



Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS NOCICEPTIVA E NEUROQUÍMICA INDUZIDAS
POR ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC)
EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA**

Stefania Giotti Cioato

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS NOCICEPTIVA E NEUROQUÍMICA INDUZIDAS
POR ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC)
EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA**

Autora: Stefania Giotti Cioato

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Cioato, Stefania Giotti

Avaliação de respostas nociceptiva e neuroquímica induzidas por Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) em ratos submetidos a um modelo de dor neuropática / Stefania Giotti Cioato. -- 2014. 117 f.

Orientadora: Iraci Lucena da Silva Torres.

Coorientador: Alexandre Silva de Quevedo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Dor neuropática. 2. ETCC. 3. Citocinas. 4. NGF. I. Torres, Iraci Lucena da Silva, orient. II. de Quevedo, Alexandre Silva, coorient. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Fernanda Morrone

Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Rosane Gomez

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Ana Lucia Abujamra

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

“O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra.”

Aristóteles

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

- Por toda a dedicação e empenho, não apenas na minha formação acadêmica, mas também para o meu crescimento pessoal, agradeço à minha orientadora Dra Iraci Lucena da Silva Torres. Obrigada por todo o incentivo, apoio e por compartilhar seu conhecimento comigo.
- Agradeço em especial ao meu colega e amigo Paulo Ricardo Marques Filho, que compartilhou comigo não apenas o desenvolvimento experimental deste trabalho, mas todas as angústias e alegrias destes dois anos. Muito obrigada pelo carinho, paciência, confiança e companheirismo.
- Especiais agradecimentos às colegas Vanessa Leal Scarabelot, Carla da Oliveira e Lauren Spezia Adachi que trabalharam com empenho, comprometimento e solicitude nessa pesquisa, compartilhando comigo seus saberes e guiando-me pelos caminhos do conhecimento. Obrigada pelo companheirismo.
- Aos colegas Liciane Fernandes Medeiros, Andressa de Souza e Rafael Vercelino, obrigada pelo apoio e pela disponibilidade infindável. Agradeço em especial à Liciane Medeiros pela dedicação inesgotável na reta final dessa pesquisa, tornando possível a sua conclusão.
- Ao meu coorientador, Alexandre Silva de Quevedo, por acreditar nesse trabalho desde a sua elaboração.
- A todos os colegas do grupo de pesquisa Farmacologia da Dor e Neuromodulação: modelos animais, pelo apoio e incentivo.
- Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - GPPG-HCPA, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto (12-0512), por dispor da

Unidade de Experimentação Animal (UEA) e da Unidade de Análises Moleculares e Proteína (UAMP) onde o trabalho foi desenvolvido com eficácia e firmeza.

- Sou grata a todos os colaboradores da Unidade de Experimentação Animal, que tornaram possível a realização deste trabalho. Obrigada pela eficiência, atenção, responsabilidade e carinho comigo.
- Agradeço ao prof. Wolnei Caumo pelas contribuições nesse trabalho e ao PPGCM pela oportunidade de desenvolver o mestrado nesta Universidade.
- Pela generosidade, agradeço ao Everaldo B de Almeida (CPE), Jeferson B da Silva (UAMP).
- Agradeço aos órgãos de fomento CNPq e FINEP que contribuíram para realização deste trabalho.
- PIBIC CNPq/UFRGS, pelas bolsas dos alunos que participaram deste trabalho.
- O meu agradecimento mais sincero ao meus pais, Ildo Cioato e Marta J. Giotti Cioato, meus exemplos, que me apoiaram e que me ensinaram a importância do trabalho árduo para atingir o que se almeja. Obrigado sempre por tudo.
- Ao meu irmão, meu incansável companheiro, muito obrigada pela paciência e pelo carinho e por compreender os momentos de privação do convívio.
- Agradeço à minha tia, Marília Giotti, pelo papel fundamental na minha formação, pela compreensão e apoio incondicionais.
- Agradeço a Fabio André Selaimen por andar lado a lado comigo, com amor e cumplicidade.
- Por fim, são muitas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. Expresso meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma participaram da construção deste ideal, compartilhando conhecimento, generosidade e empenho. Muito obrigada.

RESUMO

A dor neuropática (DN) é causada por uma lesão primária ou por uma disfunção no sistema nervoso periférico (SNP) ou central (SNC), sendo que os principais sintomas são a alodinia mecânica e a hiperalgesia a estímulos térmicos e mecânicos. A DN apresenta resposta analgésica insuficiente com terapêuticas farmacológicas clássicas, sendo um desafio para o tratamento clínico. Técnicas de neuromodulação central, como a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC), representam um recurso promissor no manejo da dor, uma vez que promovem neuroplasticidade em vias envolvidas com o processo doloroso, sendo um método não-invasivo que pode ser combinado com outras terapias. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do tratamento repetido com ETCC na resposta hiperalgésica térmica e mecânica em modelo experimental de DN. Adicionalmente, foram avaliados os níveis de IL-1 β , IL-10, TNF- α e NGF em estruturas do SNC destes animais. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA:120512). Oitenta e quatro ratos machos Wistar foram divididos em 7 grupos: controle, dor neuropática, dor neuropática+ETCC, dor neuropática+sham ETCC, sham dor neuropática, sham dor neuropática+ETCC e sham dor neuropática+sham ETCC. O modelo de DN foi induzido por meio de ligadura parcial do nervo isquiático na pata esquerda. O sham do modelo de DN seguiu o mesmo protocolo, com simulação da ligadura parcial do nervo isquiático e o grupo controle não sofreu nenhuma manipulação. O tratamento com ETCC consistiu em 20 minutos/dia/8 dias, com intensidade de 0,5mA. Para o sham do tratamento, os eletrodos foram apenas fixados à cabeça do animal durante 20 minutos/dia/8 dias, sem nenhuma estimulação. A hiperalgesia térmica e mecânica foi avaliada por meio dos testes da Placa Quente e de Von Frey, respectivamente, no tempo basal, 7 e 14 dias após a cirurgia e imediatamente, 24 horas e 7 dias após o final do tratamento. Os níveis de IL-1 β , IL-10, TNF- α e NGF no córtex cerebral, medula espinhal e tronco cerebral foram determinados por ELISA 48 horas e 7 dias após o final do tratamento. A análise estatística para os testes nociceptivos foi realizada através da *Generalized Estimation Equation* (GEE)/Bonferroni e para as análises bioquímicas por ANOVA de uma via (IL-1 β , IL-10, TNF- α) e ANOVA de três vias (NGF). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média, sendo considerado significativo $p < 0.05$. Nossos resultados demonstraram que a DN altera os níveis de IL-1 β , IL-10, TNF- α e NGF no SNC em curto e longo prazo. Além disso, a ETCC reduz a resposta nociceptiva a curto e longo prazo e na modulação dos níveis de citocinas no sistema nervoso central neste modelo. Evidencia-se a importância do papel do sistema imune central nos processos de continuidade da dor neuropática, que pode estar envolvido com as alterações neuroplásticas maladaptativas características dessa patologia.

Palavras chave: dor neuropática; analgesia estimulação transcraniana por corrente contínua, IL-1 β , IL-10, TNF- α , NGF, ratos.

ABSTRACT

Neuropathic pain (NP) is caused by a primary insult or dysfunction in the central or peripheral nervous system and its prevalence depends on the type of trauma and related dysfunction. The main symptoms are mechanical allodynia and hyperalgesia to both mechanical and thermal stimuli. NP often shows insufficient response to classic analgesics and remains a challenge to medical treatment and scientific research; and the search for new therapies for this pathology is of fundamental importance. Central neuromodulation techniques, such as transcranial direct current stimulation (tDCS), represent a promising resource to pain management since they promote neuroplasticity in the central system of pain. Moreover, tDCS has the advantages of being a noninvasive technique and can be combined with other interventions. The aim of this study was to investigate the effects of tDCS in the thermal and mechanical hyperalgesia induced by chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve and measure its effect on the neurochemical markers (IL-1 β , IL-10, TNF- α , and NGF levels) on central nervous system structures. All experiments and procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (GPPG-HCPA No.120512) and performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th ed. The CCI of sciatic nerve was used for the induction of NP. For sham surgery, the sciatic nerve was exposed similarly, but it was not ligated. The control group did not undergo surgical procedure. After the establishment of NP, the rats of treated groups were subjected to a 20 minutes session of anodal tDCS, every afternoon for eight days, under a direct constant current of 0.5 mA intensity. The thermal and mechanical hyperalgesia was assessed by Hot plate and Von Frey test, respectively, and evaluated on baseline, 7 and 14 days after surgery; immediately, 24 hours and 7 days after treatment. The IL-1 β , IL-10, TNF- α and NGF levels on cortex, spinal cord and brainstem were determined by sandwich-ELISA at 48 hours and 7 days after the end of treatment. Data were expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M). Generalized Estimating Equation (GEE) followed by Bonferroni was performed to compare all groups in different times of nociceptive tests and to biochemical data the one-way ANOVA was used to compare the IL-1 β , IL-10, TNF- α and three-way ANOVA was used to compare the NGF levels. *P*-values less than 0.05 were considered significant. SPSS 19.0 for Windows was used for statistical analysis. In summary, we showed that anodal tDCS is effective to relieve NP and modulate cytokine in CCI rat model, and its effect is observed at long-term. In addition, the CCI model induced increased NGF levels in cerebral cortex and spinal cord at long-lasting time, evidencing the important feature of this neurotrophin in neuropathic pain condition. Additionally, we observed an important role of the central immune system in the neuropathic process, which can be involved with the maladaptive neuroplastic changes.

Keywords: neuropathic pain, transcranial direct current stimulation, IL-1 β , IL-10, TNF- α , NGF, rats.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura:

Figura 1: Fluxograma da pesquisa realizada sobre o tema nas principais bases de dados	20
Figura 2: Representação da via espinotalâmica, a principal via ascendente nociceptiva	28
Figura 3: Esquema das principais alterações na transmissão nociceptiva que caracterizam a dor neuropática.....	32

Manuscrito:

Figura 1. Aplicação da ETCC. Painel A: Posicionamento dos eletrodos. Painel B: Procedimento de estimulação.....	86
Figura 2. Hiperalgesia térmica através do teste da Placa Quente.....	87
Figura 3. Hiperalgesia mecânica através do teste de von Frey.....	87
Figura 4. Níveis de IL-1 β em estruturas do sistema nervoso central. Painel A. Níveis de IL-1 β no córtex cerebral. Painel B. Níveis de IL-1 β na medula espinhal. Painel C. Níveis de IL-1 β no tronco cerebral.....	88
Figura 5. Níveis de IL-10 em estruturas do sistema nervoso central. Painel A. Níveis de IL-10 no córtex cerebral. Painel B. Níveis de IL-10 na medula espinhal. Painel C. Níveis de IL-10 no tronco cerebral.....	89
Figura 6. Níveis de TNF- α em estruturas do sistema nervoso central. Painel A. Níveis de TNF- α no córtex cerebral. Painel B. Níveis de TNF- α na medula espinhal. Painel C. Níveis de TNF- α no tronco cerebral.....	90
Figura 7. Níveis de NGF no córtex cerebral.....	106
Figura 8. Níveis de NGF na medula espinhal.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - adenosina di-fosfato
AMP - adenosina 3,5-monofosfato
AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ASIC - *acid-sensing ion channel*
ATP - adenosina tri-fosfato
cAMP – adenosina 3,5-monofosfato cíclico
BDNF- *brain derived neurotrophin factor*
DBS - *deep brain stimulation*
EAV - escala análogo visual de dor
ECG - electrocardiogram
ETCC - estimulação transcraniana por corrente contínua
GABA - ácido gama-aminobutírico
IASP - Associação Internacional para Estudos da Dor
IL-1 β - interleucina 1 beta
IL-10 – interleucina 10
LTP - *long-term potentiation*
MAPK - *mitogen-activated protein kinase*
mGluRs - *metabotropic glutamate receptors*
NGF - *nerve growth factor*
NMDA - N-metil-D-aspartato
PAG - *periaqueductal gray matter*
rTMS - *repetitive transcranial magnetic stimulation*
SCS - *spinal cord stimulation*
SNP - sistema nervoso periférico
SNC - sistema nervoso central
TNF- α - *tumor necrosis factor alfa*
TRP - *transient receptor potential*
TRPV - *transient receptor potential vanilloid*
WDR - *wide dynamic range*

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	14
II. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES.....	19
2.2 DOR: VIAS NOCICEPTIVAS	20
2.2.1 Ativação dos nociceptores.....	22
2.2.2 Processamento nociceptivo na medula espinhal.....	24
2.2.3 Vias ascendentes do processo nociceptivo na medula espinhal	26
2.2.4 Projeções aferentes supraespinhais da via nociceptiva	29
2.3 DOR NEUROPÁTICA: MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS.....	30
2.3.1 Mecanismos da dor neuropática	33
2.4 TERAPÊUTICA DA DOR NEUROPÁTICA	39
2.4.1 Tratamentos farmacológicos	39
2.4.2 Neuromodulação	40
III. MARCO TEÓRICO	43
IV JUSTIFICATIVA.....	45
V OBJETIVOS.....	47
5.1. OBJETIVO GERAL.....	48
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
VI. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	49
VII. ARTIGOS CIENTÍFICOS	61
Artigo 1.....	62
Artigo 2.....	91
VIII. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	107
IX. PERSPECTIVAS	109
X. DIVULGAÇÕES.....	111
XI. ANEXOS.....	116
A) Aprovação do Comitê de Ética	117
B) Co-autorias em artigos científicos	118

I. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As vias da dor formam um sistema complexo, dinâmico, sensorial, cognitivo e comportamental para detectar, integrar e coordenar respostas protetoras a estímulos nocivos que ameaçam a integridade tecidual ou a sobrevivência do organismo. Esse mecanismo de defesa inclui tanto reflexos medulares primitivos, que são a única proteção dos organismos simples, até respostas emocionais complexas nos seres humanos que, consciente ou inconscientemente, experimentam a sensação dolorosa (1). Portanto, a percepção da dor é uma experiência particular (2) e sua identificação e tratamento deve considerar a individualidade de cada paciente. Nesse contexto, apesar do controle da dor, sobretudo a crônica, ser uma das prioridades terapêuticas, ainda existem limitações quanto ao seu manejo, tais como dificuldades de avaliação, subestimação da dor relatada pelos pacientes, equívocos sobre o adequado uso de analgésicos e anti-inflamatórios, presença de efeitos adversos e de lacunas no tratamento (3,4), principalmente quando há a presença de dores relacionadas ao dano ou a disfunção do sistema nervoso. A dor neuropática é comumente crônica e incapacitante, e em boa parte resistente aos tratamentos farmacológicos, estando entre as condições dolorosas de mais difícil tratamento (5,6).

A dor e a perda da funcionalidade estão intimamente associadas às reações do sistema nervoso e ao dano tecidual, ambas fornecem importantes informações para o diagnóstico sobre a origem da lesão. A principal sintomatologia clínica das dores neuropáticas inclui a dor espontânea ou hipersensibilidade da área afetada, levando à hiperalgesia e/ou alodinia, que ocorrem principalmente devido às alterações na medula espinhal (7). A dor neuropática periférica resulta de lesões próprias do sistema nervoso periférico (SNP), causadas por trauma mecânico, doença metabólica, químicos neurotóxicos, infecções ou invasões tumorais e envolve múltiplas mudanças patofisiológicas, tanto no SNP, quanto no sistema nervoso central (SNC) (8,9). A dor neuropática central comumente resulta de lesão na medula espinhal, acidente vascular cerebral ou esclerose múltipla (10).

Lesões periféricas englobam mudanças na excitabilidade do nervo periférico e do gânglio da raiz dorsal, mudanças em neurônios da medula espinhal, sistemas descendentes inibitórios e mudanças plásticas corticais (11). Os processos periféricos descritos incluem descargas ectópicas e espontâneas, alterações na expressão de canais iônicos, surgimento colateral de neurônios aferentes primários, brotamento de neurônios simpáticos no gânglio da raiz dorsal e sensibilização do nociceptor. Os processos centrais são representados pela

sensibilização central, com alterações na expressão de neurotransmissores, neuromoduladores, receptores e canais iônicos (12). Nesse contexto, o sistema imune também tem um papel crítico no desenvolvimento e na manutenção da dor neuropática, uma vez que várias citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias demonstraram funções no estabelecimento dessa condição dolorosa (13).

O tratamento da dor crônica está relacionado a altos custos direcionados a tratamentos cirúrgicos, farmacológicos e fisioterapêuticos, como também afastamento do trabalho, deficiência e diminuição da qualidade de vida. Especificamente para a dor neuropática, os tratamentos farmacológicos incluem bloqueadores dos canais de cálcio e de sódio, antidepressivos, anticonvulsivantes e opióides. Porém, estes fármacos oferecem benefícios terapêuticos limitados e estão relacionados à tolerância e/ ou efeitos colaterais (14,15). Portanto, o tratamento da dor neuropática permanece um desafio, pois muitos pacientes não apresentam alívio suficiente da dor, como descrito pela experiência clínica e por dados de ensaios clínicos. A dificuldade no tratamento pode ser resultado da heterogeneidade de mecanismos da dor neuropática e a coexistência, frequentemente, de aspectos psicológicos e emocionais da dor crônica (16).

Nesse contexto, a abordagem convencional da dor neuropática tem sido a classificação e o tratamento a partir da doença de base (4). Entretanto esse manejo etiológico não atinge a característica principal da dor neuropática, que é a plasticidade maladaptativa do sistema nervoso. A doença primária e a lesão nervosa são apenas os iniciadores de uma cascata de alterações que vão induzir e sustentar a dor neuropática. Embora o tratamento da patologia primária seja essencial, entender os mecanismos reponsáveis pela plasticidade maladaptativa possibilita a instituição de terapias específicas para prevenir o desenvolvimento da hipersensibilidade neuropática e normalizar funções na dor neuropática já estabelecida (17).

Desta forma, a busca por novas modalidades de tratamento que permitam uma melhor abordagem terapêutica dos quadros dor, com menos efeitos adversos e baixo custo torna-se de fundamental importância. Uma alternativa para o tratamento das dores crônicas é a estimulação do sistema nervoso central, utilizando diferentes métodos terapêuticos. Essas técnicas incluem estimulação cortical invasiva e não invasiva. Nesse contexto, a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) tem demonstrado efeitos significativos na modulação de diversos quadros álgicos (18,19), assim como em distúrbios psiquiátricos e neurológicos (20). O princípio da ETCC baseia-se na utilização de uma corrente elétrica fraca aplicada no couro cabeludo (21), induzindo mudanças na excitabilidade cortical em áreas

específicas do cérebro, de modo reversivo e podendo produzir um efeito duradouro, além de apresentar baixo risco e pouco desconforto (18).

Considerando a escassez de produções científicas relacionando o uso da ETCC para o tratamento da dor neuropática, torna-se essencial a realização de estudos com modelos animais que envolvam o uso desta nova terapêutica, avaliando o seu impacto nas respostas nociceptivas e quantificando o efeito da ETCC na resposta inflamatória em nível de sistema nervoso central.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES

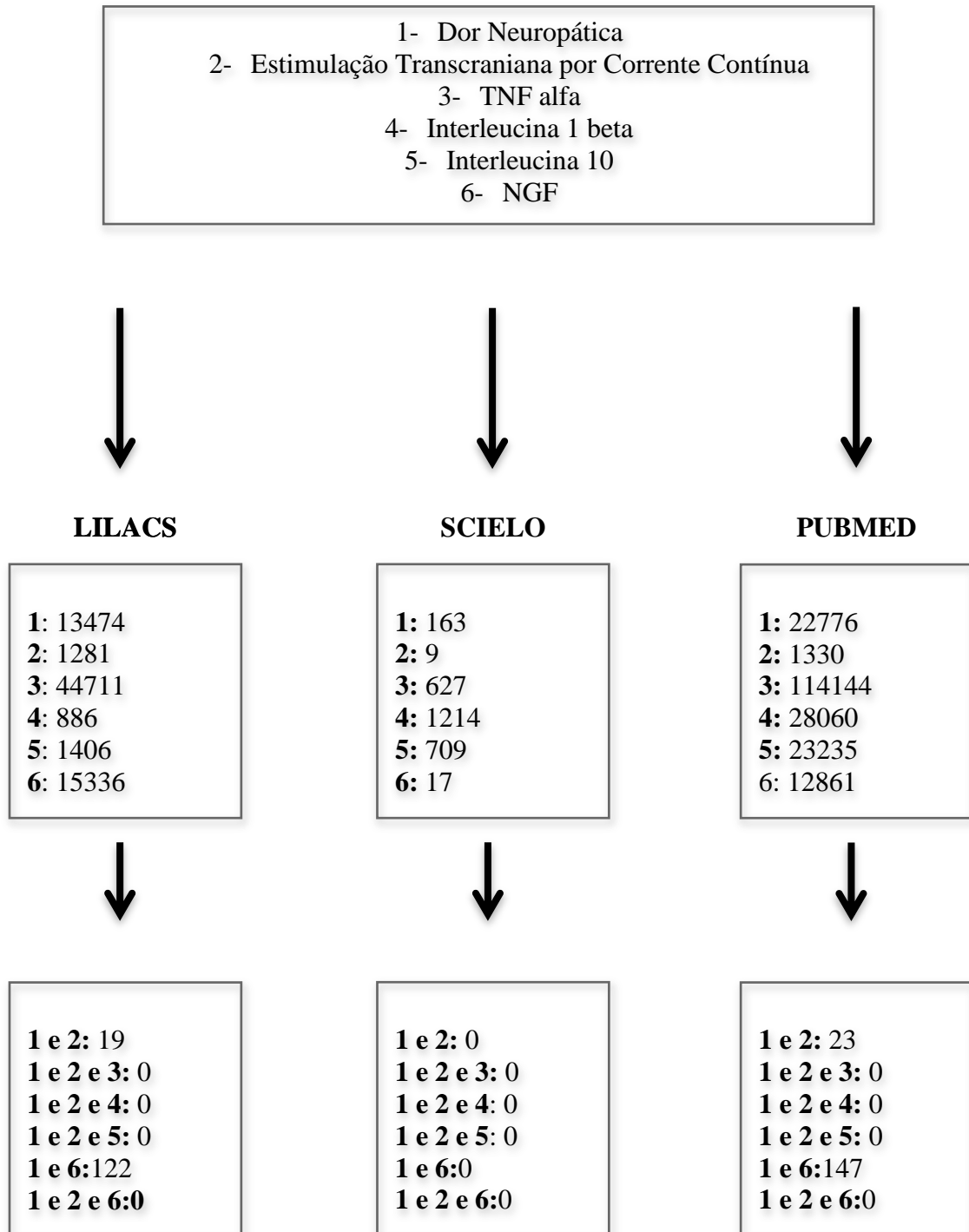
Na revisão de literatura, buscamos ressaltar os principais aspectos relacionados com a dor neuropática, estimulação transcraniana por corrente contínua, marcadores inflamatórios e receptores de glutamato. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SciELO e PubMed. Utilizaram-se artigos com datas de publicação entre 1990 e 09\2014, sendo que as referências foram revisadas para localizar outros estudos não contemplados nesta busca.

Nas bases de dados LILACS, SciELO e PubMed foram realizadas buscas por meio dos seguintes termos: dor neuropática, estimulação transcraniana por corrente contínua, TNF alfa, IL1 beta e IL 10. Em relação ao termo “dor neuropática” foram encontrados 13474 artigos no site LILACS, 163 artigos no SciELO e 22776 artigos no PubMed. Quando utilizado o termo “estimulação transcraniana por corrente contínua” foram encontrados 1281 artigos no LILACS, 9 artigos no site SciELO e no site PubMed 1330 artigos. Em relação ao termo “TNF alfa” foram encontrados 44711 artigos no site LILACS, 627 no site SciELO e 114144 artigos no portal PubMed. Realizou-se a busca utilizando o termo “IL1 beta” sendo encontrados 886 artigos no site LILACS, 1214 artigos no portal SciELO e 28060 artigos no portal PubMed. Quando utilizamos o termo “IL 10” foram encontrados 1406 artigos no LILACS, 709 artigos no site do SciELO e 23235 artigos no portal PubMed. Buscando pelo termo “NGF” foram localizados 15336 artigos no LILACS, 17 artigos no site do SciELO e 12861 artigos no portal PubMed.

Refinando-se a busca, com cruzamentos entre as palavras-chave, foi encontrado um reduzido número de artigos como mostrado na Figura 1.

Figura 1: Fluxograma da pesquisa realizada sobre o tema nas principais bases de dados.

PALAVRAS-CHAVE



2.2 DOR: VIAS NOCICEPTIVAS

A dor é uma sensação essencial que evoluiu em todos os seres complexos para minimizar o dano tecidual e celular, uma vez que ao interagir com o meio ambiente, os organismos vivos têm de reconhecer e reagir a estímulos nocivos para evitá-los. A importância da dor para a sobrevivência é evidenciada em portadores de anomalias congênitas raras que os torna incapazes de detectar estímulos dolorosos. Esses indivíduos não sentem o calor de uma chama, a dor resultante de fraturas ósseas ou a causada por objetos pontiagudos, o que pode ocasionar lesões fatais (22,23).

A Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP) descreve a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual real ou potencial ou decrito em termos destes danos. É a descrição da dor como “experiência” que a diferencia da nocicepção. A nocicepção é processo neural pelo qual o estímulo térmico, mecânico ou químico é detectado e codificado (24). Já a dor resulta de uma interação complexa entre sistemas de sinalização, modulação de centros superiores e a percepção do indivíduo (25). Neste contexto, enquanto os processos fisiológicos envolvidos na dor podem ser descritos, a sua percepção e seu significado global são únicos, podendo ser modificados pelo contexto afetivo, cultural e perspectivas cognitivas de cada indivíduo na tradução do estímulo nociceptivo em sensação dolorosa (26).

A experiência dolorosa é o produto final de uma complexa rede de processamento de informação. Esse processo inicia na periferia, onde vários órgãos, como a pele e estruturas subcutâneas (incluindo as articulações e os músculos), possuem uma subpopulação de fibras nervosas periféricas aferentes, denominadas nociceptores. Os neurônios nociceptores são especializados em detectar e responder a estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos, transmitindo essas informações através de potenciais elétricos com precisão ao sistema nervoso central. O corpos celulares dos nociceptores localizados ao longo do corpo se situam no gânglio da raiz dorsal da medula espinhal, enquanto que os localizados na face estão no gânglio trigeminal. Ambos possuem um ramo axonal periférico e um ramo central, que inerva o órgão-alvo e a medula espinhal, respectivamente (22,27).

Uma vez codificada a informação do estímulo nocivo, ela é transmitida através de sinapses entre as projeções dos nociceptores da medula espinhal e os neurônios de segunda ordem na substância cinzenta do corno dorsal da medula espinhal. Uma porção dos neurônios de segunda ordem possuem axônios que ascendem até o tronco cerebral e o tálamo, e são as

conexões entre o tálamo e os centros corticais superiores que controlam a percepção da sensação dolorosa e integram as respostas afetivas à dor. Os demais axônios dos neurônios espinhais estão envolvidos com os reflexos motores e autonômicos desencadeados pelo estímulo nocivo. Por fim, os tratos descendentes reduzem ou facilitam o processamento nociceptivo espinhal a partir dos núcleos do tronco cerebral e descem pela porção dorsolateral da medula espinhal (26,28,29).

2.2.1 Ativação dos nociceptores

Existem três tipos de fibras aferentes, classificadas de acordo com sua estrutura, diâmetro e velocidade de condução, características que determinam o padrão de propagação do estímulo doloroso. As fibras do tipo A β são mielinizadas, com diâmetro maior que 10 μm e velocidade de condução entre 30 e 100m/s; são fibras que possuem baixo limiar de ativação, são responsáveis pela conversão da informação tátil e propagam estímulos de intensidade acentuada e de curta duração. As fibras do tipo A δ são pouco mielinizadas, com diâmetro entre 2,0 e 6,0 μm e velocidade de condução entre 12 e 30 m/s; possuem alto limiar de ativação, respondendo a estímulos térmicos e mecânicos. As fibras do tipo C são desmielinizadas, com diâmetro entre 0,4 e 1,2 μm e velocidade de condução entre 0,5 a 2,0 m/s; são fibras polimodais, sensíveis ao estímulo térmico, mecânico e químico, responsáveis pela resposta dolorosa lenta e difusa, por vezes secundária à ação das fibras A β (27,30–32). Dentre as fibras C, existe um tipo em particular de nociceptores que é insensível ao estímulo mecânico na ausência de uma lesão tecidual, denominados originalmente de nociceptores silentes (33). Estes nociceptores são sensíveis a estímulos químicos, participando do processo doloroso quando há presença de componentes inflamatórios e sendo ativados por estímulo térmicos e mecânicos nesse contexto (22,34).

Em vários tecidos foram encontradas mais de uma categoria de nociceptores com diferentes respostas a vários estímulos nocivos (35). No músculo, tanto o estímulo das fibras A delta, quanto das fibras C produzem sensação dolorosa, entretanto ela é menos localizada que a dor cutânea. Os nociceptores localizados no tecido muscular apresentam receptores especiais que sinalizam não só o esforço de um grupo muscular, mas também hipóxia e isquemia. Nos órgãos viscerais, a informação nociva é propagada pelas fibras A δ e fibras C. Considerando que estímulos elétricos de baixa intensidade podem provocar efeitos vagais e

que estímulos de grande intensidade podem causar dor, acredita-se que a percepção visceral da dor é dependente da intensidade do estímulo. Além disso, a organização esparsa dos receptores e a sua pouca diferenciação sugerem que a percepção dolorosa depende da somação espacial (30,36,37).

A ativação dos nociceptores ocorre por meio da despolarização das terminações nervosas dos axônios aferentes pelo estímulo nocivo. A membrana dos nociceptores possuem vários tipos de receptores, como a família de canais iônicos receptores de potencial transitório (*transient receptor potential* - TRP), os canais purinérgicos, que convertem a energia do estímulo nocivo térmico, mecânico ou químico em potencial elétrico despolarizante e essa atividade elétrica é ampliada pela abertura de canais de sódio para induzir potenciais de ação (38).

Entre os canais TRP, os mais evidentes na tradução do estímulo nociceptivo são os receptores de potencial transitório do tipo vanilóide (*transient receptor potential vanilloid* – TRPV) TRPV1, o TRPV2 e o TRPM8. O canal TRPV1 é expresso somente em neurônios nociceptivos e é ativado por capsaicina, altas temperaturas (>43°C) e pela redução do pH, este último característico do meio químico do tecido inflamado. O canal TRPV2 é expresso predominantemente nos terminais das fibras A δ e ativado por temperaturas altas (>50°C). O canal TRPM8 é ativado por baixas temperaturas e por agentes químicos como o mentol (39–41).

Os nociceptores também expressam receptores purinérgicos ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P2Y), que são ativados pela liberação de nucleotídeos de adenina (adenosina di e tri fosfato- ADP e ATP, respectivamente) secundária à ruptura celular após dano tecidual (28). Além destes, também estão presentes os canais iônicos ácido-sensíveis (*acid-sensing ion channel* - ASIC), expressos em neurônios mecanosensitivos de baixo e de alto limiar. Os ASICs são ativados pelo aumento da concentração do íon hidrogênio decorrentes de lesões isquêmicas ou inflamação, concomitantes ao processo doloroso (22,42).

Uma vez que o estímulo é capaz de superar o limiar de ativação do neurônio aferente primário, a condução do sinal requer a geração de um potencial de ação por meio da despolarização dos canais de sódio voltagem-dependentes ou da hiperpolarização dos canais de potássio (43). Os canais de sódio Nav 1.3, 1.7, 1.8 e 1.9 são encontrados no gânglio da raiz dorsal e estão envolvidos na geração de potencial de ação e condução de nociceptores. Há um aumento da expressão de Nav 1.3 no gânglio da raiz dorsal de axônios lesados, sendo que esse canal possui propriedades cinéticas que facilitam a descarga repetitiva. Assim, a grande densidade de canais de sódio voltagem dependente no nervo lesado, pode fazer com que a

despolarização neuronal dure mais tempo que o período refratário dos canais de sódio adjacentes, permitindo que o potencial de ação se propague de forma antidrômica (de proximal para distal) nos nervos (44).

O neurônio aferente primário forma sinapses com o interneurônio e com neurônios secundários no corno dorsal da medula espinhal. Quando um potencial de ação excitatório atinge o terminal pré-sináptico do neurônio aferente, os canais de sódio voltagem-dependente são abertos. O influxo de cálcio leva ao acoplamento e exocitose de vesículas e à liberação de um neurotransmissor específico, transformando a sinalização dos nociceptores em sinapses no corno dorsal da medula espinhal (22). Os neurônios sensoriais nociceptivos que ativam os neurônios do corno dorsal da medula espinhal liberam dois tipos principais de neurotransmissores. O glutamato é o neurotransmissor primário liberado a partir dos terminais centrais dos nociceptores, tendo ação excitatória nos alvos pós-sinápticos nos neurônios de segunda ordem por meio da ativação dos receptores ionotrópicos de alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Os neuropeptídeos são liberados como cotransmissores por vários nociceptores com axônios amielinizados. Esses peptídeos incluem a substância P, o peptídeo relacionado à calcitonina, somatostatina e galanina. Enquanto o glutamato é armazenado em pequenas vesículas, os peptídeos são armazenados em grandes vesículas nos terminais centrais dos neurônios nociceptivos (28,45).

2.2.2 Processamento nociceptivo na medula espinhal

A percepção do estímulo nervoso surge a partir dos sinais periféricos nos ramos axonais dos neurônios nociceptivos, cujos corpos celulares estão localizados no gânglio da raiz dorsal da medula ou no gânglio trigeminal. As terminações nervosas desses axônios estão localizadas de maneira organizada na medula espinhal, sendo grande parte especificamente no corno dorsal da medula espinhal (28). A medula espinhal é o primeiro nível do sistema nociceptivo central, e a organização neuronal desta estrutura, suas propriedades receptivas e sua função no processamento sensorial determinam em parte as características da dor (29).

Os axônios dos neurônios aferentes primários entram na medula espinhal e no tronco cerebral por meio dos pares de nervos cranianos V, VII, IX e X. Quando próximos destas estruturas, se destacam a partir das fibras mais espessas, organizando-se no feixe ventrolateral de raízes. Os axônios dos neurônios aferentes fazem parte do Trato de Lissauer e formam

sinapses com os neurônios de segunda ordem distribuídos ao longo do corno dorsal da medula espinhal. A substância cinzenta espinhal contém os corpos celulares dos neurônios espinhais, enquanto a substância branca possui os axônios que ascendem ou descendem a partir do cérebro (28,30,36).

Rexed, em 1952, subdividiu a substância cinzenta da medula espinhal em 10 lâminas, sendo as lâminas I a VI, correspondentes ao corno dorsal (46). A maioria das fibras A δ e das fibras C tem suas terminações localizadas superficialmente nas lâminas I (zona marginal) e II (substância gelatinosa), com um pequeno número de fibras A δ em lâminas mais profundas, como a lâmina V. As fibras A β inervam predominantemente as lâminas III e IV (nucleus proprius). Os interneurônios excitatório e inibitórios que regular o fluxo de informação nociceptiva estão localizados nas camadas profundas das lâminas V e VI (26,30,47).

Interneurônios excitatórios e inibitórios regulam o fluxo de informação nociceptiva e promovem a interação entre o estímulo nociceptivo aferente e eferente, sendo responsáveis também pela sua transferência às estruturas supraespinhais (26). Esses neurônios apresentam diferenciações conforme o tipo de convergência sensitiva, como o tipo de aferência que eles recebem, e são classificados em três grupos distintos, sendo que a organização das vias ascendentes da medula espinhal e o padrão de resposta na presença de impulso nociceptivo depende deste estímulo (30).

Os neurônios nociceptivos respondem exclusivamente ao estímulo nocivo e são encontrados nas lâminas I, II, V e VII, sendo as fontes de entrada de informação as fibras A δ e as fibras C polimodais. Seus campos receptivos são puntiformes e apresentam organização somatotrópica, principalmente na lâmina I. Esses neurônios apresentam limitação na resposta gradual à estímulos de diferentes intensidades, e estão envolvidos na codificação da localização e na qualidade do estímulo (30,36).

Os neurônios do tipo ampla faixa dinâmica (*wide dynamic range* - WDR) respondem aos estímulos químicos, térmicos e mecânicos provenientes das fibras A β , A δ e C e são encontrados nas lâminas I, II, IV, V, VI, X e no corno anterior. Sua principal característica é a capacidade de codificar a intensidade do estímulo. O campo do receptor dos neurônios WDR são extremamente organizados nas regiões mais centrais do corno dorsal da medula espinhal e demonstram variação na área ativada dependente da intensidade do estímulo, respondendo de forma gradual a estímulos de intensidade inócua à nociva (29,37). Em virtude das convergências de fibras nociceptivas e não nociceptivas, esses neurônios apresentam um papel fundamental nos mecanismos de supressão segmental da dor envolvido na Teoria das Comportas da Dor (48). Os neurônios de baixo limiar ou não-nociceptivos respondem apenas

ao estímulo inócuo, como mecânicos de baixa intensidade, térmicos e proprioceptivos propagados pelas fibras A δ e A β . Esses neurônios são encontrados nas lâminas I, II e IV e agem indiretamente no mecanismo de supressão segmental (49).

2.2.3 Vias ascendentes do processo nociceptivo na medula espinhal

Posterior às interações diretas ou indiretas com as projeções neuronais no corno dorsal da medula espinhal, os axônios dos neurônios de segunda ordem passam a formar ramos aferentes que transmitem o impulso nociceptivo para estruturas do tronco cerebral e do diencefalo, incluindo o tálamo, substância periaquedutal, região parabraqueal, formação reticular da medula, complexo amigdalóide, núcleo septal e hipotálamo. Neste contexto, os feixes axonais ascendentes formam dois diferentes sistemas. O primeiro, mais antigo, atravessa a região medial do tronco cerebral, sendo formado pelos tratos espinotalâmico, espinoreticular e espinomesencefálico. O outro sistema, mais recente, ocupa a região lateral do tronco cerebral e consiste no trato espinohipotálamico, trato espinocervical e no feixe pós-sináptico do corno dorsal (30,36).

O trato espinotalâmico é a mais proeminente via nociceptiva ascendente na medula espinhal. Os axônios do trato espinotalâmico originam-se de neurônios nociceptivos, neurônios WDR e neurônios de baixo limiar. Os corpos celulares destes neurônios estão localizados na medula espinhal principalmente nas lâminas I e V, mas também em lâminas mais profundas. A maioria dos axônios cruza a linha média da medula espinhal no seu segmento de origem e ascendem na substância branca anterolateral, terminando no núcleo talâmico, que faz parte do sistema lateral talamocortical, envolvido na codificação do estímulo sensorial (28,29,36) (Figura 2).

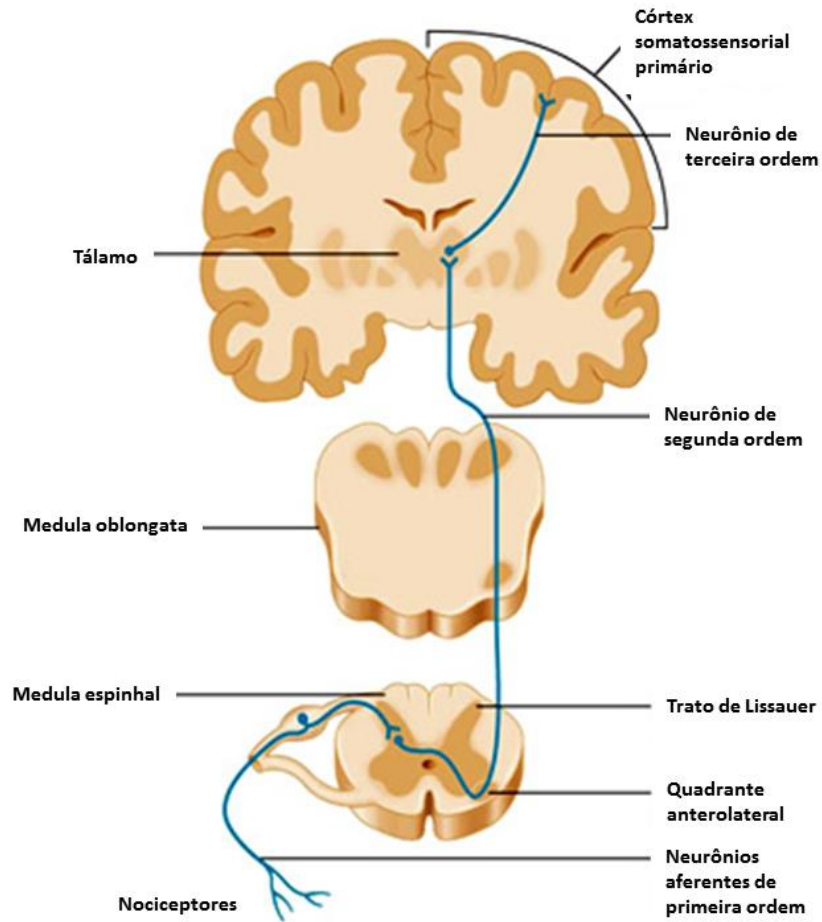
O trato espinoreticular contém axônios dos neurônios nociceptivos, neurônios WDR e neurônios de baixo limiar que se projetam nas lâminas V, VII e VIII. Esse trato ascende no quadrante anterolateral da medula espinhal e termina na formação reticular no tálamo. Os axônios deste trato não cruzam a linha média da medula espinhal (28). As aferências do trato espinoreticular estão envolvidas nas características motivacionais e afetivas, assim como respostas neurovegetativas à dor. Além disso, esse trato é um importante via de modulação do mecanismo de supressão segmental pela ativação das estruturas do tronco cerebral responsável pela supressão descendente (29,30,36).

O trato espinomesencefálico contém principalmente axônios de neurônios nociceptivos, neurônios WDR e neurônios de baixo limiar das lâminas I e V, projetando-se do quadrante anterolateral da medula espinhal para a formação reticular mesencefálica e a substância cinzenta periaquedutal (*periaqueductal gray matter* – PAG). As informações transmitidas ao longo deste trato contribuem para o componente afetivo da experiência dolorosa, uma vez que alguns neurônios deste trato chegam até o núcleo parabraquial, que apresenta projeções neuronais na amígdala, o núcleo do sistema límbico (28). Conforme a localização da PAG que atingem, as projeções dos neurônios WRD e dos neurônios nociceptivos são funcionalmente distintas. As projeções que chegam à parte mais dorsal da PAG apresentam características excitatórias na transmissão aferente nociceptiva e aquelas que se projetam na porção mais ventral da PAG ativam mecanismos responsáveis pela inibição dos estímulos aferentes (36).

O trato espinohipotálâmico origina-se a partir de neurônios nociceptivos, neurônios WDR e neurônios de baixo limiar das lâminas I, V e X, núcleo espinhal lateral e algumas regiões do canal medular. O modelo de aferências deste trato sugere que as projeções podem contribuir para o sistema neuroendócrino autonômico, respostas motivacionais/afetivas e alertas para experiências dolorosas com origem visceral ou somática. Sugere-se que a integração com o sistema nervoso autonômico ocorre a partir de projeções dos núcleos lateral, dorsomedial, supraquiasmático e supraóptico presentes no hipotálamo por meio de aferências do núcleo dorsal vagal e neurônios preganglionares da coluna intermediolateral (36).

O trato espinocervical origina-se a partir de neurônios WDR e neurônios de baixo limiar das lâminas I, II e V. As funções relacionadas a esse trato compreendem a discriminação sensorial, as características motivacionais/afetivas e as características autonômicas da dor, representando um centro integrador e modulador sensorial das aferências na medula espinhal. Por fim, o feixe pós-sináptico do corno dorsal origina-se a partir de neurônios WDR, neurônios nociceptivos e neurônios de baixo limiar das lâminas VI e VII, organizados próximos da linha média da medula espinhal. Esse trato representa a maior via aferente de informação de origem visceral, exercendo um papel importante na integração entre as projeções de órgãos abdominais e da pele até o tálamo. Além disso, há o envolvimento dessa via na cinestesia, discriminação entre dois pontos e nos componentes sensoriais, discriminativos e motivacionais/afetivos da dor (28,30,36).

Figura 2: Representação da via espinotalâmica, a principal via ascendente nociceptiva.



Fonte: Adaptado de <http://www.corpshumain.ca/en/images/SensorielFaisseauxSpinothalamique>.

2.2.4 Projeções aferentes supraespinhais da via nociceptiva

A partir de interações dos impulsos sensoriais na coluna espinhal, as vias aferentes nociceptivas dão origem a diferentes modelos de projeções até estruturas subcorticais e corticais. Neste estágio, os componentes sensorial-discriminativos e afetivo-cognitivos referentes à experiência dolorosa são atribuídos ao impulso nociceptivo. Inúmeras estruturas estão envolvidas com o processo modulatório da sensação dolorosa, principalmente o tronco cerebral e do diencefalo, incluindo o tálamo, substância periaquedutal, região parabraqueal, formação reticular da medula, complexo amigdalóide, núcleo septal e hipotálamo (36,50). Não há na literatura uma definição de um “centro de dor” específico, e sim várias estruturas em diferentes regiões corticais que podem ou não ser ativadas durante uma experiência dolorosa em particular. O conjunto destas áreas é denominado “matriz da dor” e inclui o córtex somatosensorial primário e secundário, córtex insular, córtex anterior cingulado e córtex pré-frontal (27).

As projeções medulares para o tronco cerebral são particularmente importantes, uma vez que integram a atividade nociceptiva com os processos homeostáticos, excitatórios e autonômicos, assim como proporcionar vias para a transmissão indireta de informações nociceptivas para outras regiões do córtex após o processamento no tronco cerebral. A capacidade de influência direta das projeções do tronco cerebral à atividade medular e do córtex sugere que essas vias têm as funções de afetar a experiência dolorosa. Dados de estudos em animais, em indivíduos saudáveis e em pacientes confirmam o papel central do tronco cerebral permeando mudanças na percepção da dor (51).

O tálamo é a principal área do processamento somatosensorial. Os axônios seguem através do trato lateral e espinotalâmico medial até o núcleo medial e lateral, a partir dos quais os neurônios se projetam para o córtex somatosensorial primário e secundário, ínsula, córtex anterior cingulado e córtex pré-frontal. Estas áreas apresentam diversas funções na percepção da dor e também interagem com outras áreas do cérebro, como por exemplo, o cerebelo e o gânglio basal, que são áreas tradicionalmente associadas com funções motoras (25). Além disso, os núcleos de retransmissão do tálamo tem papel essencial na filtração e no processamento da informação sensorial na rota até o córtex cerebral, estando sujeitos a processos de plasticidade induzida por atividade na medula espinhal (38).

2.3 DOR NEUROPÁTICA: MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS

Do ponto de vista clínico podem-se distinguir dois tipos de dor: aguda e crônica. A dor aguda tem caráter fisiológico, é deflagrada por lesão corporal e tem função de alerta e defesa, contribuindo para a preservação da vida. Normalmente, é de breve duração, provocada por estímulo nociceptivo periférico e/ou reação inflamatória e apresenta relação causa-efeito bem determinada (52). A dor crônica tem caráter patológico, não apresenta relação causa-efeito bem definida, frequentemente não é encontrada causa periférica que a justifique. Insidiosa, não tem função de alerta ou defesa, é gradativamente incapacitante e está relacionada à alteração de mecanismos centrais de nociceção. Pode existir ou persistir na ausência de lesão real, produz alterações persistentes no comportamento psicomotor (emocional) e pode levar à incapacidade física e mental permanente. Foram adotados parâmetros temporais com base na experiência médica para classificar a dor crônica, considerando três meses de dor como o ponto mais conveniente de transição da dor aguda à dor crônica não maligna (53).

A dor neuropática é definida pela IASP como uma dor causada por uma lesão ou doença no sistema somatosensorial (24) e representa, na sua forma mais típica, uma síndrome dolorosa crônica desencadeada após uma lesão traumática ou patológica ao nervo e/ou às vias sensoriais na medula espinhal ou cérebro. Quando a lesão ocorre, pode haver perda de sensibilidade no território de inervação correspondente aos nervos danificados ou às projeções periféricas destas estruturas do sistema nervoso central, assim como pode induzir uma representação sensorial anormal da dor (7). Portanto, a dor neuropática apresenta condições heterogeneas que não podem ser explicadas por uma única etiologia ou lesão específica e que promovem alterações em diferentes níveis do sistema nervoso, por meio da sensibilização periférica e da sensibilização central (9,13,54).

Estima-se que a prevalência de dor com características neuropáticas na população esteja entre 6,9 a 10%, variando de acordo com a disfunção relacionada (55,56). Estudos demonstram que há um conjunto de fatores que pode ser associado à dor neuropática, como sexo feminino, idade (meia idade ou idade avançada) e presença de outras comorbidades. Entretanto, não há um consenso sobre os fatores de risco relacionados a essa síndrome (57–59).

Clinicamente, os pacientes podem queixar-se de dor espontânea (independente do estímulo), lacinante ou em choque, e hipersensibilidade em resposta ao estímulo, entretanto nenhum sinal ou sintoma é patognomônico desta síndrome (60). Pacientes com dor

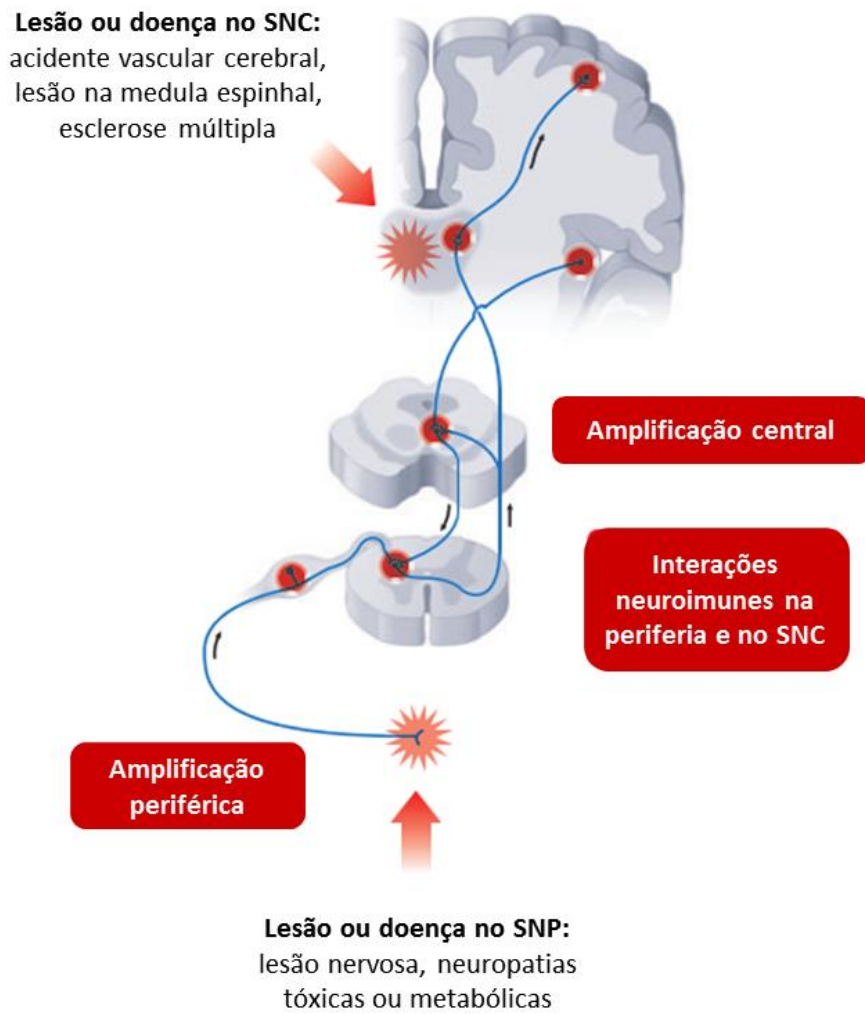
neuropática apresentam sintomas sensoriais distintos, que incluem tanto sinais e sintomas negativos, quanto positivos e que podem coexistir em várias combinações (8). Nesse contexto, as alterações sensoriais características dessa síndrome são achados cruciais para diagnosticar corretamente a dor neuropática e para diferenciá-la de outros tipos de dor (16).

Os sintomas negativos relacionados à dor neuropática envolvem déficits somatosensoriais, como hipoestesia ou anestesia tátil, hipoestesia térmica, hipoalgesia ou perda da sensação vibratória. Em geral, são sintomas que causam desconforto, entretanto não são dolorosos. Os sintomas positivos espontâneos incluem parestesia, disestesia e dor paroxística. Já os sintomas positivos evocados por estímulo compreendem a hiperalgesia, que é definida como resposta dolorosa aumentada a um estímulo que normalmente provoca dor, e a alodinia, que é caracterizada pela sensação dolorosa desencadeada por um estímulo não nocivo (24,61,62).

Do ponto de vista anatômico, a dor neuropática pode ser classificada como central e periférica, dependendo da localização da lesão primária. A dor neuropática periférica resulta de lesão no sistema nervoso periférico causado por trauma mecânico, doença metabólica, infecções, invasões tumorais ou mudanças fisiopatológicas múltiplas tanto no sistema nervoso central, quanto no sistema nervoso periférico (8,9). A dor neuropática central, na maioria das vezes, é resultado de lesões na medula espinhal, acidente vascular cerebral e esclerose múltipla, podendo estar associada também à epilepsia e outras doenças neurodegenerativas (10,17). As síndromes neoplásicas podem induzir tanto dor neuropática periférica, relacionada com o crescimento da massa tumoral, levando à pressão ou infiltração do nervo, quanto dor neuropática central consequente da infiltração ou compressão metastática da medula espinhal (63) (Figura 3).

Apesar da importância no diagnóstico e no curso da patologia, a localização periférica ou central da patologia subjacente à dor neuropática não pode ser utilizada como um *discriminandum*, uma vez que os mecanismos fisiopatológicos desta síndrome dolorosa podem expandir-se durante a progressão da doença, repercutindo tanto no sistema nervoso central, quanto no sistema nervoso periférico (64). A doença primária e os danos neuronais decorrentes desta são apenas os iniciadores de uma cascata que induzem e sustentam a dor neuropática. Embora o tratamento voltado para a patologia primária seja essencial, a compreensão dos mecanismos responsáveis pela plasticidade maladaptativa promove meios para o desenvolvimento de terapêuticas específicas para prevenir a hipersensibilidade neuropática e normalizar funções alteradas pela dor neuropática já estabelecida (17).

Figura 3: Esquema das principais alterações na transmissão nociceptiva que caracterizam a dor neuropática.



Fonte: Adaptado de Constigan et al. 2009

2.3.1 Mecanismos da dor neuropática

A sensação dolorosa é normalmente transmitida através dos neurônios aferentes primários das fibras C e das fibras A δ . Esses nociceptores são usualmente silenciosos na ausência do estímulo, respondendo principalmente ao estímulo potenciamente nocivo. Entretanto, após a lesão nervosa periférica, esses neurônios passam a apresentar sensibilidade anormal e desenvolver atividade espontânea. Estas mudanças patológicas são sustentadas por alterações moleculares e celulares ao nível do nociceptor aferente primário desencadeadas pela lesão do nervo (54). Neste contexto, dois processos independentes parecem ser os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática: o balanço entre as reações compensatórias e descompensatórias do sistema nervoso em reação ao dano neural e a herança genética, que pode tornar o indivíduo mais ou menos suscetível ao estabelecimento da dor neuropática (17).

Muitas das alterações que ocorrem em resposta ao dano neural são potenciamente adaptativas, tais como a remoção de células e de debris de mielina, mudanças nos receptores que contrabalançam a perda dos estímulos aferentes e que atenuam o fluxo de íons e o estresse metabólico após a injúria aguda, recrutamento de estratégias antiapoptóticas que previnam a morte neuronal, indução do crescimento axonal, remodelamento sináptico e remielinização (65). Entretanto, outras tantas mudanças são claramente maladaptativas: limiar e sensibilidade anormais ao estímulo, geração de impulso ectópico, bloqueio ou condução lenta do estímulo, inibição reduzida, conectividade inapropriada e perda neuronal. Parte desses eventos ocorre logo após o dano inicial e participam da fase de indução da dor neuropática, outros se desenvolvem mais tardiamente e atuam na manutenção do quadro doloroso (17).

2.3.1.1 Processos periféricos

Após o dano ao nervo, é desencadeada uma cascata de eventos envolvendo as aferências sensoriais primárias. O estímulo agressivo é transformado em potenciais de ação, que são transferidos por meio de fibras nervosas periféricas (66). Múltiplas substâncias químicas e mediadores inflamatórios são liberados a partir dos nociceptores ativados e das células não neuronais que residem ou que se deslocam até a área lesionada (incluindo

mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos). O acúmulo de fatores endógenos liberados, também chamado de “sopa inflamatória”, representa uma variedade ampla de moléculas sinalizadoras, incluindo neurotransmissores, peptídeos (como a substância P e a bradicinina), eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), neurotrofinas (*nerve growth factor* – NGF entre outros) e citocinas pró-inflamatórias (como interleucina 1 beta – IL-1 β e *tumor necrosis factor alfa* – TNF- α), assim como proteases e prótons extracelulares. Notavelmente, os nociceptores expressam um ou mais receptores capazes de reconhecer e responder a cada um desses agentes pró-inflamatórios e pró-álgicos (22,26,67).

Especificamente após o dano axonal de um nervo periférico, ocorre também a degeneração *walleriana*. O axônio e a bainha de mielina são degradados e macrófagos, assim como outros tipos de células imunes (neutrófilos, células T), são liberados para o tecido (13,68). Somado a isso, há o envolvimento dos receptores da família TRP, principalmente pelo receptor TRPV1 e de segundo mensageiros, como o AMP cíclico (adenosina 3,5-monofosfato cíclico - cAMP), proteína kinases (como a *mitogen-activated protein kinase* – MAPK) e o óxido nítrico, que promovem alterações funcionais e estruturais perpetuando a experiência dolorosa (69,70). Este conjunto de eventos que ocorre no local da injúria é denominado sensibilização periférica e representa uma forma de plasticidade funcional decorrente do estímulo do nociceptor (66,71).

Na maioria dos casos, a sensibilização periférica resulta de alterações no ambiente químico da fibra nervosa associadas à injúria e à inflamação (72). Nesse contexto, quando continuamente estimulados, os nociceptores apresentam um aumento da sensibilidade com redução do seu limiar, levando ao aumento e ao prolongamento de respostas aos estímulos nociceptivos (66). A persistência da injúria causa modificações que acentuam a excitabilidade da fibra nervosa, aumentando assim a sua sensibilidade ao toque e à temperatura. Com a persistência do processo inflamatório, o limiar de excitação dos nociceptores polimodais é reduzido, ocorrendo ativação por estímulos normalmente inócuos. Ainda, quando há ativação dos nociceptores por estímulos nociceptivos, a resposta será mais intensa do que aquela desencadeada em estados não sensibilizados (24,29). O primeiro processo é denominado alodinia (24). O segundo é chamado de hiperalgesia primária e ocorre no sítio da lesão. É decorrente da ação das substâncias algogênicas, aumentando a resposta a estímulos supraliminares e diminuindo o limiar de ativação dos nociceptores (73). A hiperalgesia secundária é caracterizada pela sensibilização da área adjacente ou remota ao local da injúria inervada pelo mesmo segmento da hiperalgesia primária, devido a maior capacidade de

resposta dos neurônios do corno dorsal que inervam o segmento da fonte primária da lesão. Essa forma de hiperalgesia não é causada pela sensibilização da terminação nervosa, mas sim devido a alterações no processamento da informação nociceptiva no SNC. Embora a indução da hiperalgesia secundária exija atividade nociceptiva nas fibras nervosas, a sua continuidade e manutenção é independente do estímulo aferente (74,75).

Na dor neuropática, somado à sensibilização periférica, os neurônios passam a apresentar sensibilidade anormal e desenvolvem atividade espontânea patológica. A sensação dolorosa espontânea surge a partir da geração de um potencial de ação ectópico nas vias nociceptivas na ausência de estímulo doloroso nos terminais periféricos (54). Teoricamente, a atividade ectópica pode ser gerada em qualquer nível anatômico proximal às regiões do córtex que medeiam a experiência sensorial. Entretanto, na dor neuropática periférica, essa alteração patológica é sustentada por mudanças moleculares e celulares principalmente ao nível dos nociceptores aferentes primários (17).

Diversos tipos de canais iônicos contribuem para o potencial de ação inicial da atividade ectópica, como os canais de cálcio, de potássio e de sódio, sendo esse último o mais crítico na fisiologia da excitabilidade das membranas, incluindo a neuronal (76). Sendo assim, os canais de sódio contribuem em grande parte para a geração da atividade ectópica, uma vez que há o aumento da expressão desses canais no gânglio dorsal da medula espinhal e no entorno do sítio da injúria nervosa. Sabe-se que após a lesão do nervo, o comportamento dos diversos tipos de canais de sódio é alterado: eles podem ter sua expressão aumentada ou diminuída e alguns podem ser translocados para diferentes compartimentos da célula. A proliferação de canais de sódio heterotópicos, como Nav1.3 e Nav1.7, e dos canais Nav1.8 pode reduzir o limiar de ativação e resultar em descargas ectópicas, além de induzir a sensibilização central, levando à alodinia (77,78).

Após a lesão do nervo periférico, a atividade espontânea pode ser gerada a partir de múltiplas origens, incluindo o neuroma (local da injúria com crescimento axonal interrompido), o corpo celular dos neurônios do gânglio da raiz dorsal e as aferências proximais intactas (17,79,80). Além disso, pode ter origem a partir da atividade ectópica nos nociceptores e das fibras aferentes largas mielinizadas com limiar reduzido devido à sensibilização central e conectividade alterada com a medula espinhal (81–83). No caso de lesão da medula espinhal, a sensação dolorosa espontânea por ser resultado do aumento da excitabilidade intrínseca dos neurônios de segunda ordem (17,84). Portanto, a dor, como resultado da lesão nervosa periférica, pode promover atividade tanto nos neurônios sensoriais danificados, quanto nos intactos (76).

2.3.1.2 Processos centrais

A sensibilização central refere-se ao processo pelo qual o estado de hiperexcitabilidade é estabelecido no SNC, reforçando o processamento das mensagens nociceptivas através de inúmeros mecanismos (85). Portanto, esse fenômeno é decorrente de alterações dos impulsos periféricos, com aumento da excitabilidade de neurônios nociceptivos, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios do corno dorsal da medula espinhal. Esses processos levam a um aumento da capacidade de resposta dos neurônios centrais à sinalização de nociceptores periféricos, promovendo alterações no processamento sensorial cerebral, mau funcionamento do mecanismo antinociceptivo descendente, aumento da atividade da rota facilitatória da dor e somação temporal e espacial do estímulo doloroso (86). Apesar de a sensibilização central ser primeiramente descrita no corno dorsal da medula espinhal, alterações sinápticas semelhantes ocorrem em estruturas envolvidas com o aspecto emocional intrínseco à sensação dolorosa, como a amígdala, o giro anterior cingulado e o cortex pré-frontal, induzindo alterações cognitivas e de humor em longo prazo (17,87).

No circuito neural, os sinais nociceptivos gerados a partir do dano nervoso são modulados pela inibição ou facilitação supraespinhal descendente, que converge nos neurônios do corno dorsal da medula espinhal. Ao nível celular, a transmissão do impulso nociceptivo junto ao SNC é regulada por elementos celulares como canais iônicos, receptores glutamatérgicos e gabaérgicos e citocinas inflamatórias liberadas a partir das células gliais ativadas (88,89).

A lesão ao nervo periférico aumenta a excitabilidade neuronal na medula espinhal pela ativação dos receptores excitatórios de glutamato, além de induzir *downregulation* dos transportadores de glutamato responsáveis pela manutenção da homeostase sináptica (90). A ativação dos receptores AMPA nos neurônios do corno dorsal da medula espinhal é responsável pela resposta ao estímulo doloroso agudo, uma vez que os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) estão fisiologicamente bloqueados pelo íon de magnésio. Esse bloqueio é removido através da despolarização repetitiva, resultando na amplificação e prolongamento do estímulo doloroso no corno dorsal da medula espinhal (27).

Conseqüentemente, o aumento da disponibilidade de glutamato regional, secundário à perda dos seus transportadores, resulta na ativação aumentada e persistente dos receptores ionotrópicos (NMDA e AMPA) e metabotrópicos (*metabotropic glutamate receptors* -

mGluRs) de glutamato, levando à redução do limiar de ativação dos neurônios, aumento da excitabilidade e da neurotoxicidade (Sung et al. 2003; Miller et al. 2011). O fenômeno de *wind up* ocorre, portanto, com o aumento progressivo da frequência e da magnitude dos disparos dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal induzido pela ativação das fibras C, estimulando a liberação de glutamato e produzindo a despolarização necessária para a remoção do bloqueio voltagem-dependente exercido pelo magnésio nos receptores NMDA. Ocorre, então, aumento da condutividade ao cálcio em resposta à dor a cada estímulo repetido e da mesma intensidade, a partir do funcionamento dos receptores NMDA. Além disso, a atividade glutamatérgica medular pode iniciar uma cascata de sinalização intracelular, incluindo a ativação da proteína quinase C, resultando em neuroplasticidade em longo prazo na medula espinhal (78,93–95).

Outro mecanismo que ocorre paralelamente à sensibilização central é a potencialização de longa duração (*long-term potentiation* – LTP). Apesar de estudado mais extensivamente em hipocampo e outras áreas corticais, esse fenômeno pode ser provocado também na medula espinhal (96). A LTP é decorrente de uma sequência de estímulos nociceptivos breves e de alta frequência, provocando a ativação de receptores AMPA e de canais de cálcio, promovendo uma resposta pós-sináptica prolongada e excitatória (97). Sabe-se que mais de 100 moléculas estão implicadas como mediadores e moduladores da LTP hipocampal, sendo muitos destes envolvidos com a sensibilização central medular e a subsequente geração da hipersensibilidade à dor. A similaridade destas duas formas de plasticidade sináptica é bastante marcada, particularmente pela regulação pós-translacional de receptores AMPA e NMDA (96).

Neste contexto, a inibição medular desempenha um papel significativo no controle da transmissão nociceptiva. A atividade contínua, a partir das aferências primárias, tem sido demonstrada como uma das causas da degeneração dos interneurônios inibitórios do corno dorsal da medula espinhal que contem ácido gama-aminobutírico (GABA), que contribui para a desinibição e aumenta a sensibilidade (98). Sabe-se também que mudanças no balanço entre a inibição descendente e a facilitação podem contribuir para a manutenção da dor neuropática, sendo que central supra-espinhais, incluindo o tronco cerebral, tem papel fundamental neste processo (7,99).

O sistema imune, por sua vez, também apresenta um papel crítico na dor neuropática, assim como na dor associada à inflamação (100). Após a lesão nervosa periférica, a microglia, os oligodendrócitos e os astrócitos (células gliais do SNC) no corno dorsal da medula espinhal, que estavam em estado de “repouso”, são convertidos para o estado ativado (101).

Esta alteração para o fenótipo ativado da microglia é secundária à alteração na expressão de múltiplas moléculas, como receptores de membrana celular (incluindo receptores purnérgicos) e moléculas de sinalização intracelular (69,102,103). Assim, a microglia ativada pode recrutar várias respostas celulares, liberando neurotrofinas e mediadores pró-inflamatórios que irão modular o processamento nociceptivo por meio da liberação de neurotransmissores pré-sinápticos ou pela excitabilidade pós-sináptica (104).

As neurotrofinas, como o fator de crescimento neural (*nerve growth factor*- NGF), contribuem para a geração da dor neuropática pelo aumento da transmissão excitatória e redução da transmissão inibitória, além de promover reforço da facilitação descendente no corno dorsal da medula espinhal (105,106). Indiretamente, o NGF contribui para a falicitação do processo doloroso pela indução da liberação de mediadores nociceptivos, como histamina e prostaglandinas, além do próprio NGF liberado pelos mastócitos, resultando na retroalimentação positiva que sensibiliza os neurônios nociceptivos adjacentes (107). No SNC, o NGF promove uma *up-regulation* de vários genes (como a substância P, os canais Nav1.8 e o BDNF- *brain derived neurotrophin factor*) nos neurônios nociceptivos, exercendo uma modulação e sensibilização de uma população significativa de neurônio envolvidos na condução do processo doloroso crônico (108,109).

Em modelos animais de dor neuropática, sabe-se que há um aumento da secreção de citocinas e quimiocinas, incluindo a interleucina-10 (IL-10), IL-1 β e TNF- α , prostaglandinas e óxido nítrico (110,111). Estas citocinas vão ampliar a ativação microglial por meio de processos autócrinos e podem agir diretamente nos neurônios do corno dorsal da medula espinhal, induzindo hipersensibilidade e contribuindo para a sinalização dolorosa patológica, assim como são responsáveis pela cascata de respostas inflamatórias no SNC (104,112). Considerando que estes mediadores inflamatórios podem exercer diversas funções (adaptativas e maladaptativas), o desafio, a partir da perspectiva do manejo da dor crônica, é a busca por novas terapias que não interfiram em suas funções inatas (113). Além disto, as estratégias terapêuticas propostas devem considerar que há um padrão temporal de ativação da resposta imune e glial no sítio da lesão nervosa e no SNC, sendo também necessária a identificação das vias que as interconectam (13).

2.4 TERAPÊUTICA DA DOR NEUROPÁTICA

2.4.1 Tratamentos farmacológicos

A dor neuropática é, portanto, uma condição prevalente na população, que desencadeia desordens na percepção dolorosa, tornando-se uma síndrome incapacitante (114). Três classes medicamentosas são recomendadas como tratamentos de primeira escolha para a dor neuropática: os antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina, os ligantes dos canais de cálcio e a lidocaína tópica. Opióides são recomendados como segunda linha de tratamento (115).

Os antidepressivos tricíclicos apresentam diversos mecanismos de ação, incluindo a inibição da recaptação de serotonina nos sistemas inibitórios descendentes e propriedades bloqueadoras de canais de ions, incluindo canais de sódio. Apesar dos efeitos analgésicos serem independentes dos efeitos antidepressivos, o seu uso tem repercussão benéfica, uma vez que a depressão é uma comorbidade comum dos pacientes que sofrem de dor neuropática. Entretanto, os efeitos adversos anticolinérgicos são frequentes e incluem boca seca, hipotensão ortostática, constipação e retenção urinária (4,115,116).

Os ligantes dos canais de cálcio incluem a gabapentina e pregabalina. Esses fármacos atuam como agonista GABA e o seu mecanismo de ação é mediado pela ligação a uma das subunidades de canais de cálcio voltagem-dependente, resultando na inibição da liberação glutamato pré e pós-sinápticamente no SNC (105). Apesar de ambos os fármacos terem poucas interações medicamentosas, eles podem produzir tonturas e sedação dose-dependente, o que requer o início do tratamento com doses baixas e uma titulação cautelosa (117).

O adesivo transdermal de lidocaína 5% tem mostrado eficácia e tolerabilidade em paciente com alodinia decorrente de diferentes tipos de neuropatias periféricas (5,118). Por ser um tratamento tópico sem absorção sistêmica significativa, os efeitos adversos mais comuns são inflamações locais moderadas; a ausência de efeitos adversos e interações medicamentosas mostra-se bastante vantajosa, principalmente em paciente idosos com dor neuropática complexa (117).

Os opióides agem inibindo a transmissão do estímulo nocivo por meio de múltiplos mecanismos, incluindo ações periféricas, pré-sinápticas e pós-sinápticas em receptores opióides no corno dorsal da medula espinhal e no cérebro. Entre os efeitos adversos mais

comuns dessa classe de fármacos estão constipação e náuseas. Além disso, o risco de abuso (dependência), tolerância e os efeitos adversos imunológicos são fatores limitantes para o uso desses medicamentos em dores não malignas (116).

Ainda assim, as intervenções farmacológicas para o tratamento da dor neuropática são inespecíficas (119). Deste modo, o tratamento da dor neuropática requer o uso de uma terapia combinada (120), que mesmo em doses alvo pode não ser totalmente satisfatória e desencadear efeitos adversos como sonolência, diminuição da memória e redução na capacidade de executar atividades que exijam alto grau de concentração. Além disso, há a preocupação com a toxicidade aos demais órgãos e o risco de abuso de medicações (119,121).

2.4.2 Neuromodulação

A neuromodulação é definida como uma alteração da atividade neural por meio da aplicação de agentes magnéticos ou elétricos diretamente em uma área do cérebro ou periferia (119). As técnicas de estimulação cerebral, tanto as invasivas, quanto as não invasivas, tem sido usadas para várias condições dolorosas, incluindo fibromialgia, dor crônica após acidente vascular cerebral e síndrome da dor complexa regional (122–124). O uso destas modalidades de estimulação no manejo da dor ocorre através da modulação da atividade de áreas do cérebro envolvidas com o processamento do estímulo nociceptivo e da sensação dolorosa (125).

Técnicas de estimulação cerebral são classificadas em invasivas e não invasivas. Dentre as técnicas invasivas, encontra-se a estimulação cerebral profunda (*deep brain stimulation* – DBS) do tálamo e de outras regiões do cérebro por meio de eletrodos implantados cirurgicamente, e a estimulação da medula espinhal (*spinal cord stimulation* – SCS), na qual implanta-se um eletrodo acoplado a um gerador de pulsos no espaço epidural da medula espinhal (126,127). Com relação às técnicas não invasivas, duas técnicas de estimulação são propostas para a modulação da excitabilidade cortical. A estimulação magnética transcraniana repetitiva (*repetitive transcranial magnetic stimulation* – rTMS) consiste em pulsos magnéticos liberados em sequência, numa mesma frequência e intensidade, gerando um campo magnético sobre o córtex cerebral induzido pela passagem de corrente elétrica em uma bobina posicionada sobre o crânio (128) e a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC), que consiste na aplicação de uma corrente direta

constante de baixa intensidade (1 – 2 mA) no couro cabeludo por meio de eletrodos para modular a excitabilidade de áreas corticais (125,129).

2.4.2.1. Eletroestimulação transcraniana por corrente contínua

Sabe-se que a gênese e a manutenção da dor neuropática cursa com sensibilização periférica e central, envolvendo uma série de adaptações de médio e longo prazo. Nesse contexto, a ETCC é uma técnica de neuromodulação central através da estimulação do córtex cerebral com uma corrente contínua direta fraca, de maneira indolor. Inúmeros estudos tem demonstrado que esta técnica modula a excitabilidade no cortex motor humano (130) e no córtex visual (131). Além disso, a ETCC não altera apenas a atividade de áreas corticais situadas diretamente abaixo dos eletrodos, mas também em áreas mais distantes, provavelmente por interconexões da área primariamente estimulada com essas outras estruturas (132).

O princípio da ETCC envolve a aplicação de corrente direta constante de baixa intensidade (1 – 2 mA) no couro cabeludo através de eletrodos (20-35 cm²), do cátodo para o ânodo, para modular a excitabilidade de áreas corticais. A estimulação anódica tipicamente despolariza (aumenta a excitação) e estimulação catódica hiperpolariza (diminui a excitação) os neurônios corticais (133,134). Os efeitos da ETCC em um curto prazo (efeito imediato) são, respectivamente, devido a uma diminuição (anódica) ou aumento (catódica) do limiar de repouso neuronal (135).

O tratamento com ETCC para dor crônica tem como foco o córtex motor, região que representa área adjacente à área da dor (18,129). Embora a aplicação de ETCC seja de corrente fraca, ela altera a excitabilidade neuronal espontânea em regiões corticais (136). Evidências sugerem que o alívio da dor pela ETCC depende da projeção das fibras do córtex motor para outras estruturas envolvidas no processamento da dor, como o tálamo e núcleos do tronco cerebral (137). Sabe-se que a ETCC em córtex aumenta o acoplamento funcional entre a região M1 ipsilateral e tálamo, onde o provável efeito analgésico seja em decorrência da modulação da atividade talâmica (138), mudanças no fluxo sanguíneo cerebral indicam que a estimulação do córtex motor desencadeia uma ativação rápida e fásica do tálamo, giro cingulado, insula e tronco cerebral (139).

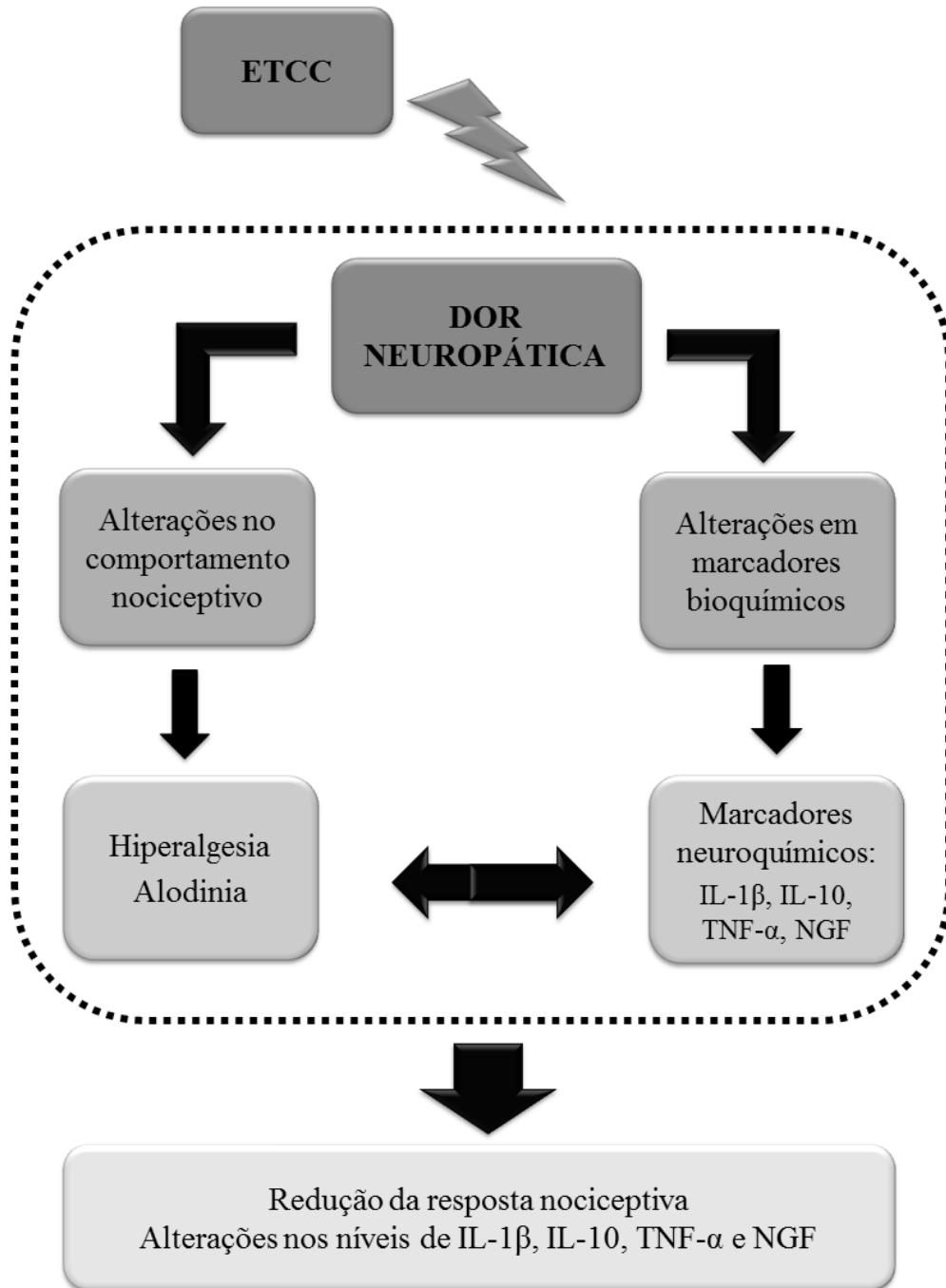
No tratamento da dor crônica, a ETCC tem mostrado resultados positivos. Em um estudo com aplicação da ETCC em pacientes com dor neuropática por lesão medular, após o tratamento os pacientes apresentaram redução na escala análogo visual de dor (EAV) e em 63% dos pacientes, esse benefício perdurou por cerca de duas semanas (140). Outro estudo feito pelo mesmo grupo apresentou resultados semelhantes em pacientes com diagnóstico de fibromialgia (18). Portanto, esta técnica apresenta baixo risco e pouco desconforto, e com a utilização em sessões repetidas o efeito pode ser duradouro (133). A segurança da ETCC tem sido observada, não há possibilidade de causar lesão cerebral pela formação de produtos tóxicos, pois não há interação dos eletrodos com o córtex cerebral (141). Estudo com ressonância magnética antes e após 30 e 60 minutos da estimulação cerebral aplicada em córtex motor ou pré-frontal não indicou alteração patológica, concluindo que a ETCC não induz edema cerebral, alterações da barreira hematoencefálica ou do tecido cerebral (142). Por fim, outro estudo demonstrou que durante e após 20 minutos do término da estimulação não são observadas variações em batimento cardíaco, pressão arterial ou temperatura (143).

Portanto, a ETCC é uma modalidade de estimulação cerebral não invasiva, indolor, que é bem tolerada e não apresenta nenhuma sensação auditiva ou sensitiva desagradável como outras técnicas de estimulação cerebral (141). Além disso, trata-se de método seguro para ser empregado em seres humanos e apresenta vantagem de poder ser combinada com outras intervenções. Com isso, a ETCC poderá ser um método adicional no tratamento da dor em pacientes com dor neuropática, porém estudos adicionais com ênfase nas mudanças neuroquímicas e moleculares devem ser realizados para confirmar essa hipótese. Para tanto, estudos experimentais têm evidenciado os efeitos neuromodulatório da ETCC em modelos animais de epilepsia focal (144), memória (145) e acidente vascular cerebral (146). Além disto, trabalhos do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado efeitos da ETCC em modelos de hiperalgesia induzida por estresse crônico (147) e dor crônica inflamatória (148).

Embora fisiopatologia dos processos da dor crônica não esteja completamente elucidada, cabe salientar que tais processos dependem de cascatas de eventos em longo prazo e, muito provavelmente, estas mesmas vias sejam seguidas quando do tratamento farmacológico ou não farmacológico. Estes dados suportam a necessidade de busca de possíveis marcadores associados a mecanismos implicados no processo fisiopatológico que envolve a dor crônica e dos tratamentos neuromodulatórios centrais, como a ETCC.

III. MARCO TEÓRICO

3 MARCO TEÓRICO



IV JUSTIFICATIVA

4 JUSTIFICATIVA

Existem poucos estudos clínicos na literatura que demonstrem a eficácia da terapia com ETCC em indivíduos com dor neuropática (149) e são também raros os estudos experimentais evidenciando os mecanismos da ETCC como alternativa terapêutica nos quadros de dor crônica (150,151). O uso de estudos experimentais permite a investigação dos efeitos neuroquímicos e moleculares da fisiopatologia dos quadros de dor crônica, tal como a dor neuropática, assim como seu tratamento, farmacológico ou não. Portanto, torna-se essencial a realização de estudos com modelos animais que envolvam o uso dessa nova terapêutica, avaliando o seu impacto nas respostas nociceptivas e quantificando a resposta inflamatória em nível de sistema nervoso central. Acredita-se que a ETCC possa reverter os quadros de hiperalgesia térmica e mecânica em ratos Wistar submetidos a um modelo de dor neuropática provocando mudanças neuroplásticas nestes animais. Além disto, espera-se que a compreensão do efeito desta terapêutica não farmacológica nos permita investigar também os mecanismos neuroquímicos da dor neuropática, podendo atingir o espectro clínico através de abordagens translacionais.

V OBJETIVOS

5 OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do tratamento repetido com ETCC em ratos submetidos a um modelo cirúrgico de dor neuropática avaliando as respostas nociceptivas e neuroquímicas em diferentes tempos (48 horas e 7 dias após o último dia de tratamento).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1 Avaliar o efeito do modelo cirúrgico de dor neuropática e da ETCC sobre a resposta nociceptiva:

- a) hiperalgesia térmica por meio do teste de placa quente
- b) hiperalgesia mecânica por meio do teste de von Frey.

5.2.2 Avaliar o efeito do modelo cirúrgico de dor neuropática e da ETCC sobre marcadores inflamatórios centrais (IL-1 β , IL-10 e TNF- α).

5.2.3 Avaliar o efeito do modelo cirúrgico de dor neuropática e da ETCC sobre os níveis de NGF em córtex cerebral e medula espinhal.

VI. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Melzack R. From the gate to the neuromatrix. *Pain*. 1999 Aug;82(1):121–6.
2. Coghill RC, Mchaffie JG, Yen Y. Neural correlates of interindividual differences in the subjective experience of pain. *PNAS*. 2003;100:8538–42.
3. Bruguerolle B, Labrecque G. Rhythmic pattern in pain and their chronotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007. p. 883–95.
4. Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain*. 2007 Dec 5;132(3):237–51.
5. Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH. Algorithm for neuropathic pain treatment: An evidence based proposal. *Pain*. 2005;118:289–305.
6. Attal N, Lanteri-Minet M, Laurent B, Fermanian J, Bouhassira D. The specific disease burden of neuropathic pain: Results of a French nationwide survey. *Pain*. 2011;152:2836–43.
7. Jensen TS, Finnerup NB. Neuropathic pain: Peripheral and central mechanisms. *Eur J Pain Suppl. European Federation of Chapters of the International Association for the Study of Pain*; 2009 Nov 6;3(S2):33–6.
8. Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*. 2003;60:1524–34.
9. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*. 1999 Jun 5;353:1959–64.
10. Ducreux D, Attal N, Parker F, Bouhassira D. Mechanisms of central neuropathic pain: a combined psychophysical and fMRI study in syringomyelia. *Brain*. 2006 Apr;129:963–76.
11. Baron R. Mechanisms of Disease : neuropathic pain. *Nat Clin Pract*. 2006;2(2):95–106.
12. Backonja M. Defining Neuropathic Pain. *Anesth Analg*. 2003;97:785–90.
13. Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*. 2007 Nov;10(11):1361–8.
14. Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. *Pain*. 2010;150:573–81.
15. Teasell RW, Mehta S, Aubut J-AL, Foulon B, Wolfe DL, Hsieh JTC, et al. A systematic review of pharmacologic treatments of pain after spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2010;91:816–31.

16. Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*. Elsevier Ltd; 2010 Aug;9(8):807–19.
17. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*. 2009 Jan;32:1–32.
18. Fregni F, Boggio PS, Lima MC, Ferreira MJL, Wagner T, Rigonatti SP, et al. A sham-controlled, phase II trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of central pain in traumatic spinal cord injury. *Pain*. 2006 May;122(1-2):197–209.
19. Antal A, Terney D, K?hnl S, Paulus W. Anodal Transcranial Direct Current Stimulation of the Motor Cortex Ameliorates Chronic Pain and Reduces Short Intracortical Inhibition. *J Pain Symptom Manage*. 2010;39:890–903.
20. Brunoni AR, Valiengo L, Baccaro A, Zanão T a, de Oliveira JF, Goulart A, et al. The sertraline vs. electrical current therapy for treating depression clinical study: results from a factorial, randomized, controlled trial. *JAMA Psychiatry*. 2013;70:383–91.
21. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol*. 2000;527 Pt 3:633–9.
22. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*. 2009;139(2):267–84.
23. Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*. 2006 Dec 14;444:894–8.
24. Merskey H, Bogduk N. Pain terms. IASP Press. 2011;
25. Steeds CE. The anatomy and physiology of pain. *Surgery*. Elsevier Ltd; 2009 Dec;27(12):507–11.
26. Moffat R, Rae CP. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesth Intensive Care Med*. Elsevier Ltd; 2011 Jan;12(1):12–5.
27. D’Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*. 2008 Jul;101(1):8–16.
28. Basbaum AI, Jessell TM. Pain. *Principles of Neuroscience*. 2013. p. 530–55.
29. Schaible HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handb Exp Pharmacol*. 2007 Jan;(177):3–28.
30. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999 Jan;57(1):1–164.
31. Perl ER. Ideas about pain, a historical view. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Jan;8(1):71–80.

32. Casey KL. The imaging of pain: background and rationale. *Pain Imaging*. 2000. p. 1–29.
33. Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H. Novel Classes of Responsive and Unresponsive Human Skin C Nociceptors in. *J Neurosci*. 1995;15(January):333–41.
34. Klede M, Handwerker HO, Schmelz M. Central origin of secondary mechanical hyperalgesia. *J Neurophysiol*. 2003 Jul;90(1):353–9.
35. Birch R. *Peripheral Nerve Injuries: A Clinical Guide*. London: Springer; 2013.
36. Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res*. 2004 Mar 12;1000:40–56.
37. Willis WD, Westlund KN. Neuroanatomy of the Pain System and of the Pathways That Modulate Pain. *J Clin Neurophysiol*. 1997;14(1):2–31.
38. Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2010 Nov;16(11):1258–66.
39. Caterina MJ, Schumacher M a, Tominaga M, Rosen T a, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997 Oct 23;389:816–24.
40. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 2000;405:183–7.
41. Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A. TRP ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci*. 2006 Jan;29:135–61.
42. Babos MB, Grady B, Wisnoff W, McGhee C. Pathophysiology of pain. *Disease-a-month*. Elsevier; 2013 Oct;59(10):330–58.
43. Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med*. Nature Publishing Group; 2010 Nov;16(11):1248–57.
44. Rogers M, Tang L, Madge DJ, Stevens EB. The role of sodium channels in neuropathic pain. *Semin Cell Dev Biol*. 2006 Oct;17(5):571–81.
45. Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci*. 2010 Dec;11(12):823–36.
46. Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol*. 1952;96(3):415–92.
47. Todd AJ. Nociceptors as Homeostatic Afferents: Central Processing Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. *Exp Physiol*. 2001;87(2):245–9.

48. Melzack R, Wall PD. Pain Mechanisms: A New Theory. *Science* (80-). 1963;150:971–9.
49. Schaible H, Grubb BD. Afferent and Spinal Mechanisms of Joint Pain. *Pain*. 1993;55:5–54.
50. Besson JM. The neurobiology of pain. *Lancet*. 1999 May 8;353:1610–5.
51. Tracey I, Mantyh PW. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*. 2007 Aug 2;55(3):377–91.
52. Woolf C. A new strategy for the treatment of inflammatory pain. Prevention or elimination of central sensitization. *Drugs*. 1994;47(5):1–9.
53. Merskey H, Bogduk N. *Classification of Chronic Pain*. IASP Press. 2011;
54. Baron R. Mechanisms of Disease: neuropathic pain. *Nat Clin Pract*. 2006;2(2):95–106.
55. Van Hecke O, Austin SK, Khan R a, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain*. International Association for the Study of Pain; 2014 Apr;155(4):654–62.
56. Smith BH, Torrance N. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. *Curr Pain Headache Rep*. 2012 Jun;16(3):191–8.
57. Attal N, Bouhassira D, Lante M, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*. 2008;136:380–7.
58. Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain*. 2006 Apr;7(4):281–9.
59. Dieleman JP, Kerklaan J, Huygen FJPM, Bouma P a D, Sturkenboom MCJM. Incidence rates and treatment of neuropathic pain conditions in the general population. *Pain*. 2008 Jul 31;137(3):681–8.
60. Chong MS, Bajwa ZH. Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain. *J Pain Symptom Manage*. 2003 May;25(5):S4–S11.
61. Jensen TS, Gottrup H, Sindrup SH, Bach FW. The clinical picture of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2001 Oct 19;429:1–11.
62. Vranken JH. Mechanisms and treatment of neuropathic pain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2009 Mar;9(1):71–8.
63. Rasmussen PV, Sindrup SH, Jensen TS, Bach FW. Symptoms and signs in patients with suspected neuropathic pain. *Pain*. 2004 Jul;110(1-2):461–9.
64. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2001 Oct 19;429(1-3):23–37.

65. Benn SC, Woolf CJ. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Sep;5(9):686–700.
66. Bessou P, Perl ER. Response of Cutaneous Sensory Units with Unmyelinated Fibers to Noxious. *Neurophysiol*. 1969;32:1025–43.
67. Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*. 2004 May 6;361(1-3):184–7.
68. Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev*. 2006 Aug;51(2):240–64.
69. Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihöfner C. Mechanisms of neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacol*. Elsevier B.V. and ECNP; 2012;22(2):81–91.
70. Hucho T, Levine JD. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron*. 2007 Aug 2;55(3):365–76.
71. Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors - noxious stimulus detectors. *Neuron*. 2007 Aug 2;55(3):353–64.
72. McMahon S, Bennett D, Bevan S. Inflammatory mediators and modulators of pain. In: McMahon S, Koltzenburg M, Tracey I, Turk D, editors. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2008. p. 49–72.
73. Fletcher D, Kayser V, Guilbaud G. Influence of timing of administration on the analgesic effect of bupivacaine infiltration in carrageenin-injected rats. *Anesthesiology*. 1996;84:1129–37.
74. Latremoliere A, Woolf CJ. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J Pain*. Elsevier Ltd; 2009;10(9):895–926.
75. Sandkühler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev*. 2009 Apr;89(2):707–58.
76. Bridges D, Thompson SWN, Rice ASC. Mechanisms of neuropathic pain. *Br J Anaesth*. 2001;87(1):12–26.
77. Levinson SR, Luo S, Henry MA. The role of sodium channels in chronic pain. *Muscle Nerve*. 2012;155–65.
78. Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain : mechanisms and their clinical implications. *Br J Med*. 2014;348:1–12.
79. Amir R, Kocsis JD, Devor M. Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. *J Neurosci*. 2005 Mar 9;25(10):2576–85.

80. Wu G, Ringkamp M, Murinson BB, Pogatzki EM, Hartke T V, Weerahandi HM, et al. Degeneration of Myelinated Efferent Fibers Induces Spontaneous Activity in Uninjured C-Fiber Afferents. *J Neurosci.* 2002;22(17):7746–53.
81. Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain.* 1988;32:89–94.
82. Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature.* 1992;355:75–8.
83. Bostock H, Campero M, Serra J, Ochoa JL. Temperature-dependent double spikes in C-nociceptors of neuropathic pain patients. *Brain.* 2005;128:2154–63.
84. Balasubramanyan S, Stemkowski PL, Stebbing MJ, Smith P a. Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol.* 2006 Aug;96(2):579–90.
85. Woolf C. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature.* 1983;306:686–8.
86. Nijs J, Houdenhove B Van, Oostendorp RAB. Recognition of central sensitization in patients with musculoskeletal pain: Application of pain neurophysiology in manual therapy practice. *Man Ther.* Elsevier Ltd; 2010;15(2):135–41.
87. Pedersen LH, Scheel-kru J, Blackburn-munro G. Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. *Pain.* 2007;127:17–26.
88. Gebhart GF. Descending modulation of pain. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004 Jan;27(8):729–37.
89. Watkins LR, Maier SF. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:973–85.
90. Guo W, Zou S, Guan Y, Ikeda T, Tal M, Dubner R, et al. Tyrosine Phosphorylation of the NR2B Subunit of the NMDA Receptor in the Spinal Cord during the Development and Maintenance of Inflammatory Hyperalgesia. *J Neurosci.* 2002;22(14):6208–17.
91. Sung B, Lim G, Mao J. Altered Expression and Uptake Activity of Spinal Glutamate Transporters after Nerve Injury Contribute to the Pathogenesis of Neuropathic Pain in Rats. *J Neurosci.* 2003;23(7):2899–910.
92. Miller KE, Hoffman EM, Sutharshan M, Schechter R. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: Physiological and pathophysiological mechanisms. *Pharmacol Ther.* Elsevier B.V.; 2011;130(3):283–309.
93. Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI. Preserved Acute Pain and Reduced Neuropathic Pain in Mice Lacking. *Science (80-).* 1997;278:279–83.

94. Li J, Simone D a, Larson A a. Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain*. 1999 Jan;79(1):75–82.
95. Rocha AP, Kraychete DC, Lemonica L, Carvalho LR, de Barros GAM, Garcia JB dos S, et al. Pain: current aspects on peripheral and central sensitization. *Rev Bras Anesthesiol*. 2007;57(1):94–105.
96. Ji R-R, Kohno T, Moore K a, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*. 2003 Dec;26(12):696–705.
97. Randic M, Jiang MC, Cerne R. Long-term Potentiation and Long-term Depression of Primary Afferent Neurotransmission in the Rat Spinal Cord. *J Neurosci*. 1993;13(12):5228–41.
98. Scholz J, Broom DC, Youn D-H, Mills CD, Kohno T, Suter MR, et al. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2005 Aug 10;25(32):7317–23.
99. Saadé NE, Jabbur SJ. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. *Prog Neurobiol*. 2008 Sep;86(1):22–47.
100. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*. 2006 Oct 5;52(1):77–92.
101. Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in “small” glia. *Trends Neurosci*. 2005 Feb;28(2):101–7.
102. Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ a, Chun J, Ueda H. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med*. 2004 Jul;10(7):712–8.
103. Ji R-R, Strichartz G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. *Sci Signal*. 2004 Sep 28;252:1–19.
104. Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R. The Role of Glia and the Immune System in the Development and Maintenance of Neuropathic Pain. *Pain Pract*. 2010;10(3):167–84.
105. Vranken JH. Elucidation of Pathophysiology and Treatment of Neuropathic Pain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2012;12:304–14.
106. Coull J a M, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):1017–21.
107. Kawamoto K, Aoki J, Tanaka A, Itakura A, Hosono H, Arai H, et al. Nerve Growth Factor Activates Mast Cells Through the Collaborative Interaction with Lysophosphatidylserine Expressed on the Membrane Surface of Activated Platelets. *J Immunol*. 2002 Jun 15;168(12):6412–9.

108. Hefti FF, Rosenthal A, Walicke P a, Wyatt S, Vergara G, Shelton DL, et al. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Feb;27(2):85–91.
109. Mantyh PW, Koltzenburg M, Mendell LM, Tive L, Shelton DL. Antagonism of Nerve Growth Factor-TrkA Signaling and the Relief of Pain. *Anesthesiology.* 2012;115(5):189–204.
110. Taves S, Berta T, Chen G, Ji R-R. Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain. *Neural Plast.* 2013 Jan;2013:753656.
111. Winkelstein BA, Rutkowski MD, Sweitzer SM, Pahl JL, Deleo JA. Nerve Injury Proximal or Distal to the DRG Induces Similar Spinal Glial Activation and Selective Cytokine Expression but Differential Behavioral Responses to Pharmacologic Treatment. *J Comp Neurol.* 2001;139:127–39.
112. Zhuo M, Wu G, Wu L-J. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Mol Brain. BioMed Central Ltd;* 2011 Jan;4(1):31.
113. Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jul;6(7):521–32.
114. McDermott AM, Toelle TR, Rowbotham DJ, Schaefer CP, Dukes EM. The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. *Eur J Pain.* 2006 Feb;10(2):127–35.
115. O'Connor AB, Dworkin RH. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am J Med. Elsevier Inc.;* 2009 Oct;122(10 Suppl):S22–32.
116. Jensen TS, Madsen CS, Finnerup NB. Pharmacology and treatment of neuropathic pains. *Curr Opin Neurol.* 2009 Oct;22(5):467–74.
117. Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, Baron R, Gourlay GK, Haanpää ML, et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc.* 2010 Mar;85(3 Suppl):S3–14.
118. Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain.* 2007 Dec 5;132(3):237–51.
119. Zaghi S, Heine N, Fregni F. Brain stimulation for the treatment of pain: A review of costs, clinical effects, and mechanisms of treatment for three different central neuromodulatory approaches. *J Pain Manag.* 2009;2(3):339–52.
120. Orza F, Boswell M V, Rosenberg SK. Neuropathic pain : Review of mechanisms and pharmacologic management. *NeuroRehabilitation.* 2000;14:15–23.
121. Harden N, Cohen M. Unmet needs in the management of neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage.* 2003;25(5):12–7.

122. Cruccu G, Aziz TZ, Garcia-Larrea L, Hansson P, Jensen TS, Lefaucheur J-P, et al. EFNS guidelines on neurostimulation therapy for neuropathic pain. *Eur J Neurol*. 2007 Oct;14(9):952–70.
123. Fregni F, Freedman S, Pascual-leone A. Recent advances in the treatment of chronic pain with non-invasive brain stimulation techniques. *Lancet Neurol*. 2007;6:188–91.
124. Gilula MF. Cranial electrotherapy stimulation and fibromyalgia. *Expert Rev Med Devices*. 2007;4(4):489–95.
125. O’Connell N, Wand B, Marston L, Spencer S, De Souza L. Non-invasive brain stimulation techniques for chronic pain (Review). *Cochrane Libr*. 2014;(4):1–217.
126. Falowski S, Celii A, Sharan A. Spinal Cord Stimulation: An Update. *Neurotherapeutics*. 2008;5(January):86–99.
127. Nardone R, Höller Y, Leis S, Höller P, Thon N, Thomschewski A, et al. Invasive and non-invasive brain stimulation for treatment of neuropathic pain in patients with spinal cord injury: a review. *J Spinal Cord Med*. 2014 Jan;37(1):19–31.
128. Fitzgerald PB, Fountain S, Daskalakis ZJ. A comprehensive review of the effects of rTMS on motor cortical excitability and inhibition. *Clin Neurophysiol*. 2006 Dec;117(12):2584–96.
129. Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJL, Rocha RR, Natalle L, et al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 2006 Dec;54(12):3988–98.
130. Nitsche M, Paulus W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology*. 2001;57(10):1899–901.
131. Antal A, Nitsche M a, Paulus W. Transcranial direct current stimulation and the visual cortex. *Brain Res Bull*. 2006 Feb 15;68(6):459–63.
132. Lang N, Siebner HR, Ward NS, Lee L, Nitsche M a, Paulus W, et al. How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? *Eur J Neurosci*. 2005 Jul;22(2):495–504.
133. Nitsche M a, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul*. 2008 Jul;1(3):206–23.
134. Rosen A, Ramkumar M, Nguyen T, Hoeft F. Noninvasive Transcranial Brain Stimulation and Pain. *Curr Pain Headache Rep*. 2009;13(1):12–7.
135. Ruscheweyh R, Wilder-Smith O, Drdla R, Liu X-G, Sandkühler J. Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy. *Mol Pain*. BioMed Central Ltd; 2011 Jan;7(1):20.

136. Plow EB, Pascual-Leone A, Machado A. Brain stimulation in the treatment of chronic neuropathic and non-cancerous pain. *J Pain*. Elsevier Ltd; 2012 May;13(5):411–24.
137. Lefaucheur JP. The use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in chronic neuropathic pain. *Neurophysiol Clin*. 2006;36(3):117–24.
138. Polanía R, Paulus W, Nitsche M a. Modulating cortico-striatal and thalamo-cortical functional connectivity with transcranial direct current stimulation. *Hum Brain Mapp*. 2012 Oct;33(10):2499–508.
139. Garcia-Larrea L, Peyron R. Motor cortex stimulation for neuropathic pain: From phenomenology to mechanisms. *Neuroimage*. 2007 Jan;37 Suppl 1:S71–9.
140. Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJL, Rocha RR, Natalle L, et al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 2006 Dec;54(12):3988–98.
141. Nitsche M a., Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, Paulus W. Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol*. 2003 Apr;114(4):600–4.
142. Nitsche M a, Niehaus L, Hoffmann KT, Hengst S, Liebetanz D, Paulus W, et al. MRI study of human brain exposed to weak direct current stimulation of the frontal cortex. *Clin Neurophysiol*. 2004 Oct;115(10):2419–23.
143. Accornero N, Li Voti P, La Riccia M, Gregori B. Visual evoked potentials modulation during direct current cortical polarization. *Exp brain Res*. 2007 Apr;178(2):261–6.
144. Liebetanz D, Klinker F, Hering D, Koch R, Nitsche MA, Potechka H, et al. Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy. *Epilepsia*. 2006;47:1216–24.
145. Bennabi D, Pedron S, Haffen E, Monnin J, Peterschmitt Y, Van Waes V. Transcranial direct current stimulation for memory enhancement: from clinical research to animal models. *Front Syst Neurosci*. 2014 Jan;8(September):159.
146. Wachter D, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Taghizadeh-Waghefi A, Nitsche MA, Kutschenko A, et al. Transcranial direct current stimulation induces polarity-specific changes of cortical blood perfusion in the rat. *Exp Neurol*. 2011;227:322–7.
147. Adachi LS, Caumo W, Laste G, Fernandes L, Ripoll J, Souza A De, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res*. Elsevier; 2012;1489:17–26.
148. Laste G, Caumo W, Naomi L, Adachi S, Ripoll J, Isabel R, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp Brain Res*. 2012;221:75–83.

149. Ngernyam N, Jensen MP, Auvichayapat N, Punjaruk W, Auvichayapat P. Transcranial Direct Current Stimulation in Neuropathic Pain. *J Pain Reli.* 2013;3:1–13.
150. Adachi LS, Caumo W, Laste G, Medeiros LF, Rozisky JR, de Souza A, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res. Elsevier;* 2012 Dec 13;1489:17–26.
151. Laste G, Caumo W, Adachi LNS, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PRM, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp brain Res.* 2012 Aug;221(1):75–83.

VII. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 1

LONG-LASTING EFFECT OF TRANSCRANIAL DIRECT CURRENT
STIMULATION (tDCS) IN THE REVERSAL OF HYPERALGESIA AND CYTOKINES
ALTERATIONS INDUCED BY NEUROPATHIC PAIN MODEL

Periódico: Brain Stimulation

Status: A ser submetido

LONG-LASTING EFFECT OF TRANSCRANIAL DIRECT CURRENT STIMULATION (tDCS) IN THE REVERSAL OF HYPERALGESIA AND THE CYTOKINES ALTERATIONS INDUCED BY NEUROPATHIC PAIN MODEL

Stefania Giotti Cioato^{1,3,4}, Liciane Fernandes Medeiros^{3,4}, Paulo Ricardo Marques Filho^{1,3,4}, Rafael Vercelino^{2,3,4}, Andressa de Souza^{1,3,4}, Vanessa Leal Scarabelot^{2,3,4}, Carla de Oliveira^{1,3,4}, Lauren Naomi Spezia Adachi^{1,3,4}, Joanna Rippol Rozisky^{1,3,4}, Wolnei Caumo^{1,3,4}, Iraci LS Torres^{1,2,3,4*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, Brazil.

³Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Modelos Animais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050–170, Porto Alegre, Brazil.

⁴Unidade de Experimentação Animal, Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

Conflict of Interest: There was no financial interest between any of the authors or any commercial interest in the outcome of this study.

* Corresponding author:

Iraci Lucena da Silva Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 0055-51 3316 3183; FAX: 0055-51 3316 3121.

E-mail: iracitorres@gmail.com

ABSTRACT

Neuropathic pain (NP) is caused by a primary insult or dysfunction in the peripheral or central nervous system. The main symptoms are mechanical allodynia and hyperalgesia to both mechanical and thermal stimuli. NP often shows insufficient response to classic analgesics and remains a challenge to medical treatment and scientific research. The transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive method of cerebral stimulation and represents a promising resource to pain management since it promotes neuroplasticity in the central system of pain and can be combined with other interventions. The aim of this study was to investigate the effects of tDCS in thermal and mechanical hyperalgesia induced by a NP model and in IL-1 β , IL-10, and TNF- α levels in central nervous system structures. The chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve was used for the induction of NP. After the establishment of NP, the animals of treated groups were subjected to a 20 minutes session of anodal tDCS, every afternoon for eight days. The thermal hyperalgesia and mechanical allodynia were assessed by Hot plate (HP) and Von Frey (VF) tests, respectively, and evaluated on baseline, 7 and 14 days after surgery; immediately, 24 hours and 7 days after treatment. The IL-1 β , IL-10 and TNF- α cortex, spinal cord and brainstem levels were determined by sandwich-ELISA at 48 hours and 7 days after the end of treatment. CCI model causes thermal and mechanical hyperalgesia until at least 30 days after the surgery; however, the anodal tDCS treatment was able to relieve the nociceptive behavior for up to 7 days after the treatment end. In summary, we showed that anodal tDCS is effective to relieve neuropathic pain and modulate cytokine in CCI rat model, and its effect is observed at long-term. Additionally, we observed an important role of the central immune system in the neuropathic process, which can be involved with the maladaptative neuroplastic changes.

Keywords: neuropathic pain, anodal tDCS, hyperalgesia, cytokines

1 INTRODUCTION

Neuropathic pain conditions arising from peripheral and central nerve damage are a significant clinical problem, which often severely debilitating and largely resistant to treatment, partially due to the fact that its mechanisms are insufficiently understood (1). The prevalence is between 6.9 to 10%, according to the related dysfunction (2,3). The main symptoms may include both hypersensitivity types: thermal and mechanical hyperalgesia, defined as an increased pain sensitivity to a thermal or mechanical nociceptive stimulus, respectively (4).

Therefore, neuropathic pain presents changes in different levels of the nervous system by peripheral and central sensitization that can not be explained by a specific etiology (5–7). After the nerve injury, the nociceptors responds directly to cytokines, chemokines, and other inflammatory mediators released (8). Interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and nerve growth factor (NGF) are also produced by peripheral immune cells and microglia in the spinal cord contributing to neuropathic pain by nociceptive neurons activation (9).

The main characteristic of neuropathic pain process is the combination of sensory loss due to transmission pathways damage, and the development of maladaptive neuroplastic changes in both peripheral and central nervous systems (10). Non-neuronal and neural plastic changes, involved in the nociceptive process, support the need for the assessment of central-based targeted non-invasive therapeutic tools for pain (10,11).

In this context, a technique that focally modulates plastic changes induced by pain-related neural networks, such as transcranial direct current stimulation (tDCS), may have significant therapeutic effects. This technique modulates the neural activity via weak electrical currents that, when applied as a direct current component, polarize neural tissue, inducing significant changes in the resting membrane threshold (12) and subsequent changes in synaptic plasticity (13). In addition, tDCS does not only alter activity of cortical areas located directly under the electrodes, but also from distant areas probably due the primary interconnections between stimulate area and other brain structures (14). This method of noninvasive brain modulation has shown significant results in different types of chronic pain in humans (15–17). Furthermore, the tDCS neuromodulatory effects have also been consistently demonstrated in animals, such as in rat models of focal epilepsy (18), memory (19), Parkinson's disease (20) and acute stroke (21). Previous studies of our research group using rats showed immediate and long-lasting effects after repeated sessions of anodal tDCS

on chronic inflammation (22) and hyperalgesia induced by chronic restraint stress models (23). Taking into account the possible benefits of tDCS on pain process, we investigated the effects of tDCS in the thermal and mechanical hyperalgesia induced by neuropathic pain model and its effect on central IL-1 β and IL-10, and TNF- α levels.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

A total of 84 adult male Wistar rats (55-65 days-old; weighing 200–250 g) were used. Animals were randomized by weight and housed in three animals per home cages made of polypropylene material (49 cm x 34cm x 16cm) with the floor covered with sawdust. All animals were maintained in a controlled environment (22 \pm 2°C), under a standard light-dark cycle (lights-on at 07:00 h and lights-off at 19:00 h), with water and chow (Nuvital, Porto Alegre/ Brazil) available *ad libitum*. All experiments and procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (GPPG-HCPA protocol No.120512) and performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th ed. (24). The experimental protocol complied with the ethical and methodological standards of the ARRIVE guidelines (25). The experiment used the number of animals necessary to produce reliable scientific data. To control the possible effect of outliers, animals that did not present behavioral responses were excluded.

2.2 Neuropathic pain model

The chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve described by Bennett & Xie (1988) (26) was used as a model for the induction of neuropathic pain. Rats were anesthetized with isoflurane (5% for induction, 2.5% maintenance) and placed in dorsal position for the realization of the left thigh trichotomy and skin antisepsis with 2 % iodine alcohol. After skin incision of the left hind limb, in the middle third of the thigh to expose the femoral biceps muscle, the common sciatic nerve was exposed and three ligatures were tied (Vycril 4.0) separated by an interval of 1 mm, thus the length of nerve affected was approximately 5.0 mm. The ligatures reduced the diameter of the nerve by a just noticeable amount, but did not interrupt the epineurial circulation. To ensure equal level of constriction, the same investigator performed the ligatures in all rats. Finally, the skin was sutured using Mononylon

4.0 thread. For sham surgery, the sciatic nerve was exposed similarly to CCI model, but it was not ligated. After surgery and anesthetic recovery, the animals were allowed in their home cages where they will remain until the day of death. The control group did not undergo surgical procedure.

2.3 tDCS

After the establishment of neuropathic pain, the animal of active treatment groups were subjected to a 20 minutes session of anodal tDCS, every afternoon for eight days, as described by Adachi et al. (2012) (27). The direct constant current of 0.5 mA intensity was delivered from a battery-driven, constant current stimulator, using electrocardiogram (ECG) electrodes with conductive adhesive hydrogel. Rats' heads were shaved for better adherence and the electrodes were trimmed to 1.5 cm² for better fit. After placement, electrodes were fixed onto the head with adhesive tape (Micropore™) and covered with a protective mesh to prevent removal.

The cathodal electrode was positioned at the midpoint between the lateral angles of both eyes (supraorbital area) and the anodal electrode was placed on the head using landmarks of the neck and shoulder lines as a guide (the anterior and posterior regions in the midline between the two hemispheres of the parietal cortex, as described by Takano et al. (2011) (28) (Figure 1). This technique mimics humans tDCS protocols used in to pain treatment (29–32), and it has been applied by our research group showing longer-lasting effects on pain relief, and an antihyperalgesic response in paw inflamed rats (22). For sham stimulation, the electrodes were placed and fixed in the same positions as for real stimulation; however, the stimulator was turned off during the entire time.

Insert Figure 1

2.2 Experimental Design

The rats were habituated to the maintenance room for one week before the experiment began. The animals were divided into the following seven groups: control (CT); sham neuropathic pain (SN); sham neuropathic pain plus sham tDCS treatment (SNS); sham

neuropathic pain plus tDCS treatment (SNT); neuropathic pain model (NP); neuropathic pain plus sham tDCS treatment (NPS); neuropathic pain plus tDCS treatment (NPT). After the establishment of neuropathic pain, animals were subjected to a daily session of tDCS for eight consecutive days. The nociceptive tests (Von Frey and Hot Plate tests) were made at baseline, 7 days and 14 days after surgery, and immediately, 24 hours and 7 days after the last session of tDCS treatment. The rats were killed by decapitation 48 hours and 7 days after the end of treatment. All procedures (nociceptive tests and biochemical assays) were blind such that the experimenter did not know about the group of rat being tested.

2.5 Hot Plate Test

The hot-plate test (HP) was carried out to confirm the neuropathic pain effectiveness and to assess the effects of tDCS on the thermal nociceptive threshold (33). This test was assessed at baseline, 14 days after surgery, and immediately, 24 hours and seven days after the last session of treatment. We used the hot-plate test to determine changes in latency as an indicator of modifications of the supraspinal pain process (34), as licking or jumping responses during this test results of supraspinal sensory integration (35,36).

All rats were exposure during to HP for 5 minutes to habituate to the hot plate 24 hours prior to testing, to avoid the analgesia induced by the novelty of apparatus (37). The surface of the hot plate was pre-heated and kept at a constant temperature of $55\pm 0.1^{\circ}\text{C}$. Animals were placed in glass funnels on the heated surface, and the time in seconds between placement of the rat and the first response (foot licking, jumping, or rapidly removing paws) was recorded as the latency of nociceptive response. The cut-off time was 20 seconds to avoid tissue damage.

2.6 Von Frey Test

Mechanical allodynia was assessed at baseline, 14 days after surgery, and immediately, 24 hours and seven days after the last session of treatment using an automatic von Frey aesthesiometer (Insight, São Paulo, Brazil). It is an adaptation of the classical von Frey filaments test in which pressure intensity is recorded automatically after paw removal (38). Rats were placed in $12\times 20\times 17$ cm polypropylene cages with wire grid floors and acclimatized for 10 minutes, 24 hours prior to the test, to avoid the analgesia induced by the novelty of apparatus (37).

For testing, a polypropylene tip was placed perpendicularly underneath the mesh floor and applied to one of the five distal footpads with a gradual increase in pressure. A tilted mirror below the grid provided a clear view of the animal's hind paw. The test consisted of poking the hind paw to provoke a flexion reflex followed by a clear flinch response after paw withdrawal. The intensity of the stimulus was automatically recorded when the paw was withdrawn. Three successive von Frey readings were averaged and the interval between the measures was at least 5 seconds. These averages were used as the final measurements and the paw withdrawal threshold was expressed in grams (g) (38).

2.7 Tissue collection

The animals were killed by decapitation 48 hours or 7 days after the last session of tDCS treatment and the tissue samples (cerebral cortex, spinal cord and brainstem) were collected. Structures were frozen at -80°C until assays were performed.

2.8 Biochemical assays

The IL-1 β , IL-10 and TNF- α cortex, spinal cord and brainstem levels were determined by sandwich-ELISA using monoclonal antibodies specific for IL-1 β , IL-10 and TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, United States). Total protein was measured by Bradford's method using bovine serum albumin as standard.

2.9 Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M). Generalized Estimating Equation (GEE) followed by Bonferroni was performed to compare all groups in different times of nociceptive tests. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls (SNK) was performed to compare all groups in biochemical data. The values were presented as percentage of the control group. P-values less than 0.05 were considered significant. SPSS 19.0 for Windows was used for Statistical analysis.

3. Results

3.1 Neuropathic model assessment

The nociceptive response was analyzed using GEE test, and there was observed interaction between group and time in the Hot plate and Von Frey tests (Wald $\chi^2= 595.128$ and Wald $\chi^2= 269.287$, respectively, $p<0.05$, $n=84$, Figure 2 and 3). At the baseline time we did not observe any difference between groups in both tests. At the 14th day the CCI animals presented decrease thermal and mechanical latency withdrawal, confirming the establishment of neuropathic pain model (NP, NPS and NPT different from CT, SN, SNS and SNT, $p<0.05$).

Insert Figure 2

Insert Figure 3

3.2 Effects of CCI and tDCS on thermal hyperalgesia

Immediately, at 24 hours, and at 7 days after end of the anodal tDCS treatment, the groups submitted to the CCI model (NP and NPS) presented paw withdrawal threshold in relation to control (CT) and sham neuropathic pain (SN, SNS and SNT). The anodal tDCS treatment (NPT) totally reversed this nociceptive behavior, being different from CCI model (NP and NPS) only immediately and 24 hours after the end of treatment. However, the long lasting effect of anodal tDCS was partially maintained, being different from SNS, NP and NPS groups and also from CT group (GEE test, Wald $\chi^2= 595.128$, $p<0.05$, $n=42$, Figure 2).

3.3 Effects of CCI and tDCS on mechanical hyperalgesia

Immediately, at 24 hours, and at 7 days after end of the anodal tDCS treatment, the groups submitted to the CCI model (NP and NPS) presented reduced paw withdrawal threshold than control (CT) and sham neuropathic pain (SN, SNS and SNT) groups. The

anodal tDCS treatment (NPT) partially reversed this nociceptive behavior, being different from all other groups (GEE test, Wald $\chi^2 = 269.287$, $p < 0.05$, $n = 42$, Figure 3).

3.4 IL-1 β levels in the cerebral cortex, the brainstem and the spinal cord

There was no difference in the IL-1 β levels in the cerebral cortex at 48 hours (One-way ANOVA, $F_{(6,35)} = 0.834$, $p > 0.05$); however, when it was analyzed 7 days after the end of treatment, we observed that the CCI model (NP, NPS and NPT) presented increased levels of IL-1 β in relation to other groups (CT, SN, SNS and SNT; One-way ANOVA, $F_{(6,33)} = 70.069$, $p < 0.05$, Figure 4-A). Interesting to note that, in the spinal cord, we found increased levels of IL-1 β followed by CCI model (NP and NPS) in relation to other groups (CT, SN, SNS and SNT), and this level was completely reversed by anodal tDCS treatment (NPT) at both times (One-way ANOVA, $F_{(6,32)} = 10.334$ and $F_{(6,31)} = 6.255$, respectively, $p < 0.05$, Figure 4-B). In the brainstem, we did not observe any difference in the IL-1 β between groups in both times, at 48 hours and 7 days after the end of the treatment (One-way ANOVA, $F_{(6,35)} = 2.117$ and $F_{(6,32)} = 0.987$, respectively, $p > 0.05$, Figure 4-C).

Insert Figure 4

3.5 IL-10 levels in the cerebral cortex, the brainstem and the spinal cord

Despite we did not find difference in the IL-10 levels of the cerebral cortex when analyzed at 48 hours after the end of the treatment (One-way ANOVA, $F_{(6,34)} = 0.560$, $p > 0.05$); we observed that the CCI model (NP, NPS and NPT) was able to increase the IL-10 levels at long lasting time (7 days) in relation to other groups (CT, SN, SNS and SNT) (One-way ANOVA, $F_{(6,32)} = 39.348$, $p < 0.05$). Our results showed that anodal tDCS treatment did not reverse the IL-10 levels in the cerebral cortex, Figure 5-A). In the spinal cord, we only observed that the anodal tDCS treatment (SNT) reduced the IL-10 levels in relation to sham treatment (SNS) at 48 hours analyzed (One-way ANOVA, $F_{(6,33)} = 2.482$, $p < 0.05$). At seventh day after the end of the treatment, we found increased levels of IL-10 induced by the CCI model (NP and NPS) in relation to CT, SN and SNT groups (One-way ANOVA, $F_{(6,31)} = 5.250$, $p < 0.05$); however, we highlighted that the anodal tDCS treatment (NPT) partially

reversed the IL-10 levels (One-way ANOVA, $p > 0.05$, Figure 5-B). In the brainstem, we did not observe any difference in the IL-10 between groups in both times, at 48 hours and 7 days after the end of the treatment (One-way ANOVA, $F_{(6,34)} = 1.944$ and $F_{(6,34)} = 0.610$, respectively, $p > 0.05$, Figure 5-C).

Insert Figure 5

3.4 TNF- α levels in the cerebral cortex, the brainstem and the spinal cord

The anodal tDCS treatment increased the levels of TNF- α in the cerebral cortex only in the animal submitted to the CCI model (NPT) at 7 days after the end of the treatment in relation to the other groups (One-way ANOVA, $F_{(6,32)} = 5.059$, $p < 0.05$); although, no difference was found between groups at 48 hours (One-way ANOVA, $F_{(6,34)} = 1.606$, $p > 0.05$, Figure 6-A). Interesting to note that we found similar results in the spinal cord, with increased levels in the NPT group only at 7 seven days after the treatment (One-way ANOVA, $F_{(6,34)} = 2.939$, $p < 0.05$; at 48 hours $F_{(6,31)} = 0.709$, $p > 0.05$, Figure 6-B). In the brainstem, we did not observe any difference in the 4 TNF- α levels between groups in both times, at 48 hours and 7 days after the end of the treatment (One-way ANOVA, $F_{(6,33)} = 2.063$ and $F_{(6,31)} = 0.460$, respectively, $p > 0.05$, Figure 6-C).

Insert Figure 6

4. Discussion

The main result in this study was that CCI model causes thermal and mechanical hyperalgesia until at least 30 days after the surgery. On the other hand, the anodal tDCS treatment was able to relieve this nociceptive behavior until at least 7 days after the end of treatment. In addition, we found that the CCI model triggered increased levels of IL-1 β and IL-10 in the central nervous system (cerebral cortex and spinal cord) at long lasting time analyzed; which were totally or partially reversed by anodal tDCS. Interestingly, we observed

that the anodal tDCS in sham neuropathic pain animal decreased the IL-10 levels in the spinal cord in relation to sham neuropathic pain model plus sham tDCS only at short time (48 hours). Furthermore, the anodal tDCS plus neuropathic pain model increased the TNF- α levels in the cerebral cortex and spinal cord only at 7 days after the end of tDCS sessions.

Firstly, we need to highlight that the establishment of neuropathic pain induced by the CCI model was assessed using a time course (7 and 14 days after surgery) of nociceptive behavior like thermal and mechanical threshold; we observed that nociceptive behavior was pronounced and significant different only at 14 days corroborating previous studies (39,40). However, some data from the literature are controversy in relation to establishment of neuropathic pain using CCI model, showing early increased nociceptive response after the procedure (41–43).

Additionally, we found that the CCI model presented increased in the cerebral cortex and spinal cord IL-1 β levels 24 until approximately 30 days after the surgery. In the same way, a recent study showed elevated IL-1 β expression in sciatic nerve, dorsal root ganglion and spinal cord using a time course, all those levels were increased after 7 days and remained until at least 21 days after the CCI model (44). It is interesting to note that IL-1 β has an important role in the induction and the maintenance of neuropathic pain caused by peripheral nerve injury in rodents (45). Neuropathic pain is characterized by hyperalgesia and allodynia (4); and it was demonstrated that the intrathecal administration of IL-1 β induces both thermal and mechanical hyperalgesia (46,47).

Previous study showed that neuropathic pain conditions can be linked to the imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines (48). In the present study, we observed elevated IL-10 levels in the cerebral cortex and spinal cord after the CCI model at long-term assessed approximately 30 days after the injury. The IL-10 presented a classical anti-inflammatory role (49); and this interleukin appears to be involved with the development of neuropathic pain, since increased IL-10 expression was found after peripheral nerve injury (50–52) and elevated patterns IL-10 were found over at least 6 weeks after induction of neuropathic pain model (53).

The neuropathic pain is related to maladaptive neuroplastic process in the nervous system (10); thus, at the present neuromodulatory techniques, such as tDCS, have been showed as modulators of these plastic changes with potential therapeutic effects (29). Our main findings showed that anodal tDCS treatment reduces the nociceptive responses in the neuropathic pain model at short- and long-term. The thermal hypersensitivity was totally reversed by anodal tDCS treatment at immediately and 24 hours of the last session; however,

at 7 days after the end of treatment, this effect was not so pronounced. At the same time, we observed that the anodal tDCS treatment partially reversed the mechanical hypersensitivity at immediately, at 24 hours and at 7 days of the last session. It is need to consider that the thermal withdrawal latency evaluated by hot plate test is characterized as supraspinal response; while the mechanical withdrawal latency is linked firstly with spinal reflexes, and more complex behaviors, as vocal reaction, and it is dependent of supraspinal process (54). Our findings suggest that action response of anodal tDCS can be involved with the different fibers stimulated by those tests; while the thermal nociception is mediated by C- and A δ -fibers and the mechanical response is mediated by A β fibers (55). Furthermore, it has been showed that a subpopulation of A β primary afferent neurons came to express substance P after conditioning inflammation, thereby enhancing synaptic transmission in the spinal cord and exaggerating the central response to innocuous stimuli (56,57).

Our previous research using rats confirmed immediate and long-lasting effects after repeat sessions of anodal tDCS treatment on chronic inflammation (22) and hyperalgesia induced by chronic restraint stress models (23). Despite the main action mechanisms of anodal tDCS remains unclear, studies suggest that it can be involved with nerve fiber orientation (58), depolarization of the neural membrane (59,60) and changes in the cortico-striato-thalamo-cortical connectivity (61). In addition, data from literature suggest that tDCS effects depend on projection of fibers from the motor cortex to other structures involved in pain processing, such as the thalamus and brainstem nuclei that downregulate processing from sensitized neurons (62,63). Moreover, the effects of tDCS might be similar to those observed in long-term potentiation (LTP), as demonstrated in an animal study that used anodal motor cortex stimulation (64); and it can be explained at least in part our findings, the long-lasting anti-nociceptive effects after 8 sessions of the anodal tDCS treatment.

The development and maintenance of neuropathic pain processes involve not only neuronal pathways, but also Schwann cells, satellite cells in the dorsal root ganglia, components of the peripheral immune system and spinal microglia (5). The excess of glutamate in the intracellular space result from a positive feedback between glia and neurons, it is suggested as part of the mechanisms in the neuropathic pain (65). There is an increasing evidence of the relationship between tDCS neuromodulation and the activation of the immune system, and the effects of this technique are neuronally and non-neuronal driven (66).

As described above, neuropathic pain process are involved with the imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines: increased levels of pro-inflammatory (TNF- α , IL-2 and IL-6) and decreased levels of anti-inflammatory (IL-10 and IL-4) (67–69); however,

the pain characteristics of the patients can present an unexpected response, such as increased levels of anti-inflammatory cytokines (68). Our data demonstrated that anodal tDCS reduced the IL-1 β levels in the spinal cord at short and long time; and this technique partially reversed the IL-10 levels at the same structure. However, it did not present effects in other structures of central nervous system (cerebral cortex and brainstem). One interesting finding in the present study was that anodal tDCS was able to reduce the IL-10 levels in sham neuropathic pain animals at short time. A recent study showed that cathodal and anodal tDCS triggered a pro-inflammatory effect, thus modulating the neuroinflammation pathway (70). There are few researches in the literature assessing the inflammatory effects induced by tDCS in this pathological condition and in specific brain structures.

Thus, anodal tDCS is a neuromodulatory technique able to promote plastic changes and it has been studied in different pain conditions, its mechanism is not fully understood; however our findings highlight the interaction of the immune system and the neural circuitry in the pain relief promoted by tDCS. In addition, the tDCS-induced potent neuroplastic changes in animal (71) and human models (64). In this context, the anodal tDCS treatment promoted the increase levels of TNF- α in animals submitted to CCI model only at long-term in cerebral cortex and spinal cord. This cytokine plays a typical pro-inflammatory function (72) and its elevation occurs only at 14 days after the CCI model (44,73); in the opposite of that, several studies has been demonstrated the involvement of TNF- α in plasticity and neuroprotection under pathological conditions (74–76). At the present work, the anodal tDCS improves the nociceptive response and modulate specific cytokines (IL-1 β , IL-10 and TNF- α); however, the entire relief of pain symptoms are intricated link to the cytokine cascade involved in the development and maintenance of neuropathic pain.

5. Conclusion

In summary, we showed that anodal tDCS is effective to relieve neuropathic pain and modulate cytokine in CCI rat model, and its effect is observed at long-term. Additionally, we observed an important role of the central immune system in the neuropathic process, which can be involved with the maladaptative neuroplastic changes. Considering all those alterations, to achieve a constant beneficial with non-pharmacological and non-invasive treatment, this intervention needs to modulate the entire signaling pathway. Furthermore, it is necessary the development of new studies to elucidate the fully mechanisms of anodal tDCS, increasing knowledge about the immediate and delayed effects of this technique.

Acknowledgements

This study was supported by the following Brazilian funding agencies: the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (I.L.S. Torres, L.F. Medeiros, V. L. Scarabelot, J. Rozisky); the Committee for the Improvement of Higher Education Personnel, CAPES (P.R.M. Filho, C. de Oliveira, L. Adachi, R. Vercelino); the Graduate Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, GPPG (I.L.S. Torres, Grant 120514). FAPERGS/PRONEM (Dr. I.L.S. Torres, grant no. 11/2050), MCT/FINEP – COENG/2013.

References

1. Harden N, Cohen M. Unmet needs in the management of neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage*. 2003;25(5):12–7.
2. Van Hecke O, Austin SK, Khan R a, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain*. International Association for the Study of Pain; 2014 Apr;155(4):654–62.
3. Smith BH, Torrance N. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. *Curr Pain Headache Rep*. 2012 Jun;16(3):191–8.
4. Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol*. Elsevier Ltd; 2010 Aug;9(8):807–19.
5. Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*. 2007 Nov;10(11):1361–8.
6. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*. 1999 Jun 5;353:1959–64.
7. Baron R. Mechanisms of Disease: neuropathic pain. *Nat Clin Pract*. 2006;2(2):95–106.
8. Binshtok AM, Wang H, Zimmermann K, Amaya F, Shi L, Brenner GJ, et al. Nociceptors Are Interleukin-1 β Sensors. *J Neurosci*. 2009;28(52):14062–73.
9. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*. 2009 Jan;32:1–32.
10. Jensen TS, Finnerup NB. Neuropathic pain: Peripheral and central mechanisms. *Eur J Pain Suppl*. European Federation of Chapters of the International Association for the Study of Pain; 2009 Nov 6;3(S2):33–6.
11. Bruguerolle B, Labrecque G. Rhythmic pattern in pain and their chronotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007. p. 883–95.
12. Zaghi S, Heine N, Fregni F. Brain stimulation for the treatment of pain: A review of costs, clinical effects, and mechanisms of treatment for three different central neuromodulatory approaches. *J Pain Manag*. 2009;2(3):339–52.
13. Fritsch B, Reis J, Martinowich K, Schambra HM, Ji Y, Cohen LG, et al. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: Potential implications for motor learning. *Neuron*. 2010;66(2):198–204.
14. Lang N, Siebner HR, Ward NS, Lee L, Nitsche M a, Paulus W, et al. How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? *Eur J Neurosci*. 2005 Jul;22(2):495–504.

15. Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJL, Rocha RR, Natalle L, et al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2006 Dec;54(12):3988–98.
16. Fregni F, Freedman S, Pascual-leone A. Recent advances in the treatment of chronic pain with non-invasive brain stimulation techniques. *Lancet Neurol.* 2007;6:188–91.
17. Antal A, Terney D, K?hnl S, Paulus W. Anodal Transcranial Direct Current Stimulation of the Motor Cortex Ameliorates Chronic Pain and Reduces Short Intracortical Inhibition. *J Pain Symptom Manage.* 2010;39:890–903.
18. Liebetanz D, Klinker F, Hering D, Koch R, Nitsche MA, Potechka H, et al. Anticonvulsant effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy. *Epilepsia.* 2006;47:1216–24.
19. Dockery C, Liebetanz D, Birbaumer N, Malinowska M, Wesierska MJ. Cumulative benefits of frontal transcranial direct current stimulation on visuospatial working memory training and skill learning in rats. *Neurobiol Learn Mem.* Elsevier Inc.; 2011 Oct;96(3):452–60.
20. Li Y, Tian X, Qian L, Yu X, Jiang W. Anodal transcranial direct current stimulation relieves the unilateral bias of a rat model of Parkinson’s disease. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2011;765–8.
21. Wachter D, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Taghizadeh-Waghefi A, Nitsche M a, Kutschenko A, et al. Transcranial direct current stimulation induces polarity-specific changes of cortical blood perfusion in the rat. *Exp Neurol.* 2011 Feb;227(2):322–7.
22. Laste G, Caumo W, Adachi LNS, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PRM, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp brain Res.* 2012 Aug;221(1):75–83.
23. Adachi LS, Caumo W, Laste G, Medeiros LF, Rozisky JR, de Souza A, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res.* Elsevier; 2012 Dec 13;1489:17–26.
24. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eight.* Washington, D.C.: The National Academies Press; 2011.
25. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010 Jan;8(6):1–6.
26. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain.* 1988 Apr;33(1):87–107.
27. Adachi LS, Caumo W, Laste G, Fernandes L, Ripoll J, Souza A De, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res.* Elsevier; 2012;1489:17–26.

28. Takano Y, Yokawa T, Masuda A, Niimi J, Tanaka S, Hironaka N. A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. *Neurosci Lett*. Elsevier Ireland Ltd; 2011 Mar 10;491(1):40–3.
29. Nitsche M a, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul*. 2008 Jul;1(3):206–23.
30. Antal A, Nitsche M a, Paulus W. Transcranial direct current stimulation and the visual cortex. *Brain Res Bull*. 2006 Feb 15;68(6):459–63.
31. Rosen A, Ramkumar M, Nguyen T, Hoeft F. Noninvasive Transcranial Brain Stimulation and Pain. *Curr Pain Headache Rep*. 2009;13(1):12–7.
32. Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJL, Rocha RR, Natalle L, et al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 2006 Dec;54(12):3988–98.
33. Woolfe G, MacDonald AD. The Evaluation of the Analgesic Action of Pethidine Hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exper Ther*. 1944;133:300–7.
34. Ossipov MH, Kovelowski CJ, Nichols ML, Hruby VJ, Porreca F. Characterization of supraspinal antinociceptive actions of opioid delta agonists in the rat. *Pain*. 1995 Sep;62(3):287–93.
35. Caggiula AR, Epstein LH, Perkins KA, Saylor S. Different methods of assessing nicotine-induced antinociception may engage different neural mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995 Dec;122(3):301–6.
36. Rubinstein M, Mogil JS, Japón M, Chan EC, Allen RG, Low MJ. Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking beta-endorphin by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 30;93(9):3995–4000.
37. Netto CA, Siegfried B, Izquierdo I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol*. 1987 Sep;48(2):304–9.
38. Vivancos GG, Verri WA, Cunha TM, Schivo IRS, Parada CA, Cunha FQ, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian J Med Biol Res*. 2004 Mar;37(3):39139–9.
39. Jaggi AS, Singh N. Exploring the potential of telmisartan in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol*. Elsevier B.V.; 2011 Sep 30;667(1-3):215–21.
40. Balasubramanyan S, Stemkowski PL, Stebbing MJ, Smith A, Lu VB, Colmers WF, et al. Sciatic Chronic Constriction Injury Produces Cell-Type-Specific Changes in the Electrophysiological Properties of Rat Substantia Gelatinosa Neurons Sciatic Chronic

- Constriction Injury Produces Cell-Type-Specific Changes in the Electrophysiological Propert. *J Neurophysiol.* 2006;96:579–90.
41. Valsecchi AE, Franchi S, Panerai AE, Sacerdote P, Trovato AE, Colleoni M. Genistein, a natural phytoestrogen from soy, relieves neuropathic pain following chronic constriction sciatic nerve injury in mice: anti-inflammatory and antioxidant activity. *J Neurochem.* 2008 Oct;107(1):230–40.
 42. Kukkar A, Singh N, Jaggi AS. Attenuation of neuropathic pain by sodium butyrate in an experimental model of chronic constriction injury in rats. *J Formos Med Assoc. Elsevier Taiwan LLC;* 2013 Jul 16;1–8.
 43. Ignatowski TA, Covey WC, Knight PR, Severin CM, Nickola TJ, Spengler RN. Brain-derived TNF-alpha mediates neuropathic pain. *Brain Res.* 1999;841:70–7.
 44. Sacerdote P, Franchi S, Moretti S, Castelli M, Procacci P, Magnaghi V, et al. Cytokine Modulation is Necessary for Efficacious Treatment of Experimental Neuropathic Pain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8:202–11.
 45. Honore P, Wade CL, Zhong C, Harris RR, Wu C, Ghayur T, et al. Interleukin-1alpha gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav Brain Res.* 2006 Feb 28;167(2):355–64.
 46. Reeve A, Patel S, Fox A, Walker K, Urban L. Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur J Pain.* 2000;4(3):247–57.
 47. Sung C-S, Wen Z-H, Chang W-K, Ho S-T, Tsai S-K, Chang Y-C, et al. Intrathecal interleukin-1beta administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. *Brain Res.* 2004 Jul 23;1015(1-2):145–53.
 48. Austin PJ, Moalem-taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol. Elsevier B.V.;* 2010;229(1-2):26–50.
 49. Moore KW, Malefyt RDW, Robert L, Garra AO. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;1:683–765.
 50. Jancalék R, Dubový P, Svízenská I, Klusáková I. Bilateral changes of TNF-alpha and IL-10 protein in the lumbar and cervical dorsal root ganglia following a unilateral chronic constriction injury of the sciatic nerve. *J Neuroinflammation.* 2010 Jan;7:11.
 51. Jancalék R, Svizenska I, Klusakova I, Dubovy P. Bilateral changes of IL-10 protein in lumbar and cervical dorsal root ganglia following proximal and distal chronic constriction injury of peripheral nerve. *Neurosci Lett. Elsevier Ireland Ltd;* 2011 Aug 26;501(2):86–91.

52. Ruohonen S, Jagodi M, Khademi M, Taskinen H, Ojala P, Olsson T, et al. Contralateral non-operated nerve to transected rat sciatic nerve shows increased expression of IL-1h, TGF-h1, TNF-alpha, and IL-10. *J Neuroimmunol.* 2002;132:11–7.
53. Okamoto K, Martin DP, Schmelzer JD, Mitsui Y, Low PA. Pro- and Anti-inflammatory Cytokine Gene Expression in Rat Sciatic Nerve Chronic Constriction Injury Model of Neuropathic Pain. *Exp Neurol.* 2001;169:386–91.
54. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53(4):597–652.
55. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 1999 Jan;57(1):1–164.
56. Ma QP, Woolf CJ. Progressive tactile hypersensitivity: an inflammation-induced incremental increase in the excitability of the spinal cord. *Pain.* 1996 Sep;67(1):97–106.
57. Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Wolff C. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature.* 1996;384:360–4.
58. Holsheimer J, Nguyen J, Lefaucheur J, Manola L. Cathodal , anodal or bifocal stimulation of the motor cortex in the management of chronic pain? *Acta Neurochir Suppl.* 2007;97:57–66.
59. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol.* 2000;527 Pt 3:633–9.
60. Nitsche M, Paulus W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology.* 2001;57(10):1899–901.
61. Polanía R, Paulus W, Nitsche M a. Modulating cortico-striatal and thalamo-cortical functional connectivity with transcranial direct current stimulation. *Hum Brain Mapp.* 2012 Oct;33(10):2499–508.
62. Drouot X, Nguyen J, Peschanski M, Lefaucheur J, Mondor AH. The antalgic efficacy of chronic motor cortex stimulation is related to sensory changes in the painful zone. *Brain.* 2002;125:1660–4.
63. Lefaucheur JP. The use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in chronic neuropathic pain. *Neurophysiol Clin.* 2006;36(3):117–24.
64. Fritsch B, Reis J, Martinowich K, Schambra HM, Ji Y, Cohen LG, et al. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: Potential implications for motor learning. *Neuron.* 2011;66(2):198–204.
65. Fields D. New Culprits in Chronic Pain. *Sci Am.* 2009;(301):50–7.

66. Ruohonen J, Karhu J. tDCS possibly stimulates glial cells. *Clin Neurophysiol. International Federation of Clinical Neurophysiology*; 2012 Oct;123(10):2006–9.
67. Uçeyler N, Eberle T, Rolke R, Bircklein F, Sommer C. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. *Pain*. 2007 Nov;132(1-2):195–205.
68. Uçeyler N, Rogausch JP, Toyka K V, Sommer C. Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. *Neurology*. 2007 Jul 3;69(1):42–9.
69. Davies AL, Hayes KC, Dekaban G a. Clinical correlates of elevated serum concentrations of cytokines and autoantibodies in patients with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2007 Nov;88(11):1384–93.
70. Rueger MA, Keuters MH, Walberer M, Braun R, Klein R, Sparing R, et al. Multi-session transcranial direct current stimulation (tDCS) elicits inflammatory and regenerative processes in the rat brain. *PLoS One*. 2012 Jan;7(8):e43776.
71. Brunoni AR, Fregni F, Pagano RL. Translational research in transcranial direct current stimulation (tDCS): a systematic review of studies in animals. *Rev Neurosci*. 2011 Jan;22(4):471–81.
72. Moore KW, O’Garral A, Malefyt R de W, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165–90.
73. George A, Schmidt C, Weishaupt A, Toyka K V, Sommer C. Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. *Exp Neurol*. 1999 Nov;160(1):124–32.
74. Figiel I. Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2008 Jan;68(4):526–34.
75. Carlson NG, Wieggl W a, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC. Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J Immunol*. 1999 Oct 1;163(7):3963–8.
76. Dolga AM, Granic I, Blank T, Knaus H-G, Spiess J, Luiten PGM, et al. TNF-alpha mediates neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity via NF-kappaB-dependent up-regulation of K2.2 channels. *J Neurochem*. 2008 Nov;107(4):1158–67.

Legends

Figure 1. Panel A: tDCS electrode placement. The cathodal stimulus electrode was positioned at the midpoint of the lateral angle of the eyes, and the anodal electrode is positioned over the neck and shoulder areas. Panel B: tDCS stimulation procedure. The stimulator was placed onto the thorax with a corset and the electrodes were fixed onto the rat's head. Adapted from Adachi et al.(147).

Figure 2. Thermal hyperalgesia: basal measure, 14 days after the CCI model, immediately, 24 hours and 7 days after the end of anodal tDCS treatment on evaluated with the Hot plate test (n=5-6 per group). Data presented as mean±S.E.M of latency in seconds (s). (CT) control; (SN) sham neuropathic pain; (SNS) sham neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (SNT) sham neuropathic pain plus tDCS treatment; (NP) neuropathic pain model; (NPS) neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (NPT) neuropathic pain plus tDCS treatment.

** significant difference between NP, NPS, and NPT groups and CT, SNS and SNT groups (GEE, $p < 0.05$).

δ significant difference from CT and NPS groups at 7 days after the CCI model (GEE, $p < 0.05$).

significant difference between NP, NPS and NPT groups and CT, SN, SNS and SNT groups at 14 days after the CCI model (GEE, $p < 0.05$).

* significant difference between NP and NPS groups and CT, SN, SNS, SNT and NPT groups (GEE, $p < 0.05$).

§ significant difference between NPT group and CT, SN, SNS, SNT, NP and NPS groups at (GEE, $p < 0.05$).

Figure 3. Mechanical hyperalgesia: basal measure, 14 days after the CCI model, immediately, 24 hours and 7 days after the end of anodal tDCS treatment evaluated in the von Frey test (n=5-6 per group). Data presented as mean±S.E.M of paw withdrawal threshold in grams (g). (CT) control; (SN) sham neuropathic pain; (SNS) sham neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (SNT) sham neuropathic pain plus tDCS treatment; (NP) neuropathic pain model; (NPS) neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (NPT) neuropathic pain plus tDCS treatment.

significant difference between NP, NPS and NPT groups and CT, SN, SNS and SNT groups (GEE, $p < 0.05$).

* significant difference between NP and NPS groups and CT, SN, SNS, SNT and NPT groups (GEE, $p < 0.05$).

§ significant difference between NPT and other groups (GEE, $p < 0.05$).

Figure 4. IL-1 β levels in the structures of the central nervous system (n=5-6 per group). Data are expressed as percentage of control mean \pm S.E.M (pg/mg of protein). (CT) control; (SN) sham neuropathic pain; (SNS) sham neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (SNT) sham neuropathic pain plus tDCS treatment; (NP) neuropathic pain model; (NPS) neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (NPT) neuropathic pain plus tDCS treatment.

Panel A. IL-1 β levels in cerebral cortex.

* significant difference from CT, SN, SNS and SNT groups (one-way ANOVA/ SNK, $p < 0.05$).

Panel B. IL-1 β levels in spinal cord.

* significant difference from CT, SN, SNS, SNT and NPT (one-way ANOVA/ SNK, $p < 0.05$).

Panel C. IL-1 β levels in braistem. There is no difference between the groups in both times (one-way ANOVA/ SNK, $p > 0.05$).

Figure 5. IL-10 levels in the structures of the central nervous system (n=5-6 per group). Data are expressed as percentage of control mean \pm S.E.M (pg/mg of protein). (CT) control; (SN) sham neuropathic pain; (SNS) sham neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (SNT) sham neuropathic pain plus tDCS treatment; (NP) neuropathic pain model; (NPS) neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (NPT) neuropathic pain plus tDCS treatment.

Panel A. IL-10 levels in cerebral cortex.

* significant difference from CT, SN, SNS and SNT groups (one-way ANOVA/ SNK, $p < 0.05$).

Panel B. IL-10 levels in spinal cord.

* significant difference from CT, SN, SNS, SNT and NPT groups (one-way ANOVA/ SNK, $p < 0.05$).

§ significant difference from SNS group (one-way ANOVA/ SNK, $p < 0.05$).

Panel C. IL-10 levels in braistem. There is no difference between the groups in both times (one-way ANOVA/ SNK, $p > 0.05$).

Figure 6. TNF- α levels in the structures of the central nervous system (n=5-6 per group). Data are expressed as percentage of control mean \pm S.E.M (pg/mg of protein). (CT) control; (SN) sham neuropathic pain; (SNS) sham neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (SNT) sham neuropathic pain plus tDCS treatment; (NP) neuropathic pain model; (NPS) neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (NPT) neuropathic pain plus tDCS treatment.

Panel A. TNF- α levels in cerebral cortex.

* significant difference from other groups (one-way ANOVA/ SNK, $p < 0.05$).

Panel B. TNF- α levels in spinal cord.

* significant difference from other groups (one-way ANOVA/ SNK, $p < 0.05$).

Panel C. TNF- α levels in brainstem. There is no difference between the groups in both times (one-way ANOVA/ SNK, $p > 0.05$).

Figures

Figure 1

Panel A



Panel B



Figure 2

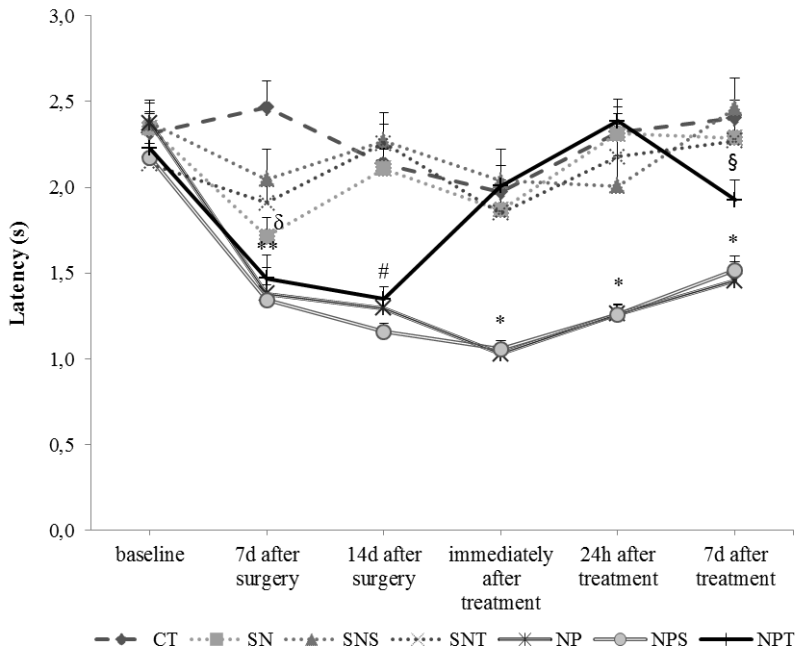


Figure 3

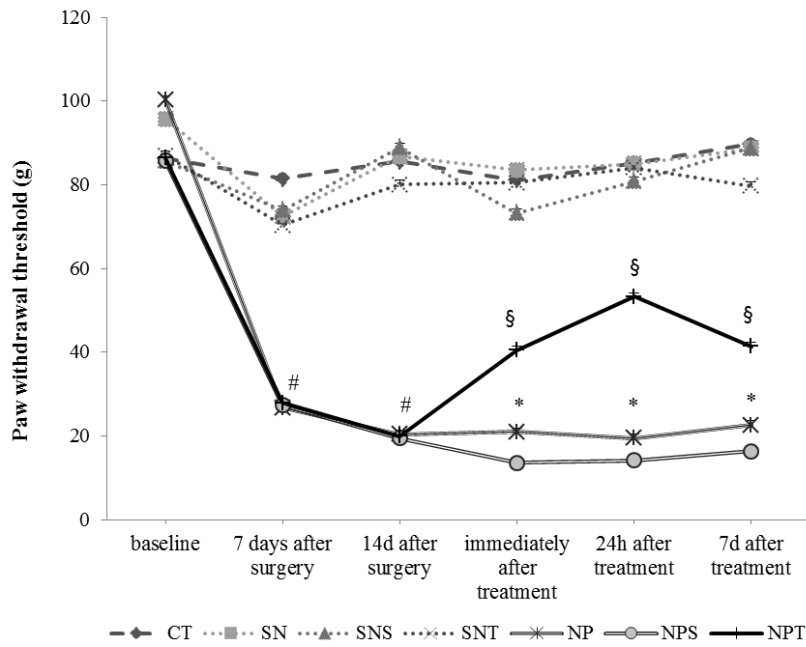
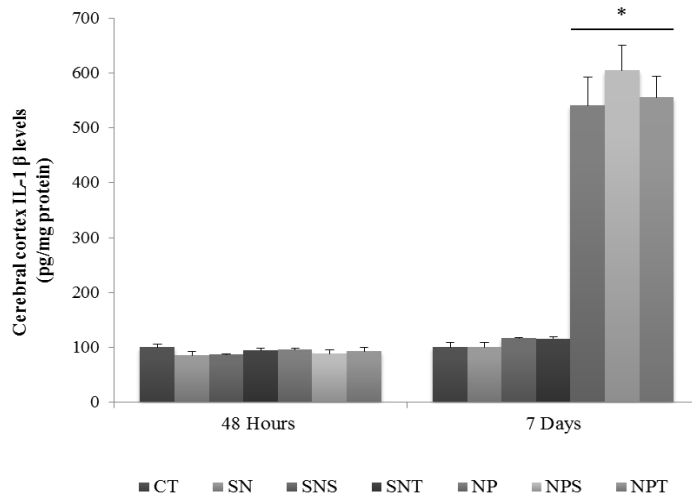
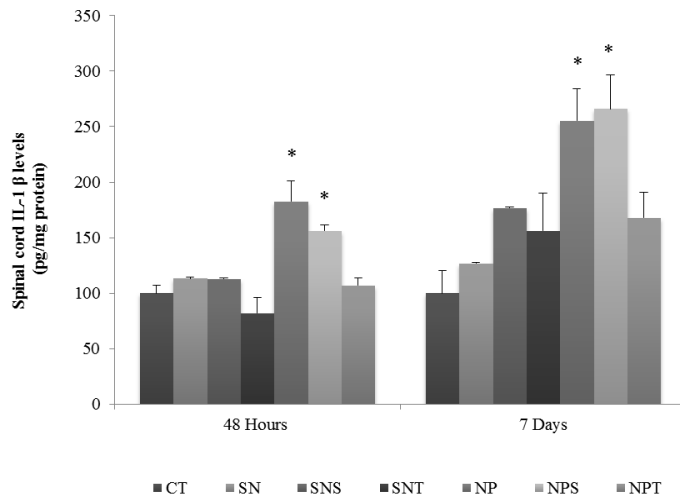


Figure 4

Panel A



Panel B



Panel C

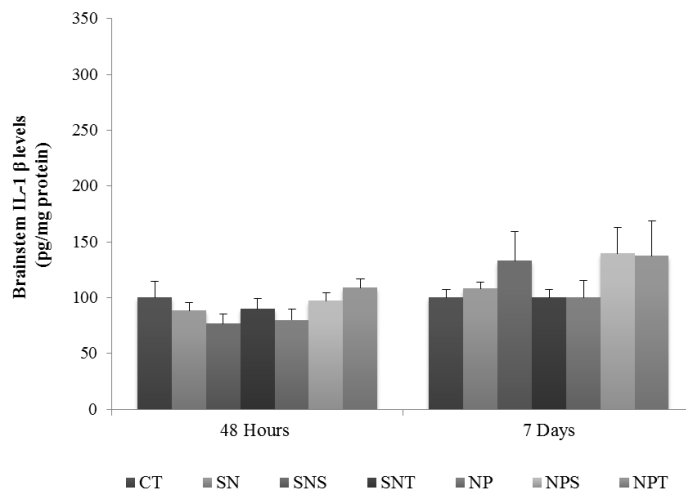
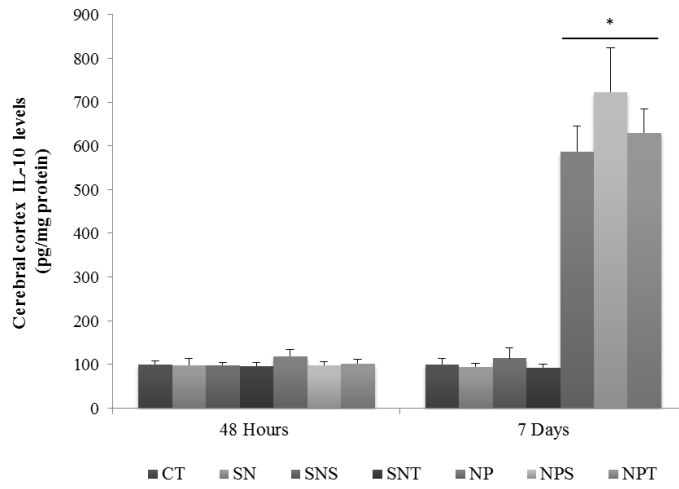
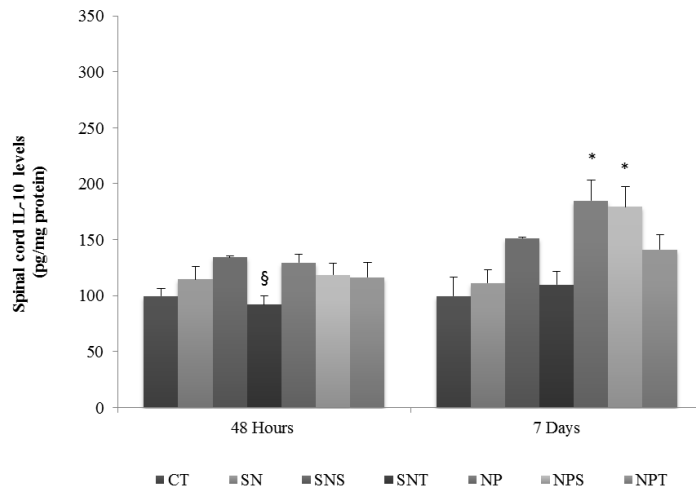


Figure 5

Panel A



Panel B



Panel C

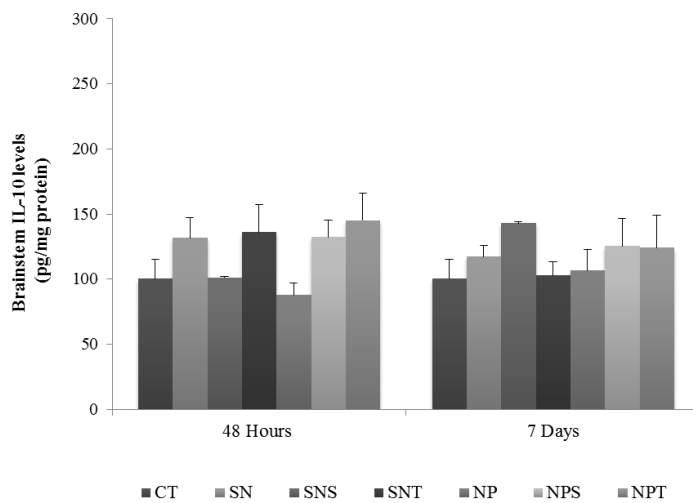
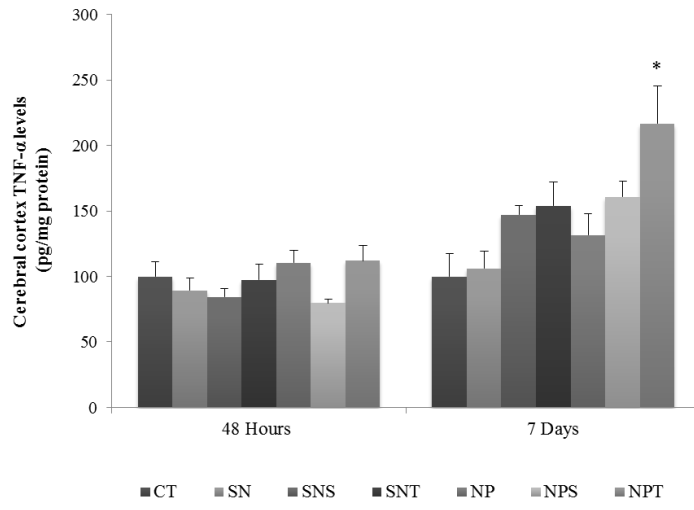
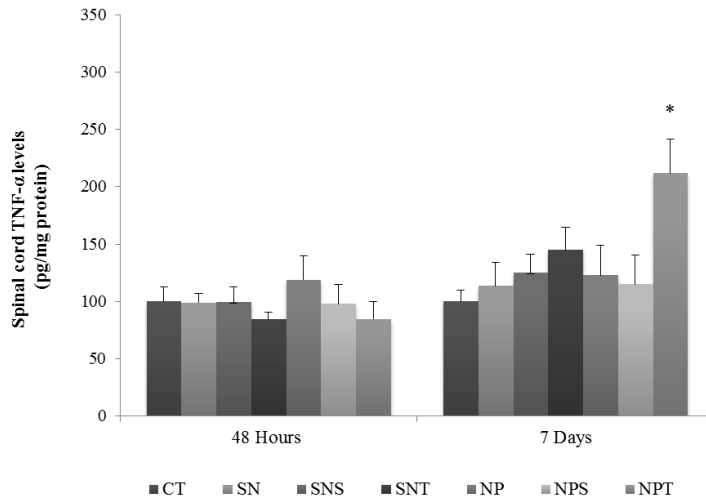


Figure 6

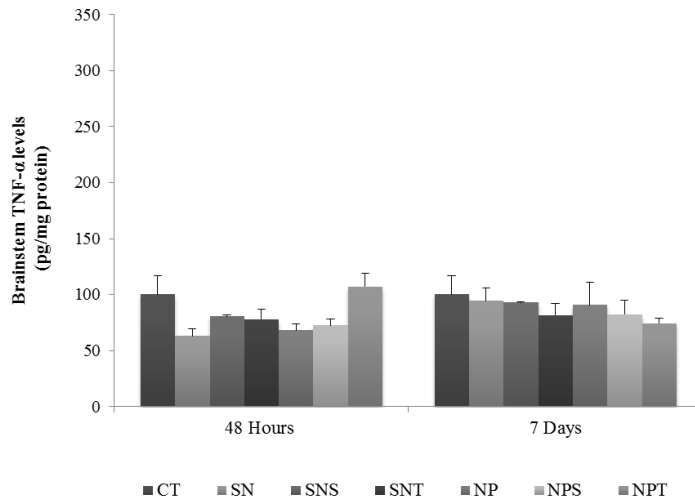
Panel A



Panel B



Panel C



Artigo 2

TRANSCRANIAL DIRECT CURRENT STIMULATION (tDCS) DID NOT
REVERT THE INCREASED CENTRAL NGF LEVELS INDUCED BY NEUROPHATIC
PAIN IN RATS

Periódico: Neuroscience Letters

Status: A ser submetido

TRANSCRANIAL DIRECT CURRENT STIMULATION (tDCS) DID NOT REVERT THE INCREASED CENTRAL NGF LEVELS INDUCED BY NEUROPATHIC PAIN IN RATS

Stefania Giotti Cioato^{1,3,4}, Liciane Fernandes Medeiros^{3,4}, Paulo Ricardo Marques Filho^{1,3,4}, Rafael Vercelino^{2,3,4}, Andressa de Souza^{1,3,4}, Vanessa Leal Scarabelot^{2,3,4}, Carla de Oliveira^{1,3,4}, Lauren Naomi Spezia Adachi^{1,3,4}, Wolnei Caumo^{1,3,4}, Iraci LS Torres^{1,2,3,4*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, Brazil.

³Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Modelos Animais, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050–170, Porto Alegre, Brazil.

⁴Unidade de Experimentação Animal, Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

Conflict of Interest: There was no financial interest between any of the authors or any commercial interest in the outcome of this study.

* Corresponding author:

Iraci Lucena da Silva Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 0055-51 3316 3183; FAX: 0055-51 3316 3121.

E-mail: iracitorres@gmail.com

ABSTRACT

Peripheral nerve injury causes alterations in the expression of neurotrophins levels and their cellular receptors in the peripheral and central nervous systems. The nerve growth factor (NGF) role in neuropathic pain (NP) has been difficult to define. However, the expression of NGF in the large-size neurons may present an essential role in the neuronal synaptic plasticity and re-organization of neuronal function after a nerve injury. The transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive method of cerebral stimulation and represents a promising resource to pain management since it promote neuroplasticity in the central system of pain and can be combined with other interventions. The aim of this study was to investigated the the effects of tDCS in the NGF levels in different central nervous system structures of rats submitted to a NP model. All experiments and procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (GPPG-HCPA No.120512) and performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th ed. The chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve was used for the induction of NP. For sham surgery, the sciatic nerve was exposed similarly, but it was not ligated. The control group did not undergo surgical procedure. After the establishment of NP, the rats of treated groups were subjected to a 20 minutes session of anodal tDCS, every afternoon for eight days. The direct constant current of 0.5 mA intensity was delivered from a battery-driven, constant current stimulator, using ECG electrodes with conductive adhesive hydrogel. The NGF levels on cerebral cortex and spinal cord were determined by sandwich-ELISA at 48 hours and 7 days after the end of treatment. Data were expressed as the mean±standard error of the mean (S.E.M). Three-way ANOVA was used to compare the data. *P*-values less than 0.05 were considered significant. SPSS 19.0 for Windows was used for Statistical analysis The CCI model increased NGF levels in cerebral cortex and spinal cord at long-lasting time, evidencing the important feature of this neurotrophin in neuropathic pain condition. On the other hand, there was not effect of tDCS treatment in the central NGF levels suggesting no participation this neurotrofin in the analgesic tDCS effect.

Keywords: neuropathic pain, anodal tDCS, NGF, rats

1 INTRODUCTION

Neurotrophic factors are defined as endogenous substance that acts in the development, maintenance and regeneration of the nervous system (1). Peripheral nerve injury causes alterations in the expression of neurotrophins levels and their cellular receptors in the peripheral and central nervous system. Furthermore, a change in the neurotrophin signaling seems to be fundamental in peripheral nerve regeneration and in neuropathic pain development (2).

The nerve growth factor (NGF) is a neurotrophin produced and secreted by cells of the target tissue, then taken up by sympathetic and small sensory fibres through a tyrosine-kinase A receptor (trkA), and retrogradely transported (1). The role of NGF in neuropathic pain has been difficult to define; studies have been proposed an exacerbating and alleviating effects of this neurotrophin in rodent models (3–5). Moreover, the expression of NGF in the large-size neurons may present an essential role in neuronal synaptic plasticity and re-organization of neuronal function after a nerve injury (6).

In this context, a technique that can modulate focally induced plastic changes in pain-related neural networks, such as transcranial direct current stimulation (tDCS), may have significant therapeutic effects (7). Previous studies of our research group showed long-lasting analgesic effects after repeated sessions of anodal tDCS on chronic inflammation (8), hyperalgesia induced by chronic restraint stress models (9), and in the chronic constriction injury of sciatic nerve (Cioato et al, personal communication).

In addition, studies in animal and cellular models demonstrated that tDCS is able to modulating synaptic transmission, molecular biosynthesis, and neuronal morphology. Several neurotransmission systems are involved in its effects; however, the main mechanisms of this technique are not completely understood (10). Considering the importance of non-invasive therapies to management of neuropathic pain conditions and the need to identify the mechanisms tDCS, the aim of this study was investigated the the effects of tDCS in the NGF levels in the central nervous system structures of rats submitted to a NP model.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

A total of 84 adult male Wistar rats (55-65 days-old; weighing 200–250 g) were used. Animals were randomized by weight and housed in three animals per home cages made of polypropylene material (49 cm x 34cm x 16cm) with the floor covered with sawdust. All animals were maintained in a controlled environment ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), under a standard light-dark cycle (lights-on at 07:00 h and lights-off at 19:00 h), with water and chow (Nuvital, Porto Alegre/ Brazil) available *ad libitum*. All experiments and procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (GPPG-HCPA protocol No.120512) and performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th ed. (2011)(11). The experimental protocol complied with the ethical and methodological standards of the ARRIVE guidelines (12). The experiment used the number of animals necessary to produce reliable scientific data. To control the possible effect of outliers, animals that did not present behavioral responses were excluded.

2.2 Neuropathic pain model

The chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve described by Bennett & Xie (1988) (13) was used as a model for the induction of neuropathic pain. Rats were anesthetized with isoflurane (5% for induction, 2.5% maintenance) and placed in dorsal position for the realization of the left thigh trichotomy and skin antisepsis with 2 % iodine alcohol. After skin incision of the left hind limb, in the middle third of the thigh to expose the femoral biceps muscle, the common sciatic nerve was exposed and three ligatures were tied (Vycril 4.0) separated by an interval of 1 mm, thus the length of nerve affected was approximately 5.0 mm. The ligatures reduced the diameter of the nerve by a just noticeable amount, but did not interrupt the epineurial circulation. To ensure equal level of constriction, the same investigator performed the ligatures in all rats. Finally, the skin was sutured using Mononylon 4.0 thread. For sham surgery, the sciatic nerve was exposed similarly to CCI model, but it was not ligated. After surgery and anesthetic recovery, the animals were allowed in their home cages where they will remain until the day of death. The control group did not undergo surgical procedure.

2.3 tDCS

After the establishment of neuropathic pain, the animals of active treatment group were subjected to a 20 minutes session of anodal tDCS, every afternoon for eight days, as described by Adachi et al. (2012) (14). The direct constant current of 0.5 mA intensity was delivered from a battery-driven, constant current stimulator, using ECG electrodes with conductive adhesive hydrogel. Rats' heads were shaved for better adherence and the electrodes were trimmed to 1.5 cm² for better fit. After placement, electrodes were fixed onto the head with adhesive tape (Micropore™) and covered with a protective mesh to prevent removal.

The cathodal electrode was positioned at the midpoint between the lateral angles of both eyes (supraorbital area) and the anodal electrode was placed on the head using landmarks of the neck and shoulder lines as a guide (the anterior and posterior regions in the midline between the two hemispheres of the parietal cortex, as described by Takano et al. (2011) (15). This technique mimics humans tDCS protocols to pain treatment (16–19) and it has been applied by our research group showing longer-lasting effects on pain relief, and an antihyperalgesic response in paw inflamed rats (8). For sham stimulation, the electrodes were placed and fixed in the same positions as for real stimulation; however, the stimulator was turned off during the entire time.

2.2 Experimental Design

The rats were habituated to the maintenance room for one week before the experiment began. The animals were divided into the following seven groups: control (CT); sham neuropathic pain (SN); sham neuropathic pain plus sham tDCS treatment (SNS); sham neuropathic pain plus tDCS treatment (SNT); neuropathic pain model (NP); neuropathic pain plus sham tDCS treatment (NPS); neuropathic pain plus tDCS treatment (NPT). After the establishment of neuropathic pain, animals were subjected to a daily session of tDCS for eight consecutive days. The rats were killed by decapitation 48 hours and 7 days after the end of treatment (24th and 29th post-surgery day, respectively). All procedures were blind such that the experimenter did not know about the group of rat being tested.

2.7 Tissue collection

The animals were killed by decapitation 48 hours and 7 days after the last session of tDCS and the tissue samples (cerebral cortex and spinal cord) were collected. Structures were frozen at -80°C until assays were performed.

2.8 Biochemical assays

The NGF levels on cerebral cortex and spinal cord were determined by sandwich-ELISA using monoclonal antibodies specific for NGF (R&D Systems, Minneapolis, United States). Total protein was measured by Bradford's method using bovine serum albumin as standard.

2.9 Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M). We performed three-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni to compare all groups considering three independent factors (time, treatment and pain model). The values were presented as percentage of the control group. *P*-values less than 0.05 were considered significant. SPSS 19.0 for Windows was used for Statistical analysis.

3. Results

To confirm the establishment of neuropathic pain model, the nociceptive response was evaluated. There was not difference between groups at the baseline time from thermal and mechanical latency withdrawal; however at the fourth day after the CCI model these animals presented decreased latency withdrawal (data not show).

3.1 Cerebral cortex NGF level

We observed an interaction pain model *vs* time in the cerebral cortex NGF levels (Three-way ANOVA, $p < 0.05$, $F_{(1,69)} = 286.380$, Figure 1), with significant increase in the NGF levels at 29th post-surgery day when compared to 24th post-surgery day.

Insert Figure 1

3.2 Spinal cord NGF level

At the spinal cord, there were time and pain model effects (Three-way ANOVA, $p < 0.05$, $F_{(1,68)} = 9.258$ and $F_{(1,68)} = 10.776$, respectively, Figure 2). All animals presented increased levels of spinal cord NGF after the CCI surgery; however, its levels were significantly higher at 29th post-surgery day.

Insert Figure 2

4. Discussion

In this study, we found an interesting increase of NGF levels in the cerebral cortex approximately 30 days after the surgery. Furthermore, at the spinal cord, there was an increased NGF levels after the CCI model and the time presented an important factor to demonstrate this augmentation.

Preclinical models of inflammation and neuropathic pain and have been demonstrated that hyperalgesia presented by the animals is linked to the NGF (20–22). Additionally, clinical studies using healthy volunteers support the NGF role in the induction of abnormal pain states, such as mechanical and thermal hyperalgesia (23,24). Few evidences from literature show the NGF function in the central nervous system acting in the generation and maintenance of neuropathic pain CCI model.

It is interesting to highlight that we found increased NGF levels at long-lasting time after the CCI model. This effect was observed only at approximately 30 days after the neuropathic pain model in the cerebral cortex; however, increased levels were already showed at 24th day post-surgery with a progressively augmentation at 30th post-surgery in the spinal cord. Previous studies demonstrated the NGF role in some peripheral nerve injury models; after

unilateral sciatic nerve crush, higher synthesis of NGF was found in dorsal root ganglia (25) and after CCI model, the neuropathic pain was linked to a glial overexpression of NGF (26–28).

In the central nervous system, the production of NGF is through by glial cells, such as microglia (29) and oligodendrocytes (30); however the main source of NFG is the astrocytes (31,32). Several studies have been shown the complex interaction between the immune central system and neuropathic pain process (33–35). Our previous research (Cioato et al., personal communication) showed long-lasting increased levels of IL-1 β in central nervous structures, such as cerebral cortex and spinal cord; similar pattern of findigs were observed about NGF levels at same structures as demonstrated at the present study. It is suggested the action of NGF upon the immune axis, since it is characterized the presence of the TrkA receptor, corroborating the interaction between central nervous and immune systems (36).

Considering the challenge of the treatment to relief the pain symptoms in different neuropathic pain conditions, new therapeutics has been investigated. It has been studied in CCI model that treatment with anti-NGF is able to prevent and reverse the hyperalgesia and mechanical allodynia (28,37,38). Additionally, the anti-NGF treatment also can reverse neuropathic pain already established by both CCI and spared-nerve injury models (39).

It the present study, we proposed to comprehend the mechanisms of a new therapeutical tool for neuropathic pain; which is nowadays demonstrated efficacy in clinical (40–42) and preclinical studies (43,44). Despite the reversion of thermal and mechanical hyperalgesia after the CCI model through repeated anodal tDCS (Cioato et al., personal communication); we did not find a relationship between its effect and NGF pathway in the central nervous system.

Although the increasing evidence of NGF role in the induction and maintenance of neuropathic pain, few studies have been shown its central structures levels. Our results demonstrated the importance of NGF levels at cerebral cortex and spinal cord structures. On the other hand, we need to highlight some limitations of the present study: i) lack of a time-course of NGF levels since early stage post-surgery; ii) long-lasting evaluation of NGF levels; iii) assessment of NGF levels in the peripheral nerve and different structures of the central nervous system.

In summary, the CCI model increased NGF levels in cerebral cortex and spinal cord at long-lasting time, evidencing the important feature of this neurotrophin in neuropathic pain condition. Furthermore, evidences showed that anodal tDCS can modulate nociceptive

pathways; this effect it is not linked to the NGF signalling. New studies are necessary to elucidate the role of NGF central levels in neuropathic pain.

Acknowledgements

This study was supported by the following Brazilian funding agencies: the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (I.L.S. Torres, L.F. Medeiros, V. Scarabelot); the Committee for the Improvement of Higher Education Personnel, CAPES (P.R.M. Filho, C. de Oliveira, L. Adachi, R. Vercelino); the Graduate Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, GPPG (I.L.S. Torres, Grant 120514). FAPERGS/PRONEM (Dr. I.L.S. Torres, grant no. 11/2050), MCT/FINEP – COENG/2013.

References

1. Anand P. Nerve growth factor regulates nociception in human health and disease. *Br J Anaesth.* 1995;201–8.
2. Richner M, Ulrichsen M, Elmegaard SL, Dieu R, Pallesen LT, Vaegter CB. Peripheral Nerve Injury Modulates Neurotrophin Signaling in the Peripheral and Central Nervous System. *Mol Neurobiol.* 2014;
3. Herzberg U, Eliav, EDorsey JM, Gracely R, Kopin IJ. NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Neuroreport.* 1997;8(7):1613–8.
4. Ro L-S, Chen S-T, Tang L-M, Jacobs JM. Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain.* 1999 Feb;79(3):265–74.
5. Ramer MS, Kawaja MD, Henderson JT, Roder JC, Bisby MA. Glial overexpression of NGF enhances neuropathic pain and adrenergic sprouting into DRG following chronic sciatic constriction in mice. *Neurosci Lett.* 1998;251:53–6.
6. Tender GC, Li Y-Y, Cui J-G. The role of nerve growth factor in neuropathic pain inhibition produced by resiniferatoxin treatment in the dorsal root ganglia. *Neurosurgery.* 2013 Jul;73(1):158–65; discussion 165–6.
7. Lang N, Siebner HR, Ward NS, Lee L, Nitsche M a, Paulus W, et al. How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? *Eur J Neurosci.* 2005 Jul;22(2):495–504.
8. Laste G, Caumo W, Adachi LNS, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PRM, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp brain Res.* 2012 Aug;221(1):75–83.
9. Adachi LS, Caumo W, Laste G, Medeiros LF, Rozisky JR, de Souza A, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res. Elsevier;* 2012 Dec 13;1489:17–26.
10. Medeiros LF, de Souza ICC, Vidor LP, de Souza A, Deitos A, Volz MS, et al. Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: a review. *Front psychiatry.* 2012 Jan;3(December):110.
11. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eight.* Washington, D.C.: The National Academies Press; 2011.
12. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010 Jan;8(6):1–6.

13. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988 Apr;33(1):87–107.
14. Adachi LS, Caumo W, Laste G, Fernandes L, Ripoll J, Souza A De, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res*. Elsevier; 2012;1489:17–26.
15. Takano Y, Yokawa T, Masuda A, Niimi J, Tanaka S, Hironaka N. A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. *Neurosci Lett*. Elsevier Ireland Ltd; 2011 Mar 10;491(1):40–3.
16. Nitsche M a, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul*. 2008 Jul;1(3):206–23.
17. Antal A, Nitsche M a, Paulus W. Transcranial direct current stimulation and the visual cortex. *Brain Res Bull*. 2006 Feb 15;68(6):459–63.
18. Rosen A, Ramkumar M, Nguyen T, Hoeft F. Noninvasive Transcranial Brain Stimulation and Pain. *Curr Pain Headache Rep*. 2009;13(1):12–7.
19. Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJL, Rocha RR, Natalle L, et al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 2006 Dec;54(12):3988–98.
20. Ozaki Y, Kitamura N, Tsutsumi A, Dayanithi G, Shibuya I. NGF-induced hyperexcitability causes spontaneous fluctuations of intracellular Ca²⁺ in rat nociceptive dorsal root ganglion neurons. *Cell Calcium*. 2009 Mar;45(3):209–15.
21. Taiwo YO, Levine JD, Bruch RM, Woo JE, Mobley WC. Hyperalgesia induced in the rat by the amino-terminal octapeptide of nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:5144–8.
22. Lin C-L, Heron P, Hamann SR, Smith GM. Functional distinction between NGF-mediated plasticity and regeneration of nociceptive axons within the spinal cord. *Neuroscience*. IBRO; 2014 Jul 11;272:76–87.
23. Svensson CI, Sommer C, Sorkin LS. Tumor Necrosis Factor- alpha Induces Mechanical Allodynia after Spinal Nerve Ligation by Activation of p38 MAPK in. *J Neurosci*. 2003;23(7):2517–21.
24. Petty B, Cornblath D, Adornato B, Chaudhury V, Flexner C, Wachsman M, et al. The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann Neurol*. 1994;36:244–6.
25. Huang J, Zhang X, McNaughton P. Inflammatory Pain: The Cellular Basis of Heat Hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol*. 2006 Jul 1;4(3):197–206.
26. Sevcik M a, Ghilardi JR, Peters CM, Lindsay TH, Halvorson KG, Jonas BM, et al. Anti-NGF therapy profoundly reduces bone cancer pain and the accompanying

- increase in markers of peripheral and central sensitization. *Pain*. 2005 May;115(1-2):128–41.
27. Shelton DL, Zeller J, Ho W-H, Pons J, Rosenthal A. Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis. *Pain*. 2005 Jul;116(1-2):8–16.
 28. Röhn T a, Ralvenius WT, Paul J, Borter P, Hernandez M, Witschi R, et al. A virus-like particle-based anti-nerve growth factor vaccine reduces inflammatory hyperalgesia: potential long-term therapy for chronic pain. *J Immunol*. 2011 Feb 1;186(3):1769–80.
 29. Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain Microglia/Macrophages Selectively Regulate Microglial Express Neurotrophins that Proliferation and Function. *J Neurosci*. 1996;76(8):2508–21.
 30. Du Y, Dreyfus CF. Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J Neurosci Res*. 2002 Jun 15;68(6):647–54.
 31. Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes—Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*. 1993;54(1):15–36.
 32. Øren A, Falk K, Ro O, Nitsch R, Gimsa U. Production of neuroprotective NGF in astrocyte – T helper cell cocultures is upregulated following antigen recognition. *J Neuroimmunol*. 2004;149:59–65.
 33. Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev*. 2006 Aug;51(2):240–64.
 34. Austin PJ, Moalem-taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol*. Elsevier B.V.; 2010;229(1-2):26–50.
 35. Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R. The Role of Glia and the Immune System in the Development and Maintenance of Neuropathic Pain. *Pain Pract*. 2010;10(3):167–84.
 36. Levi-Montalcini R, Skaper SD, Toso RD, Petrelli L, Leon A, Levi- R. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci*. 1996 Nov;19(11):514–20.
 37. Mokhtarani M, Shelton DL, Ph D, Smith MD, Brown MT. Tanezumab for the Treatment of Pain from Osteoarthritis of the Knee. *N Engl J Med*. 2010;363:1521–31.
 38. Bergmann I, Reiter R, Toyka K V, Koltzenburg M. Nerve growth factor evokes hyperalgesia in mice lacking the low-affinity neurotrophin receptor p75. *Neurosci Lett*. 1998 Sep;255(2):87–90.
 39. Wild KD, Bian D, Zhu D, Davis J, Bannon AW, Zhang TJ, et al. Antibodies to Nerve Growth Factor Reverse Established Tactile Allodynia in Rodent Models of Neuropathic Pain without Tolerance. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(1):282–7.
 40. Fregni F, Freedman S, Pascual-leone A. Recent advances in the treatment of chronic pain with non-invasive brain stimulation techniques. *Lancet Neurol*. 2007;6:188–91.

41. Moreno-Duarte I, Morse LR, Alam M, Bikson M, Zafonte R, Fregni F. Targeted therapies using electrical and magnetic neural stimulation for the treatment of chronic pain in spinal cord injury. *Neuroimage*. Elsevier B.V.; 2014 Jan 15;85 Pt 3:1003–13.
42. Pascoal-Faria P, Yalcin N, Fregni F. Neural Markers of Neuropathic Pain Associated with Maladaptive Plasticity in Spinal Cord Injury. *Pain Pract*. 2014 Aug 28;2:1–7.
43. Spezia Adachi LN, Caumo W, Laste G, Fernandes Medeiros L, Ripoll Rozisky J, de Souza A, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res*. Elsevier; 2012 Dec 13;1489:17–26.
44. Laste G, Caumo W, Naomi L, Adachi S, Ripoll J, Isabel R, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp Brain Res*. 2012;221:75–83.

Legends

Figure 1. NGF levels in cerebral cortex (n=4-6 per group). Data are expressed as percentage of control mean±S.E.M (pg/mg of protein). Groups: (CT) control; (SN) sham neuropathic pain; (SNS) sham neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (SNT) sham neuropathic pain plus tDCS treatment; (NP) neuropathic pain model; (NPS) neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (NPT) neuropathic pain plus tDCS treatment.

* there was interaction between pain model vs time (three-way ANOVA/ Bonferroni, p<0.05).

Figure 2. NGF levels in spinal cord (n=4-6 per group). Data are expressed as percentage of control mean±S.E.M (pg/mg of protein). Groups: (CT) control; (SN) sham neuropathic pain; (SNS) sham neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (SNT) sham neuropathic pain plus tDCS treatment; (NP) neuropathic pain model; (NPS) neuropathic pain plus sham tDCS treatment; (NPT) neuropathic pain plus tDCS treatment.

§ significant effect of pain model

significant effect of time (three-way ANOVA/ Bonferroni, p<0.05).

Figures

Figure 1

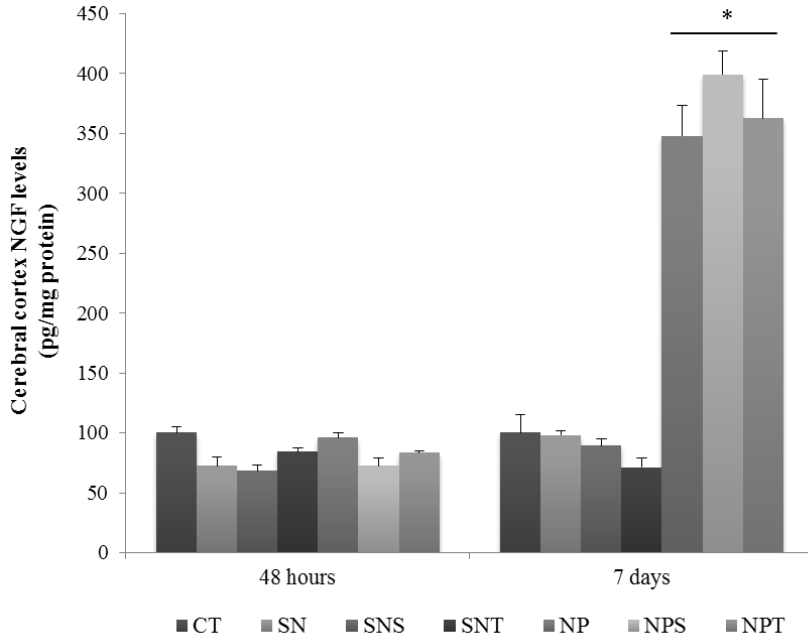
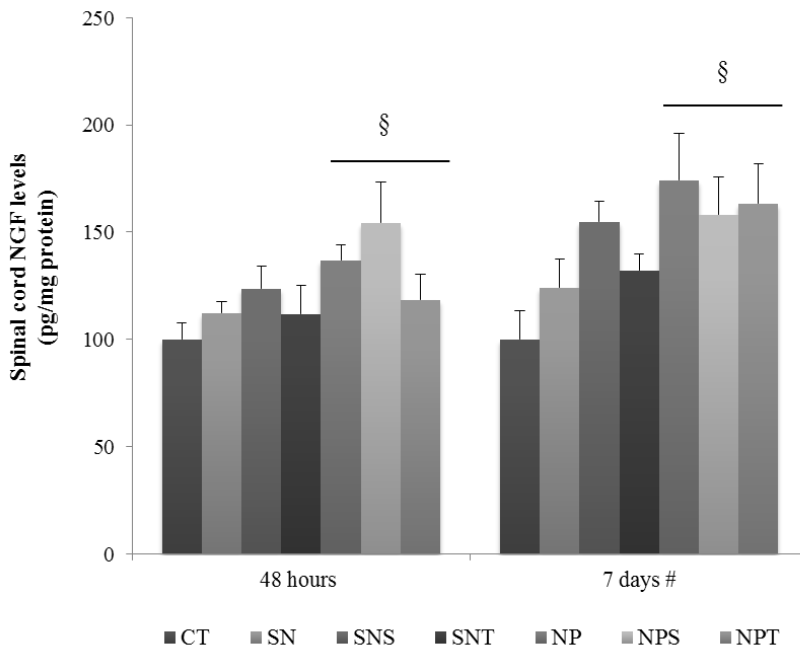


Figure 2



VIII. CONSIDERAÇÕES GERAIS

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente estudo demonstrou que a ETCC é um tratamento efetivo para a redução da resposta nociceptiva em um modelo de dor neuropática por constrição do nervo isquiático em ratos. Observou-se também o efeito dessa terapêutica na modulação dos níveis de citocinas no sistema nervoso central, sendo essas alterações observadas a curto e longo prazo. Além disso, demonstrou-se que a dor neuropática é capaz de alterar os níveis de citocinas e de uma neurotrofina no SNC a curto e longo prazo. Nesse contexto, evidencia-se a importância do papel do sistema imune central nos processos de continuidade da dor neuropática, que pode estar envolvido com as alterações neuroplásticas maladaptativas características dessa patologia.

Considerando a escassez de tratamentos farmacológicos específicos para a dor neuropática e a necessidade de novas terapias adjuvantes não-farmacológicas e não-invasivas que contemplem as alterações envolvidas na manutenção dessa condição dolorosa, é necessário que essas intervenções sejam capazes de modular toda uma via de sinalização nociceptiva para a obtenção de resultados benéficos a longo prazo. Portanto, estudos adicionais são necessários para o entendimento dos mecanismos da ETCC, acrescentando novos conhecimentos sobre os efeitos a curto e longo prazo dessa terapia.

IX. PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Para o melhor entendimento das vias de sinalização envolvidas na manutenção da dor neuropática e dos mecanismos de ação da ETCC em relação ao tratamento das dores crônicas, torna-se necessária a realização da dosagem de outros marcadores neuroquímicos e moleculares. Dentre elas, a quantificação dos receptores NMDA em córtex cerebral e medula espinhal, uma vez que tem papel fundamental na excitabilidade do sistema nervoso central, além de estar diretamente envolvido com processos de plasticidade sináptica. Além disso, a mensuração da hidrólise de nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) podem elucidar o papel do sistema purinérgico no desencadeamento da resposta inflamatória central nas condições de dor neuropática. Afim de esclarecer os função do NGF na dor neuropática, propõe-se a realização de uma curva de tempo dos níveis desta neurotrofina a partir da realização da cirurgia de constrição do nervo isquático até avaliações mais tardias e a mensuração dos níveis de NGF no nervo lesado e em diferentes estruturas do SNC.

X. DIVULGAÇÕES

DIVULGAÇÕES

2013:

1 Stefania Giotti Cioato; Paulo Ricardo Marques Filho; Carla de Oliveira; Vanessa Leal Scarabelot; Éllen Nunes; Lauren Spezia Adachi; Alexandre Quevedo; Iraci Lucena da Silva. Efeito da Eletroestimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) sobre a resposta nociceptiva de ratos Wistar submetidos a modelo de dor neuropática. Apresentado sob a forma de Pôster. Em: 33ª Semana Científica do HCPA, 2013, Porto Alegre, RS Anais da 33ª Semana Científica do HCPA, 2013. v. 33. p. 218-218.

2 Vanessa Leal Scarabelot; Carla de Oliveira; Paulo Ricardo Marques Filho; **Stefania Giotti Cioato;** Liciane Fernandes Medeiros; Lauren Naomi Spezia Adachi; Ellen Nunes; Andressa de Souza; Wolnei Caumo; Iraci Lucena da Silva Torres. Reversão da alodinia mecânica por Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) em ratos submetidos a um modelo de dor crônica orofacial. Apresentado sob a forma de pôster. In: 33ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre. Anais da 33ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. HCPA, 2013. v. 33. p. 1-222.

3 Ivan Cirilo Gluz; Vanessa Leal Scarabelot; Carla de Oliveira; Liciane Fernandes Medeiros Paulo Ricardo Marques Filho; **Stefania Giotti Cioato;** Lauren Naomi Spezia Adachi; Andressa de Souza; Wolnei Caumo; Iraci Lucena da Silva Torres. Administração aguda de melatonina em ratos Sprague Dawley submetidos a um modelo de dor crônica orofacial reverte alodinia mecânica. Apresentado sob a forma de pôster. In: 33ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2012, Porto Alegre. Anais da 33ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. HCPA, 2013. v. 33. p. 1-234

4 Paulo Ricardo Marques Filho; **Stefania Giotti Cioato;** Carla de Oliveira; Vanessa Leal Scarabelot; Lauren Spezia Adachi; Liciane Fernande Medeiros; Wolnei Caumo; Iraci Lucena da Silva Torres. Efeitos da Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (tDCS) na alodinia mecânica de ratos submetidos a modelo de dor neuropática. Apresentado sob a forma de pôster. In: V Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2013, São Paulo, SP. Anais do V Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2013 v. 01, p 1-34

5 Stefania Giotti Cioato; Paulo Ricardo Marques Filho; Vanessa Leal Scarabelot; Carla de Oliveira; Liciane Fernandes Medeiros; Lauren Spezia Adachi; Wolnei Caumo; Iraci Lucena da Silva. Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) reverte hiperalgesia em ratos submetidos a modelo de dor neuropática. Apresentado sob a forma de pôster. In: V Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2013, São Paulo, SP. Anais do V Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2013 v. 01, p 1-34

6 Vanessa Leal Scarabelot; Carla de Oliveira; **Stefania Giotti Cioato;** Paulo Ricardo Marques Filho; Lauren Spezia Adachi; Liciane Fernandes Medeiros; Andressa de Souza; Isabel Cristina de Macedo; Wolnei Caumo; Iraci Lucena da Silva. Eletroestimulação transcraniana por corrente direta (tDCS) reverte alodinia mecânica em ratos expostos a um modelo de dor crônica orofacial. Apresentado sob a forma de pôster. In: V Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2013, São Paulo, SP. Anais do V Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2013 v. 01, p 1-34.

7 Carla de Oliveira; Vanessa Leal Scarabelot; **Stefania Giotti Cioato;** Paulo Ricardo Marques Filho; Liciane Fernandes Medeiros; Andressa de Souza; Lauren Naomi Spezia Adachi; Wolnei Caumo; Iraci Lucena da Silva. Reversão da hiperalgesia pela eletroestimulação transcraniana por corrente (tDCS) em ratos submetidos a um modelo de dor crônica orofacial. Apresentado sob a forma de pôster. In: V Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2013, São Paulo, SP. Anais do V Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2013 v. 01, p 1-34.

8 Vanessa Leal Scarabelot; Carla de Oliveira; Liciane Fernandes Medeiros Paulo Ricardo Marques Filho; **Stefania Giotti Cioato;** Andressa de Souza; Ellen Nunes; Iraci Lucena da Silva Torres. Eletroestimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) reverte a alodinia mecânica de ratos submetidos a um modelo de dor crônica orofacial. Apresentado sob a forma de pôster. In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto, SP. Anais da XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, p 1-246

9 Liciane Fernandes Medeiros; Vanessa Leal Scarabelot; Carla de Oliveira; Paulo Ricardo Marques Filho; **Stefania Giotti Cioato**; Andressa Souza; Iraci Lucena da Silva Torres. Administração aguda de melatonina reverte alodinia mecânica em ratos Sprague-Dawley submetidos a um modelo de dor crônica orofacial. Apresentado sob a forma de pôster. In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto, SP. Anais da XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, p 247-248.

2014

1 Paulo Ricardo Marques Filho; **Stefania Giotti Cioato**; Carla de Oliveira; Vanessa Leal Scarabelot; Lauren Naomi Adachi; Joanna Ripoll Rozisky; Rafael Vercelino; Alexandre Quevedo; Wolnei Caumo; Iraci Lucena da Silva Torres. Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) aumenta a atividade locomotora e exploratória em ratos com dor neuropática. Apresentado sob a forma de pôster. In: 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2014, Porto Alegre. Anais da 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Clinical Biomedical Research 2014. v. 34. p. 46-47.

2 Lauren Naomi Spezia Adachi; Rafael Vercelino; Vanessa Leal Scarabelot; Paulo Ricardo Marques Filho; Carla de Oliveira; Liciane Fernandes Medeiros; **Stefania Giotti Cioato**; Alexandre Quevedo; Wolnei Caumo; Iraci Lucena da Silva Torres. Avaliação do Efeito da Acupuntura e Eletroacupuntura em modelo animal de dor neuropática- Estudo Piloto. Apresentado sob a forma de pôster. In: 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2014, Porto Alegre. Anais da 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Clinical Biomedical Research 2014. v. 34. p. 190-190.

3 Vanessa Leal Scarabelot; Carla de Oliveira; Paulo Ricardo Marques Filho; **Stefania Giotti Cioato**; Lauren Naomi Spezia Adachi; Liciane Fernandes Medeiros; Andressa de Souza; Alexandre Quevedo; Wolnei Caumo; Iraci Lucena da Silva de Torres. Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) reverte o aumento nos níveis de BDNF em tronco encefálico de ratos submetidos a um modelo de dor crônica orofacial. Apresentado sob a forma de pôster. In: 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2014, Porto Alegre. Anais da 34ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Clinical Biomedical Research 2014. v. 34. p. 283-284.

4 Stefania Giotti Cioato; Paulo Ricardo Marques Filho; Vanessa Leal Scarabelot; Carla de Oliveira; Lauren Spezia Adachi; Liciane Fernandes Medeiros; Joanna Ripoll Rozisky; Alexandre Quevedo da Silva; Rafael Vercelino; Iraci Lucena da Silva. Effects of transcranial direct-current stimulation (tDCS) on mechanical allodynia and hyperalgesia in rats submitted to neuropathic pain model. Apresentado sob a forma de pôster. In: 15th World Congress on Pain, 2014, Buenos Aires, AR.

5 Vanessa Leal Scarabelot; Carla de Oliveira; Liciane Fernandes Medeiros; Paulo Ricardo Marques Filho; **Stefania Giotti Cioato;** Lauren Spezia Adachi; Andressa de Souza; Alexandre Quevedo da Silva; Wolnei Caumo; Iraci Lucena da Silva. Effect of acute melatonin administration in a model of chronic orofacial pain. . Apresentado sob a forma de pôster. In: 46th Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014, Fortaleza, CE.

6 Vanessa Leal Scarabelot; Carla de Oliveira; Paulo Ricardo Marques Filho; **Stefania Giotti Cioato;** Lauren Spezia Adachi; Liciane Fernandes Medeiros; Andressa de Souza; Alexandre Quevedo da Silva; Wolnei Caumo; Iraci Lucena da Silva. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverses the increase in BDNF levels in the brainstem of rats submitted to a model of orofacial chronic pain. Apresentado sob a forma de pôster. In: 15th World Congress on Pain, 2014, Buenos Aires, AR.

XI. ANEXOS

A) Aprovação do Comitê de Ética



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 120512
Data da Versão do Projeto: 22/01/2013

Pesquisadores:
IRACI LUCENA DA SILVA TORRES
STEFANIA GIOTTI CIGATO
PAULO RICARDO MARQUES FILHO

Título: AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS NOCICEPTIVA E NEUROQUÍMICA INDUZIDAS POR ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC) EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.


Port. 114/13, 17 de março de 2013.
Dr. Alessandro Oswald
Coordenador CEUA/HCPA

B) Co-autorias em artigos científicos

1 Medeiros LF, de Souza AC, de Souza A, **Cioato SG**, Scarabelot VL, Caumo W, Fernandes LC, Torres IL. Fentanyl administration in infant rats produces long-term behavioral responses. *Int J Dev Neurosci.* 2012;30(1):25-3.

2 Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, **Cioato SG**, Caumo W, Torres IL. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides.* 2012 ;38(1):189-96.

3 de Oliveira C, Scarabelot VL, de Souza A, de Oliveira CM, Medeiros LF, de Macedo IC, Marques Filho PR, **Cioato SG**, Caumo W, Torres IL. Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides. *Peptides.* 2014;51:46-53.