

HELOÍSA ALONSO MATIELO

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

Versão Parcial

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

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 a ínsula 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 astrocitárias, bem como avaliar a presença de projeções excitatórias e inibitórias entre a ínsula 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 na ínsula posterior esquerda (1.0 mm caudal ao bregma, 5.8 mm de lateralidade, 7.1 mm de profundidade) e foram submetidos a cinco estimulações diárias, consecutivas (15 min, 60 Hz, 210 μ s, 1V). Metiodeto de bicuculina, antagonista de receptores GABA_A, (0.1ug, 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 na ínsula após EECI foi observado por imunofluorescência, sem alterações de GFAP, sinaptofisina e tirosina-hidroxilase (TH) na ínsula, 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. 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- subunidade B (CTB488). Foi demonstrado a presença de projeções GABAérgicas, parvalbumina positivas (PV+) e glutamatérgicas entre a ínsula 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) na ínsula direita e uma fibra óptica foi implantada na ínsula (0.5 mm posterior ao bregma, 0.375 de lateralidade, 4.0 mm de profundidade) ou ACC direito (1.055 mm anterior ao bregma, 0.255 mm de lateralidade, 1.522 mm de profundidade). Animais foram submetidos ao SNI e 6 a 8 semanas após a injeção do vírus, à optostimulação (lasers azuis 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 a ínsula 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 analgesic 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 insula as a 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 of excitatory and inhibitory projections between the insula 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 insula (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, (0.1ug, 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 insula, 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 collaboration with the University of Calgary, GAD2Crex Ai9, PVCrex Ai9, Vglut2Crex Ai9 mice underwent Spared Nerve Injury (SNI) and injection of tract tracer choleric toxin-subunit B (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 insula and a fiberoptic cannula was

implanted in right insula (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 to 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 insula and the ACC, and their influence on pain modulation in neuropathic pain models.

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

1. Introdução

1.1 Dor e dor neuropática

A definição mais recente 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 o 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 a seis 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 - 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 induzirem 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, a ínsula 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. A ínsula está estrategicamente localizada 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, a ínsula se localiza bilateralmente abaixo do sulco lateral (WYNFORD-THOMAS; POWELL, 2017), dividida em ínsula 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 na ínsula (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, ela 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+} parvalbumina (PV), o neuropeptídeo somatostatina (SST), e o receptor ionotrópico de serotonina 5HT_{3a} (5HT_{3a}R) (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 na ínsula 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 na ínsula 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 (MA ZHIGUO, 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 distúrbios neurológicos, patológicos e de dor crônica. Em resposta à dor crônica 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 neuropeptídeos, 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 condução nervosa (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; LAZORTHE 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 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 a ínsula 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 da ínsula 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 na ínsula 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.

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.

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.; W. 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 pharmaco-resistant 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, H. 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.