de animais de laboratório (NIH Publications No. 8023, revisada em 1978), como forma de minimizar estresse e sofrimento dos animais utilizados. É imprescindível distinguir que o uso de animais neste trabalho foi necessário pela não existência de possíveis

métodos alternativos ou sistemas biológicos *in vitro* que reproduzam a total complexidade dos fenômenos biológicos e fisiopatológicos de ativação neural e modulação da dor aqui investigados.

5.15 Avaliação comportamental

5.15.1 Anestesiômetro digital plantar (DPA)

O anestesiômetro digital plantar foi utilizado para avaliação da sensibilidade mecânica em camundongos (*Digital Plantar Anesthesiometer- DPA- Ugo Basile®*; **Figura 7**). Para este teste, os animais foram colocados individualmente em uma área fechada em cima de um piso de malha de arame e um filamento de nylon de 0,4 g (0.5 mm) foi posicionado e aplicado diretamente sob a superfície plantar das patas posteriores direita (contralateral ao SNI) e esquerda (ipsilateral ao SNI), para um teste mecânico de pressão até resposta de retirada dos animais, avaliado em gramas (g). Cada pata foi testada três vezes, com intervalo de 10 a 15 seg. Os animais foram avaliados em uma medida antes (LIGHT OFF) e, 1 h após, durante a estimulação optogenética (LIGHT ON), três minutos após o início da estimulação.

Figura 7. Anestesiômetro digital plantar. Abaixo o equipamento para avaliação da sensibilidade mecânica em camundongos (*Digital Plantar Anesthesiometer- DPA- Ugo Basile®*). O equipamento constitui-se de um filamento de nylon de 0,4 g (0.5 mm) que irá aplicar uma força crescente, em gramas (g), na superfície plantar da pata dos animais até sua resposta comportamental de retirada do membro.

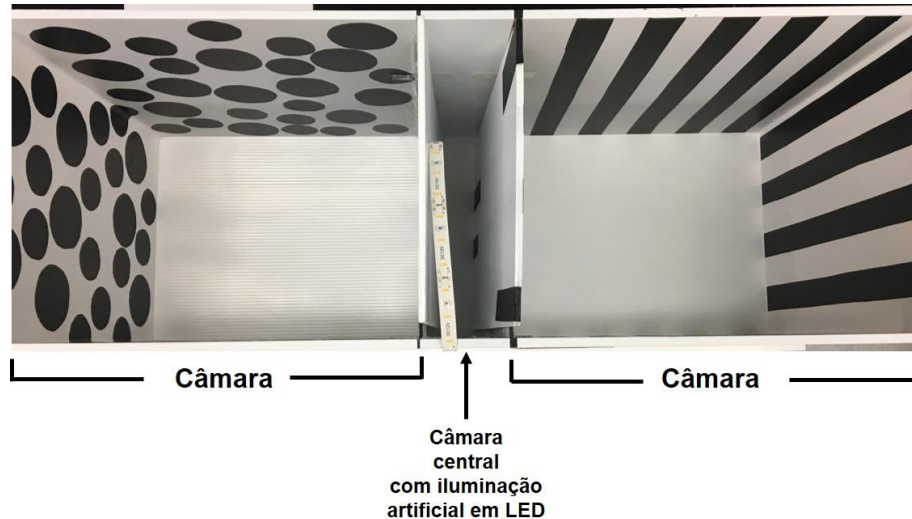


Fonte: Autor (2020)

5.15.2 Teste de preferência condicionada ao lugar (CPP)

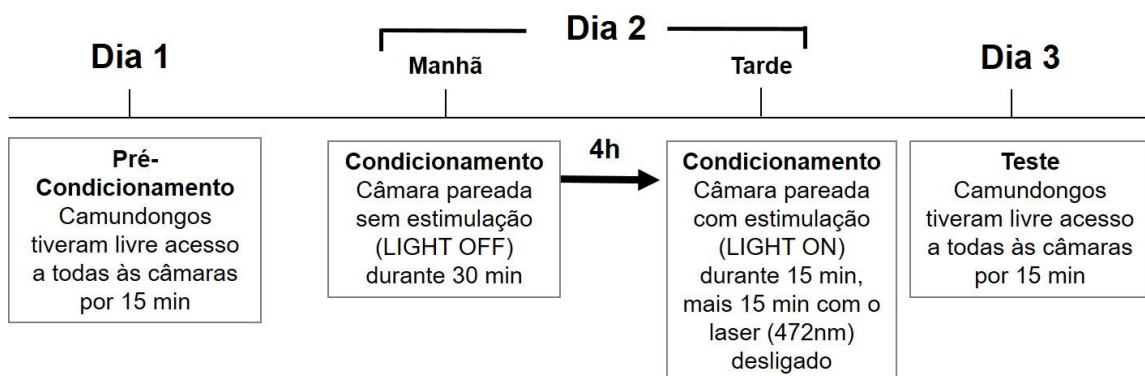
O teste de preferência condicionada ao lugar (*Conditioned Place Preference*- CPP) foi realizado em camundongos como descrito previamente (ZHANG et al., 2015), com algumas modificações, para avaliação de dor espontânea. O protocolo incluiu um dia inicial de fase de pré-condicionamento, em que o animal, com um cabo conector acoplado à fibra óptica implantada, é colocado individualmente no meio de uma caixa de CPP de três câmaras (duas câmaras laterais com dimensões 29 cm x 22 cm x 30 cm; e uma câmara central de 6 cm x 22 cm x 30 cm iluminada artificialmente com luz LED; **Figura 8**) com acesso livre a todas as câmaras por 15 min. O tempo (em segundos- seg) gasto em cada câmara foi registrado para verificar nenhuma preferência de pré-condicionamento. Os animais que passaram mais de 70% (ou menos de 30% do tempo) na mesma câmara foram excluídos de todas as análises (HE et al., 2012). Posteriormente, os camundongos passaram por uma fase de condicionamento de um dia, que consistia em uma sessão de 30 min pela manhã e uma sessão de 30 min, 4 h depois, a tarde, realizada em mesma condição ambiente de temperatura, umidade e luz na sala. Na sessão da manhã, os animais foram condicionados (pareados) com não estimulação (**LIGHT OFF**) - em que foram conectados aos cabos de estimulação porém o laser não foi ligado- em uma das duas câmaras (paredes com listradas pretas verticais e piso liso; ou paredes com círculos pretos e piso irregular), enquanto a estimulação optogenética com laser (472 nm) (**LIGHT ON**) foi condicionada (pareada) na câmara oposta por 15 min, mais 15 min de laser (472 nm) desligada, à tarde. No dia do teste, os camundongos não foram submetidos à estimulação optogenética e tiveram livre acesso a todas as câmaras por 15 min e o tempo gasto em cada uma foi registrado (**Figura 9**). O tempo total gasto em cada câmara e a pontuação em scores de CPP foram calculados como: o tempo gasto na câmara condicionada com **LIGHT ON** no dia do teste menos o tempo gasto na mesma câmara no dia de pré-condicionamento.

Figura 8. Caixa de CPP. A imagem ilustra uma caixa de CPP para avaliação da resposta comportamental de camundongos. A caixa é dividida em três câmaras duas câmaras laterais com dimensões 29 cm x 22 cm x 30 cm, e uma câmara central de 6 cm x 22 cm x 30 cm iluminada artificialmente com luz LED. Para distinção espacial, uma câmara, à esquerda da figura, contém piso irregular e paredes com círculos pretos e a segunda câmara, à direita, contém piso liso e parede com listras negras.



Fonte: Autor (2020)

Figura 9. Desenho experimental CPP. O esquema apresenta o protocolo experimental de avaliação comportamental do CPP em camundongos. O teste consistiu de 3 dias consecutivos (Dia 1, Dia 2, Dia 3), em que os animais foram submetidos ao Pré-Condicionamento, Condicionamento e Teste conforme a figura.



Fonte: Autor (2020)

5.16 Modelo de dor neuropática: Lesão parcial do nervo isquiático (*Spared Nerve Injury-SNI*)

A lesão parcial do nervo isquiático (*Spared Nerve Injury-SNI*) foi utilizada para indução de dor neuropática em camundongos conforme descrito por Bourquin et al (2006) e reproduzido por Zhang et al (2015). Neste modelo, os animais foram anestesiados com isoflurano (5% para indução e 2,5% para manutenção) e submetidos ao procedimento cirúrgico em que o nervo isquiático esquerdo foi dissecado no nível da trifurcação e um nó justo foi feito conectando apenas os nervos tibial e peroneal comum com fio de sutura de seda (6-0) e cerca de 1 mm do nervo foi tricotomizado distalmente à ligadura. O nervo sural foi mantido intacto. Os músculos e a pele foram suturados com fio de sutura Vicryl (6-0 ou 4-0). Animais controle (**SHAM_{SNI}**) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém não tiveram a lesão do nervo. Este modelo gera hipersensibilidade mecânica de longa duração membro correspondente à lesão nervosa, que se inicia 3 dias após a cirurgia de indução e se estende por pelo menos um mês (BOURQUIN et al., 2006).

5.17 Procedimentos cirúrgicos para implante e injeção

5.17.1 Injeção de traçador CTB488

Os camundongos **GAD2CrexAi9**, **PVCrexAi9** e **Vglut2CrexAi9** (6-8 semanas de idade) foram anestesiados com isoflurano (5% para indução e 2,5% para manutenção) e submetidos a cirurgia estereotáxica para implante de uma cânula de vidro para injeção de traçador retrógrado toxina colérica subunidade B (CTB488, 0,1% peso / volume; 400-450 nl / animal - Thermo Fisher Scientific, EUA; entregue a uma velocidade de 100 nl por minuto) no ACC direito (coordenadas 1.055 mm anterior ao bregma, 0.255 mm direito à linha média e 1.622 mm profundidade). Após a injeção, a cânula foi mantida em posição por 5 min, depois elevada em 100 µm e mantida por mais 10 min para permitir a difusão do traçador. O rastreamento retrógrado das projeções entre o córtex insular e o ACC, CTB488 foi analisado 21 dias após a injeção de forma a permitir o transporte e marcação neuronal suficientes. A pele foi suturada com fio de sutura Vicryl (4-0) e antibacteriano e analgésico Polysporin[®] foi aplicada topicamente.

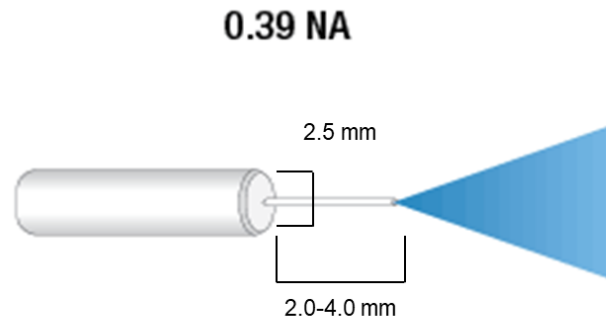
5.17.2 Injeção de vírus

Camundongos com 6-8 semanas de idade **GAD2Cre**: $Gad2^{tm2 (cre) Zjh} / J$; **PVCre**: B6; 129P2-Pvalb^{tm1 (cre) Arbr} / J; **Vglut2Cre**: 368 Slc17a6^{tm2 (cre) Lowl} / J (Jackson Laboratories, EUA) foram submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção de títulos virais como vetores para expressão seletiva de *Channelrhodopsin* (ChR2) em células neuronais pAAV9-EF1a-DIO-hChR2 (H134R) - EYFP (12×10^{13} partículas / ml; 100-200 nl / animal; Addgene), foi injetado no CIp direito, de acordo com as coordenadas estereotáxicas: 0.5 mm posterior ao bregma, lateralidade de 0.375 mm e 4.1 mm de profundidade. Com a cabeça fixada no aparelho, o crânio foi exposto, limpo com solução salina 0,9% e um pequeno orifício foi aberto no escalpo na região de implante. Um capilar de vidro foi usado para injetar o vírus a uma velocidade de 50 nl por min. Após a injeção, o capilar permaneceu na posição por 5 min, foi elevado a 100 μ m e mantido na posição por mais 10 min para permitir a difusão da solução na região alvo. Ao final do procedimento, a pele foi suturada com fio de sutura Vicryl (4-0) e antibacteriano e analgésico Polysporin[®] foi aplicado topicamente.

5.17.3 Implante de fibra óptica

Camundongos com idade entre 6-8 semanas foram anestesiados com isoflurano (5% para indução e 2,5% para manutenção) e submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de fibra óptica (2.5 mm de ponteira de cerâmica, 2.0 mm de comprimento para implante no ACC e 4.0 mm de comprimento para implante no CIp; 200 μ m de diâmetro do núcleo e abertura numérica de 0,39 (NA), Thorlabs, EUA; **Figura 10**). O crânio foi exposto e limpo com solução salina a 0,9% e peróxido de hidrogênio e um pequeno orifício foi aberto acima do alvo para implante da cânula fibra óptica. Camundongos **GAD2Cre** e **PVCre** foram implantados no ACC direito (coordenadas: 1.055 mm anterior ao bregma; 0.255 mm direito à linha média e 1.522 mm de profundidade) e camundongos **Vglut2Cre** no CIp direito (0.5 mm posterior ao bregma, lateralidade de 0.375 mm e 4 mm de profundidade), ambas condições no lado contralateral da cirurgia do SNI. A cirurgia foi realizada 14 dias após a injeção do vírus. Cimento C&B Metabond (Parkel Inc, EUA) e uma capa plástica foram utilizados para fixar e proteger o implante. A pele foi suturada usando fio de sutura Vicryl (4-0) e antibacteriano e analgésico Polysporin[®] foi aplicado topicamente.

Figura 10. Fibra óptica implantável para estimulação optogenética. A imagem ilustra uma cânula de fibra óptica de ponteira de cerâmica usada para estimulação optogenética em camundongos (2.5 mm de diâmetro, 2.0 mm a 4.0 mm de comprimento; 200 μ m de diâmetro do núcleo e 0,39 NA, Thorlabs, EUA).



Fonte: Adaptado de <https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=6036>
Acesso em 03 de março de 2020.

5.18 Estimulação optogenética em camundongos com dor neuropática

Os camundongos foram mantidos em ambiente experimental por pelo menos 30 min antes de qualquer manipulação. Os animais foram rapidamente anestesiados com isoflurano 2% para permitir a conexão da fibra óptica implantada, ao cabo conector contendo uma junção de zircônia de 2.5 mm e uma junta rotativa acoplada ao gerador do laser (472 nm-azul). Os animais foram submetidos à estimulação optogenética com laser e submetidos aos testes comportamentais 6 a 8 semanas após a cirurgia de injeção de vírus. Os neurônios que expressam ChR2 foram estimulados com lasers DPSS (472 nm- azul) (Laserglow Technologies, Ontario) com 5 mW de potência medida na ponta da fibra óptica (sensor de potência S130C, Thorlabs, EUA). Foi utilizada laser pulsado de 40 Hz, 4 V e 10 ms para a estimulação de células GABAérgicas e PV + (camundongos **GAD2Cre** e **PVCre**, respectivamente), simulando a frequência γ em experimentos comportamentais (ZHANG et al., 2015), enquanto laser pulsado de 10 Hz, 4 V e 10 ms foi usado para estimulação de células glutamatérgicas (camundongos **Vglut2Cre**). Os animais foram estimulados por 3 min e então avaliados no teste de DPA e/ ou CPP (conforme protocolo experimental) ainda sob estimulação.

5.19 Coleta de amostras

Uma hora e trinta minutos após a realização dos experimentos comportamentais, os camundongos foram eutanasiados por overdose de anestésico isoflurano 5% e perfundidos

com solução salina 0,9% (20 ml / animal) e PFA 4% (20 ml / animal), ambos dissolvidos em tampão fosfato-salino 1X (PBS 1X; pH 7,4). Amostras de encéfalo foram coletadas e amostras foram pós-fixadas em PFA 4% *overnight* e mantidas sob refrigeração 4 °C em solução de sacarose 30%, dissolvida em tampão fosfato-salino 1X (PBS 1X; pH 7,4) para crioproteção, até serem processadas.

5.20 Imunofluorescência para c-Fos

Cortes coronais de encéfalo de camundongos **GAD2CrexAi9**, **PVCrexAi9** and **Vglut2CrexAi9** foram obtidos com corte em criostato e preparadas em lâminas de microscopia carregadas positivamente (espessura dos cortes de 30 µm) de acordo com o seguinte protocolo: a) três lavagens de 10 min em PBS 1X ; b) incubação em solução de bloqueio contendo Triton X-100 a 0,3% e 5% NGS por 1 h30 min à temperatura ambiente; c) incubação *overnight* com anticorpo primário específico para Fos diluído em Triton X-100 0,3% e 5% NGS (*Rabbit anti- c-Fos* sc-52 ab190289; 1: 1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc, EUA); d) três lavagens de 10 min em PBS 1X; e) incubação à temperatura ambiente por 2h30 min com anticorpo secundário Alexa Fluor 633 anti-rabbit (1: 600, *Goat anti-Rabbit A-21070* Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA); f) três lavagens de 10 min em PBS 1X; g) cobertura com lamínulas utilizando meio de montagem *anti-fading* Fluoromount / PlusTM Plus (Cedarlane, Canadá). A imunomarcagem foi observada usando uma lente objetiva 10 × 0,4 e 20 × 0,75 NA em um microscópio confocal Leica TCS SP8, e as imagens foram capturadas no software LAS X Life Science Leica (Leica, Alemanha). Para cada animal, imagens de três cortes foram capturadas, e analisadas usando o software ImageJ calculando-se o número de núcleos marcados com c-Fos para os grupos **SNI** e **SHAM_{SNI}**. Imagens foram otimizadas para contraste e brilho após análise usando o Adobe Photoshop (Adobe Systems, CA, EUA).

5.21 Análise de expressão de vírus em camundongos

Amostras de encéfalo de camundongos **GAD2Cre**, **PVCre** e **Vglut2Cre** dos grupos **SNI** e **SHAM_{SNI}** submetidos à estimulação optogenética foram coletadas 1 h30 min após avaliação comportamental 8 semanas após a injeção do vírus por perfusão transcárdica para avaliação da expressão viral nas regiões de interesse. As células que expressaram AAV pAAV9-EF1a-DIO-hChR2 (H134R) - eYFP foram observadas usando uma lente de NA de 10 × 0,4 e uma lente de NA de 20 × 0,75 em microscopia confocal (Leica TCS SP8) e

imagens foram obtidas no software LAS X Life Science Leica (Leica, Alemanha) para análise qualitativa da expressão anterógrada do vetor viral nas células neuronais.

5.22 Análise estatística dos resultados obtidos

Os resultados 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. ANOVA usando correção de Geisser-Greenhouse foi usada quando a esfericidade não foi considerada. Teste t paramétrico pareado ou não pareado foi utilizado para a análise entre dois grupos. Em todos os casos, $p < 0.05$ é considerado estatisticamente significativo.

6. Resultados

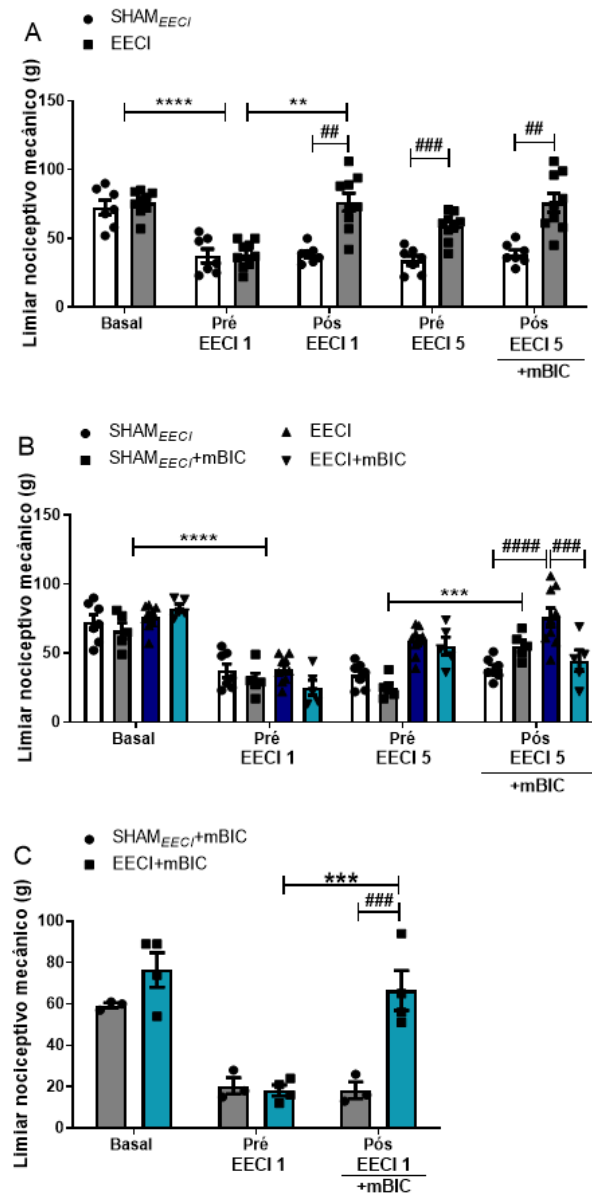
6.1 mBIC reverte a antinociceção induzida por EECI em ratos com dor neuropática

Animais estimulados (**EECI** n= 9) apresentaram antinociceção mecânica na pata direita, ipsilateral ao CCI, e contralateral à estimulação (EECI no CIP esquerdo), quando comparados ao seu grupo controle **SHAM_{EECI}** (n= 7), que se estendeu desde o primeiro dia de estimulação e de forma sustentada até o quinto dia de estimulação (ANOVA de duas vias, tratamento x tempo; $F_{(4, 56)} = 8.020$, $p < 0.0001$; pós teste de Bonferroni, $p < 0.01$; **EECI** - n= 9; Pré 1= 38.222 ± 3.256 ; Pós 1: 76.333 ± 6.658 ; Pós 5 = 75.889 ± 6.945 ; vs **SHAM_{EECI}** - n=7; Pré 1= 37.286 ± 5.415 ; Pós 1: 38.428 ± 2.348 ; Pós 5 = 38.714 ± 2.876 ; $p < 0.01$); (**Figura 11A**).

O tratamento intratecal com mBIC 1h anterior ao teste comportamental após cinco EECI reverteu a antinociceção induzida nos animais conforme apresentado no **Figura 11B** (ANOVA de duas vias, $F_{(9, 66)} = 5.697$, $p < 0.0001$; pós teste de Bonferroni, $p < 0.001$; **EECI** - n= 9; Pós 5= 75.889 ± 6.945 ; vs **EECI+mBIC** - n= 5; Pós 5= 44.400 ± 7.750 ; $***p = 0.0001$). Foi também observada uma reversão do quadro de hipersensibilidade mecânica do grupo controle **SHAM_{EECI+mBIC}** (n=5) após a administração da mBIC ao quinto dia do protocolo experimental, (**SHAM_{EECI+mBIC}** group- n= 5; Pre 5= 25.000 ± 3.592 ; Post 5= 55.200 ± 4.259 ; $**p = 0.0005$); (**Figura 11B**).

Por sua vez, o tratamento com mBIC não alterou a antinociceção induzida após uma única EECI como observado na Figura 11C (ANOVA de duas vias, tratamento x tempo; $F_{(2, 15)} = 7.470$, $p = 0.0056$; pós teste de Bonferroni, $p = 0.0003$; **EECI+mBIC** - n= 4; Pré 1= 18.250 ± 2.658 ; Pós 1: 66.500 ± 9.613 ; vs **SHAM_{EECI} +mBIC** - n= 3; Pré 1= 20.333 ± 3.930 ; Pós 1: 18.333 ± 3.930 ; $p = 0.0003$); (**Figura 11C**).

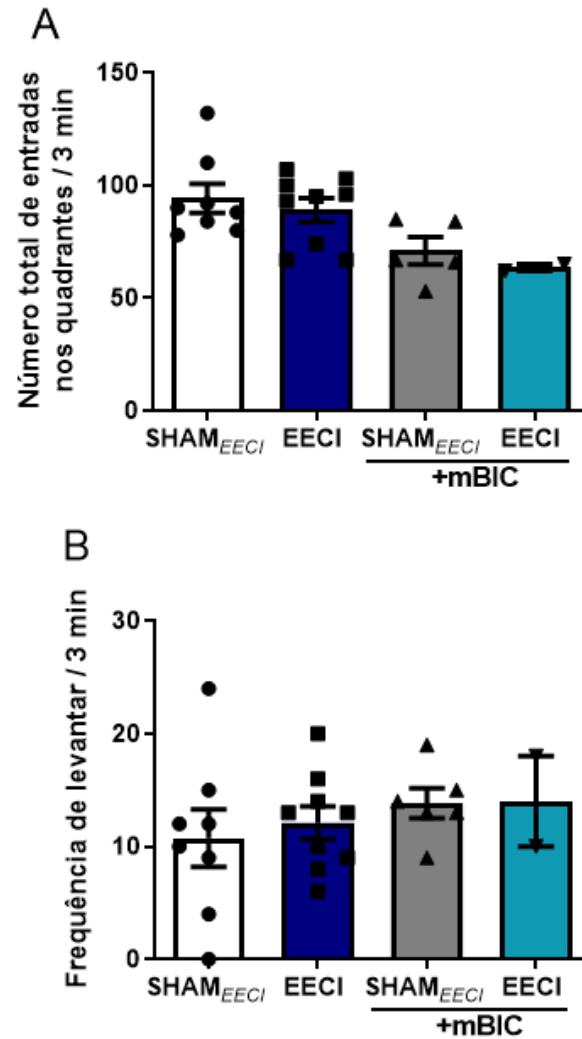
Figura 11- Efeito da administração de mBIC sobre a antinociceção mecânica induzida pela EECI. Foram aferidas medidas basais (Basal) de resposta ao estímulo mecânico na pata posterior direita no teste de pressão de pata (g). Grupos **EECI** (n=9), **SHAM_{EECI}** (n=7), **EECI+mBIC** (n=4 a 5) e **SHAM_{EECI} +mBIC** (n=3 a 5) foram avaliados em uma medida Basal, então submetidos ao CCI e avaliados em uma medida antes da estimulação (Pré EECI 1), e antes e após (Pré e Pós) a sessão de estimulação ao primeiro (EECI 1) e quinto dia (EECI 5) de estimulação. Dados apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. Em (A) ** p= 0.0035 Pré EECI 1 vs Pós EECI 1 grupo EECI; ****p<0.0001 Basal vs Pré EECI 1; ##p=0.0016; ###p=0.0009; ##p=0.0025 grupos SHAM vs EECI em Pós EECI, Pré EECI 5 e Pós EECI 5, respectivamente. Em (B), ****p<0.0001 Basal vs Pré EECI 1; ***p=0.0005 Pré EECI 5 vs Pós EECI 5 grupo SHAM_{EECI} +mBIC; ###p=0.0001 grupo EECI vs EECI+mBIC medida Pós EECI 5; #####p<0.0001 grupo EECI vs SHAM medida Pós EECI 5. Em (C) ***p= 0.0002 Pré vs Pós grupo EECI+mBIC; e ###p=0.0003 grupos EECI+mBIC vs SHAM_{EECI} +mBIC.



6.2 EECI e a transmissão GABAérgica central não alteram a atividade locomotora geral de ratos com dor neuropática

Os resultados obtidos demonstram que tanto a EECI quanto a administração intratecal de mBIC não alteram a atividade locomotora geral dos animais, tanto sob o aspecto da locomoção, em número total de entradas nos quadrantes (ANOVA de uma via, $F_{(3, 20)} = 3.672$, $*p = 0.0295$; pós teste de Bonferroni, $p > 0.05$; **EECI**: $n = 9$; 89.11 ± 5.184 ; **SHAM_{EECI}**: $n = 8$; 94.25 ± 6.419 ; $p > 0.05$; **EECI+mBIC**: $n = 2$; 63.500 ± 1.500 ; **SHAM_{EECI+mBIC}**: $n = 5$; 71.00 ± 6.042 ; $p > 0.05$); quanto da frequência de levantar (ANOVA de uma via, $F_{(3, 21)} = 0.4611$, $p = 0.7124$; teste de Bonferroni, $p > 0.05$; **EECI**: $n = 9$; 12.11 ± 1.448 ; **SHAM_{EECI}**: $n = 8$; 10.75 ± 2.541 ; $p > 0.05$; **EECI+mBIC**: $n = 2$; 14.00 ± 4.00 ; **SHAM_{EECI} +mBIC**: $n = 6$; 13.83 ± 1.327 ; $p > 0.05$) (**Figura 12**).

Figura 12- Efeito da EECI e da administração de mBIC na atividade locomotora geral de ratos com dor neuropática. Animais $EECI$ (n=9) e $SHAM_{EECI}$ (n=8), $EECI+mBIC$ (n=2) e $SHAM_{EECI+mBIC}$ (n=5), foram submetidos ao teste de campo aberto uma única vez após cinco EECI, ou uma hora após administração de mBIC, sendo aferida locomoção (número total de entrada em quadrantes (em A) e frequência de levantar (em B)). Dados apresentados como média \pm e.p.m. Anova de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni.



Fonte: Autor (2020)

6.3 EECI aumenta a imunomarcção de GAD65 no CIp sem alterar a presença de GFAP nas demais regiões da circuitaria central de dor

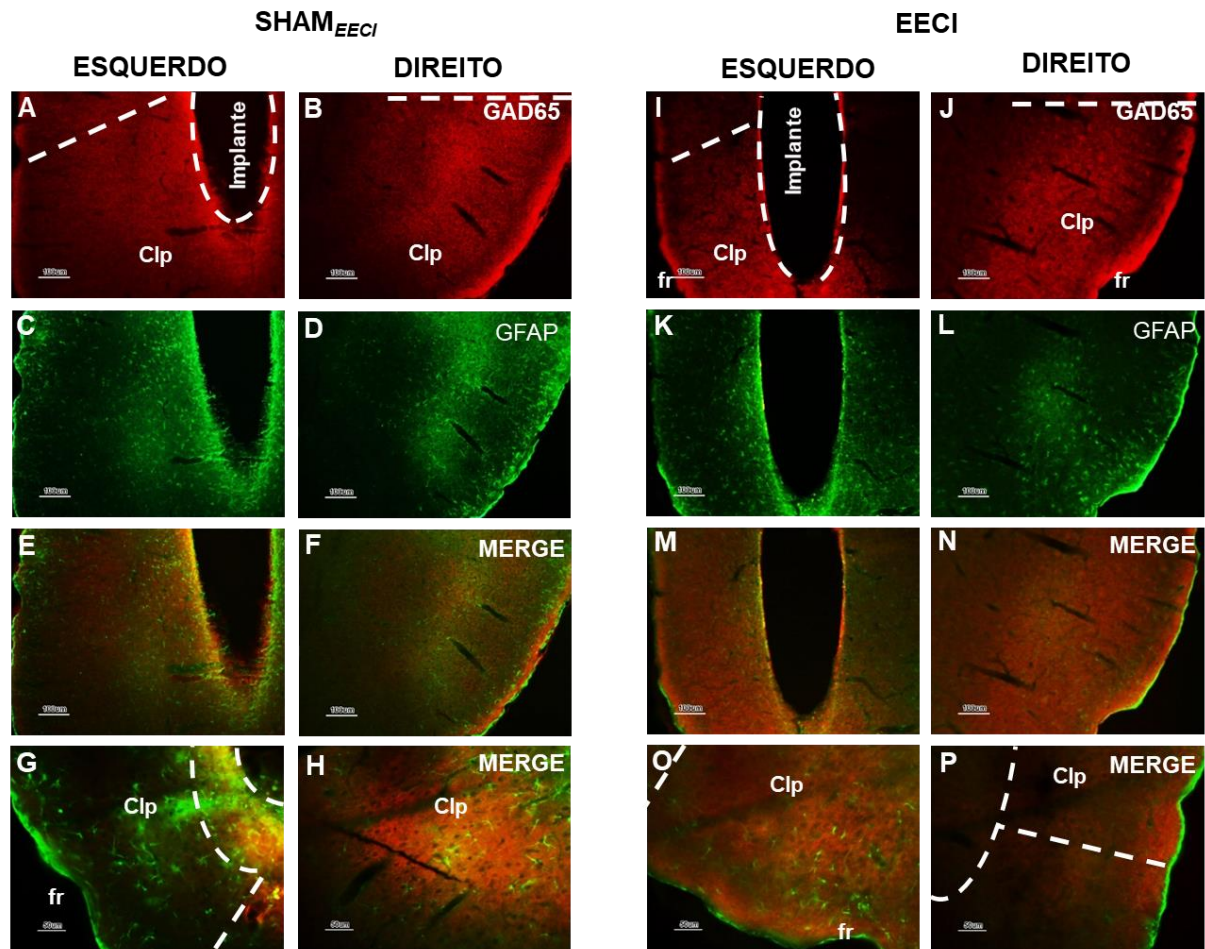
A imunorreatividade para GAD65 e GFAP foi analisada em cortes submetidos à imunofluorescência de dupla marcação no córtex insular posterior (CIp), PAG, hipocampo (HIP), córtex do cíngulo anterior e medial (ACC e MCC) e bulbo rostral ventro-medial (RVM) de animais **EECI** (n= 3 a 5) e **SHAM_{EECI}** (n= 3 a 5) submetidos a cinco EECI.

Imagens de cortes coronais de encéfalo de rato representativas das regiões de interesse, considerando o hemisfério estimulado (esquerdo) ou contralateral à estimulação (direito) estão representadas nas Figuras 13, 15, 17, 19, 21, onde a marcação fluorescente para GAD65 é apresentada em vermelho e de GFAP em verde, e as sobreposições de GAD65 e GFAP representadas pelas figuras *MERGE*.

A análise qualitativa da sobreposição de GAD65 e GFAP (*MERGE*) não permitiu a distinção de co-localização dos marcadores nas regiões analisadas (n= 3 fotos por região/ n=3 a 5 por grupo), como observado nas Figuras 13 (E, F, G, H, M, N, O, P), 15 (E, F, G, H), 17 (E, F, G, H, M, N, O, P), 19 (E, F, G, H, M, N, O, P), 21 (E, F, G, H, M, N, O, P), não implicando diretamente na presença ou alterações de GAD65 em células astrocíticas no modelo utilizado.

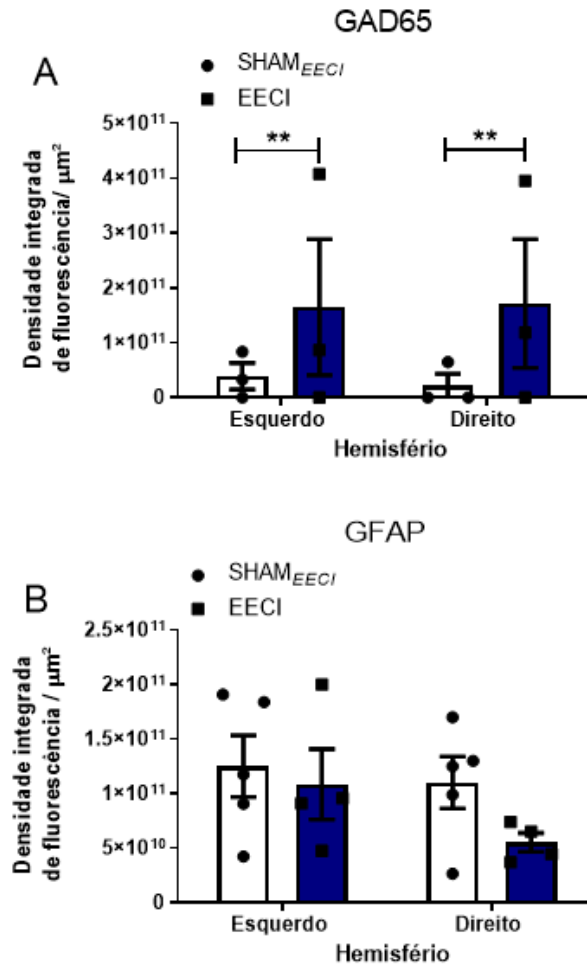
A análise semi-quantitativa da densidade integrada de fluorescência para GAD65 e GFAP apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, demonstram que cinco EECI aumentaram a imunomarcção de GAD65 no CIp em ambos hemisférios, sem influenciar a imunorreatividade desta enzima nas demais regiões analisadas (Tabela 1). Não foram observadas alterações na imunomarcção de GFAP nas regiões analisadas (Tabela 2).

Figura 13- Imunofluorescência para GAD65 e GFAP no Clp. Encéfalos de ratos **EECI** (n=3 GAD65/ n=4 GFAP – I a P) e **SHAM_{EECI}** (n=3 GAD65/ n=5 GFAP – A a H) foram coletadas após cinco EECI e cortes histológicos foram submetidos a imunofluorescência de dupla marcação para GAD65 (vermelho) e GFAP (verde). Imagens obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no programa ImageJ. Tracejado branco define a área de implante e a área do Clp nos hemisférios estimulado (esquerdo) e contralateral à estimulação (direito), (coordenadas de referência: bregma -8.40 mm até bregma -5.76 mm). *MERGE* corresponde à sobreposição de GAD65 e GFAP em aumento maior e menor, respectivamente, em (E), (F), (M), (N) e (G), (H), (O), (P). Réguas representativas de 100 e 50 μ m. Abreviações: Clp: córtex insular posterior; fr: fissura rinal.



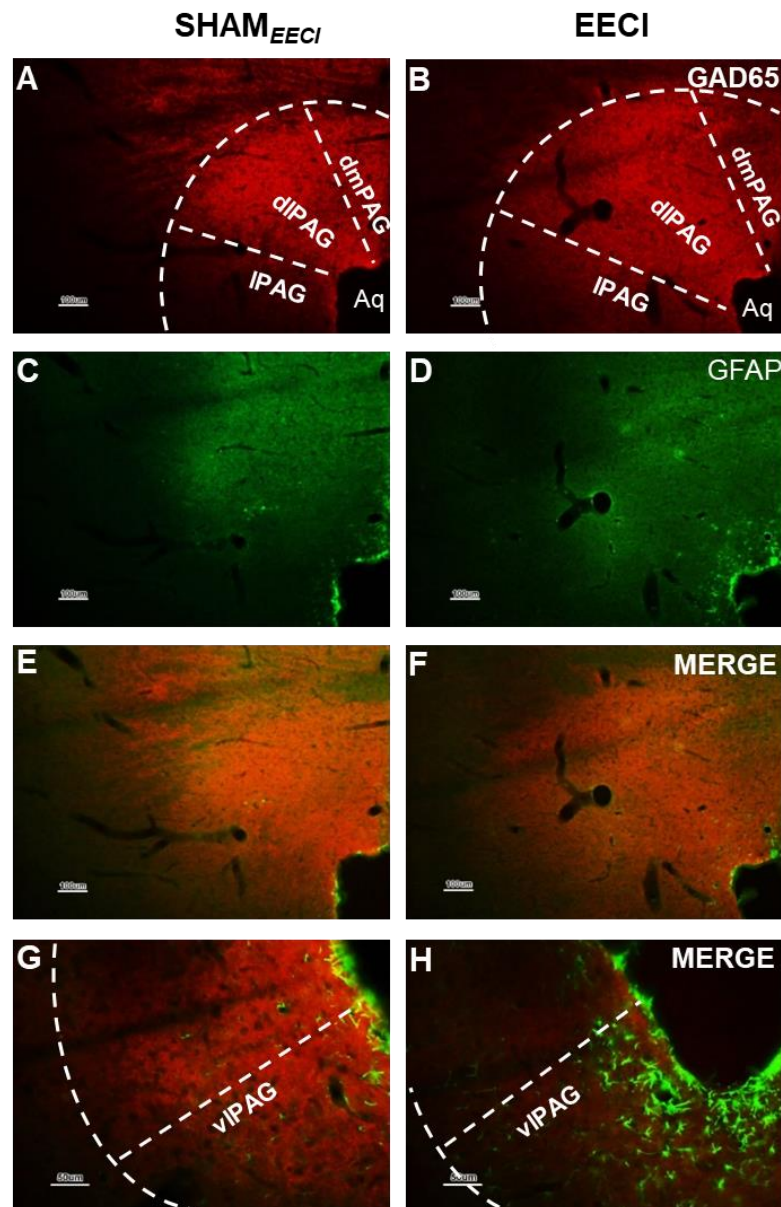
Fonte: Autor (2020)

Figura 14- Efeito de cinco EECI sobre a imunomarcção para GAD65 e GFAP no CIp. Foram obtidas imagens em microscópio de fluorescência do CIp de animais EECI (n=3) e SHAM_{EECI} (n=3) e a densidade integrada de fluorescência de GAD65 (A) e GFAP (B) analisada nos hemisférios esquerdo e direito utilizando o programa ImageJ. Dados apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. Em (A) $**p=0.0033$ SHAM_{EECI} vs EECI, lado esquerdo; $**p=0.0047$ SHAM_{EECI} vs EECI, lado direito.



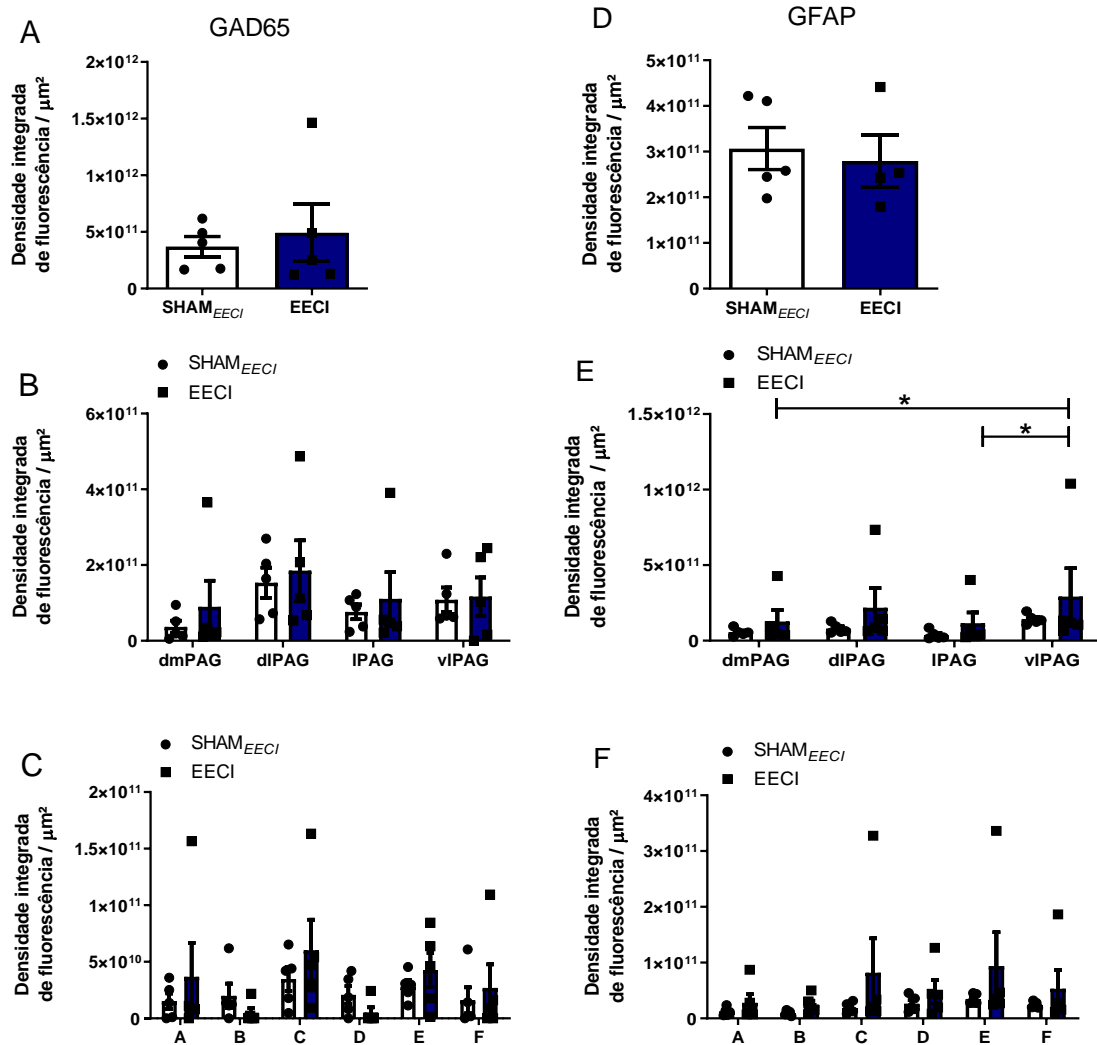
Fonte: Autor (2020)

Figura 15- Imunofluorescência para GAD65 e GFAP na PAG. Cortes coronais de ratos **EECI** (n=5 – B, D, F, H) e **SHAM_{EECI}** (n=5 – A, C, E, G) coletados após cinco EECI foram submetidos à imunofluorescência para GAD65 (vermelho) e GFAP (verde). Imagens obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no programa ImageJ. Réguas representativas de 100 e 50 μ m. Tracejado branco delimita as regiões de colunas da PAG dorso-medial (dmPAG), dorso-lateral (dlPAG), lateral (lPAG) e ventro-lateral (vlPAG); (coordenadas de referência: bregma -2.56 mm até bregma 0.00 mm). **MERGE** corresponde à sobreposição de GAD65 e GFAP em aumento maior e menor, respectivamente, em (E), (F) e (G), (H). Abreviaturas: Aq: aqueduto.



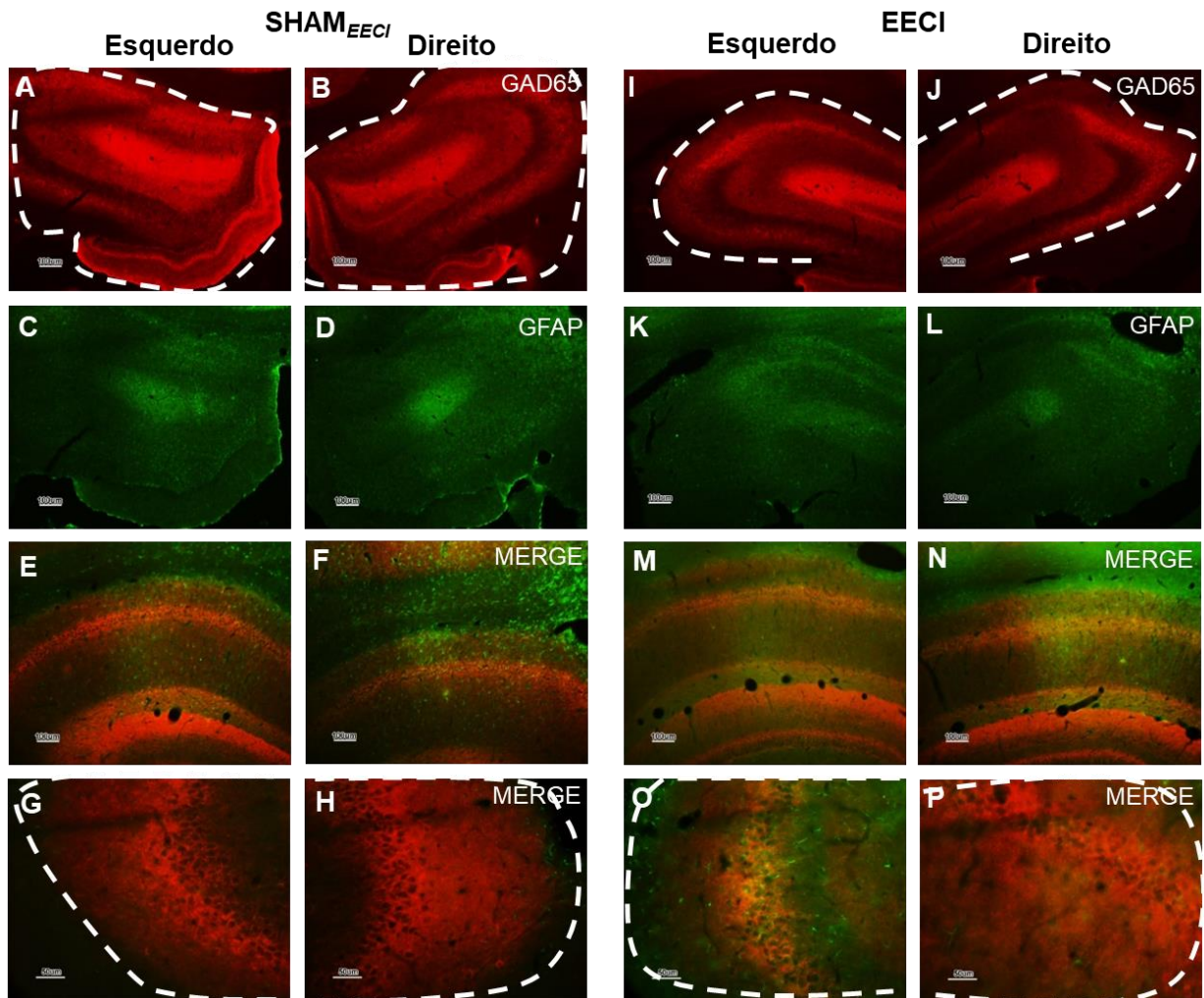
Fonte: Autor (2020)

Figura 16- Efeito de EECI sobre a imunomarcação para GAD65 e GFAP na PAG. Imagens de cortes coronais da PAG foram obtidas em microscopia de fluorescência e a densidade integrada de fluorescência de GAD65 (A) e GFAP (B) de animais **EECI** (n=5) e **SHAM_{EECI}** (n=5) analisada 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); e níveis rostro-caudais (A, B, C, D, E, F). Dados estão apresentados como média \pm e.p.m. Teste t não pareado ou ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. *p=0.0285 dmPAG vs vlPAG grupo EECI; e *p=0.0180 lPAG vs vlPAG grupo EECI.



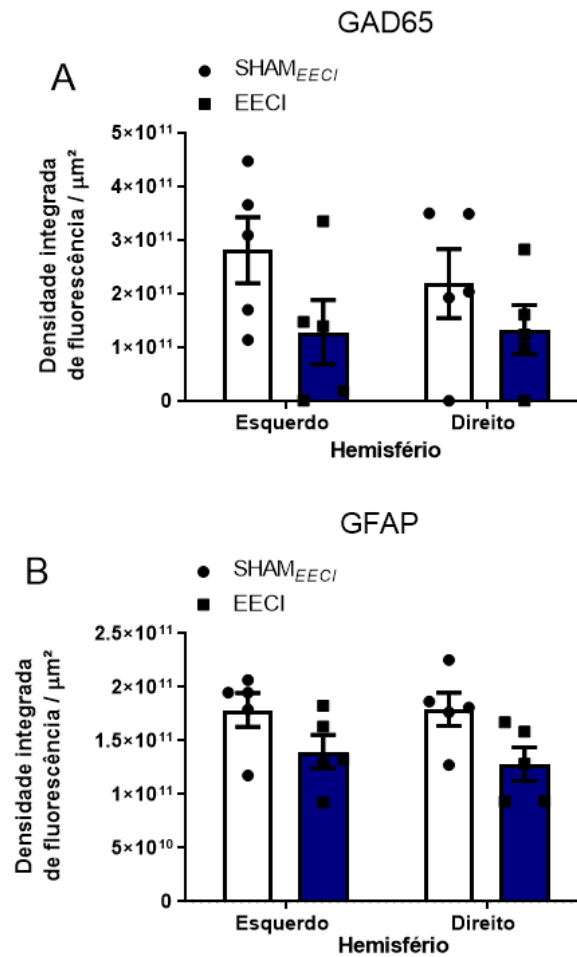
Fonte: Autor (2020)

Figura 17- Imunofluorescência para GAD65 e GFAP no hipocampo. Amostras de encéfalo de ratos **EECI** (n=3 – I a P) e **SHAM_{EECI}** (n=4 – A a H) foram coletadas após cinco EECI e cortes coronais de hipocampo (coordenadas de referência: bregma 3.96 mm até bregma -1.8 mm) foram submetidos à imunofluorescência para GAD65 (vermelho) e GFAP (verde). As imagens dos hemisférios esquerdo e direito foram obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no ImageJ. Tracejado branco delimita a região analisada. Réguas representativas de 100 e 50 μ m.



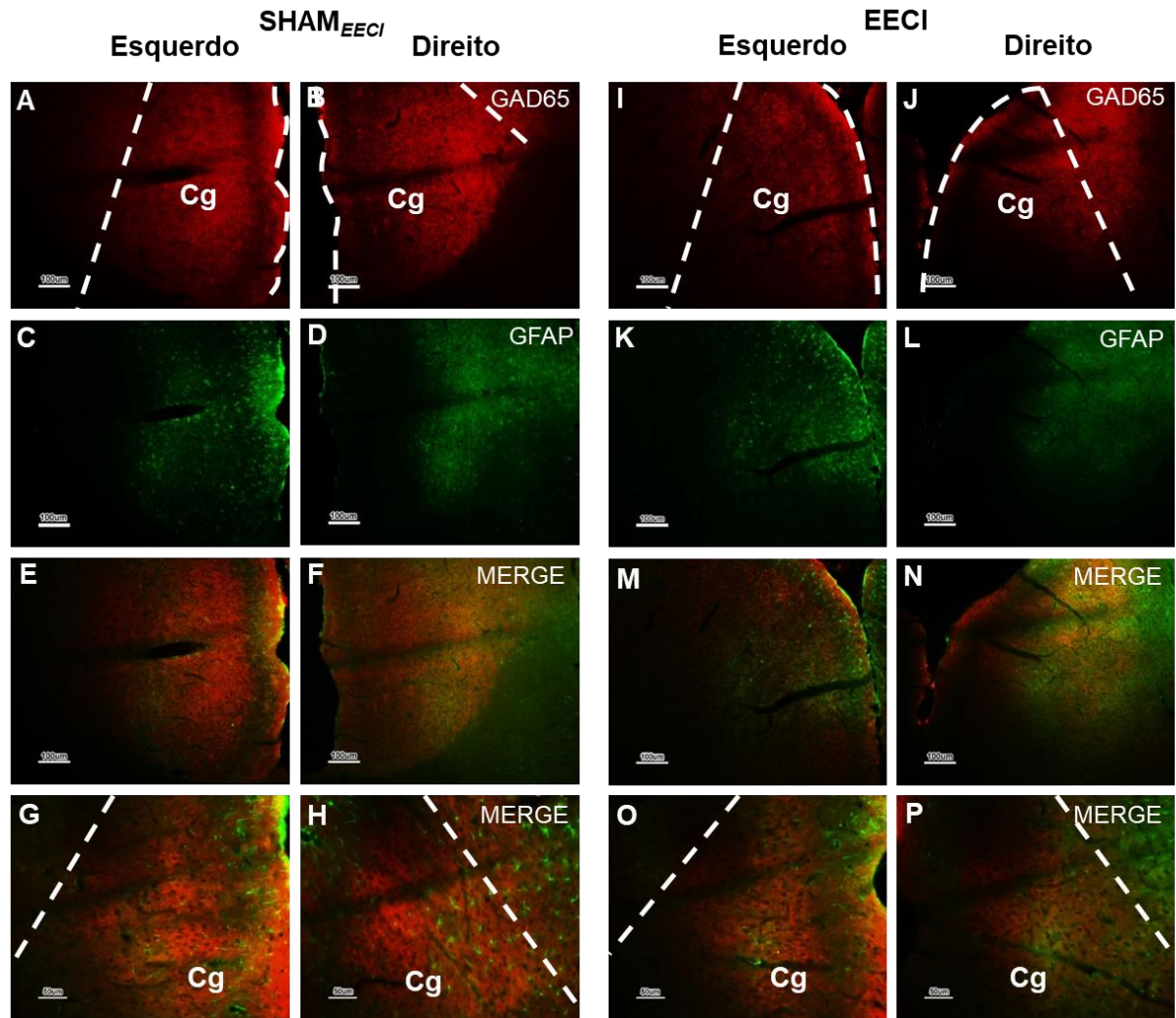
Fonte: Autor (2020)

Figura 18- Efeito de cinco EECI sobre a imunomarcção para GAD65 e GFAP no hipocampo. Foram obtidas imagens em microscópio de fluorescência e quantificada a densidade integrada de fluorescência de GAD65 (A) e GFAP (B) em amostras de animais **EECI** (n=3) e **SHAM_{EECI}** (n=4) no ImageJ. Dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.



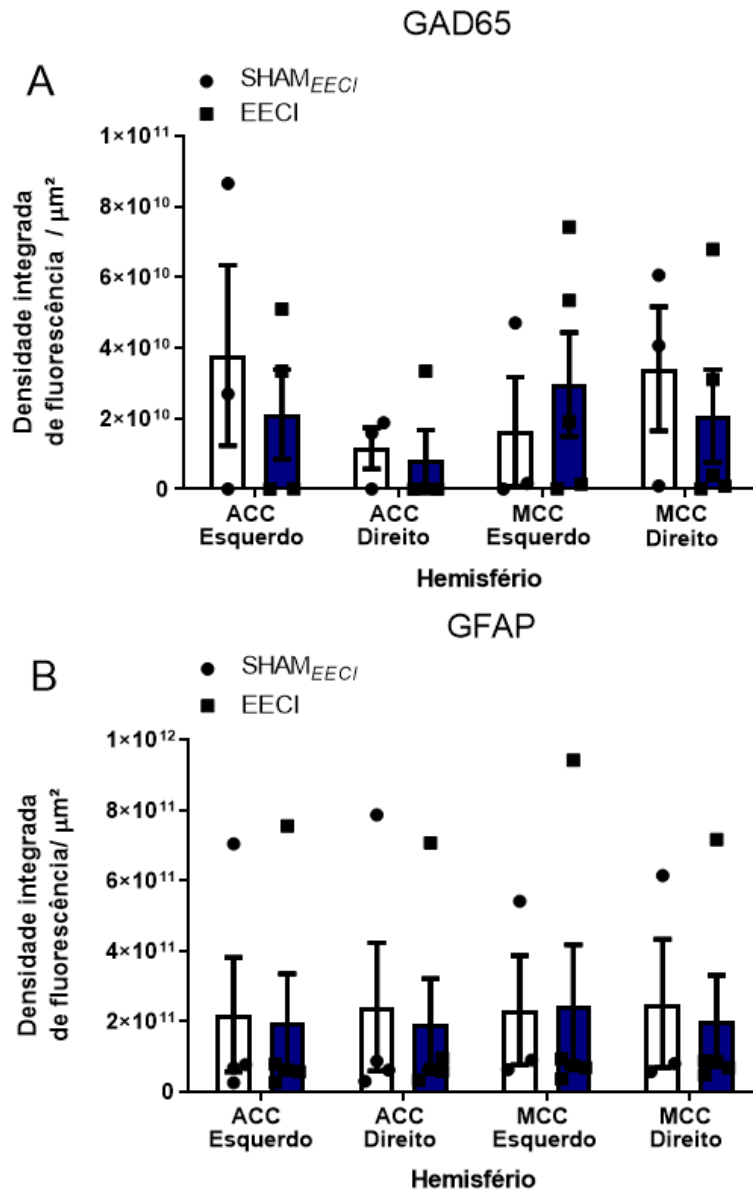
Fonte: Autor (2020)

Figura 19- Imunofluorescência para GAD65 e GFAP no córtex do cíngulo. Cortes coronais de encéfalos **EECI** (n=5 – I a P) e **SHAM_{EECI}** (n=5– A a H) foram submetidos à imunofluorescência de dupla marcação para GAD65 (vermelho) e GFAP (verde) no ACC (Imagens representativas abaixo de A a P) e MCC (coordenadas de referência: bregma 0.48 mm até bregma 4.80 mm; MCC: bregma -1.56 mm até bregma 0.36 mm). Imagens dos hemisférios esquerdo e direito obtidas em microscópio de fluorescência e analisadas no programa ImageJ. Tracejado branco delimita a região analisada. Réguas representativas de 100 e 50 μ m. Abreviações: Abreviações: Cg:cíngulo.



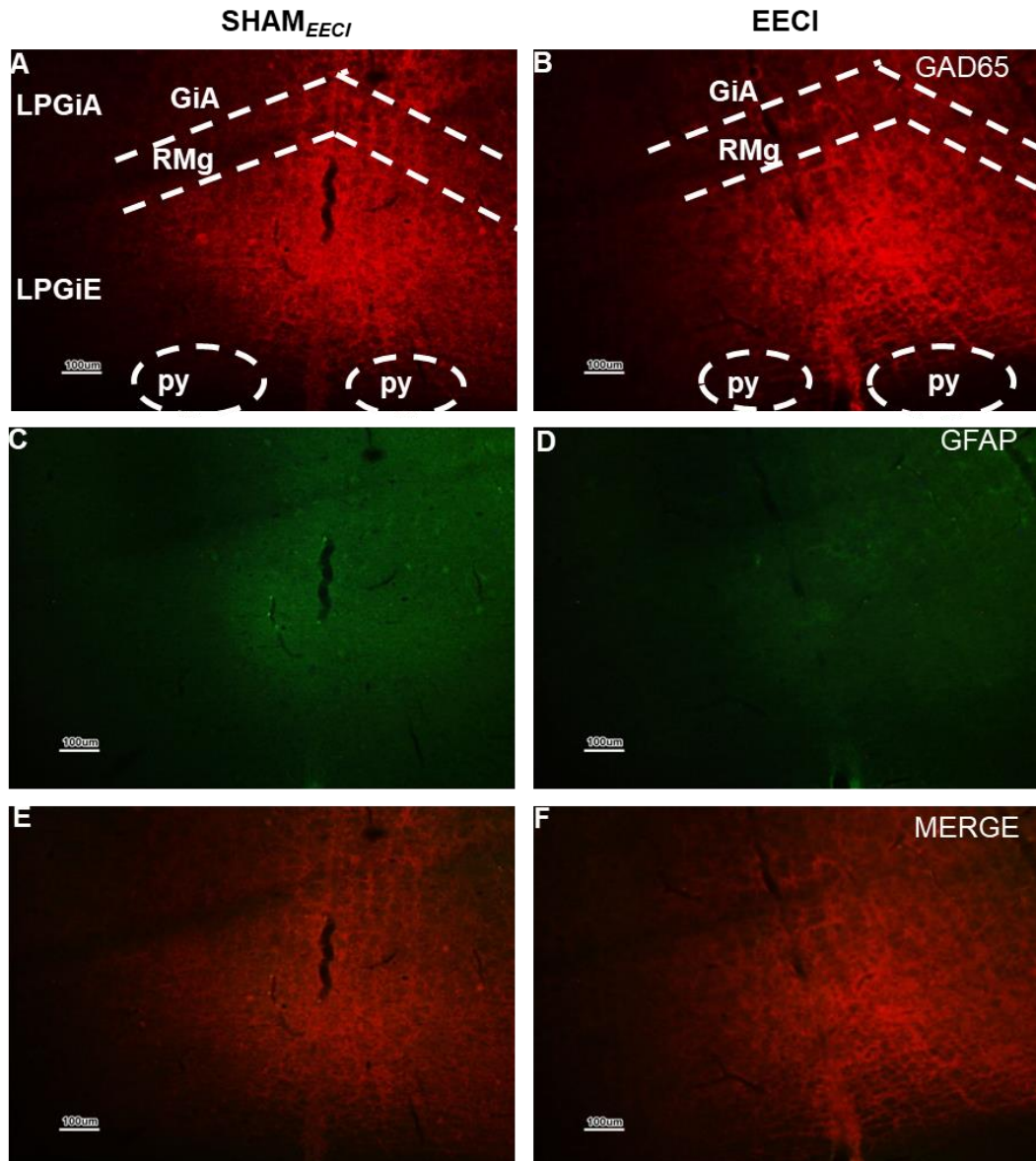
Fonte: Autor (2020)

Figura 20- Efeito de cinco EECI sobre a imunomarcação para GAD65 e GFAP no cíngulo. Cortes de encéfalos de EECI (n=5) e SHAM_{EECI} (n=5) foram submetidos a ensaio de imunofluorescência para GAD65 (A) e GFAP (B). Imagens obtidas em microscópio de fluorescência e a densidade integrada de fluorescência foi quantificada no ImageJ. Dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.



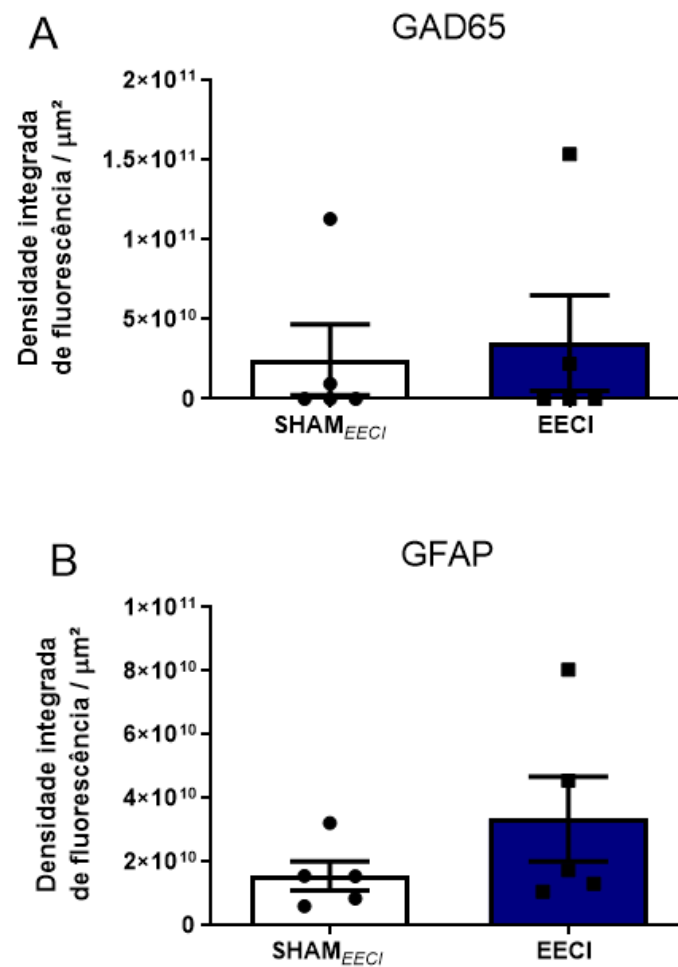
Fonte: Autor (2020)

Figura 21- Imunofluorescência para GAD65 e GFAP no RVM. Cortes **EECI** (n=5 – A, C, E) e **SHAM_{EECI}** (n=5 – B, D, F) submetidos à imunofluorescência para GAD65 (vermelho) e GFAP (verde). Imagens obtidas em microscópio de fluorescência do RVM (coordenadas de referência: bregma -11.88 mm até bregma -10.44 mm) e analisadas no ImageJ. Régua representativa de 100µm. Abreviações: GiA núcleo reticular gigantocelular; LPGiA: núcleo paragigantocelular lateral alpha; LPGiE: núcleo paragigantocelular lateral externo; RMg: núcleo magno da raphe; py: trato piramidal.



Fonte: Autor (2020)

Figura 22- Efeito de cinco EECI sobre a imunomarcção para GAD65 e GFAP no RVM. Cortes coronais coletados de encéfalo de ratos **EECI** (n=5) e **SHAM_{EECI}** (n=5) foram submetidos à imunofluorescência para GAD65 (A) e GFAP (B). Imagens representativas obtidas em microscópio de fluorescência e a densidade integrada de fluorescência das imagens foi quantificada utilizando-se o programa ImageJ. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. Teste t não-pareado.



Fonte: Autor (2020)

Tabela 1 - Imunorreatividade para GAD65

	SHAM _{EECI}		EECI		F/t teste	Valor de p
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito		
Clp	3.885x10 ¹⁰ ±2.429x10 ¹⁰	2.164 x10 ¹⁰ ±2.162x10 ¹⁰	1.647x10 ¹¹ ±1.240x10 ¹¹ a	1.713x10 ¹¹ ±1.171x10 ¹¹ a	F _(1,2) = 1.870	0.3049
PAG	3.716 x10 ¹¹ ± 8.827x10 ¹¹		4.918 x10 ¹¹ ± 2.518x10 ¹⁰		t(8)=0.4507	0.6642
HIP	2.811x10 ¹¹ ±6.163x10 ¹⁰	2.189x10 ¹¹ ±6.436x10 ¹⁰	1.281x10 ¹¹ ±5.991x10 ¹⁰	1.329x10 ¹¹ ±4.586x10 ¹⁰	F _(1,16) = 0.3297	0.5738
ACC	3.789x10 ¹⁰ ±2.555x10 ¹⁰	1.161x10 ¹⁰ ±5.823x10 ⁰⁹	2.118x10 ¹⁰ ±1.269x10 ¹⁰	8.445x10 ⁰⁹ ±8.331x10 ⁰⁹	F _(1,7) = 0.6825	0.4360
MCC	1.632x10 ¹⁰ ±1.542x10 ¹⁰	3.408x10 ¹⁰ ±1.752x10 ¹⁰	2.971x10 ¹⁰ ±1.471x10 ¹⁰	2.0821x10 ¹⁰ ±1.310x10 ¹⁰	F _(1,12) = 0.7242	0.4114
RVM	2.453 x10 ¹⁰ ± 2.217x10 ¹⁰		3.512 x10 ¹⁰ ± 2.989x10 ¹⁰		t(8)=0.2848	0.7830

Amostras de encéfalo foram obtidas 1 h após a 5^a sessão de **EECI** em ratos com dor neuropática (n = 3 a 5) ou **SHAM_{EECI}** (n = 2 a 5) e submetidas à imunofluorescência para GAD65. Imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e a densidade integrada de fluorescência foi analisada para cada área de interesse nos hemisférios esquerdo (estimulado) e direito (contralateral à estimulação): córtex insular posterior (Clp); PAG; Hipocampo (HIP); córtex do cíngulo anterior e medial (ACC e MCC); e bulbo rostral ventro-medial (RVM). Esquerdo e direito correspondem ao lado do hemisfério. Dados apresentados como média ± e.p.m. Anova de duas vias seguido do pós teste de Bonferroni; **a** p<0.05 EECI comparado ao grupo SHAM_{EECI}. Ou teste t não pareado.

Fonte: Autor (2020)

Tabela 2- Imunorreatividade para GFAP

	SHAM _{EECI}		EECI		F/t teste	Valor de p
	Esquerdo	Direito	Esquerdo	Direito		
Cip	1.252x10 ¹¹ ±2.817x10 ¹⁰	1.101x10 ¹¹ ±2.379x10 ¹⁰	1.086x10 ¹¹ ±3.233x10 ¹⁰	5.519x10 ¹⁰ ±8.683x10 ⁰⁹	F _(1,7) = 1.092	0.3308
PAG	3.067x10 ¹¹ ±4.592x10 ¹⁰		2.794x10 ¹¹ ±5.659x10 ¹⁰		t(7)=0.3793	0.7157
HIP	1.786x10 ¹¹ ±1.587x10 ¹⁰	1.794x10 ¹¹ ±1.559x10 ¹⁰	1.400x10 ¹¹ ±1.543x10 ¹⁰	1.282x10 ¹¹ ±1.560x10 ¹⁰	F _(1,16) = 0.1602	0.6943
ACC	2.193x10 ¹¹ ±1.623x10 ¹¹	2.418x10 ¹¹ ±1.821x10 ¹¹	1.960x10 ¹¹ ±1.401x10 ¹¹	1.920x10 ¹¹ ±1.294x10 ¹¹	F _(1,10) = 0.241	0.8795
MCC	2.321x10 ¹¹ ±1.552x10 ¹¹	2.510x10 ¹¹ ±1.821x10 ¹¹	2.430x10 ¹¹ ±1.750x10 ¹¹	2.018x10 ¹¹ ±1.291x10 ¹¹	F _(1,8) = 0.2556	0.6268
RVM	1.546x10 ¹⁰ ±4.581x10 ⁰⁹		3.334x10 ¹⁰ ±1.332x10 ¹⁰		t(7)=1.270	0.2399

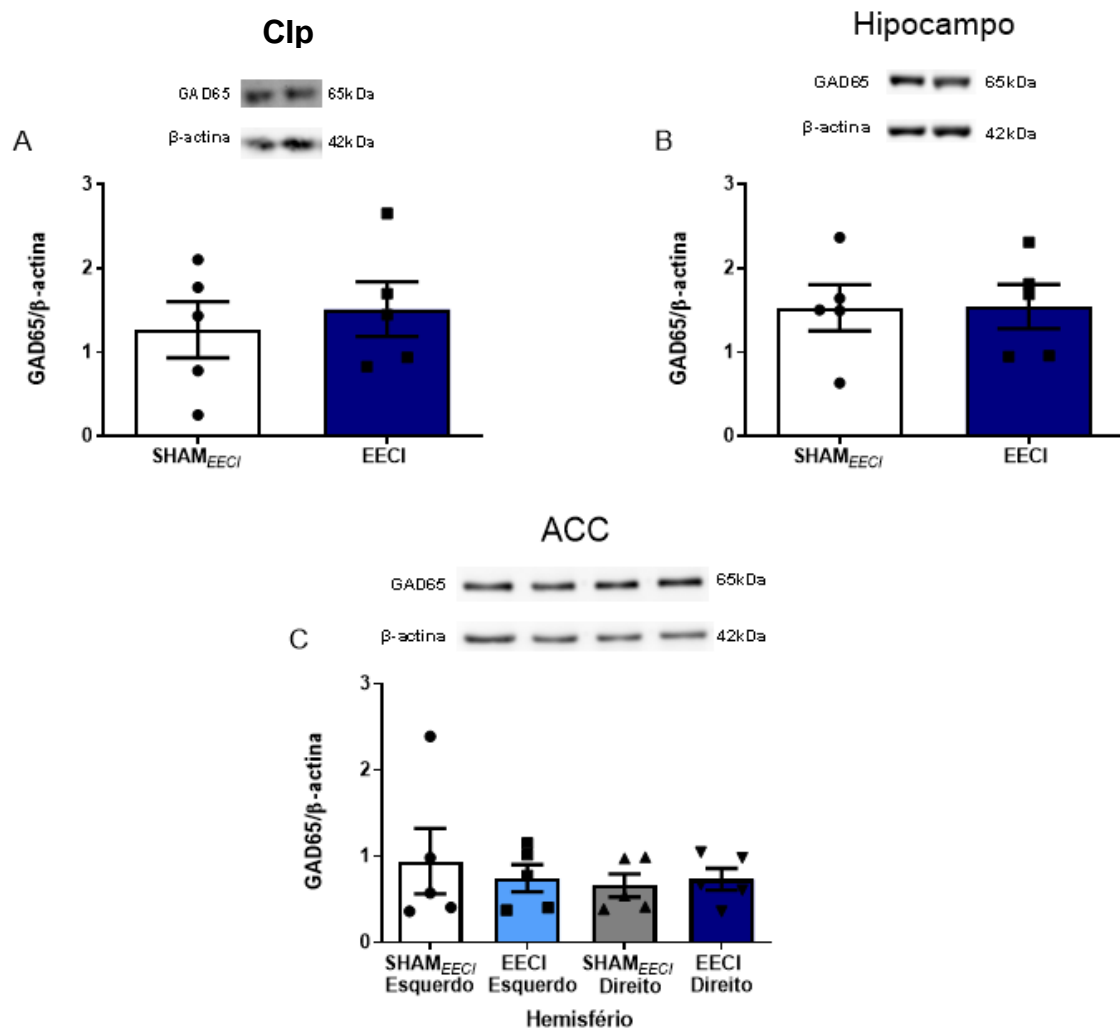
Imunofluorescência para GFAP foi realizada em amostras de encéfalo de ratos **EECI** (n = 3 a 5) ou **SHAM_{EECI}** (n = 2 a 5). Imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e obtida a densidade integrada da fluorescência nos hemisférios esquerdo (estimulado) e direito (contralateral à estimulação) no córtex insular posterior (Cip); PAG; Hipocampo (HIP); córtex do cíngulo anterior e medial (ACC e MCC); e bulbo rostral ventro-medial (RVM). Esquerdo e direito correspondem ao lado do hemisfério. Dados apresentados como média ± e.p.m. Anova de duas vias seguido do teste de Bonferroni; ou teste t não pareado.

Fonte: Autor (2020)

6.4 EECI não altera a proteína total GAD65 no CIp, hipocampo e ACC

Os níveis de GAD65 no CIp, hipocampo e ACC também foram avaliados em animais **EECI** (n=5) e **SHAM_{EECI}** (n=5) por meio de ensaio de western blotting. Os resultados apresentados na **Figura 23** demonstram que cinco EECI não alteram a quantidade de proteína total de GAD65 nas regiões analisadas no CIp esquerdo (Teste t não pareado t (8)= 0.5209; p= 0.6165; grupo EECI n= 5; 1.513 ± 0.3267 ; grupo **SHAM_{EECI}**, n= 5; 1.269 ± 0.335 ; p>0.05); hipocampo total (Teste t não pareado t(8)= 0.424; p= 0.9672; grupo **EECI** n= 5; 1.544 ± 0.226 ; grupo **SHAM_{EECI}**, n= 5; 1.528 ± 0.275 ; p>0.05) e ACC (Esquerdo: Teste t não pareado t (8) = 0.4838; p= 0.6415; grupo **EECI** n=5; 0.744 ± 0.157 ; grupo **SHAM_{EECI}**, n= 5; 0.942 ± 0.377 ; p>0.05); (Direito: teste t não pareado: $F_{(4, 4)} = 1.111$; p= 0.9212; **EECI** n=5; 0.732 ± 0.126 ; **SHAM_{EECI}**, n=5; 0.66 ± 0.133 ; p>0.05).

Figura 23- Efeito de cinco EECI sobre os níveis de GAD65. Amostras de Clp (A), hipocampo (B) e ACC (C) foram coletadas de animais **EECI** (n= 5) ou **SHAM_{EECI}** (n= 5) e congeladas imediatamente após cinco EECI para análise de western blotting. Utilizou-se anticorpo primário para GAD65 e β -actina foi usada como controle. Dados apresentados como a média \pm e.p.m. Teste t não pareado ou ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni.



Fonte: Autor (2020)

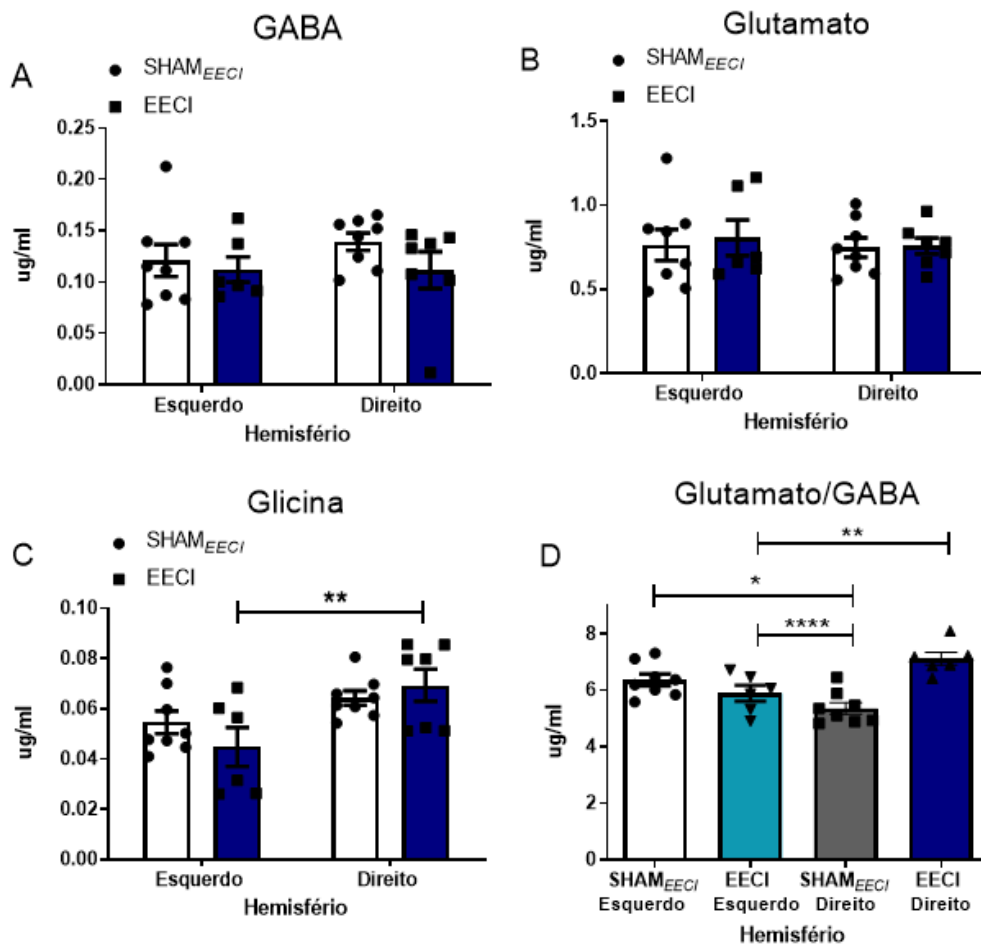
6.5 EECI não altera os níveis de GABA, glutamato e glicina no CIp

Os níveis de GABA, glutamato e glicina foram analisados por HPLC nas amostras de CIp após cinco EECI em animais **EECI** (n=6 a 7) e **SHAM_{EECI}** (n= 8). A razão glutamato / GABA também foi calculada com base na análise quantitativa dos neurotransmissores. Os resultados apresentados na **Figura 24** mostram que cinco EECI não alteraram os níveis de GABA e glutamato nas amostras analisadas (GABA: ANOVA de duas vias, tratamento x grupo; $F_{(1,25)} = 0.4660$; $p = 0.5011$; pós teste de Bonferroni, $p > 0.05$; **EECI** n=5; 1.544 ± 0.226 ; **SHAM_{EECI}**, n = 5; 1.528 ± 0.275 ; $p > 0.05$; Esquerdo: **EECI** - n=3; 0.112 ± 0.012 ; **SHAM_{EECI}** - n= 3; 0.120 ± 0.015 ; $p > 0.05$; Direito: **EECI**- n=3; 0.111 ± 0.017 ; **SHAM_{EECI}** - n = 3; 0.139 ± 0.008 ; $p > 0.05$); (Glutamato: ANOVA de duas vias, tratamento x grupo, $F_{(1, 25)} = 0.04883$; $p = 0.8269$; pós teste de Bonferroni, $p > 0.05$; Esquerdo: **EECI**- n=3; 0.807 ± 0.106 ; **SHAM_{EECI}** n=3; 0.764 ± 0.092 ; $p > 0.05$; Direito: **EECI** - n=3; 0.757 ± 0.047 ; **SHAM_{EECI}** - n= 3; 0.749 ± 0.057 ; $p > 0.05$).

Os níveis de glicina no CIp do hemisfério contralateral à estimulação (direito) dos animais com EECI foram mais altos em comparação com o lado esquerdo (ANOVA de duas vias, tratamento x grupo, $F_{(1,25)} = 10.23$; $p = 0.0037$; pós teste de Bonferroni, $**p < 0.01$; **EECI** – Esquerdo - n=3; 0.044 ± 0.007 ; Direito - n=3; 0.069 ± 0.006 ; $**p = 0.0099$), mas não diferente do grupo **SHAM_{EECI}** (Anova de duas vias, $F_{(1,25)} = 1.931$; $p = 0.1769$; pós teste de Bonferroni, $**p < 0.01$; grupo **SHAM_{EECI}** - Esquerdo - n= 3; 0.054 ± 0.004 ; Direito - n= 3; 0.064 ± 0.002 ; $p > 0.05$) (**Figura 24**).

Por fim, a razão glutamato/GABA na **Figura 24** foi maior no CIp esquerda em comparação ao lado direito (ANOVA de duas vias, tratamento x grupo, $F_{(3, 24)} = 10.47$; $p = 0.0001$; pós teste de Bonferroni $*p < 0,05$; esquerdo: **EECI** - n=3; 7.125 ± 0.230 ; **SHAM_{EECI}** - n= 3; 6.37 ± 0.21 ; Direito: **EECI** - n=3; 5.893 ± 0.280 ; **SHAM_{EECI}** - n=3; 5.367 ± 0.200 ; $*p = 0.0169$ **SHAM_{EECI}** Esquerdo vs Direito; $**p = 0.0099$ **EECI** Esquerdo vs Direito; $****p < 0.0001$ **EECI** Esquerdo vs **SHAM_{EECI}** Direito).

Figura 24- Efeito de cinco EECI sobre os níveis de neurotransmissores no CIP. Amostras de CIP foram obtidas de ratos **EECI** (n= 6 a 7) ou **SHAM_{EECI}** (n= 8) imediatamente após cinco EECI e submetidas à extração de aminoácidos e análise por HPLC para avaliação dos níveis de GABA (A), glutamato (B) e glicina (C) e a razão glutamato/GABA (D). Dados apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguido do pós teste de Bonferroni. Em (C) $**p= 0.099$ EECI esquerdo vs direito; em (D) $*p=0.0169$ SHAM_{EECI} esquerdo vs direito; $** p= 0.0099$; EECI esquerdo vs direito; $****p<0.0001$ EECI esquerdo vs SHAM_{EECI} direito.

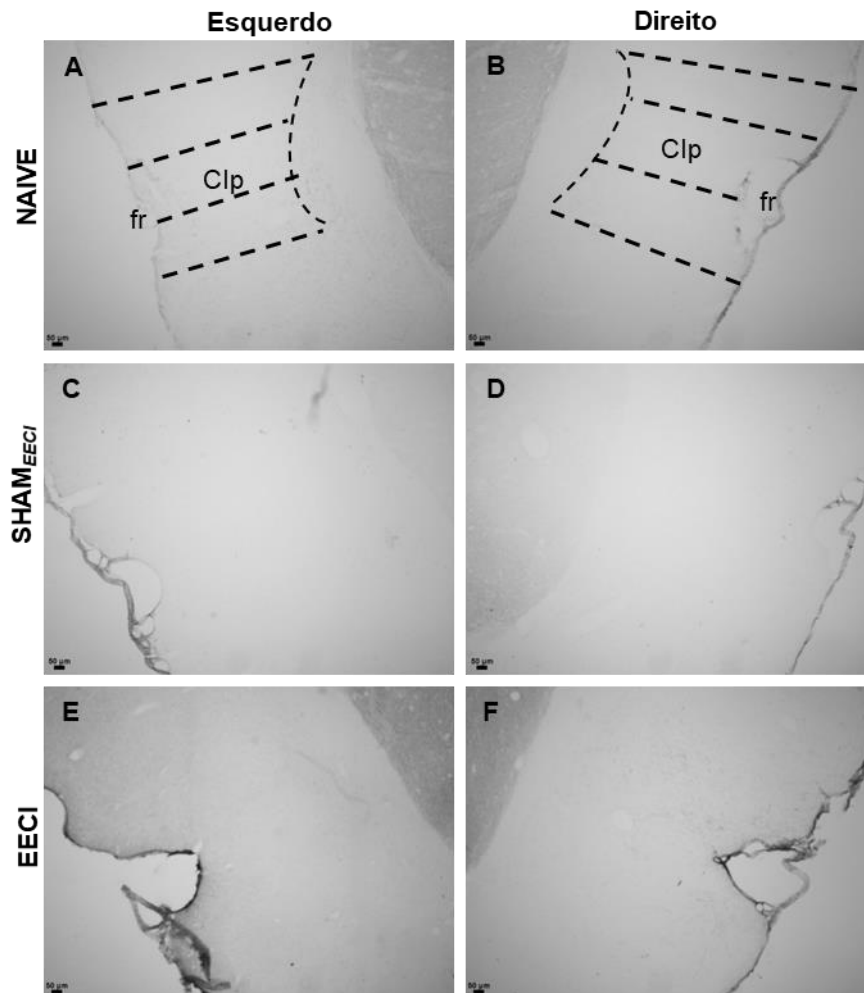


Fonte: Autor (2020)

6.6 EECI não altera a imunomarcção de tirosina hidroxilase na ínsula posterior

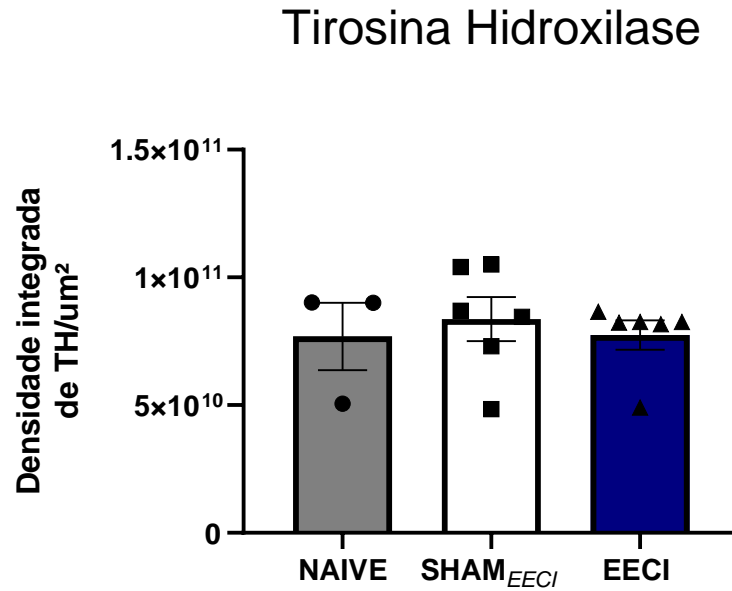
A imunorreatividade de tirosina hidroxilase (TH; **Figuras 25 e 26**) foi analisada em cortes coronais de CIp em **EECI** (n=3), **SHAM_{EECI}** (n=3) e **NAIVE** (n=2). A análise qualitativa das imagens apresentadas na **Figura 25** mostram que não se apresentaram marcações positivas de TH no córtex insular posterior. Além disso, a análise da densidade de TH na **Figura 26** demonstra que animais, **EECI**, **SHAM_{EECI}** e **NAIVE** apresentam níveis semelhantes de densidade de TH no CIp (ANOVA de uma via $F_{(2,12)}=0.2064$; $p=0.8163$; pós teste de Bonferroni $p>0.05$; **EECI** - n= 6; $7.75 \times 10^{11} \pm 5.72 \times 10^{09}$; **SHAM_{EECI}** - n= 6; $8.37 \times 10^{10} \pm 8.63 \times 10^{09}$; **NAIVE**-n= 3; $7.69 \times 10^{10} \pm 1.32 \times 10^{10}$; $p>0.9999$).

Figura 25- Imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase no CIp. Cortes coronais de ratos **EECI** (n=3), **SHAM_{EECI}** (n=3) e **NAIVE** (n=2) foram submetidos à imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase (TH) e imagens foram capturadas em microscópio óptico. Tracejado preto delimita a área do CIp nos hemisférios estimulado (esquerdo – A, C, E) e contralateral à estimulação (direito – B, D, F). Régua representativa de 100 μ m. Abreviações: CIp: córtex insular posterior; fr: fissura rinal.



Fonte: Autor (2020)

Figura 26- Análise imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase no CIp. Imagens de cortes de encéfalo de ratos **EECI** (n=6), **SHAM_{EECI}** (n=6) e **NAIVE** (n=3) submetidos à imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH) foram analisadas no programa ImageJ e foi obtida a densidade integrada de TH no CIp total. Dados foram apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni.

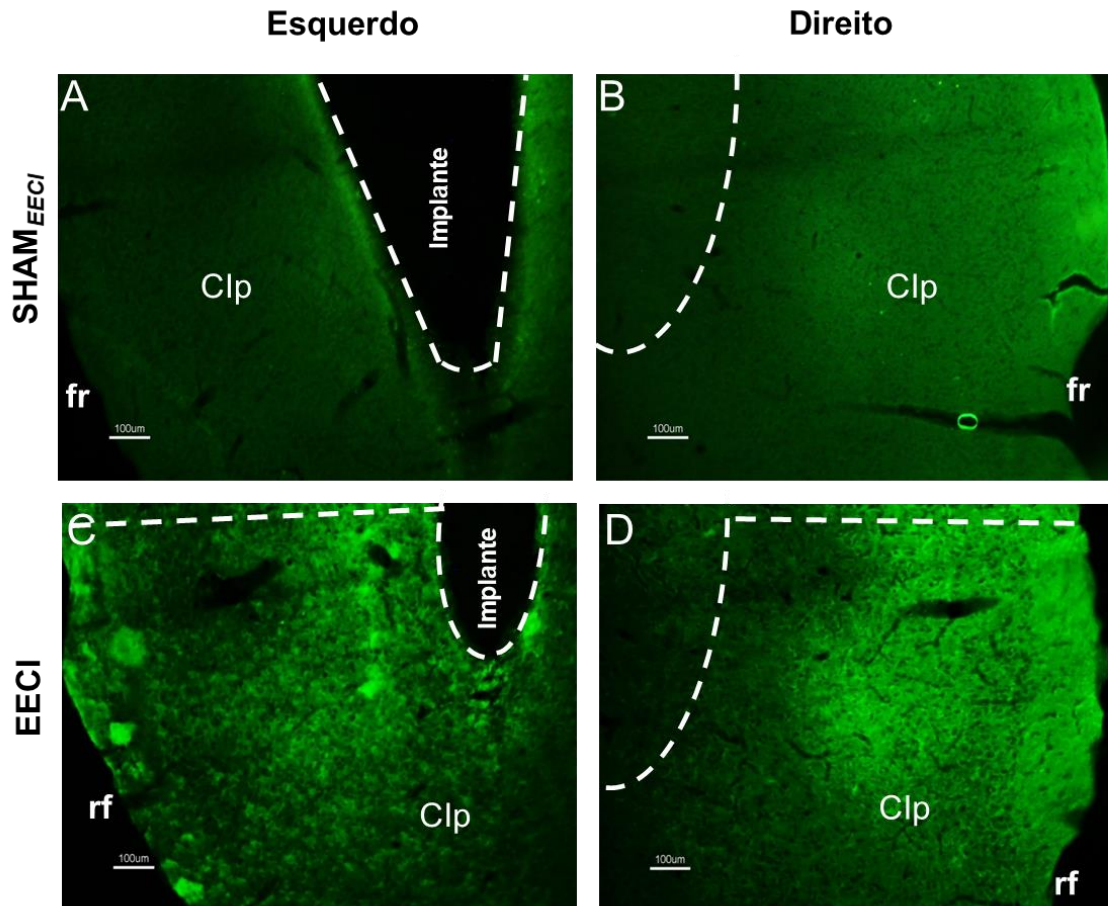


Fonte: Autor (2020)

6.7 EECI não altera a imunomarcção de sinaptofisina no CIp

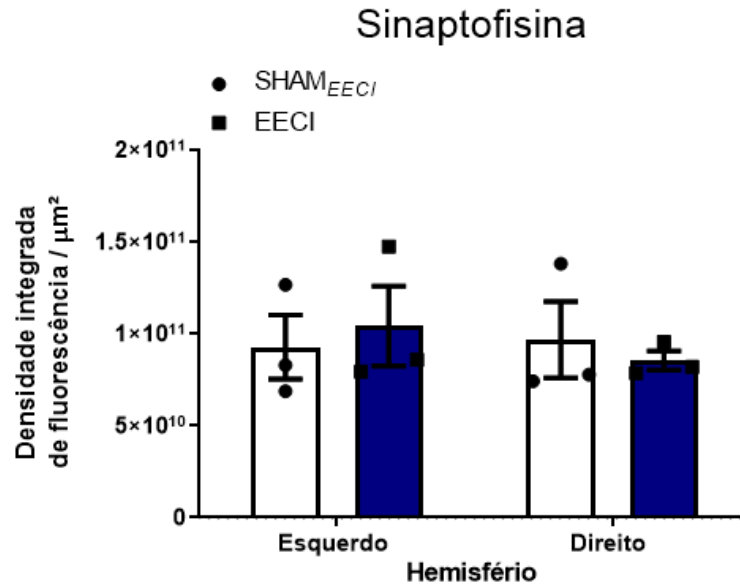
A imunomarcção para a proteína sináptica sinaptofisina (em verde, **Figura 27**) foi analisada em cortes coronais do CIp de animais **EECI** (n= 3) e **SHAM_{EECI}** (n= 3). Os dados apresentados na **Figura 28** demonstram que cinco EECI não alteram a imunomarcção de sinaptofisina no CIp (Anova de duas vias, tratamento x grupo; $F_{(1, 4)} = 1.615$; $p = 0.2727$; pós teste de Bonferroni $p > 0.05$; Esquerdo **EECI** - n= 3; $1.042 \times 10^{11} \pm 2.169 \times 10^{10}$; vs **SHAM_{EECI}** n= 3; $9.280 \times 10^{10} \pm 1.743 \times 10^{10}$; $p = 0.8836$; Direito **EECI** - n= 3; $8.538 \times 10^{10} \pm 5.163 \times 10^9$; vs **SHAM_{EECI}** - n= 3; $9.677 \times 10^{10} \pm 2.074 \times 10^{10}$; $p = 0.8833$).

Figura 27- Imunofluorescência para sinaptofisina no Clp. Cortes coronais de ratos **EECI** (n=3) e **SHAM_{EECI}** (n=3) foram submetidos a imunofluorescência para sinaptofisina e imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência e analisadas no programa ImageJ. Tracejado branco delimita o implante do eletrodo no Clp esquerdo e a área analisada nos hemisférios estimulado (esquerdo – A, C) e contralateral à estimulação (direito – B, D). Régua representativa de 100 μ m. Abreviações: Clp: córtex insular posterior; fr: fissura rinal.



Fonte: Autor (2020)

Figura 28 - Efeito de cinco EECI na imunomarcção de sinaptofisina no CIp. Cortes coronais de encéfalo de animais **EECI** (n=3) e **SHAM_{EECI}** (n=3) submetidos à imunofluorescência e a marcação para a proteína sinaptofisina foram analisados no programa ImageJ para obtenção da densidade integrada de fluorescência. Dados foram apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.

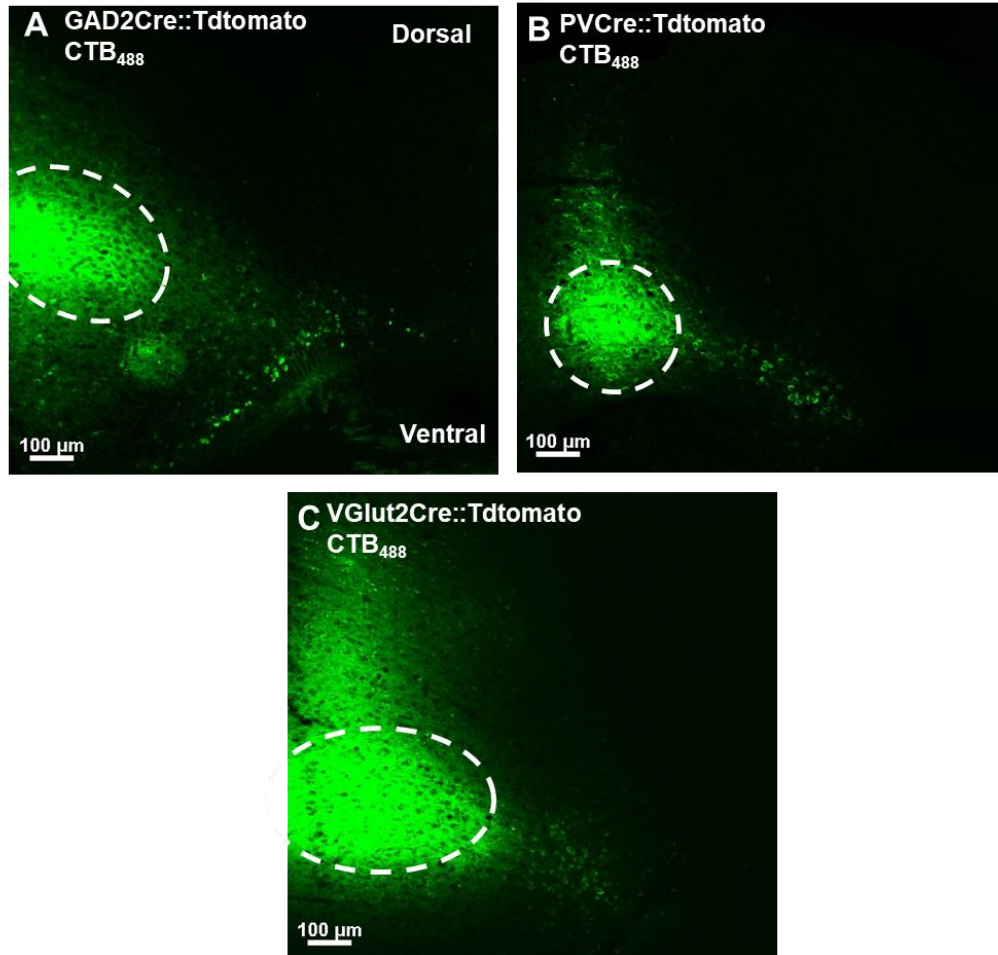


Fonte: Autor (2020)

6.8 Análise histológica confirma área de injeção de CTB488 no ACC em camundongos GAD2CrexAi9, PVCrexAi9 e Vglut2CrexAi9

O traçador retrógrado CTB488 (marcado em verde na Figura 29) foi injetado nos camundongos **GAD2CrexAi9** (n=9), **PVCrexAi9** (n=11) e **Vglut2CrexAi9** (n=10) e cortes histológicos foram analisados qualitativamente por microscopia confocal. Na **Figura 29**, círculos brancos pontilhados mostram a área de injeção no ACC direito, de acordo com as coordenadas estereotáticas padronizadas 1.055 mm anterior ao bregma; 0.255 mm de lateralidade à direita e 1.622 mm de profundidade.

Figura 29- Representação do local de injeção de CTB488 no ACC. Cortes coronais de encéfalo de camundongos onde os círculos brancos pontilhados mostram o local da injeção de CTB488 marcado em verde na parte posterior direita do ACC dos camundongos **GAD2Crex*Ai9*** (A, n=9), **PVCrex*Ai9*** (B; n=11) e **VGlut2Crex*Ai9*** (C; n=10).



Fonte: Autor (2020)

6.9 A análise de traçador retrógrado CTB488 revelou a presença de projeções GABAérgicas, PV⁺ e glutamatérgicas entre o CIp e o ACC

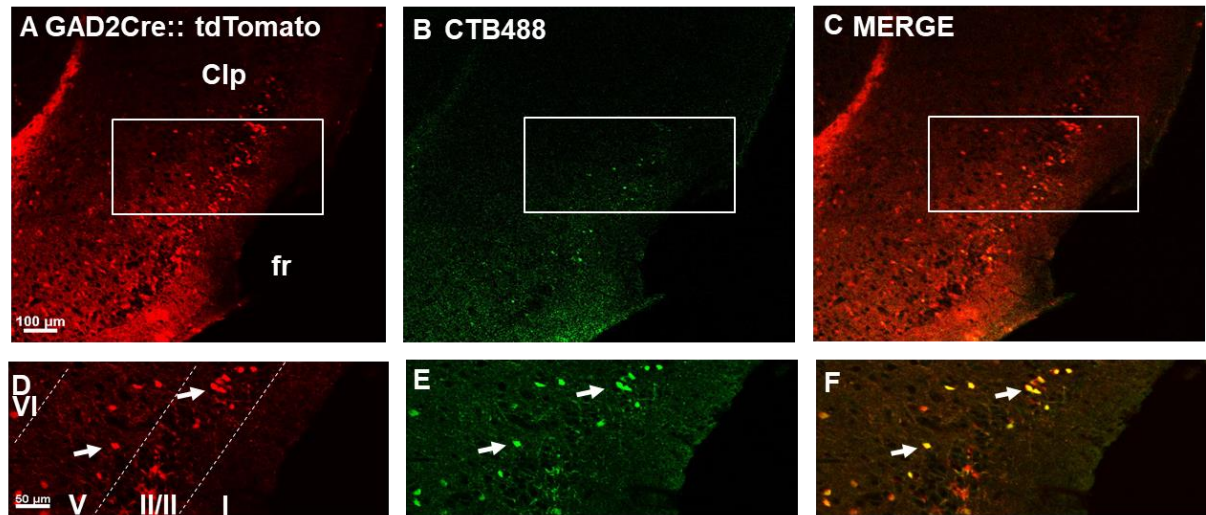
Traçador retrógrado CTB488 (marcado em verde nas **Figuras 30,32,34**) foi injetado no ACC de camundongos **GAD2CrexAi9** (n=9), **PVCrexAi9** (n=11) e **Vglut2CrexAi9** (n=10) nos quais a células GABAérgicas que expressam tdTomato estão marcadas em vermelho. Cortes histológicos foram analisados por microscopia confocal e analisados qualitativamente e quantitativamente para análise do número total de células.

A **Figura 30** mostra células neuronais GABAérgicas no CIp direita (**Figuras 30A e D**), bem como células marcadas retrogradamente com CTB488 no CIp (**Figura 30B e E**). Imagens sobrepostas (**Figura MERGE em 30C e F**) identificaram células GABAérgicas do CIp que se projetam para o ACC (setas brancas).

A análise quantitativa nas **Figuras 31A e B** mostra que nem todas as células positivas para GABA no CIp se projetam para o ACC (ANOVA de uma via $F_{(2,24)} = 1.915$; $p < 0.0001$; pós teste de Bonferroni $p < 0.0001$; **Fig. 31A**: número total de células- **GAD2Cre::tdTomato**= 187.7 ± 10.72 ; **CTB488**= 104.3 ± 12.00 ; **Sobreposição**= 100.3 ± 11.04 ; $p < 0.0001$ para as duas comparações; **Fig. 31B**: porcentagem de células **GAD2Cre::tdTomato** sobrepostas- **GAD2Cre::tdTomato** 53.68 ± 5.697), embora a porcentagem de células sobrepostas **CTB488** demonstrem que a maioria das células retrogradamente marcadas podem ser caracterizadas como células GABAérgicas (**Fig. 31B**: porcentagem = 96.96 ± 1.832).

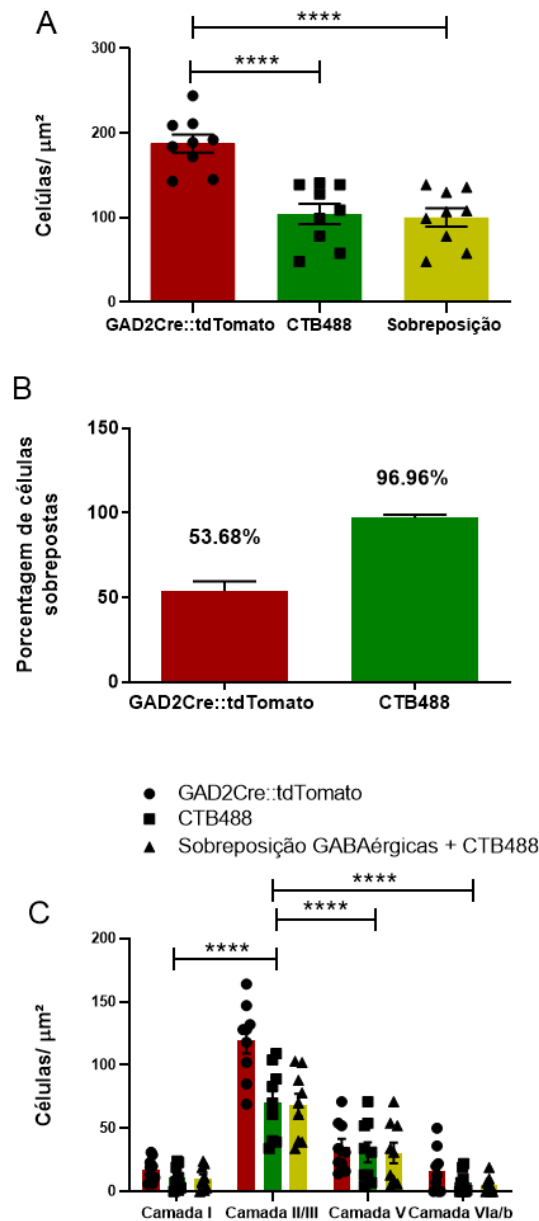
A análise das camadas corticais na **Figura 31C** demonstrou maior presença de células que se projetam do CIp para o ACC na camada II/III (**Fig. 31C**: número total de células- ANOVA de duas vias $F_{(3,96)} = 87.10$; $p < 0.0001$; pós teste de Bonferroni $p < 0.0001$; **GAD2Cre::tdTomato**= 119.222 ± 9.920 ; **CTB488**= 69.889 ± 9.461 ; **Sobreposição**= 68.33 ± 8.908 ; $p < 0.0001$)

Figura 30- Células GABAérgicas CTB488-positivas do CIp projetando-se para o ACC. Imagens representativas de cortes coronais do CIp de encéfalo de camundongos **GAD2CrexAi9** (n=9). Os animais foram injetados com CTB488 no ACC e amostras de CIp foram coletadas após 21 dias e analisadas por microscopia confocal. Em (A) e (D), células GABAérgicas positivas que expressam Tdtomato; em (B) e (E), células marcadas retrogradamente por CTB488; em (C) e (F) sobreposição de células GABAérgicas e CTB488 positivas. As setas brancas apontam para células GABAérgicas (D) e CTB488 positivas (E) e sobrepostas (F). Em (D), I a VI representam as camadas corticais. Barras de escala de 100 μ m e 50 μ m. Abreviações: CIp: córtex insular posterior; fr:fissura rinal.



Fonte: Autor (2020)

Figura 31.- Quantificação de células GABAérgicas CTB488 positivas do CIp projetando-se para o ACC em camundongos GAD2CreAi9. Animais foram injetados com CTB488 no ACC, e imagens do CIp foram analisadas com microscopia confocal. Análise quantitativa das células foi realizada utilizando Imagem J. Um total de três cortes por área por animal **GAD2CreAi9** (n = 9) foram analisadas. Dados apresentados como média \pm e.p.m. Em (A), ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni; ****p<0.0001 para as duas comparações. Em (C), ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni; ****p<0.0001.



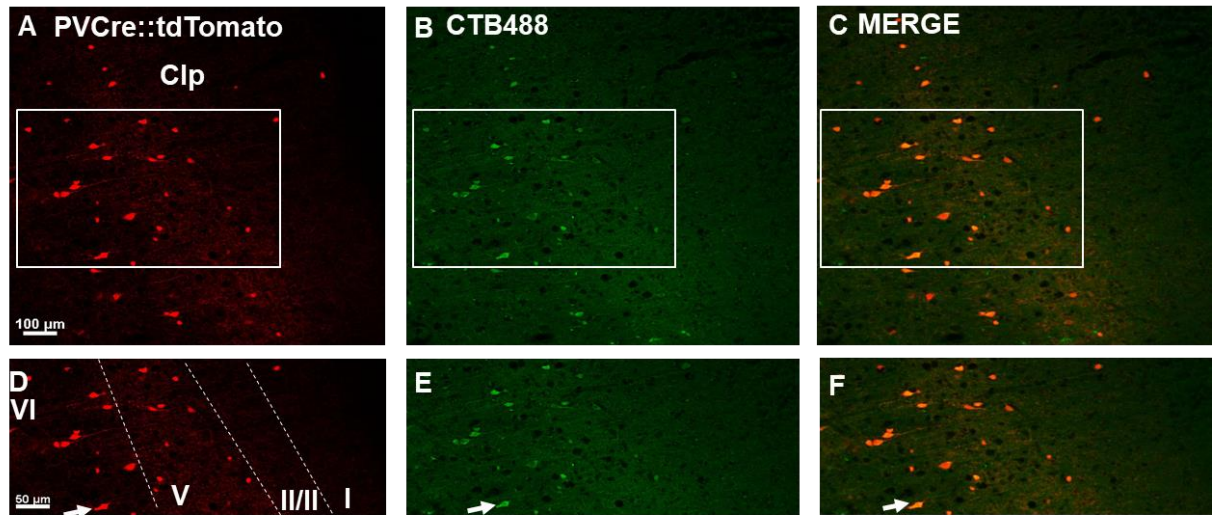
Fonte: Autor (2020)

De modo semelhante, foi-se analisado qualitativamente e quantitativamente células neuronais PV+ que expressavam tdTomato marcadas em vermelho e que marcadas retrogradamente por CTB488. A **Figura 32A e D** representa células que expressam **PV+ tdTomato**, e células CTB488 positivas no CIP são mostradas na **Figura 32B e E**. A sobreposição das marcações para co-localização de neurônios PV+ CTB488 positivos são representados na **Figura MERGE 32C e F**, e identificados por setas brancas.

A análise quantitativa demonstrada nas **Figuras 33A e B** confirma a presença de células PV+ no CIP também marcadas positivamente com CTB488 e que se sobrepõe, confirmando células que se projetam para o ACC (ANOVA de uma via $F_{(2,30)}=12.66$; $p=0.0001$; pós teste de Bonferroni $p=0.0004$; **Fig. 33A**: número total de células- **PVCre::tdTomato**= 47.91 ± 7.866 ; **CTB488**= 6.727 ± 6.035 ; **Sobreposição**= 6.364 ± 6.067 ; ******* $p=0.0004$ para ambas as comparações; **Fig. 33B**: porcentagem de células PVCre::tdTomato sobrepostas- 6.365 ± 5.30 ; **CTB488**= 17.64 ± 10.98).

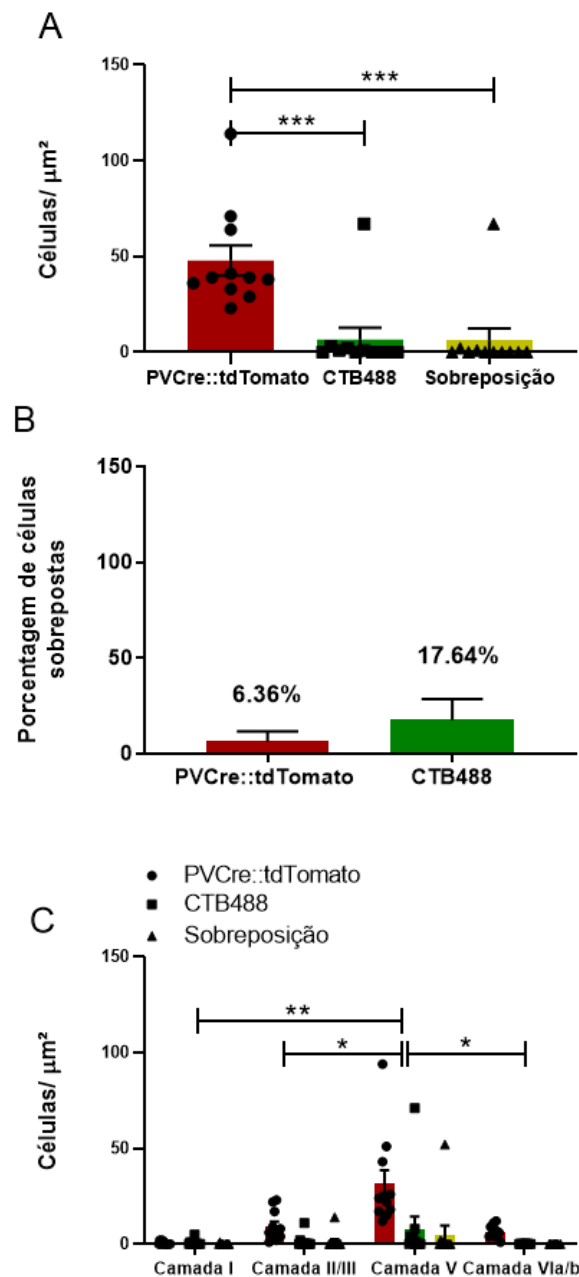
Ainda, a análise de camadas corticais na **Figura 33C** demonstra maior presença de células nas camadas V (**Fig. 33C**: número total de células- ANOVA de duas vias $F_{(1,117,33,52)}=13.51$; $p<0.0006$; pós teste de Bonferroni $p<0.05$; camada V: **PVCre::tdTomato**= 31.545 ± 7.188 ; **CTB488**= 8.00 ± 6.345 ; **Sobreposição**= 5.000 ± 4.704 ; $p<0.05$)

Figura 32- Células PV+ CTB488-positivas do CIp projetando-se para o ACC. Animais foram injetados com CTB488 no ACC e amostras de CIp de camundongos **PVCreAi9** (n=11) foram coletadas após 21 dias e analisadas por microscopia confocal. Em (A) e (D), células GABAérgicas positivas expressando Tdtomato; em (B) e (E), células marcadas retrogradamente por CTB488; em (C) e (F) sobreposição de células GABAérgicas e CTB488 positivas. As setas brancas apontam para células GABAérgicas (D) e CTB488 positivas (E) e sobrepostas (F). Em (D), I a VI representam as camadas corticais. Barras de escala de 100 μ m e 50 μ m. Abreviações: CIp: córtex insular posterior.



Fonte: Autor (2020)

Figura 33- Quantificação de células PV+ CTB488 positivas do Clp projetando-se para o ACC em camundongos PVCreAi9. Imagens do Clp de animais injetados com CTB488 no ACC foram obtidas em microscopia confocal e a análise quantitativa de células PV+ expressando tdTomato e CTB488 foi realizada usando ImageJ. Um total de 3 cortes por região para cada animal (n=11) foram analisados. Dados apresentados como média±e.p.m. Em (A), ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni, ***p=0.0004 para as duas comparações; em (C), ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, *p=0.0149 camada II/III vs V; *p=0.0166 camada V vs VIa/b; **p=0.0055 camada I vs V.



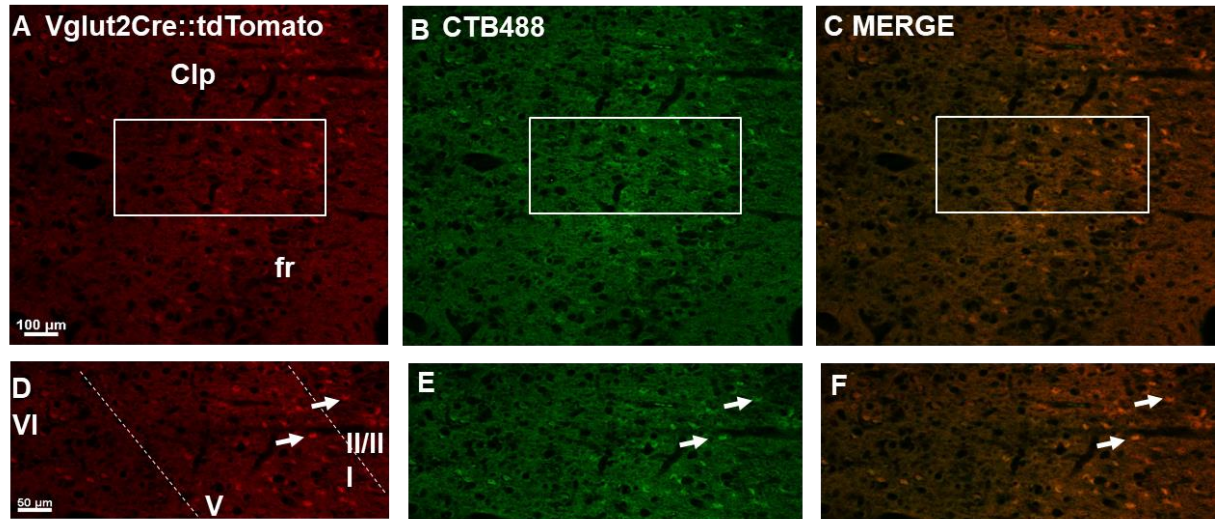
Fonte: Autor (2020)

A análise de cortes histológicos do CIp de animais **Vglut2CrexAi9** injetados com CTB488 no ACC na **Figura 34** ilustra células glutamatérgicas expressando tdTomato positivamente no CIp direita (vermelho nas **Figuras 34A e D**), e células CTB488 positivas nas **Figuras 34B e E**. Imagens sobrepostas (**Figuras MERGE 34C e F**) identificaram células glutamatérgicas do CIp que se projetam para o ACC, como indicado pelas setas brancas.

A análise quantitativa das imagens nas **Figuras 35A e B** confirma a presença de células marcadas glutamatérgicas projetando de CIp para o ACC e que se sobrepõe (Anova de uma via $F_{(2,27)}=7.624$; $p=0.0024$; pós teste de Bonferroni $p=0.0004$; **Fig. 35A**: número total de células- **Vglut2Cre::tdTomato**= 50.40 ± 12.32 ; **CTB488**= 10.50 ± 5.414 ; **Sobreposição**= 10.00 ± 5.506 ; **Vglut2Cre::tdTomato vs CTB488** ** $p=0.0070$; **Vglut2Cre::tdTomato vs Sobreposição** ** $p=0.0063$). A porcentagem de células **Vglut2Cre::tdTomato** e **CTB488** positivas sobrepostas demonstram que nem todas as células glutamatérgicas em CIp correspondem a projeções marcadas retrogradamente (**Fig. 35B**: porcentagem de células **Vglut2Cre::tdTomato** sobrepostas- 14.11 ± 8.386 ; **CTB488**= 28.94 ± 14.74).

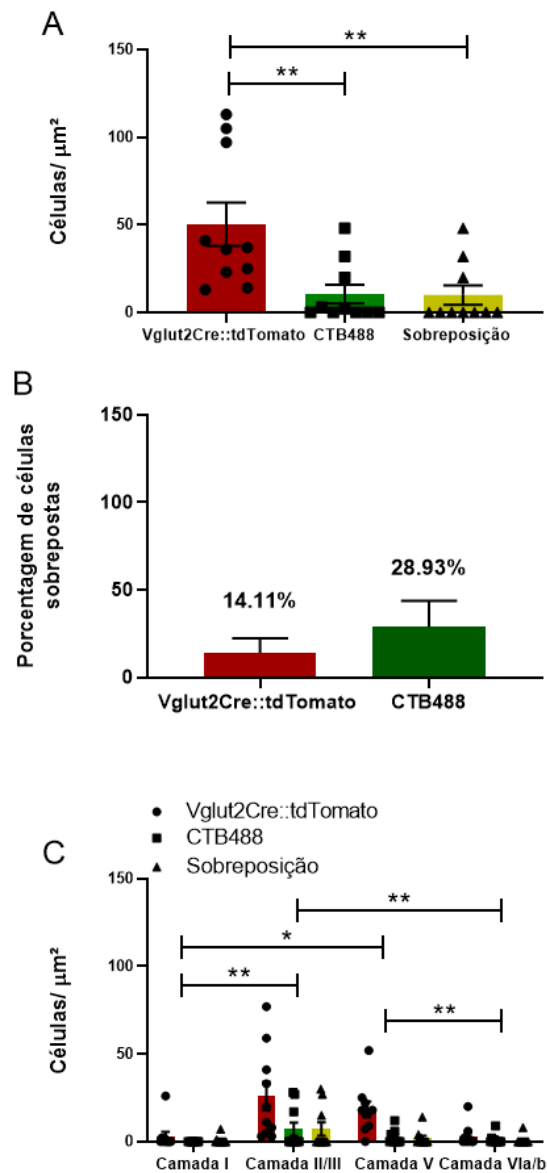
A análise das camadas corticais na **Figura 35C** demonstra uma maior presença de células projetadas nas camadas II / III e V (**Fig. 35C**: número total de células- Anova de duas vias $F_{(1.465,39.55)}=11.67$; $p=0.0004$; pós teste de Bonferroni $p<0.05$; camada II/III: **Vglut2Cre::tdTomato**= 26.00 ± 8.198 ; **CTB488**= 7.20 ± 3.77 ; **Sobreposição**= 7.20 ± 3.852 ; camada V: **Vglut2Cre::tdTomato**= 18.40 ± 4.410 ; **CTB488**= 2.40 ± 1.258 ; **Sobreposição**= 2.00 ± 1.398 ; $p<0.05$).

Figura 34- Quantificação de células glutamatérgicas CTB488 positivas do CIp projetando-se para o ACC em camundongos *Vglut2Crex^{Ai9}*. Animais tiveram amostras do CIp coletadas após 21 dias após a injeção de CTB488 no ACC e imagens foram capturadas em microscopia confocal. Em (A) e (D), células glutamatérgicas marcadas por Tdtomato; em (B) e (E), células do CIp marcadas retrogradamente por CTB488; em (C) e (F), sobreposição de células glutamatérgicas e CTB488 positivas. As setas brancas apontam para células glutamatérgicas (D) e CTB488 positivas (E) e sobrepostas(F). Em (D), I a VI representam as camadas corticais. Barras de escala de 100 μm e 50 μm . Abreviações: CIp: córtex insular posterior; fr: fissura rinal.



Fonte: Autor (2020)

Figura 35- Quantificação de células glutamatérgicas CTB488 positivas do C1p projetando-se para o ACC em camundongos *Vglut2Crex^{Ai9}*. Imagens do C1p de animais injetados com CTB488 no ACC foram obtidas em microscopia confocal e a análise quantitativa de células glutamatérgicas expressando tdTomato e CTB488 foi realizada usando ImageJ. Um total de 3 cortes por região para cada animal (n=10) foram analisados. Dados apresentados como média±e.p.m. Em (A), ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni, **p=0.0070 *Vglut2Cre::tdTomato* vs **CTB488**; **p=0.0063 *Vglut2Cre::tdTomato* vs **Sobreposição**; em (C), ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, *p=0.0209 camada I vs V; **p=0.036 camada I vs II/III; **p=0.0079 camada II vs Via/b; **p=0.0040 camada V vs Via/b.

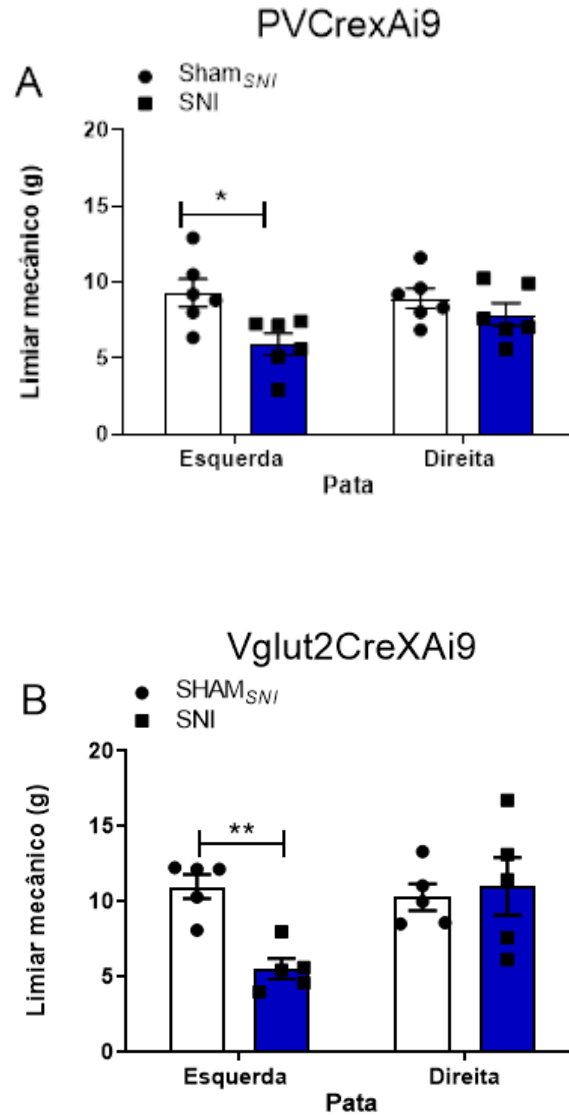


Fonte: Autor (2020)

6.10 SNI induziu hipersensibilidade mecânica em camundongos **PVCrexAi9** e **Vglut2CrexAi9**

Camundongos **PVCrexAi9** (n=6 SNI / 5 **SHAM_{SNI}**) e **Vglut2CrexAi9** (n=5 SNI / 5 **SHAM_{SNI}**) injetados com CTB488 foram submetidos a cirurgias SNI ou **SHAM_{SNI}** e o limiar mecânico foi avaliado 14 dias depois. Na **Figura 36**, o SNI induziu hipersensibilidade mecânica restrita à pata esquerda, ipsilateral ao SNI, nos dois grupos de animais: **PVCrexAi9** (ANOVA de duas vias tratamento x grupo; $F_{(1,16)} = 6.866$; $p = 0.0186$; pós teste de Bonferroni $p < 0.05$; Pata Esquerda: **SNI** = 5.908 ± 1.761 ; **SHAM_{SNI}** = 9.293 ± 2.236 ; * $p = 0.0106$); (Pata Direita: SNI = 7.882 ± 1.828 ; **SHAM_{SNI}** = 8.937 ± 1.619 ; $p = 0.6828$), e em camundongos **Vglut2CrexAi9** (ANOVA de duas vias tratamento x grupo; $F_{(1,20)} = 8.411$; $p = 0.0088$; pós teste de Bonferroni $p < 0.05$; Pata Esquerda: SNI = 5.538 ± 1.527 ; **SHAM_{SNI}** = 10.996 ± 1.815 ; ** $p = 0.0094$); (Pata Direita: SNI = 11.014 ± 4.256 ; **SHAM_{SNI}** = 10.304 ± 1.992 ; $p > 0.9999$), confirmando a robustez desse modelo de dor neuropática.

Figura 36- SNI induz hipersensibilidade mecânica em camundongos *PVCrexAi9* e *Vglut2CrexAi9*. Os animais foram submetidos à injeção de CTB488 e uma semana depois à cirurgia para indução do modelo de SNI. 14 dias após a cirurgia de indução, animais *PVCrexAi9* (n=6 SNI / 5 *SHAM_{SNI}*) e *Vglut2CrexAi9* (n=5 SNI / 5 *SHAM_{SNI}*) tiveram avaliados o limiar mecânico no teste DPA. Dados apresentados como média \pm e.p.m. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. Em (A) *p=0.0106, em (B) **p=0.0094.



Fonte: Autor (2020)

6.11 A análise c-Fos não mostra a ativação de projeções GABAérgicas, PV+ e glutamatérgicas do CIp para o ACC

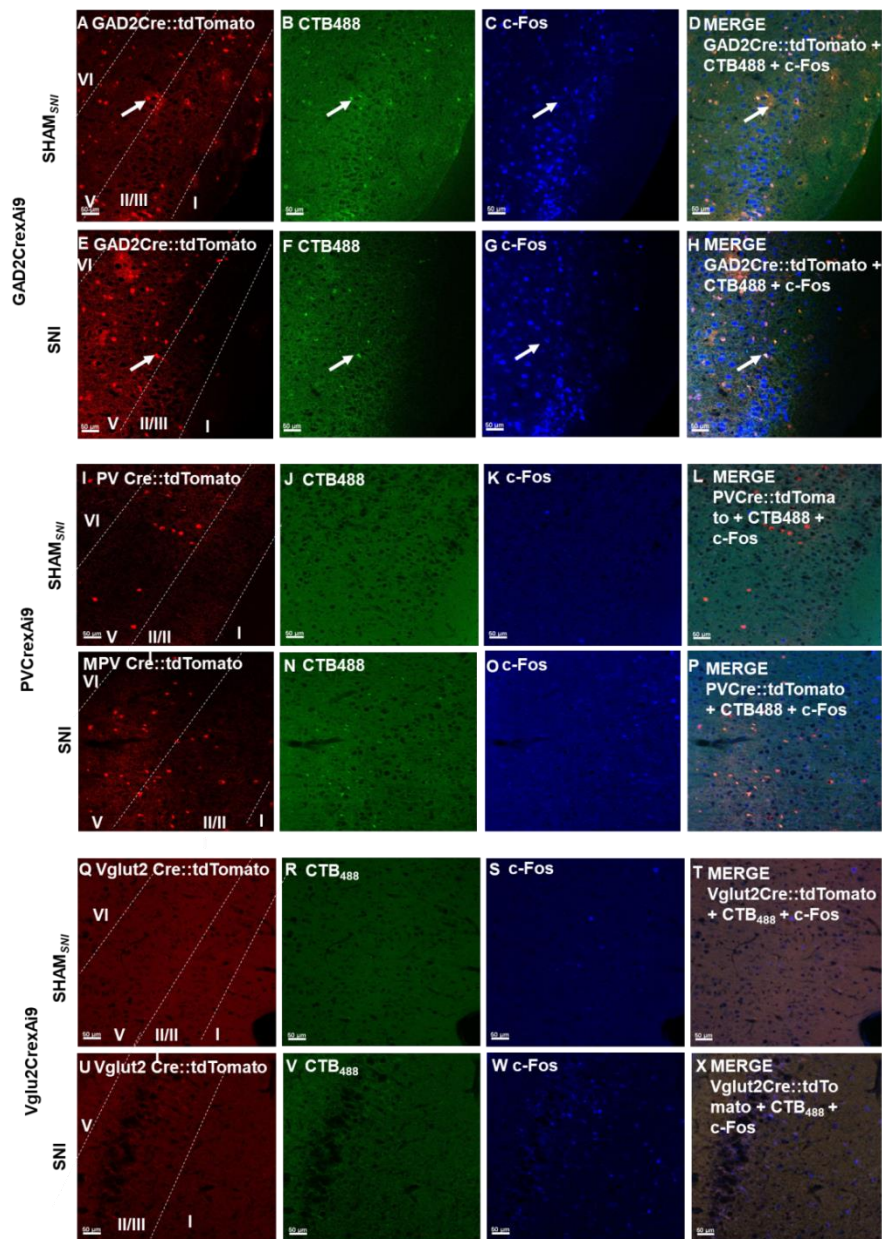
Traçador retrógrado CTB488 (marcado em verde) foi feita em camundongos **GAD2CrexAi9** (n= 3 SNI/ 2 SHAM_{SNI}), **PVCrexAi9** (n= 6 SNI/ 5 SHAM_{SNI}), e **Vglut2Cre** (n= 6 SNI/ 4 SHAM_{SNI}), submetidos ao modelo de dor neuropática por SNI para posterior análise da imunomarcação de c-Fos no CIp.

A análise qualitativa ilustrada na **Figura 37 A-H** indicada por setas brancas e a análise quantitativa na **Figura 38A** demonstraram a presença de ativação neuronal marcada por c-Fos em ambos os animais SNI e SHAM_{SNI **GAD2CrexAi**, bem como um pequeno número de neurônios marcados com c-Fos que correspondem simultaneamente à célula GABAérgicas no CIp que se projetam ao ACC em ambas condições SNI e SHAM_{SNI} (Anova de duas vias $F_{(1,21)} = 8.525$; $p = 0.0082$; pós teste de Bonferroni $p > 0.05$: Sobreposição total: SNI = 10.667 ± 0.333 ; SHAM_{SNI} = 13.00 ± 0.00 ; $p > 0.05$; c-Fos: SNI = 300.33 ± 15.377 ; SHAM_{SNI} = 291.50 ± 44.50 ; $p > 0.05$).}

Os dados nas **Figuras 37 I-P e 38B** indicam que a ausência de neurônios marcados com c-Fos que correspondem a células PV+ que se projetam do CIp para o ACC (CTB488 positivas) em animais SNI e SHAM_{SNI}, bem como indicam semelhante ativação neuronal marcada por c-Fos nestes grupos (Anova de duas vias $F_{(1,62)} = 4.669$; $p = 0.0346$; pós teste de Bonferroni $p > 0.05$: Sobreposição total: SNI = 0.167 ± 0.167 ; SHAM_{SNI} = 0.200 ± 0.200 ; $p > 0.05$; c-Fos: SNI = 49.50 ± 5.971 ; SHAM_{SNI} = 39.40 ± 5.758 ; $p > 0.05$).

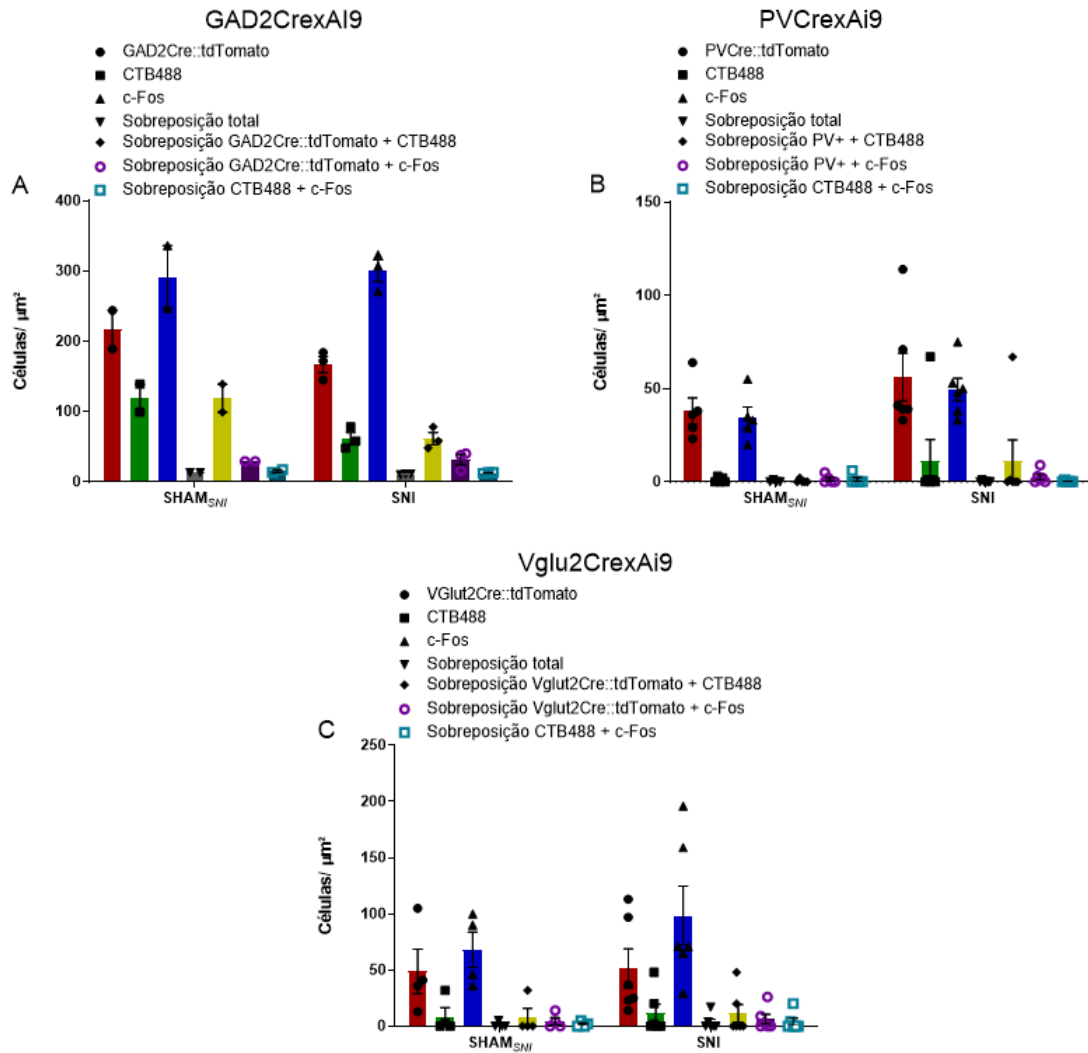
Por sua vez, as **Figuras 37 Q-X e 38C** também representam uma população similar de neurônios marcados com c-Fos nos grupos SNI e SHAM_{SNI} mas que não correspondem a células glutamatérgicas que se projetam do CIp em direção ao ACC (CTB488 positivas) (Anova de duas vias $F_{(1,56)} = 0.9196$; $p = 0.3417$; pós teste de Bonferroni $p > 0.05$: Sobreposição total: SNI = 3.500 ± 2.778 ; SHAM_{SNI} = 1.250 ± 1.250 ; $p > 0.05$; c-Fos: SNI = 98.50 ± 26.224 ; SHAM_{SNI} = 68.00 ± 15.853 ; $p > 0.05$).

Figura 37- Imunofluorescência para c-Fos no Clp de camundongos GAD2Crex*Ai9*, PVC*CrexAi9* e Vglut2*Cre* com dor neuropática.** Camundongos **GAD2Crex*Ai9*** (n= 3 SNI/ 2 SHAM_{SNI}), **PVC*Crex**Ai9*** (n= 6 SNI/ 5 SHAM_{SNI}), e **Vglut2*Cre*** (n= 6 SNI/ 4 SHAM_{SNI}), foram injetados com CTB488 no ACC e amostras do Clp foram submetidas à imunofluorescência para c-Fos analisadas em microscopia confocal. As células GABAérgicas, PV+ e glutamatérgicas que expressam tdTomato são apresentadas em A, E, I, M, Q, U; neurônios marcados retrogradamente por CTB488 é em F, J, N, R, V; c-Fos em C,G, K, O, S, W e sobreposições em D, H, L, P, T, X. As setas brancas indicam neurônios GABAérgicos que também são marcados como CTB488 com c-Fos e sobrepostos. Barras de escala de 100 μ m e 50 μ m.



Fonte: Autor (2020)

Figura 38- Imunofluorescência para c-Fos no CÍp de camundongos GAD2CreAi9, PVCrexAi9 e Vglut2Cre com dor neuropática. Camundongos **GAD2CreAi9** (n= 3 SNI/ 2 SHAM_{SNI}), **PVCrexAi9** (n= 6 SNI/ 5 SHAM_{SNI}), e **Vglut2Cre** (n= 6 SNI/ 4 SHAM_{SNI}), foram injetados com CTB488 no ACC e submetidos ao modelo de SNI, e amostras do CÍp foram submetidas à imunofluorescência para c-Fos. Imagens de 3 cortes do CÍp para cada animal de cada grupo foram capturadas em microscópio confocal e quantificadas no ImageJ. Dados apresentados como média ± e.p.m. Anova de duas vias seguido do teste de Bonferroni.



Fonte: Autor (2020)

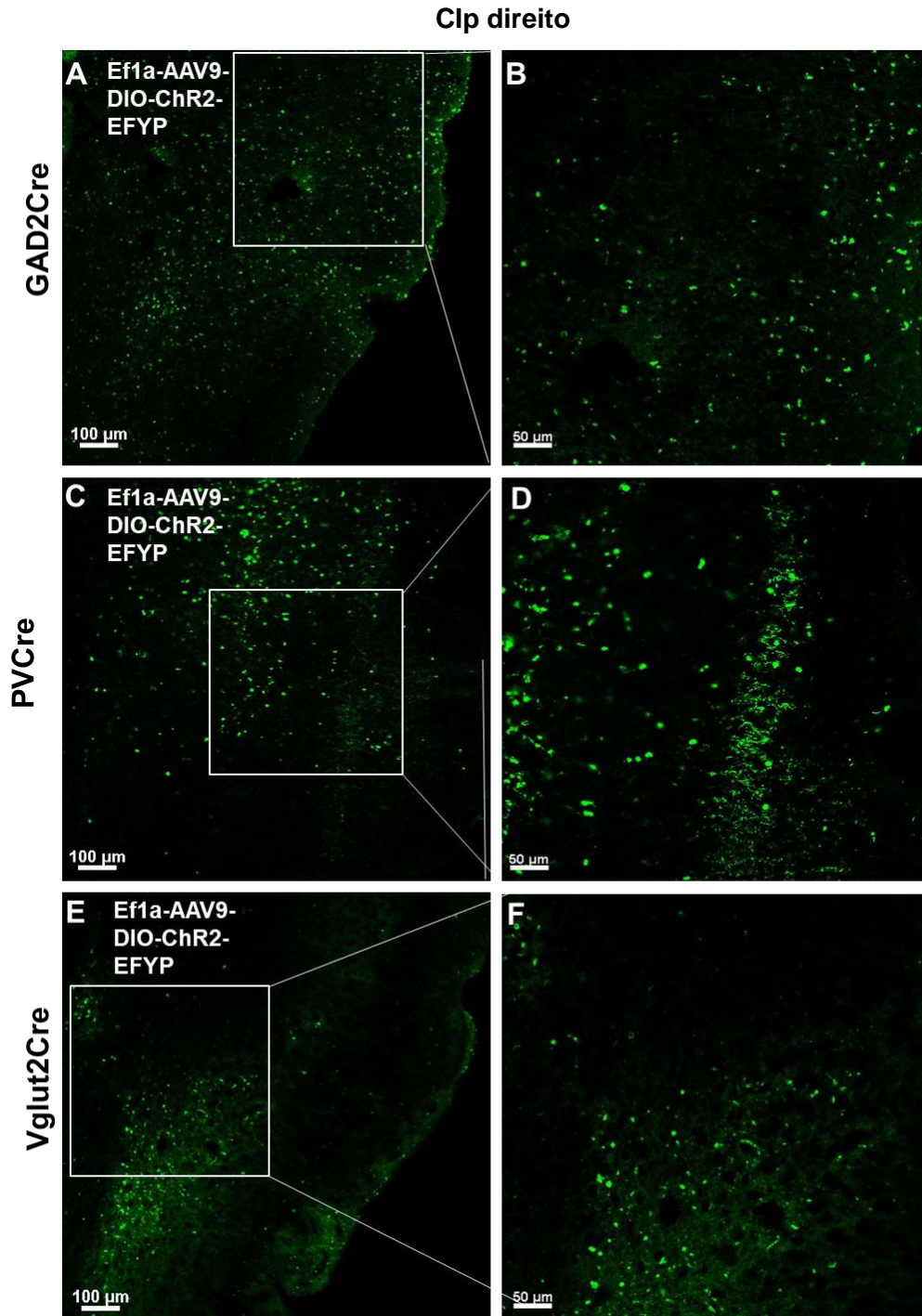
6.12 Padronização do local de injeção do vetor viral AAV e do implante de cânula de fibra óptica n ACC e CIp camundongos GAD2Cre, PVCre e Vglut2Cre

Vetor viral AAV (Efl α -AAV9-DIO-ChR2-EFYP) foi injetado no CIp direito de camundongos **GAD2Cre**, **PVCre** e **Vglut2Cre**, contralateral à indução do modelo de SNI no nervo isquiático esquerdo dos animais. Uma fibra óptica no foi implantada no ACC direito de animais **GAD2Cre**, **PVCre** para estimulação optogenética de células neuronais GABAérgicas e PV+ que expressaram ChR2 e que se projetam ao ACC. Em animais **Vglut2Cre**, a fibra óptica foi implantada no CIp direito para estimulação optogenética de células glutamatérgicas que expressaram ChR2. Cortes coronais do CIp foram analisadas por microscopia confocal para confirmar as coordenadas estereotáxicas dos dois locais de injeção e implante.

A **Figura 39** mostra a expressão de AAV em torno do local da injeção em cortes coronais do CIp 8 semanas após a injeção em animais **GAD2Cre** (**Figura 39A e B**), **PVCre** (**Figura 39C e D**) e **Vglut2Cre** (**Figura 39E e F**), demonstrando alta expressão viral necessária à estimulação optogenética.

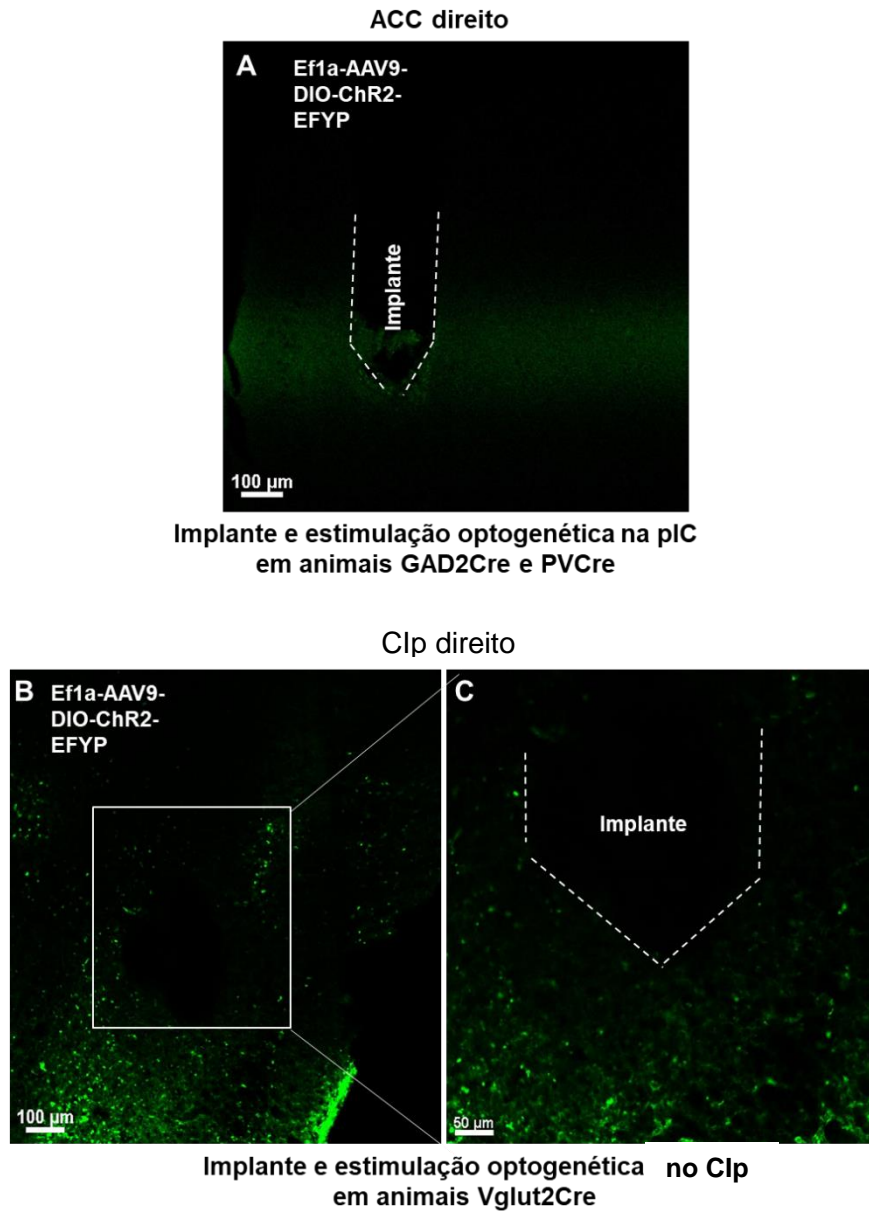
A **Figura 40A** ilustra a posição de implante da fibra óptica no ACC de acordo com as coordenadas padronizadas 1.055 mm anteriores ao bregma; lateralidade à direita da linha média de 0.255 mm e profundidade de 1.522 mm. **Figura 40B** mostra o implante no CIp direito (coordenadas 0.5 mm posterior ao bregma, lateralidade à direita da linha média de 0.375 mm e 4 mm de profundidade). Ambas imagens confirmam o direcionamento correto para posterior estimulação no ACC e CIp.

Figura 39- Imagens representativas do Clp direita de camundongos **GAD2Cre**, **PVCre** e **Vglut2Cre** expressando vetor viral **AAV-DIO-ChR2** marcados por **EYFP** (verde). Imagens em maior e menor aumento à esquerda e direita, respectivamente. Ao todo foram utilizados **GAD2Cre** (n= 6 - A, B), **PVCre** (n= 10 - C, D) e **Vglut2Cre** (n= 11 - E, F) em que foi conferida a expressão viral. Barras de escala de 100 μ m e 50 μ m.



Fonte: Autor (2020)

Figura 40- Representação de implante de fibra óptica no ACC direito e Clp direita de camundongos GAD2Cre. Tracejado branco marca a região do o implante na área do ACC para posterior estimulação optogenética. Ao todo foram utilizados **GAD2Cre** (n= 6), **PVCre** (n= 10) e **Vglut2Cre** (n= 11) em foi conferido o implante no ACC ou Clp. Imagens em maior e menor aumento à esquerda e direia, respectivamente, em B e C. Barra de escala 100 μ m.



Fonte: Autor (2020)

6.13 Ativação optogenética de ChR2 em neurônios GABAérgicos, PV+ e glutamatérgicos do CIp não reverte a hipersensibilidade mecânica de camundongos com dor neuropática

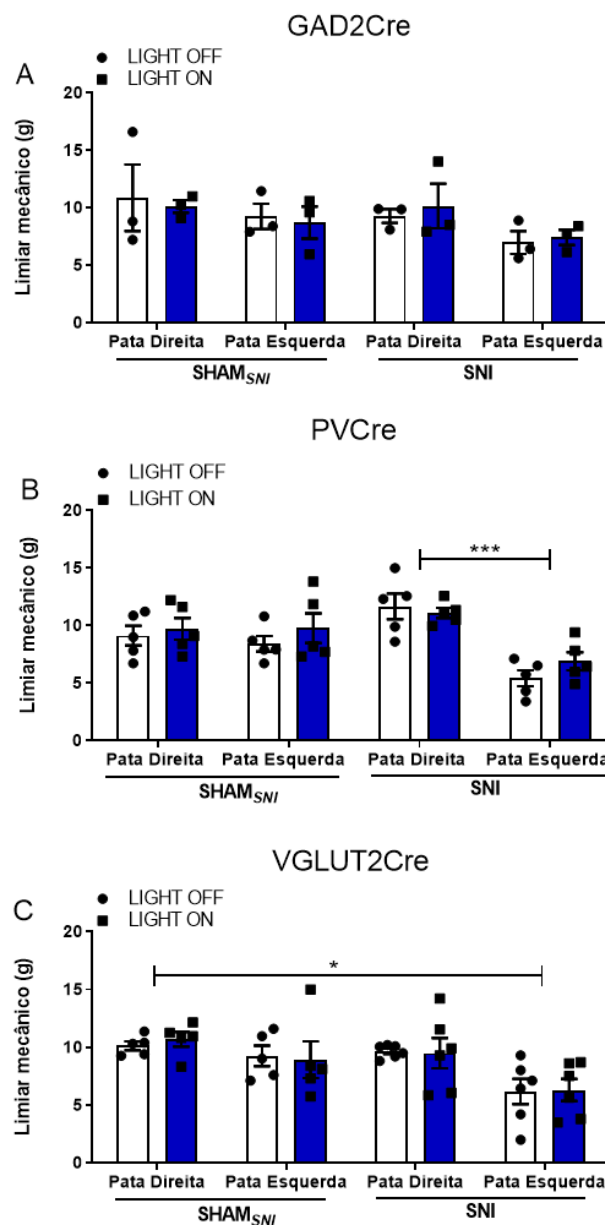
Os camundongos **GAD2Cre** (n= 3 **SNI**/ 3 **SHAM_{SNI}**) e **PVCre** (n= 5 **SNI**/ 5 **SHAM_{SNI}**) foram submetidos à estimulação optogenética com laser no ACC (**GAD2Cre** e **PVCre**; 472 nm, luz pulsada, 5mW, 40 Hz, 4 V e 10ms) para ativação seletiva de ChR2 em projeções GABAérgicas no ACC que se originam do CIp, e animais **Vglut2Cre** (n= 6 **SNI**/ 5 **SHAM_{SNI}**) foram estimulados no CIp (**Vglut2Cre**; 472 nm, luz pulsada, 5mW, 10 Hz, 4 V e 10ms) para ativação seletiva de ChR2 em células glutamatérgicas do CIp. O teste de DPA foi realizado 8 semanas após injeção de AAV no CIp.

Camundongos **GAD2Cre (Figura 41A) SNI** mostraram uma diminuição parcial no limiar mecânico da pata posterior esquerda, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa (Anova de duas vias tratamento x grupo; $F_{(3,8)} = 1.519$; $p = 0.2824$; pós teste de Bonferroni $p > 0.05$; Pata Direita: **SNI** = 10.163 ± 1.941 ; Pata Esquerda: **SNI** = 7.430 ± 0.664 ; $p > 0.05$), e que não se alterou após estimulação optogenética (ANOVA de duas vias tratamento x grupo; $F_{(1,8)} = 7.178 \times 10^{06}$; $p = 0.9979$; pós teste de Bonferroni $p > 0.9999$; LIGHT ON: **SNI** = 7.430 ± 0.664 ; **SHAM_{SNI}** = 8.723 ± 1.407 ; LIGHT OFF: **SNI** = 6.987 ± 0.984 ; **SHAM_{SNI}** = 9.263 ± 1.917 ; $p > 0.05$).

Camundongos **PVCre (Figura 41B) SNI** mostraram uma diminuição do limiar mecânico na pata posterior esquerda (Anova de duas vias tratamento x grupo; $F_{(3,8)} = 1.519$; $p = 0.2824$; pós teste de Bonferroni $p > 0.05$; Pata Direita: **SNI** = 11.120 ± 0.440 ; Pata Esquerda: **SNI** = 6.906 ± 0.781 ; $p > 0.05$), que não foi revertida pela optostimulação (ANOVA de duas vias tratamento x grupo; $F_{(1,16)} = 1.290$; $p = 0.2727$; pós teste de Bonferroni $p > 0.9999$; LIGHT ON: **SNI** = 6.906 ± 0.781 ; **SHAM_{SNI}** = 9.786 ± 1.297 ; LIGHT OFF: **SNI** = 5.424 ± 0.693 ; **SHAM_{SNI}** = 8.412 ± 0.675 ; $p > 0.05$).

Por fim, camundongos **Vglut2Cre (Figura 41C) SNI** tiveram redução do limiar mecânico na pata posterior esquerda (Anova de duas vias tratamento x grupo; $F_{(3,18)} = 0.1058$; $p = 0.9556$; pós teste de Bonferroni $p > 0.05$; Pata Direita: **SNI** = 9.485 ± 1.315 ; Pata Esquerda: **SNI** = 6.303 ± 0.952 ; $p > 0.05$), e a optoestimulação não mudou os limiares (ANOVA de duas vias tratamento x grupo; $F_{(1,16)} = 1.290$; $p = 0.2727$; pós teste de Bonferroni $p > 0.9999$; LIGHT ON: **SNI** = 6.303 ± 0.952 ; **SHAM_{SNI}** = 8.924 ± 1.587 ; LIGHT OFF: **SNI** = 6.187 ± 1.088 ; **SHAM_{SNI}** = 9.266 ± 0.887 ; $p > 0.05$).

Figura 41- Efeito da ativação optogenética *in vivo* de Chr2 em células neuronais GABAérgicas, PV+ e glutamatérgicas do C1p no limiar mecânico. Camundongos **GAD2Cre** (n= 3 SNI/ 3 SHAM_{SNI} - A), **PVCre** (n= 5 SNI/ 5 SHAM_{SNI} - B) e **Vglut2Cre** (n= 6 SNI/ 5 SHAM_{SNI} - C) foram submetidos a estimulação optogenética com laser no ACC (GAD2Cre e PVCre; 472 nm, luz pulsada, 5mW, 40 Hz, 4 V e 10ms) ou no C1p (Vglut2Cre; 472 nm, luz pulsada, 5mW, 10 Hz, 4 V e 10ms) por três minutos e avaliados no teste de DPA para análise do limiar mecânico durante a estimulação. Os animais foram avaliados 8 semanas após a injeção do vírus no C1p. Dados apresentados como média \pm e.p.m. Em (B) ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, ***p=0.0001. Em (C) ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, *p=0.0462.

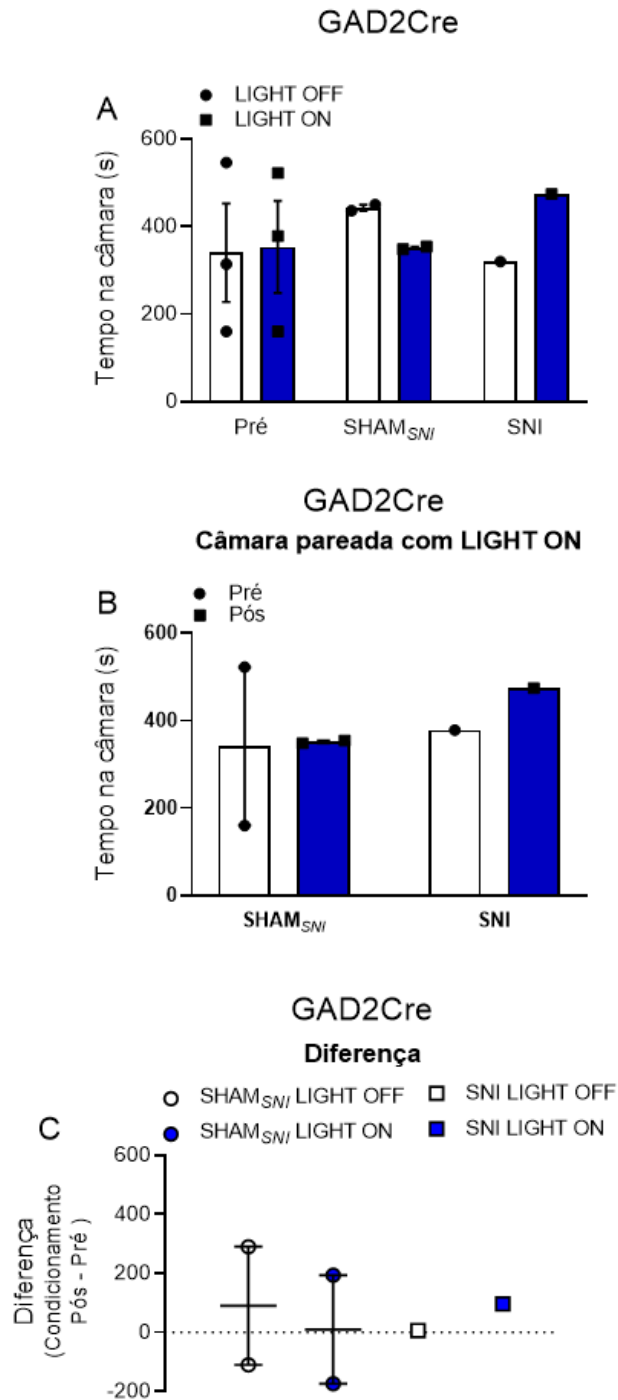


Fonte: Autor (2020)

6.14 Ativação optogenética de Chr2 em neurônios GABAérgicos não induz preferência condicionada ao lugar camundongos com dor neuropática

Camundongos **GAD2Cre** separados em grupos **SNI** (n=1) ou **SHAM_{SNI}** (n=2) foram submetidos ao paradigma de CPP 6 semanas após injeção de vetor viral AAV para estimulação optogenética. A análise descritiva dos escores de CPP mostrado nas **Figuras 42A** e **B** sugere que os camundongos não apresentaram preferência condicionada ao lugar induzida pelo laser ligado (estimulação optogenética ligada) (**LIGHT ON: SNI= 474.00±0.00; n= 2; SHAM_{SNI}= 351.00±3.00; n = 1;**) nem pelo laser desligado (estimulação optogenética desligada) (**LIGHT OFF: SNI= 320.00 ± 0.00;n= 1) SHAM_{SNI}= 443.00±7.00; n= 2**). O cálculo do escore pós-condicionamento (Diferença Pós- Pré) na **Figura 36C** mostra que não houve efeito da estimulação optogenética no paradigma de CPP (**SNI LIGHT ON= 96.00±0.0; SNI LIGHT OFF=6.00±0.0; n=1; (SHAM_{SNI} LIGHT=10.00±184.00; SHAM_{SNI} LIGHT OFF=90.00±200.00; n=2)**).

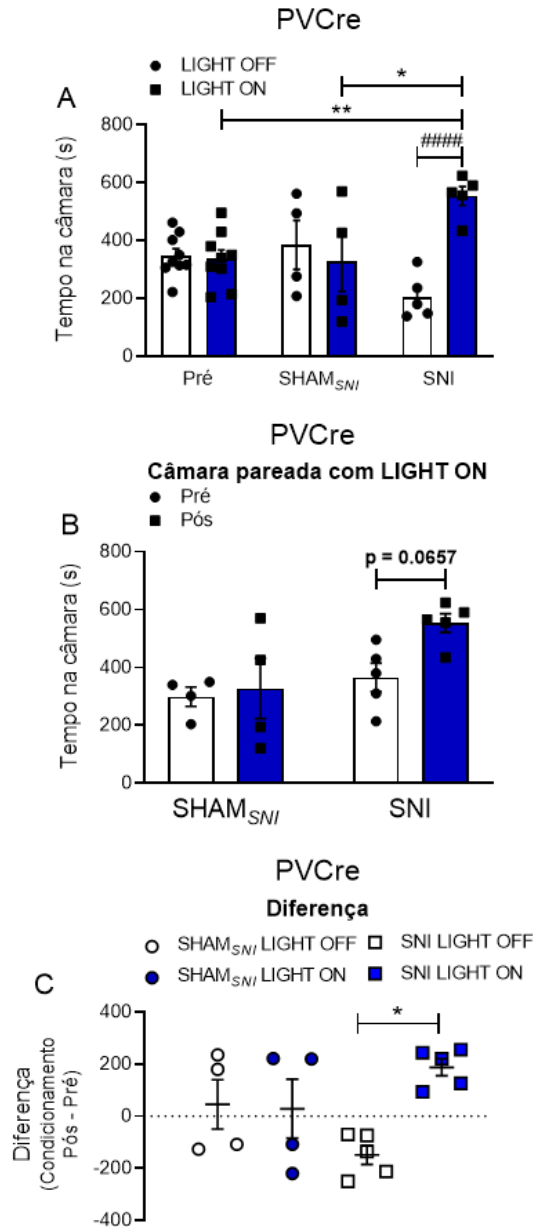
Figura 42- Efeito da ativação optogenética *in vivo* de Chr2 em células GABAérgicas no CIp de camundongos com dor neuropática. Os camundongos **GAD2Cre** (n= 1 SNI/ 2 SHAM_{SNI}) foram submetidos teste de CPP com uma fase de condicionamento de um dia (15 min de laser desligado LIGHT OFF, e 15 min de estimulação optogenética LIGHT ON - 472 nm, luz pulsada, 5mW, 40 Hz, 4 V e 10 ms). Os camundongos foram avaliados 6 semanas depois da administração do vírus. Dados apresentados como média ± e.p.m.



6.15 Ativação optogenética de ChR2 em neurônios PV+ induz preferência condicionada ao lugar em camundongos com dor neuropática

Os animais PVCre submetidos a procedimentos **SNI** (n=5) ou **SHAM_{SNI}** (n=5) através do paradigma de CPP. Os resultados mostrados na **Figura 43A e B** mostram que os camundongos SNI PVCre sob estimulação optogenética apresentaram uma preferência de local condicionado induzida pela LIGHT ON (ANOVA de duas vias tratamento x grupo; $F_{(2,14)} = 10.61$; $p < 0.05$; pós teste de Bonferroni $p < 0.05$; **SNI: LIGHT ON** = 554.00 ± 32.206 ; **LIGHT OFF** = 205.600 ± 34.614 , ##### $p < 0.0001$), (**LIGHT: SNI** = 554.00 ± 32.206 ; Pré = 336.222 ± 31.341 , ** $p = 0.0082$), e confirmado pelo cálculo da diferença pós-condicionamento (Diferença Pós-Pré) na **Figura 37C** (Anova de uma via $F_{(3,14)} = 4.294$; $p = 0.0241$; pós-teste de Bonferroni $p < 0.05$; **SNI LIGHT ON** = 188.00 ± 32.76 ; **SNI LIGHT OFF** = -148.4 ± 36.20 ; * $p = 0.0182$). Esse efeito foi restrito aos camundongos **SNI** quando comparado ao grupo **SHAM_{SNI}** (**LIGHT: SNI** = 554.00 ± 32.206 ; **SHAM_{SNI}** = 327.500 ± 103.838 ; * $p = 0.0331$).

Figura 43- Efeito da ativação optogenética *in vivo* de ChR2 em células PV+ no CIP de camundongos com dor neuropática. Os camundongos **PVCre** ($n= 5$ SNI/ 5 SHAM_{SNI}) foram submetidos teste de CPP com uma fase de condicionamento de um dia (15 min de laser desligado LIGHT OFF, e 15 min de estimulação optogenética LIGHT ON - 472 nm, luz pulsada, 5mW, 40 Hz, 4 V e 10 ms). Os animais foram avaliados 6 semanas após a injeção do vírus no CIP. Dados apresentados como média \pm e.p.m. Em (A) e (B), ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni, * $p= 0.0331$ SNI vs SHAM_{SNI}; LIGHT ON; ** $p=0.0082$ Pré vs SNI LIGHT ON; ##### $p<0.0001$ LIGHT ON vs LIGHT OFF grupo SNI. Em (C), ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni, * $p=0.0182$.

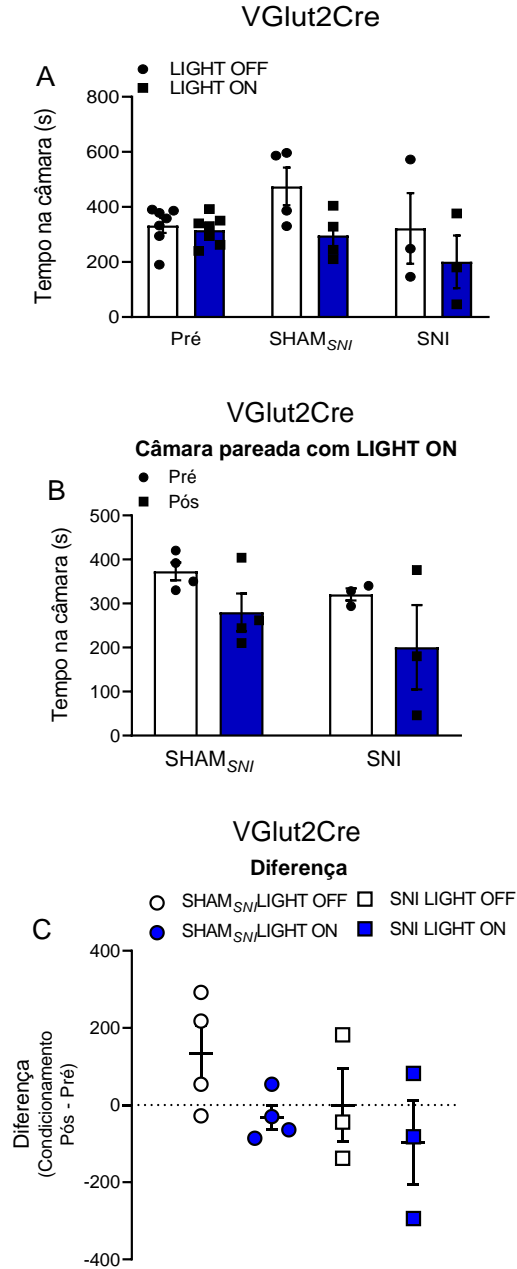


Fonte: Autor (2020)

6.16 Ativação optogenética de ChR2 em neurônios glutamatérgicos não induz preferência condicionada ao lugar em camundongos com dor neuropática

Camundongos **Vglut2Cre** dos grupos **SNI** (n=3) ou **SHAM_{SNI}** (n=4) foram submetidos ao paradigma de CPP. Os resultados nas **Figuras 44A e B** demonstram que os camundongos **Vglut2Cre** não apresentaram preferência condicionada ao lugar induzida pela LIGHT ON (Anova de duas vias tratamento x grupo; $F_{(2,10)} = 18.61$; $p < 0.05$; pós teste de Bonferroni $p < 0.05$; LIGHT ON: **SNI** = 200.667 ± 95.822 ; **SHAM_{SNI}** = 296.500 ± 43.577 ; $p > 0.05$) ou LIGHT OFF (LIGHT OFF: **SNI** = 322.00 ± 128.421 ; **SHAM_{SNI}** = 474.50 ± 68.256 ; $p > 0.05$), confirmado pelo cálculo do escore pós-condicionamento (Diferença Pós-Pré) na **Figura 38C** (ANOVA de uma via $F_{(3,10)} = 1.717$; $p = 0.2263$; pós teste de Bonferroni $p < 0.05$; **SNI** LIGHT ON = -98.00 ± 108.8 ; **SNI** LIGHT OFF = 0.0 ± 94.96 ; $p > 0.05$); (**SHAM_{SNI}** LIGHT = -31.50 ± 30.74 ; **SHAM_{SNI}** LIGHT = 134.00 ± 73.41 ; $p > 0.05$).

Figura 44- Efeito da ativação optogenética *in vivo* de ChR2 em células glutamatérgicas no CIp de camundongos com dor neuropática. Os camundongos *Vglut2Cre* ($n= 3$ SNI/ 4 *SHAM_{SNI}*) foram submetidos ao protocolo de CPP com uma fase de condicionamento de um dia (15 min de laser desligado LIGHT OFF, mais 15 min de estimulação optogenética LIGHT ON - 472 nm, luz pulsada, 5mW, 10 Hz, 4 V e 10 ms). Os animais foram avaliados 6 semanas após a injeção do vírus no CIp. Dados apresentados como média \pm e.p.m. Em (A) e (B), ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni; em (C), ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni.



Fonte: Autor (2020)

7. Discussão

A dor neuropática representa um desafio neurológico por muito tempo negligenciado e de grande impacto sócio-econômico e de qualidade de vida para os pacientes que sofrem com este tipo de dor (BARON, 2006), de modo que seu entendimento é fundamental para firmar conhecimentos no que se refere à instalação e progressão da dor neuropática, bem como que permitam maximizar o potencial dos tratamentos farmacológicos e não farmacológicos, desenvolvendo novas abordagens direcionadas aos principais mecanismos para aliviar a dor do paciente.

O córtex insular e outras áreas centrais que compreendem o que se diz conectoma e matriz de dor, especialmente o ACC, são áreas principais que respondem consistentemente à dor fisiológica e patológica (GARCIA-LARREA, PEYRON, 2013, ZHUO, 2008) e o mais importante, aos componentes sensitivo-discriminativo e afetivo-motivacional da dor. Muitos trabalhos já demonstraram a concreta relação do CIp com as vias de modulação e percepção da dor (LU et al., 2016; YOKOTA et al., 2016). A ínsula recebe informação sensorial de projeções aferentes de núcleos talâmicos, e possui conexões recíprocas com áreas límbicas e áreas corticais associativas (JASMIN et al., 2003; QIU et al., 2013; LU et al., 2016; NAMKUNG et al., 2017). Isso se torna especialmente significativo uma vez que a dor é uma sensação subjetiva e depende de vários níveis de informação para ser percebida e regulada (GARCIA-LARREA; PEYRON, 2013). No que se refere à dor crônica, a plasticidade sináptica no córtex insular e no ACC se associam à manutenção dos sintomas da dor crônica (ZHUO, 2016).

A Estimulação Magnética Transcraniana é uma abordagem neuroestimulatória que foi aplicada na ínsula posterior superior de voluntários saudáveis sendo demonstrada sua inocuidade (CIAMPI de ANDRADE et al, 2012), justificando a escolha do córtex insular como um alvo para neuroestimulação em dor. Técnicas neuroestimulatórias são alternativas eficazes para pacientes refratários aos tratamentos farmacológicos aplicados na clínica médica. Porém, considerando-se as áreas de estimulação atualmente tidas como alvo, destacando-se o córtex motor, núcleos talâmicos, PAG, substância cinzenta periventricular (PVG) e o próprio ACC (BOCCARD; PEREIRA; AZIZ, 2015; MO et al., 2019; MOISSET; LEFAUCHEUR, 2019) apenas parte dos pacientes é beneficiada com o alívio dos sintomas dolorosos (BOCCARD; PEREIRA; AZIZ, 2015; GALHARDONI et al., 2015; LEVY; DEER; HENDERSON, 2010).

O modelo de Estimulação Elétrica do Córtex Insular (EECI) desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa também tem se mostrado eficaz, sob diferentes protocolos experimentais, em induzir antinocicepção em ratos submetidos a um modelo de dor neuropática induzido por CCI, sendo capaz de alterar a atividade neuronal marcada por c-Fos na ínsula posterior, ACC, MCC, PAG e hipocampo, além de envolver a participação de receptores opióides e canabinóides no sistema nervoso central (DIMOV et al., 2018; ALONSO-MATIELO et al., *submitted*). Neste trabalho, objetivamos descrever os mecanismos pontuais pelos quais a EECI atua, relacionados ao envolvimento da transmissão inibitória GABAérgica central e demais marcadores de plasticidade, e como a ínsula e determinadas conexões podem modular a atividade da circuitaria central e influenciar a dor neuropática em modelos animais.

A transmissão neuronal inibitória mediada por GABA compõe vias nociceptivas no sistema nervoso central e, portanto, participa da regulação da sensibilidade dolorosa inclusive em condições de dor neuropática (JASMIN et al., 2004; ENNA, McCARSON, 2006; VAYSSE et al., 2011; FRANÇOIS et al., 2017). Notadamente no córtex insular, a maior sinalização mediada por GABA está envolvida na indução direta de analgesia tanto em modelos experimentais quanto na clínica médica (JASMIN et al., 2003; THIAUCOURT et al., 2018). Por outro lado, na PAG e no RVM, a sinalização GABAérgica em projeções eferentes das vias modulatórias descendentes tem ação pró-nociceptiva, enquanto que no córtex do cíngulo um grande número de terminações GABAérgicas e receptores GABA_A participam da atenuação do comportamento associado à dor afetivo-motivacional no teste de *place escape/avoidance* em camundongos, mas sua ativação não reduz a hipersensibilidade mecânica (LaGRAIZE, FUCHS, 2007). Com isso, neste trabalho tivemos por um dos objetivos direcionar os mecanismos envolvidos na analgesia induzida pela EECI relacionados à transmissão inibitória mediada por GABA na circuitaria central de dor, bem como a indução de neuroplasticidade associado ao modelo e à dor neuropática.

Inicialmente, avaliamos a participação da transmissão GABAérgica mediada por receptores GABA_A na antinocicepção mecânica induzida por uma e cinco sessões de EECI, avaliada no teste de pressão de pata após administração de mBIC. A literatura mostra que administração de bicuculina é capaz de gerar hipersensibilidade e alodínea em roedores (YAMAMOTO et al., 1993; WEI et al., 2014). Sua forma em sal quartenário (metiodeto de bicuculina- mBIC), age diretamente e de forma restrita ao sistema nervoso central uma vez que não atravessa a barreira hematoencefálica (JOHNSTON, 2013). Os resultados apresentados demonstraram que a administração intratecal de mBIC reverteu a antinocicepção induzida por cinco sessões mas não por uma EECI, sugerindo a participação deste tipo de

transmissão inibitória nos efeitos da EECI. Dado este resultado, optamos por padronizar todos os experimentos utilizando cinco sessões de EECI. A ínsula é uma região extremamente plástica (ZHUO, 2016), sendo possível sugerir que após cinco sessões de EECI, novas alterações celulares e moleculares foram promovidas pelas estimulações diárias, que passaram a requerer a participação, ainda que parcial, da sinalização GABAérgica rápida de receptores GABA_A para indução do efeito antinociceptivo, quando em comparação à uma única EECI.

É importante considerar que a administração intratecal do fármaco tem ação geral no sistema nervoso central e, portanto, age sobre receptores GABA_A em sinapses inibitórias onde GABA pode ter efeitos pró e antinociceptivos, ressaltando que diferentes áreas no sistema nervoso central podem estar envolvidas nos efeitos associados à EECI. A exemplo, projeções bulbo-espinais a partir de conexões da ínsula diretamente com o *locus coeruleus*, as quais tem o receptor GABA_A como principal mediador (JASMIN et al., 2003), influenciam diretamente o controle endógeno da dor, e e poderiam, portanto, estar sendo influenciadas pela EECI.

Também foi observada uma reversão do quadro de hipersensibilidade dos animais SHAM_{EECI} com a administração de mBIC. Considerando que no modelo de CCI é descrito o processo de facilitação descendente através de projeções entre a PAG e o RVM que contribui para o quadro de hipersensibilidade e que nesta circuitaria ocorre a ativação de receptores GABA_A, tendo ação pronociceptiva (JASMIN et al., 2004), o mBIC pode ter influenciado a atividade desta via facilitatória, inibindo-a, resultando na resposta antinociceptiva observada.

É também importante considerar que a estimulação de estruturas encefálicas pode desencadear efeitos adversos que não estejam relacionados com a indução de alterações da sensibilidade dolorosa. Portanto, outro objetivo deste trabalho consistiu em avaliar possíveis interferências da EECI sobre a atividade locomotora geral dos animais submetidos ao modelo de CCI. Neste caso, cinco sessões de EECI ou o mBIC não alteraram a resposta locomotora geral dos animais avaliada no teste de campo aberto reafirmando resultados prévios obtidos pelo grupo (DIMOV et al., 2018; ALONSO-MATIELO et al., *submitted*) e garante a capacidade geral e locomotora dos animais.

A menor presença de GAD65 e menores níveis de GABA se associam diretamente à redução da sinalização inibitória na ínsula, uma causa de hipersensibilidade na dor neuropática em animais e outras síndromes dolorosas em humanos como fibromialgia (KUBO et al., 2009; TAO et al., 2015; FOERSTER et al., 2012). Assim, avaliamos a imunomarcagem de GAD65 no CIp e regiões como PAG, hipocampo, ACC, MCC e RVM após cinco EECI. Foi observado um aumento da imunomarcagem para GAD65 no CIp em ambos hemisférios, esquerdo estimulado, e direito contralateral à estimulação, sem alterações nas demais regiões

quando comparado ao grupo controle SHAM_{EECI}. Tais regiões participam e influenciam a percepção dolorosa e tem seu funcionamento alterado pela dor neuropática (ZHUO, 2008, 2016), além de se conectarem com a ínsula, e constituírem regiões onde a transmissão GABAérgica constitui mecanismo chave para a regulação da dor (LaGRAIZE, FUCHS, 2007; TAYLOR et al., 2009; TAN et al., 2016; LINNMAN et al., 2012; CALEJESAN et al., 2000; JASMIN et al., 2004). Com isso, os efeitos da EECI em aumentar GAD65 podem indicar um fator importante na reversão do quadro de hipersensibilidade dos animais com CCI aqui utilizados e sugere uma inibição seletiva GABAérgica no CIp nos mecanismos de antinocicepção induzida pela EECI. Contudo, não foram observadas alterações nos níveis de GABA no CIp após cinco EECI, da mesma forma que não foram obtidas mudanças na proteína total de GAD65 avaliada por *western blotting* em amostras de ínsula, ACC e hipocampo. Neste caso é necessário levar em consideração pontos metodológicos relevantes, como análise dos dados e características do processamento da amostra, que podem ter uma parte responsável nessas discrepâncias de dados.

Ao mesmo tempo, níveis elevados de glutamato na ínsula e a transmissão excitatória de receptores NMDA envolvida em mecanismos de LTP participam da dor crônica (ZHUO, 2016), e o desbalanço entre glutamato e GABA no CIp já foi relatado em animais com CCI (CHANG, 2010; HARRIS; CLAUW, 2012; WATSON, 2016; THIAUCOURT et al., 2017). A EECI, por outro lado, não alterou os níveis nem de GABA ou glutamato no CIp, indicando que o protocolo utilizado não influencia os níveis totais destes neurotransmissores. Animais com EECI e SHAM_{EECI} apresentaram diferenças na razão glutamato/GABA na ínsula esquerda, ipsilateral à estimulação e contralateral ao modelo do CCI, em comparação com o lado direito, o que pode sugerir diferenças na dinâmica destes neurotransmissores em função do processamento da dor em cada hemisfério.

O nível de glicina total também foi avaliado pelo teste de HPLC. Glicina é um neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central que atua em receptores NMDA permitindo sua ativação (CUMMINGS; POPESCU, 2015). Variações na glicina poderiam ser correlacionadas com a plasticidade sináptica de longo prazo mediada por receptores NMDA na ínsula. Foi observada uma elevação no nível de glicina no CIp direito, em comparação com o lado esquerdo, em ratos EECI, sem alterações em comparação ao grupo SHAM_{EECI}, indicando que este neurotransmissor na ínsula não é influenciado pela EECI diretamente.

A transmissão neuronal GABAérgica, glutamatérgica e a dinâmica de funcionamento de células gliais, especialmente astrócitos, são metabolicamente relacionadas (LI et al., 2019). No modelo de CCI, a ativação de astrócitos já tem sido demonstrada na literatura, tanto na

medula espinal quanto em regiões encefálicas (YIN et al., 2015; NI et al., 2016). A avaliação da imunorreatividade de GFAP, marcador astrocitário, foi analisada no CIp, hipocampo, ACC, MCC, PAG e RVM e não mostrou diferenças significativas nas estruturas analisadas entre EECI e SHAM_{EECI}, sugerindo que a EECI não altera diretamente a ativação de astrócitos nestas regiões. Em regiões como o CIp direito e hipocampo, houve uma aparente tendência para diminuição de GFAP, ainda que não estatisticamente significante, que pode se relacionar com a reversão do quadro de hipersensibilidade induzido observado nos animais após as estimulações, o que vai ao encontro da literatura que há muito descreve que tratamentos que aliviam o quadro doloroso também bloqueiam a ativação de astrócitos (GARRISON, 1994). Ainda, em relação à maior marcação de GFAP na PAG VL pode indicar maior ativação glial presente relacionada ao processo de facilitação descendente da PAG na dor (NI et al., 2016).

Astrócitos são também células responsivas a GABA, que contém grandes quantidades deste neurotransmissor, podendo liberá-lo e influenciar a transmissão sináptica inibitória (YOON et al., 2012). A atividade das enzimas GAD já foi identificada nestas células, ainda que em menor grau do que em neurônios (BEHRSTOCK et al., 2000). A análise qualitativa da sobreposição das imagens de imunofluorescência não identificou a co-localização de GAD65 e GFAP no modelo de EECI. É importante considerar ainda que GAD65 pode não estar presente nestas células, como sugerido por alguns autores (LEE et al., 2011). Cabe considerar que outros tipos de células gliais, como micróglia, podem ainda exercer outras funções sobre o controle da liberação e captação de GABA por meio de transportadores GAT e assim influenciar a antinocicepção induzida pela EECI de outras maneiras.

A capacidade de síntese e controle sobre o metabolismo e liberação de neurotransmissores é notadamente um mecanismo associado à neuroplasticidade (ICARD-LIEPKALNS et al., 1993). A regulação da enzima tirosina hidroxilase (TH), essencial à produção de dopamina, é um exemplo utilizado para avaliar alterações neuronais de curto e longo prazo (ICARD-LIEPKALNS et al., 1993). No córtex insular anterior, foi demonstrada uma grande densidade de fibras dopaminérgicas que se conectam a interneurônios GABAérgicos através dos quais podem participar modular dor afetivo-motivacional e induzir analgesia (BURKEY; CARSTENS; JASMIN, 1999; OHARA et al., 2003). Assim, avaliamos a marcação de TH no CIp, porém os dados obtidos não revelaram a presença de grande número de fibras dopaminérgicas na ínsula posterior evidenciado pela análise imunohistoquímica em animais NAIVE, bem como a EECI não alterou esta imunorreatividade de TH, de forma a sugerir que na ínsula posterior, os mecanismos associados ao controle de dor não envolvem a modulação da sinalização de dopamina marcada por TH.

Também foi analisada a imunomarcagem de sinaptofisina, uma proteína sináptica acoplada a vesículas pré-sinápticas, que participa do processo de liberação de neurotransmissores, e é, portanto, encontrada em terminais axonais nervosos e sinapses (CHOU et al., 2002), sendo utilizada como um indicador de neuroplasticidade local em andamento (HUNG et al., 2014; TAJERIA et al., 2014). A sinaptofisina também é altamente regulada em processos como LTP (ANTONOVA et al., 2001), e na ínsula tais processos, sejam modificações funcionais ou estruturais, ocorrem em função de processos dolorosos. Os resultados obtidos não demonstraram alterações de sinaptofisina no CIP após cinco EECI em comparação a animais SHAM_{EECI}, sugerindo inicialmente que cinco EECI não alteram diretamente a regulação desta proteína, além de poder indicar que o protocolo de EECI utilizado não induz neuroplasticidade estrutural marcada pela sinaptofisina, uma vez que esta também é utilizada como medida indireta do número de sinapses (TAJERIA et al., 2014). Contudo é importante considerar que no modelo de CCI, aumento de sinaptofisina na coluna dorsal da medula espinal de ratos já foi demonstrado 14 dias após a indução do modelo, retornando a níveis basais após 21 dias (CHOU et al., 2002). Analisados neste caso, é possível que os resultados observados não correspondam a alterações induzidas pelo protocolo de cinco EECI iniciado no 14º dia pós-CCI, e sim ao retorno de níveis basais de sinaptofisina.

Em conjunto estes resultados apresentados reforçam a influência da ínsula na modulação da dor e seu potencial como alvo para abordagens de neuroestimulação com estimulação elétrica em pesquisas básicas e clínicas no tratamento da dor neuropática e/ou dor crônica.

Uma vez demonstrada a potencial, ainda que parcial, participação da transmissão GABAérgica insular sobre a sensibilidade dolorosa na dor neuropática por meio do modelo de EECI aqui apresentado, novos objetivos deste trabalho constituíram direcionar mais especificamente possível influência do controle do CIP sobre áreas centrais envolvidas na modulação endógena da dor, como o ACC, através de projeções inibitórias e excitatórias responsáveis por comportamentos analgésicos em uma condição de dor neuropática em camundongos geneticamente modificados. Assim, neste trabalho também abordamos essas questões através da análise de traçadores neuronais e estimulação optogenética pela ativação de Chr2 de populações neuronais específicas no CIP que demonstraram se projetar à parte mais posterior do ACC (pACC).

Inicialmente, os resultados da análise da marcação retrógrada com traçador CTB488 demonstraram a presença de projeções GABAérgicas, PV+ e glutamatérgicas do CIP para o ACC. A existência de projeções GABAérgicas de longo alcance já foi demonstrada, ainda que

em pequeno número, em conexões córtico-corticais, córtico-fugais e aferências corticais, porém sua conectividade detalhada ainda é uma lacuna em nosso entendimento (TAMAMAKI; TOMIOKA, 2010). Projeções GABAérgicas de longo alcance entre o CIp e o ACC são um achado interessante neste trabalho, dado que células GABAérgicas são comumente descritas como interneurônios em circuitos locais de inibição.

A presença de projeções PV+ entre o CIp e o ACC demonstrada pela marcação de CTB488 em animais PVCre sugere um papel importante desse subtipo neuronal em projeções inibitórias de longo alcance. Células PV+ são consideradas células de padrão de disparo rápido (*fast-spiking*) e são predominantemente as células que produzem um controle inibitório rápido neocórtex, gerando depressão neuronal ao receber *inputs* excitatórios (RUDY et al., 2011). Ainda, como observado nos resultados, há uma maior presença de células PV+ na camada V de animais PVCre. Diferenças morfológicas e eletrofisiológicas em células *fast-spiking* que expressam PV+ são observadas ao longo das camadas corticais e se associam à inibição por *feed-forward* em circuitos tálamo-corticais que processam informação sensorial (RUDY et al., 2011), sendo consideradas essenciais para o controle excitação/inibição no córtex (RUDY et al., 2011). Na ínsula, o balanço excitação/inibição é da mesma forma essencial para sua atividade e controle sobre a informação sensorial relacionada à dor (WATSON, 2016; THIAUCOURT et al., 2017), sendo aqui também correlacionado pela razão glutamato/GABA, sendo passível sugerir que células PV+ no CIp poderiam participar deste processo.

Ainda, também foi demonstrada a presença de células glutamatérgicas no CIp, especialmente nas camadas corticais II/III e V, além de marcações positivas para CTB488, confirmando projeções glutamatérgicas para a porção mais posterior do ACC. Dados da literatura mostram que neurônios na camada II/III são responsáveis pela recepção de informação sensorial e comunicação à camada V, de onde ocorre dispersão de informação para todo o córtex (GUY; STAIGER, 2017), o que aponta para importância também da sinalização de células glutamatérgicas da ínsula na recepção, integração e comunicação da informação sensorial com outras regiões da matriz central, que inclui o ACC.

A análise na imunomarcação de c-Fos não demonstrou ativação neuronal específica de nenhum dos tipos celulares referentes a células que se projetariam ao ACC, GABAérgicas, PV+ ou glutamatérgicas no modelo de dor neuropática induzida por SNI, bem como observou-se um padrão semelhante de c-Fos em animais SNI e SHAM_{SNI}. Alguns dados da literatura indicam que a dor aumenta a ativação do córtex insular (ZHUO 2016), enquanto que no modelo de EEI, observamos que a estimulação elétrica do CIp induziu aumento da

atividade neuronal marcada por c-Fos em animais que tiveram redução da hipersensibilidade (ALONSO-MATIELO et al, *submitted*). Assim, os resultados aqui observados podem indicar a existência de outros mecanismos associados à modulação da dor pela ínsula.

Ensaio que envolvam a manipulação optogenética têm sido amplamente utilizados e aceitos na pesquisa devido à sua capacidade de entender o envolvimento seletivo de diferentes classes de neurônios nos circuitos cerebrais, sendo aplicada em estudos de pesquisa no campo da dor e combinados a avaliações comportamentais, análises eletrofisiológicas, moleculares e celulares. Assim, também objetivamos utilizar a ativação optogenética *in vivo* seletiva de ChR2 em populações neuronais combinada à avaliação do comportamento animal em modelo de dor neuropática por SNI.

Em relação à expressão do vírus AAV nos locais alvo, amostras de CIp e ACC mostraram uma expressão viral marcada por EYFP bem estabelecida cerca de 8 semanas após a injeção no CIp. Esse controle é inicialmente adequado para confirmar a expressão de ChR2 seletivamente em camundongos Vglut2Cre, nos quais uma cânula de fibra óptica foi implantada no mesmo local. Por outro lado, uma menor expressão viral foi observada no ACC de camundongos GAD2Cre e PVCre, onde houve o implante da fibra óptica para manipulação optogenética. Nossos resultados anteriores com a marcação retrógrada de traçador CTB488 também revelaram um número menor de projeções PV+ entre CIp e ACC. Dados de projeções mostrados no “The Allen Brain Atlas” (ALLEN BRAIN ATLAS, 2006) demonstram pequena marcação de projeções entre a ínsula e o ACC considerando-se coordenadas semelhantes às utilizadas aqui. Assim, e dada a característica de transporte anterógrado dos vírus adeno-associados, análises adicionais podem se fazer necessárias para melhorar a descrição das projeções entre o córtex insular posterior, o córtex do cíngulo e demais regiões encefálicas, bem como para aumento da presença viral no ACC determinando características posteriores à estimulação optogenética.

Sabe-se que a sinalização inibitória no córtex insular e no ACC é responsável pela indução da analgesia (JASMIN, 2003; ZHUO, 2008; JUAREZ-SALINAS et al., 2019), e que as células PV+ estão relacionadas à manutenção de ritmos corticais rápidos baseados na frequência gama- para a ativação de projeções PV+, utilizamos 40 Hz de forma a mimetizar frequências do tipo gama, como descrito anteriormente (ZHANG et al., 2015)- e que podem influenciar respostas sensoriais (CARDIN et al., 2009). Por sua vez, como a sinalização excitatória por meio da liberação de glutamato no CIp está correlacionada com comportamento hiperalgésico em roedores (WATSON et al., 2016), é possível supor que a ativação optogenética seletiva de células glutamatérgicas no CIp poderia agravar a dor nos

animais, ainda que comparavelmente alterações de glutamato não tenham sido identificados no modelo de CCI e EECI previamente estudados. Os resultados obtidos nos protocolos de estimulação optogenética aplicados demonstram que a ativação optogenética específica de ChR2 em projeções GABAérgicas, PV+ ou células glutamatérgicas no CIp não induziram hipersensibilidade mecânica em camundongos SHAM_{SNI} ou alteraram o quadro em animais SNI. Não obstante, esses resultados também permitem sugerir que a manipulação aguda da transmissão inibitória ou excitatória no CIp, respectivamente, não é suficiente para alterar drasticamente os comportamentos associados à dor neuropática, e que a sensibilização central nas áreas cerebrais relacionadas à dor, que também podem incluir processos da potencialização a longo prazo mediada pelo glutamato no córtex insular e no ACC (ZHUO, 2014) contribuam para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática.

A dor espontânea é uma modalidade de dor frequentemente relatada por pacientes na prática clínica que sofrem de dor crônica e que afeta seu bem-estar diário (TAPPE- THEODOR; KUNER, 2014) . O teste de preferência condicionada ao lugar (CPP) é uma abordagem eficaz e validada para se avaliar o comportamento animal relacionado à dor espontânea e associada à dor afetivo-motivacional em modelos de dor neuropática por lesão nervosa periférica em camundongos (HE et al., 2012). O teste é baseado em um comportamento voluntário, evocado sem estímulos nos animais ao passar mais tempo em uma câmara específica da caixa de CPP na qual os mesmos foram previamente condicionados. O teste pode ser adaptado de diferentes maneiras, para corresponder aos objetivos da pesquisa e direcionar o paradigma de condicionamento. Aqui, demonstramos que apenas a ativação de ChR2 em projeções PV+ entre o CIp e ACC provocaram alterações no comportamento de preferência dos animais com SNI sugerindo influência sobre o aspecto afetivo-motivacional da dor observado no paradigma da CPP. Não foi observada diferenças nos scores de CPP nos camundongos GAD2Cre e Vglut2Cre, sugerindo um efeito seletivo derivado da ativação dos neurônios PV+.

Considerando-se que o alívio da dor pode envolver um comportamento motivacional mediado pela atividade de circuitos centrais de recompensa, nos quais o córtex insular também participa e constitui uma área afetada durante condições de dor crônica (DOSSANTOS; MOURA; DASILVA, 2017), é importante considerar que os resultados obtidos aqui podem não se restringir ou não representar a modulação de dor espontânea ou contínua *per si*, mas também à modulação de sistemas de recompensa nos camundongos PVCre. De fato, apenas o comportamento associado ao teste de CPP, mas não a sensibilidade

mecânica avaliada no teste DPA, foi influenciada pela manipulação optogenética, sugerindo a participação de mecanismos de associados à recompensa.

Além disso, foi demonstrado que a transmissão inibitória no ACC, mediada pela sinalização via receptores GABA_A, mas não receptores GABA_B (LAGRAIZE; FUCHS, 2007), media profundo alívio da dor contínua em condições clínicas de dor crônica e em modelos animais, avaliados através de paradigmas de CPP (JUAREZ -SALINAS et al., 2019). Considerando-se a distribuição anatômica e citológica do córtex do cíngulo, a porção mais posterior do ACC (pACC) e sua porção mais rostral (rACC) estão envolvidos de maneiras diferentes na percepção da dor, enquanto o rACC tem sido amplamente correlacionado com a modulação restrita de componentes afetivo-motivacionais (JUAREZ-SALINAS et al., 2019), o pACC é comumente associado ao processamento de dor espontânea e contínua. No entanto, estudos recentes têm apontado o pACC como uma região igualmente importante para a modulação de outros aspectos da dor afetiva em alguns modelos de dor crônica (JUAREZ-SALINAS et al., 2019), o que vai ao encontro de nossos achados em que a dor contínua foi regulada após manipulação optogenética das projeções PV+ entre o CIp e a porção mais posterior do ACC. Assim, considerando-se as coordenadas estereotáxicas utilizadas para o ACC (1.055 mm anteriores ao bregma; lateralidade de 0.255 mm e profundidade de 1.555 a 1.622 mm) e tais observações, pode-se sugerir que a região assinalada funcionalmente assemelha-se ao ACC posterior (pACC).

Por fim, há algumas limitações em relação ao teste de CPP que devem ser considerados como a necessidade de habilidades de memória e aprendizado (TAPPE-THEODOR; KUNER, 2014) em roedores. Em nosso trabalho, a intenção do paradigma da CPP foi de compreender como a ativação optogenética de ChR2 na subpopulação específica de células pode alterar as respostas afetivo-motivacionais relacionadas à dor e, ao longo do protocolo, todos os esforços foram aplicados para atestar as respostas comportamentais dos animais, como a realização de experimentos *blind* (e que o experimentador desconhecia o grupo animal ao qual o indivíduo testado pertencia), além de respeitar o intervalo de quatro horas entre as fases de condicionamento no dia 2. Ainda assim, futuramente, experimentos adicionais podem ser necessários para a melhor descrição dos fenômenos aqui apresentados.

8. Conclusões

Na gama de resultados apresentados neste trabalho, podemos concluir que a EECI é uma modalidade capaz de induzir antinocicepção mecânica no modelo de dor neuropática em ratos induzido por constrição nervosa, sem gerar efeitos adversos sobre a atividade

locomotora geral, e sugerem que a participação da transmissão GABAérgica na circuitaria envolvida na analgesia induzida pela EECI é parcial, sendo mediada por receptores GABA_A e capaz de modular a presença de GAD65 no córtex insular, sem influenciar GAD65, a ativação de astrócitos e a presença de tirosina hidroxilase e sinaptofisina em áreas envolvidas com a percepção e modulação da dor. Tal fato reforça e garante a aplicabilidade da EECI como possível e potencial tratamento para dor neuropática.

Além disso, os dados consolidam a ideia proposta da existência de possíveis vias inibitórias e excitatórias entre o córtex insular e o ACC, demonstrado pela análise do traçador retrógrado CTB488 em camundongos GAD2CrexAi9, PVCrexAi9 e Vglut2CrexAi9, através das quais o aspecto afetivo-motivacional da dor pode ser modulado, como evidenciado pela avaliação no teste de CPP após ativação optogenética de células PV+ em camundongos com dor neuropática por lesão nervosa periférica, destacando o córtex insular posterior como uma área-chave com significado crítico para o tratamento da dor neuropática. Mecanismos moleculares e celulares detalhados envolvidos nesses efeitos serão uma questão importante a ser conduzida por pesquisas futuras.

9. Colaborações neste trabalho

Experimentos comportamentais e moleculares do *protocolo I* tiveram colaboração da Profa Dra. Elaine F. Toniolo, da Universidade Cidade de São Paulo, e das alunas Elizamara S. Gonçalves e Victória R. S. Oliveira do ICB/USP.

Os experimentos de HPLC foram realizados em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Ivo Lebrun e Admilson Silva no Instituto Butantan, São Paulo, SP.

Os experimentos de imunofluorescência e imuno-histoquímica do *protocolo I* foram realizados em colaboração e co-orientação do Prof. Dr. Luiz Roberto G. de Britto e Adilson Silva, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/USP.

Os experimentos descritos nos *protocolos II e III* deste trabalho foram realizados no Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Hotchkiss Brain Institute, Cumming School of Medicine, da Universidade de Calgary, Canadá, em colaboração com o Dr. Zizhen Zhang e o aluno Eder Gambeta e sob orientação do Prof. Dr. Gerald Zamponi.

**Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processos nº 2017/25399-4; nº2018/20702-3. As opiniões, hipóteses, e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.*

APÊNDICES*

APÊNDICE A- Aprovação da CEUA 3447131117 do ICB/USP São Paulo, SP, Brasil



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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da modulação gabaérgica na circuitaria envolvida na analgesia induzida pela estimulação elétrica do córtex insular", protocolada sob o CEUA nº 3447131117, sob a responsabilidade de **Camila Squarzoni Dale e equipe; Heloísa Alonso Matielo** - 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 do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 05/12/2017.

We certify that the proposal "Study of the gabaergic circuitry involved on insular cortex stimulation-induced analgesia", utilizing 144 Heterogenics rats (144 males), protocol number CEUA 3447131117, under the responsibility of **Camila Squarzoni Dale and team; Heloísa Alonso Matielo** - 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 12/05/2017.

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

Vigência da Proposta: **30 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**

Linagem: **Sprague-Dawley**

N amostral: 144

São Paulo, 05 de dezembro de 2017

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)

APÊNDICE B- Aprovação de emenda ao protocolo CEUA 3447131117 do ICB/USP São Paulo, SP, Brasil



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

São Paulo, 11 de outubro de 2019
CEUA N 3447131117

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

Título da proposta: "Estudo da modulação gabaérgica na circuitaria envolvida na analgesia induzida pela estimulação elétrica do córtex insular".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 000386)

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** a Emenda (versão de 04/setembro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Emenda ao projeto CEUA 3447131117 para certificar experimentos de estágio BEPE-Fapesp. Neste projeto BEPE, adicionalmente, temos por objetivo avaliar a presença de projeções gabaérgicas; parvalbumina (PV +); e glutamatérgicas da ínsula posterior ao ACC, bem como sua ativação e excitabilidade neuronal em um modelo de dor neuropática, além de analisar a influência da manipulação optogenética de tais projeções na nocicepção mecânica e dor espontânea de animais submetidos ao modelo de lesão parcial do nervo isquiático (Spared Nerve Injury- SNI). Camundongos machos, 7-8 semanas de idade geneticamente modificados Cre, GAD2-cre: Gad2tm2(cre)Zjh/j; PV-cre: B6;129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/j; Vglut2-cre:368 Slc17a6 tm2(cre)Lowl/j (obtidos de Jackson Laboratories) serão cruzados com camundongos carregando o gene repórter tdTomato Ai9: B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze 369/j para marcação dos neurônios gabaérgicos (GAD2-cre x Ai9), parvalbumina (PV-cre x Ai9) e glutamatérgicos (Vglut2-cre x Ai9) e submetidos à cirurgia de SNI e traçador toxina colérgica subunidade b (CTB488-Thermo Fisher Scientific) será injetada no ACC para marcação retrógrada de projeções entre a ínsula posterior e ACC. Cortes coronais da ínsula posterior submetidas a ensaio de imunofluorescência para c-Fos e analisadas em microscopia confocal. Cortes coronais da ínsula de animais PV-cre x Ai9, serão submetidos ainda processados para registro eletrofisiológico in vitro. Para análise optogenética, animais GAD2-cre, PV-cre e Vglut2-cre submetidos ao SNI receberão injeção de títulos virais para a expressão de opsinas na ínsula posterior direita, e/ou no ACC direito, e uma fibra óptica (Thorlabs) será implantada no córtex insular direito ou ACC direito. 5 a 8 semanas após a injeção de vírus, animais serão submetidos a optoestimulação (DPSS lasers- azul 472 nm, 5mW, 10Hz e/ou 40Hz ou amarelo 589 nm, 5mW, 10Hz. Laserglow Technologies, Ontario) e avaliados nos testes de sensibilidade mecânica (anestesiômetro digital plantar- Digital Plantar Anesthesiometer -DPA) e teste de preferência condicionada ao lugar (Conditioned Place Preference- CPP). Amostras de encéfalo serão coletadas após perfusão transcardíaca para análise de expressão viral em microscopia confocal. "

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

APÊNDICE C- Aprovação do protocolo do Comitê de Cuidados Animais da Universidade de Calgary, Calgary, Alberta, Canada - AC16-0191

26/06/2019

Print: AC16-0191_MOD15-001 - Prefrontal and related brain circuits of pain



Date: Wednesday, June 26, 2019 1:19:18 PM

Print

Close

View: SF - Identification & Key Personnel

Getting Started - Identification & Key Personnel

If you need help, refer to the "?".

As you complete this form, you can save your work, exit and come back at any time. Please save your work often.

BE AWARE that while some navigation features in this form will prompt you to save, if you click the **'Back'** Button either in this form or in your web-browser before saving your work, you will lose any changes you have made to that page.

People named on this application will be able to access the application and can assist in its completion. However, only the Primary Applicant named in item 4.0 can submit.

NOTE: by listing people on this first page, you will be providing them with the ability to see limited information about your personal contact information, your training and experience, and any project funding records you have registered under your name with Research Services.

(* indicates a required field)

1.0 * Purpose of Application:
Fourth year electronic Resubmission only

1.1 Electronic Application Id: AC12-0198

2.0 * Short (abbreviated) Title:
Prefrontal and related brain circuits of pain

3.0 * Formal Title: (This title will appear on official documentation)
Optogenetic interrogation of prefrontal and related brain circuits in Modulation of pain

(NOTE: For *Research Protocols* tied to funding managed by Research Services, keeping this title consistent with the title used in funding applications greatly assists in post-approval management.)

4.0 * Primary Applicant:
Gerald Zamponi

26/06/2019

Print: AC16-0191_MOD15-001 - Prefrontal and related brain circuits of pain

*** 4.1 - Applicant's Role(must be one of these choices):**

Principal Investigator

5.0 List all Co-Investigators / Co-Applicants:

Name	Department	E-Mail	Phone	Cell
Suirong Wayne Chen	Physiology & Pharmacology	swchen@ucalgary.ca	+1 (403) 220-4235	

6.0 Primary Administrative Contact:

Zizhen Zhang

View: SF - Application Type

Application Type

The answer given to the question below will determine which sections are relevant for the application you are about to complete.

Designate Breeding Protocols (protocols to generate/hold animals that have not yet been assigned to a particular research or testing protocol) as Research/Testing Protocols.

(* indicates a required field)

1.0*** Please indicate the type of ACC Approval you are applying for:**

- | | |
|--|---|
| <input checked="" type="radio"/> Research / Testing Protocol | A study involving animals as study subjects or as sources of cadavers or tissues derived solely for the purpose of the study, animals used for purposes of scientific investigation or medical research, or in order to conduct regulatory testing of drugs, procedures or appliances. |
| <input type="radio"/> Teaching Protocol | When animals are to be used for the purpose of teaching undergraduate or graduate classes and/or labs, or other training in conjunction with the University. If students or post-doctoral fellows will receive training while a scientific objective is pursued (e.g. independent studies course, Investigative Medicine 4th year rotation), you should select the "Research /Testing Protocol" category above. |
| <input type="radio"/> Statement of Animal Tissue or Cadaver Use | When NONE of the tissues and cadavers to be used will be derived from live animals purposely sourced or killed for the study or course. Animals purchased or procured that are euthanized specifically to supply tissue or cadavers (including species/tissues from biological supply companies, etc.) require submission of a full (Research/Testing or Teaching) Animal Use Protocol. |

View: SF - Application Routing

Application Routing

The answer given to the question below will help determine which ACC receives this application.

(* indicates a required field)

1.0*** Please select the appropriate Animal Care Committee:**

- Health Sciences Animal Care Committee** **HSACC** **All research, teaching or testing conducted on the Health Sciences Complex or off-campus by CSM faculty and students.**
- Life & Environmental Sciences Animal Care Committee** **LESACC** All research, teaching or testing conducted on the Main Campus or off-campus by faculty and students from Main Campus, or by faculty and students from other institutions using U of Calgary field facilities (excluding activities related to UCVM).
- Veterinary Sciences Animal Care Committee** **VSACC** All research, teaching or testing conducted on the Spy Hill Campus or off-campus by UCVM faculty or students.

View: SF - Registered Funding

Funding Information

All questions preceded by a red asterisk () are required responses that map you to the application sections that are relevant to your study. All questions within the section to which you are mapped must be addressed.*

1.0 * Proposed research is:

- Unfunded
- Funded**

2.0 * Type of Funding: (select all that apply)

- Grant (external)**
- Contract (e.g. Industry sponsored / for-profit organization)
- Internal Funds (e.g. start-up funds, operational)
- Service Agreement (Funder pays for specific services, e.g., animal testing)
- Cooperative Groups
- Other

2.1 Specify (if Other is selected):

3.0 * Funding Agency/Sponsor:

Funding ID	Title	Agency / Sponsor	Unlisted Agency / Sponsor	Funding Status
	Voltage gated calcium channels, molecular targets for pain therapeutics	Canadian Institutes of Health Research		Awarded / Confirmed
	Molecular Physiology Of T-type calcium channels	Canadian Institutes of Health Research		Awarded / Confirmed

Funding ID	Title	Agency / Sponsor	Unlisted Agency / Sponsor	Funding Status
	Regulation of T-type calcium channel expression - a novel strategy for the treatment of pain	Alberta Innovates - Health Solutions		Awarded / Confirmed

4.0 * Indicate which office administers the funding:

- University of Calgary – Research Services Office (RSO)
- University of Calgary – Legal, Research Services, Cumming School of Medicine (CSM Legal)
- Alberta Health Services
- Covenant Health
- University of Alberta – Research Services Office (RSO)
- Other

4.1 Specify (if Other is selected):

5.0 * Indicate if this research is sponsored or monitored by any of the following: (select all that apply)

- Health Canada
- United States Food and Drug Administration (US FDA)
- United States Department of Health and Human Services (US DHHS - NIH, NCI, OHRP)
- European Medicines Agency (EMA)
- Not Applicable

View: SF - Study Support Staff

Study Support Staff, Students, Trainees & External Collaborators

1.0 Lab Manager (if applicable):
Jawed Hamid

2.0 Study Support Staff, Students, and Trainees:

The following list should include any staff (other than the PI, or Co-Is) that will be directly accountable to the PI. Anyone involved in use and handling of live animals during this study (other than the PI or Co-Is) must be listed in this application. Anyone NOT working with animals or tissues should not be listed as study support staff.

Last	First	Classification
------	-------	----------------

26/06/2019

Print: AC16-0191_MOD15-001 - Prefrontal and related brain circuits of pain

	Last	First	Classification
View	Yabuki	Yasushi	-- Other
View	Hill	Matthew	-- Other
View	Gadotti	Vinicius	-- Other
View	Zhang	Zizhen	-- Other
View	de Andrade	Eder	Graduate Student Trainee
View	Petrie	Gavin	Graduate Student Trainee
View	Huang	Shuo	Graduate Student Trainee
View	Matielo	Heloisa	Graduate Student Trainee
View	Huang	Junting	Post-Doctoral Fellows Trainee
View	M'Dahoma	Said	Post-Doctoral Fellows Trainee
View	Gandini	Maria	Post-Doctoral Fellows Trainee
View	Chen	Lina	Research Assistant
View	Wang	Decheng	Undergraduate Student Trainee

3.0 Are any of the above people Trainees?

Yes No

3.1 – If “YES”, how will the PI will ensure that the trainees understand and act within the obligations and restrictions set by this protocol:

Dr. Zamponi will meet with the research team regularly and discuss details of the protocol with the trainees to ensure that all the procedures specified in the this protocol are followed.

The trainees will report and discuss research progress and issues regarding the protocol with Dr. Zamponi for his advice. Senior research personnel in the team are also responsible for the training of postdoctoral fellow and the strict implementation of the protocol.

4.0 External Collaborators / Experts:

List any non-U of C personnel who will be participating in this study.

Last Name	First Name	Phone Number	Email
There are no items to display			

[View: SF - Emergency Contacts](#)

Emergency Contacts

Designate two members of the Staff already listed on the application to act as the 24-hour "on-call" contacts (day-time and after-hour phone numbers required). People listed here must be qualified and prepared to handle animals in emergency situations.

(* indicates a required field)

(Two emergency contacts are preferred)

APÊNDICE D- Ficha do aluno

07/04/2020

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
 Instituto de Ciências Biomédicas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

42138 - 8945840/1 - Heloisa Alonso Matielo

Email: heloisa.matielo@usp.br
Data de Nascimento: 23/04/1996
Cédula de Identidade: RG - 39.332.334-1 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharela em Ciências Biomédicas - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2017

Curso: Mestrado
Programa: Biologia de Sistemas
Área: Biologia Morfofuncional
Data de Matrícula: 30/01/2018
Início da Contagem de Prazo: 30/01/2018
Data Limite para o Depósito: 30/07/2020
Orientador: Prof(a). Dr(a). Camila Squarzoni Dale - 09/05/2019 até o presente. Email: camila.dale@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 05/02/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 05/04/2019
Estágio no Exterior: University of Calgary, Canadá - Período de 01/05/2019 até 31/10/2019
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 30/01/2018

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 03/02/2020

Impresso em: 07/04/2020 18:21:37

07/04/2020

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

42138 - 8945840/1 - Heloisa Alonso Matielo

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BIF5722-2/1	Introdução à Pesquisa Experimental em Neurociências (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	26/02/2018	04/03/2018	30	2	100	A	N	Concluída
BMA5896-2/2	Seminários Avançados do Programa de Ciências Morfofuncionais - Tópico VI	27/02/2018	11/06/2018	15	1	100	A	N	Concluída
MNE5743-3/2	Fundamentos Biológicos e Psicossociais da Dor (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	13/04/2018	03/05/2018	90	6	100	A	N	Concluída
BMA5792-7/3	Metodologia Neuroanatômica	03/05/2018	28/06/2018	75	5	100	A	N	Concluída
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
Atividade do Programa	Participou da XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, com apresentação do trabalho "Involvement of the gabaergic system in the antinociceptive effect of the electrical stimulation of the insular cortex", publicado nos anais, página 32, volume único, São Paulo (1)	22/08/2018	25/08/2018	-	1	-	-	-	-
BMB5795-5/2	Neurociência Básica	13/09/2018	22/11/2018	120	8	100	A	N	Concluída
BMB5788-6/2	Comunicação Celular no Sistema Nervoso	15/10/2018	03/12/2018	90	6	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**Observações:**

1) Créditos atribuídos de acordo com o Artigo 64 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 06/11/2018.

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.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 03/02/2020**Impresso em:** 07/04/2020 18:21:37

Referências¹

- ALLEN BRAIN ATLAS, Developing Mouse Brain. **Allen brain atlas**. 2006.
- ALONSO-MATIELO et al. Electrical stimulation of the posterior insula induces mechanical analgesia in a rodent model of neuropathic pain by modulating GABAergic signaling and activity in the pain circuitry. **Submitted. Brain Research**.
- ALVES, J. M.; LIN, K. Neuropathic Pain: A Review of Interneuronal Disinhibition. **Archives of Neuroscience**, v. 5, n. 1, 2018.
- ANTONOVA, I. et al. Rapid increase in clusters of presynaptic proteins at onset of long-lasting potentiation. **Science**, v. 294, n. 5546, p. 1547-1550, 2001.
- 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.
- BARON, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain—a clinical perspective. **Nature Reviews Neurology**, v. 2, n. 2, p. 95, 2006.
- 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.
- BEHRSTOCK, S. P. et al. Conditionally-immortalized astrocytic cell line expresses GAD and secretes GABA under tetracycline regulation. **Journal of neuroscience research**, v. 60, n. 3, p. 302-310, 2000.
- BENARROCH, E. E. Periaqueductal gray An interface for behavioral control. **Neurology**, v. 78, n. 3, p. 210-217, 2012.
- 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.
- BLOM, S. M. et al. Nerve injury-induced neuropathic pain causes disinhibition of the anterior cingulate cortex. **Journal of neuroscience**, v. 34, n. 17, p. 5754-5764, 2014.
- BOCCARD, S. G. J.; PEREIRA, E. A. C.; AZIZ, T. Z. Deep brain stimulation for chronic pain. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 1537–1543, 2015.

¹De acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOURQUIN, A. F. et al. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. **Pain**, v. 122, n. 1–2, p. 14.e1-14.e14, 2006.

BOYDEN, E. S. et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 9, p. 1263–1268, 2005.

BRIZZI, K. T.; LYONS, J. L. Peripheral nervous system manifestations of infectious diseases. **The Neurohospitalist**, v. 4, n. 4, p. 230-240, 2014.

BURKEY, A. R.; CARSTENS, E.; JASMIN, L. Dopamine reuptake inhibition in the rostral agranular insular cortex produces antinociception. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 4169–79, 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.

CALEJESAN, A. et al. Descending facilitatory modulation of a behavioral nociceptive response by stimulation in the adult rat anterior cingulate cortex. **European Journal of Pain**, v. 4, n. 1, p. 83-96, 2000.

CARDIN, J. A. et al. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 663–667, 2009.

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.

CHANG, L. et al. Magnetic resonance spectroscopy to assess neuroinflammation and neuropathic pain. **Journal of neuroimmune pharmacology**, v. 8, n. 3, p. 576-593, 2013.

CHOU, A. et al. Altered synaptophysin expression in the rat spinal cord after chronic constriction injury of sciatic nerve. **Neuroscience letters**, v. 333, n. 3, p. 155-158, 2002.

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.

COLLINS, S. et al. NMDA Receptor Antagonists for the Treatment of Neuropathic Pain. **Pain medicine**, v. 11, n. 11, 2010.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain. **Annu Rev Neurosci**, n. 32, p. 1–32, 2009.

CRAIG, A. D. Interoception: The sense of the physiological condition of the body. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 13, n. 4, p. 500–505, 2003.

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.

CRUCCU, G. et al. EAN guidelines on central neurostimulation therapy in chronic pain conditions. **European Journal of Neurology**, v. 23, n. 10, p. 1489–1499, 2016.

CRUCCU, G. et al. EFNS guidelines on neurostimulation therapy for neuropathic pain. **European Journal of Neurology**, v. 14, n. 9, p. 952-970, 2007.

CUMMINGS, K. A.; POPESCU, G. K. Glycine-dependent activation of NMDA receptors. **The Journal of general physiology**, v. 145, n. 6, p. 513-527, 2015.

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.

DEISSEROTH, K. Optogenetics. **Nature Methods**, v. 8, n. 1, p. 26–29, 20 Jan. 2011.

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.

DOSSANTOS, M. F.; MOURA, B. DE S.; DASILVA, A. F. Reward circuitry plasticity in pain perception and modulation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. NOV, p. 1–13, 2017.

DROSSMAN, D. A. Brain imaging and its implications for studying centrally targeted treatments in irritable bowel syndrome: A primer for gastroenterologists. **Gut**, v. 54, n. 5, p. 569–573, 2005.

DWORKIN, R. H. et al. Advances in Neuropathic Pain. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 11, p. 1524, 2003.

ENNA, S. J.; MCCARSON, K. E. The role of GABA in the mediation and perception of pain. **Advances in pharmacology**, v. 54, p. 1-27, 2006.

ESCLAPEZ, M. et al. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 3, p. 1834-1855, 1994.

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.

FELDBLUM, S. et al. Comparative distribution of GAD65 and GAD67 mRNAs and proteins in the rat spinal cord supports a differential regulation of these two glutamate decarboxylases in vivo. **Journal of neuroscience research**, v. 42, n. 6, p. 742-757, 1995.

FINNERUP, N. B. et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 2, p. 162–173, 2015.

FOERSTER, Bradley R. et al. Reduced insular γ -aminobutyric acid in fibromyalgia. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 2, p. 579-583, 2012.

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.

FRANÇOIS, A. et al. A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron*, v. 93, n. 4, p. 822-839. e 6, 2017.

GALHARDONI, R. et al. Insular and anterior cingulate cortex deep stimulation for central neuropathic pain. *Neurology*, p. 10.1212/WNL.0000000000007396, 2019.

GALHARDONI, R. et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation in chronic pain: A review of the literature. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, v. 96, n. 4, p. S156–S172, 2015.

GAMBETA, E.; CHICHORRO, J. G.; ZAMPONI, G. Trigeminal neuralgia: An overview from pathophysiology to pharmacological treatments. *Molecular Pain*, v. 16, 2020.

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.

GEBHART, G. F. Descending modulation of pain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 27, n. 8, p. 729-737, 2004.

GHAZIRI, J. et al. Subcortical structural connectivity of insular subregions. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

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

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

GRADINARU, V. et al. Molecular and Cellular Approaches for Diversifying and Extending Optogenetics. *Cell*, v. 141, n. 1, p. 154–165, 2010.

GUY, J.; STAIGER, J. F. The functioning of a cortex without layers. *Frontiers in Neuroanatomy*, v. 11, n. July, p. 1–13, 2017.

HANOĞLU, L. et al. Preliminary findings on the role of high-frequency (5Hz) rTMS stimulation on M1 and pre-SMA regions in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, v. 724, n. February, p. 11–14, 2020.

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

HARA, K. et al. Chlorogenic acid administered intrathecally alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. **European journal of pharmacology**, v. 723, p. 459-464, 2014.

HARRIS, R. E.; CLAUW, D. J. Imaging central neurochemical alterations in chronic pain with proton magnetic resonance spectroscopy. **Neuroscience letters**, v. 520, n. 2, p. 192-196, 2012.

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

HE, Y. et al. Negative Reinforcement Reveals Non-Evoked Ongoing Pain in Mice With Tissue or Nerve Injury. **The Journal of Pain**, v. 13, n. 6, p. 598–607, jun. 2012.

HEINRICHER, M. M. et al. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. **Brain research reviews**, v. 60, n. 1, p. 214-225, 2009.

HUANG, J. et al. Modulation of Neuropathic Pain. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. October, 2019.

HUNG, K. L. et al. Upregulation of presynaptic proteins and protein kinases associated with enhanced glutamate release from axonal terminals (synaptosomes) of the medial prefrontal cortex in rats with neuropathic pain. **Pain**, v. 155, n. 2, p. 377–387, 2014.

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>> Acesso em: 30.janeiro.2019.

ICARD-LIEPKALNS, C. et al. Tyrosine hydroxylase regulation in neurotransmission and neuroplasticity. **Journal of Physiology-Paris**, v. 87, n. 3, p. 153–157, jan. 1993.

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

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.

JOHNSON, R. W.; RICE, A. S. C. Postherpetic neuralgia. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 16, p. 1526–1533, 2014.

JOHNSTON, G. A. R. Advantages of an antagonist: Bicuculline and other GABA antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 2, p. 328–336, 2013.

JUAREZ-SALINAS, D. L. et al. GABAergic cell transplants in the anterior cingulate cortex reduce neuropathic pain aversiveness. **Brain**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2019.

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.

KHASABOV, S. G.; SIMONE, D. A. Loss of neurons in rostral ventromedial medulla that express neurokinin-1 receptors decreases the development of hyperalgesia. **Neuroscience**, v. 250, p. 151-165, 2013.

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.

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

KUBO, K. et al. Thermal hyperalgesia via supraspinal mechanisms in mice lacking glutamate decarboxylase 65. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 331, n. 1, p. 162-169, 2009.

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

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

LAGRAIZE, S. C.; FUCHS, P. N. GABAA but not GABAB receptors in the rostral anterior cingulate cortex selectively modulate pain-induced escape/avoidance behavior. **Experimental neurology**, v. 204, n. 1, p. 182-194, 2007.

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

LEE, et al. Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. **Glia**, v. 59, n. 1, p. 152-165, 2011.

LEVY, R.; DEER, T. R.; HENDERSON, J. Intracranial neurostimulation for pain control: A review. **Pain Physician**, v. 13, n. 2, p. 157–165, 2010.

LI, D. et al. Multimodal Memory Components and Their Long-Term Dynamics Identified in Cortical Layers II/III but Not Layer V. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 13, n. October, p. 1–13, 2019.

- LIM, E. S.; LEE, Il Ok. Effect of intrathecal glycine and related amino acids on the allodynia and hyperalgesic action of strychnine or bicuculline in mice. **Korean journal of anesthesiology**, v. 58, n. 1, p. 76-86, 2010.
- LINNMAN, C. et al. Neuroimaging of the periaqueductal gray: state of the field. **Neuroimage**, v. 60, n. 1, p. 505-522, 2012.
- 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, H.; CELIK, M. Ö. Recent advances in understanding neuropathic pain: glia, sex differences, and epigenetics. **F1000Research**, v. 5, 2016.
- 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.
- MEKHAIL, N. A. et al. Clinical applications of neurostimulation: Forty years later. **Pain Practice**, v. 10, n. 2, p. 103–112, 2010.
- MELZACK, R; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-979, 1965.
- MESULAM, M. -MARSEL; MUFSON, E. 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, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.
- MILLS, E. P. et al. Brainstem pain-control circuitry connectivity in chronic neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 465–473, 2018.
- MO, J. J. et al. Motor cortex stimulation: A systematic literature-based analysis of effectiveness and case series experience. **BMC Neurology**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019.
- MOISSET, X.; 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.
- 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.
- 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.

OHARA, P. T. et al. Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. **Journal of neurocytology**, v. 32, n. 2, p. 131-141, 2003.

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

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

PEREA, G. et al. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends in neurosciences**, v. 32, n. 8, p. 421-431, 2009.

PEYRON, R. et al. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis. **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.

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.

RANG, R. et al. *Rang & Dale Farmacologia*. **Elsevier Brasil**, 2015.

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

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

RUDY, B. et al. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. **Developmental neurobiology**, v. 71, n. 1, p. 45-61, 2011.

SAFFARPOUR, S. et al. In vivo evaluation of the hippocampal glutamate, GABA and the BDNF levels associated with spatial memory performance in a rodent model of neuropathic pain. **Physiology and Behavior**, v. 175, p. 97–103, 2017.

SATO, F. 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, H. G; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 389, n. 4, p. 237-43, 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.

SHEIKH, S. N. et al. Regional distribution and relative amounts of glutamate decarboxylase isoforms in rat and mouse brain. **Neurochemistry international**, v. 35, n. 1, p. 73-80, 1999.

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.

SOUZA, J. B. et al. Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception, and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey. **Pain Research and Management**, v. 2017, 2017.

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.

TAJERIA, M. et al. Brain Neuroplastic Changes Accompany Anxiety and Syndrome. **Anesthesiology**, v. 121, n. 4, p. 852–865, 2014.

TAMAMAKI, N.; TOMIOKA, R. Long-range GABAergic connections distributed throughout the neocortex and their possible function. **Frontiers in Neuroscience**, v. 4, n. DEC, p. 1–8, 2010.

TAN, L. L. et al. A pathway from midcingulate cortex to posterior insula gates nociceptive hypersensitivity. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 1591–1601, 2017.

TAO, W. et al. Brainstem BDNF Signaling is Required for Histone Deacetylase Inhibitor-Induced Pain Relief. **Molecular pharmacology**, p. mol. 115.098186, 2015.

TAPPE-THEODOR, A.; KUNER, R. Studying ongoing and spontaneous pain in rodents - challenges and opportunities. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 11, p. 1881–1890, 2014.

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.

TAYLOR, et al. Two systems of resting state connectivity between the insula and cingulate cortex. **Human brain mapping**, v. 30, n. 9, p. 2731-2745, 2009.

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

THIAUCOURT, M. et al. Posterior Insular GABA Levels Inversely Correlate with the Intensity of Experimental Mechanical Pain in Healthy Subjects. **Neuroscience**, v. 387, p. 116-122, 2018.

THOMPSON, J. M.; NEUGEBAUER, V. Cortico-limbic pain mechanisms. **Neuroscience Letters**, v. 702, n. November 2018, p. 15–23, 2019.

TIAN, N. et al. The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal γ -aminobutyric acid release. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 22, p. 12911-12916, 1999.

TREEDE, R.-D. et al. A classification of chronic pain for ICD-11. **PAIN**, v. 156, n. 6, p. 1, mar. 2015.

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. 3-4, p. 411, 2009.

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

TYE, K. M.; DEISSEROTH, K. Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 251–266, 2012.

VAN HECKE, O. et al. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**, v. 155, n. 4, p. 654–662, 2014.

VAYSSE, L. et al. GABAergic pathway in a rat model of chronic neuropathic pain: modulation after intrathecal transplantation of a human neuronal cell line. **Neuroscience research**, v. 69, n. 2, p. 111-120, 2011.

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.

WARREN, S.; YEZIERSKI, R. P.; CAPRA, N. F. The somatosensory system II: touch, thermal sense, and pain. **Fundamental neuroscience. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone**, p. 273-92, 2002.

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

WEI, H. et al. Histamine in the locus coeruleus promotes descending noradrenergic inhibition of neuropathic hypersensitivity. **Pharmacological research**, v. 90, p. 58-66, 2014.

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

WILLIAMS, A. C. de C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **Pain**, v. 157, n. 11, p. 2420-2423, 2016.

WOOLF, C. J. Review series introduction What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 10-12, 2010.

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

YAMAMOTO, T.; YAKSH, T. L. Effects of intrathecal strychnine and bicuculline on nerve compression-induced thermal hyperalgesia and selective antagonism by MK-801. **Pain**, v. 54, n. 1, p. 79-84, 1993.

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.

YOKOTA, E. et al. Opioid subtype- and cell-type-dependent regulation of inhibitory synaptic transmission in the rat insular cortex. **Neuroscience**, v. 339, p. 478-490, 2016.

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.

ZHANG, F. et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. **Nature**, v. 446, n. 7136, p. 633-639, 2007.

ZHANG, Z. et al. Role of Prelimbic GABAergic Circuits in Sensory and Emotional Aspects of Neuropathic Pain. **Cell Reports**, v. 12, n. 5, p. 752-759, 2015.

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. 199–207, 2008.

ZHUO, M. Long-term potentiation in the anterior cingulate cortex and chronic pain. **Philosophical transactions of the Royal Society of London.**, v. 369, n. 1, p. 4–15, 2014.

ZHUO, M. Neuronal mechanism for neuropathic pain. **Molecular pain**, v. 3, n. 1, p. 14, 2007.