

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR
CORRENTE CONTÍNUA EM UM MODELO DE CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO
NERVO CIÁTICO EM RATOS WISTAR**

PRISCILA CENTENO CRESPO

PELOTAS
2016

PRISCILA CENTENO CRESPO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR
CORRENTE CONTÍNUA EM UM MODELO DE CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO
NERVO CIÁTICO EM RATOS WISTAR JOVENS E ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial, para obtenção de título de mestre em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientador: Izabel Cristina Custódio de Souza

Co-orientador: Giovana DuzzoGamaro

PELOTAS

2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C921a Crespo, Priscila Centeno

Avaliação dos efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua em modelo de constrição crônica do nervo ciático em ratos Wistar jovens e adultos. / Priscila Centeno Crespo ; Izabel Cristina Custódio de Souza, orientadora ; Giovana Duzzo Gamaro, coorientadora. — Pelotas, 2016.

67 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Estimulação cerebral não invasiva. 2. Dor neuropática. 3. Neurogênese. 4. Fator neurotrófico derivado do cérebro. I. Souza, Izabel Cristina Custódio de, orient. II. Gamaro, Giovana Duzzo, coorient. III. Título.

CDD : 574.19

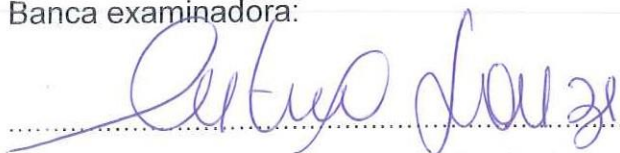
PRISCILA CENTENO CRESPO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR
CORRENTE CONTÍNUA EM UM MODELO DE LESÃO DO NERVO CIÁTICO
POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA EM RATOS WISTAR JOVENS E ADULTOS

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de mestre em Bioquímica e Bioprospecção do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 12/09/2016

Banca examinadora:



Profa. Dr. Izabel Cristina Custódio de Souza

Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dra. Roselia Maria Spanevello

Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Dra. Vanessa Leal Scarabelot

Doutora em Ciências Biológicas – Fisiologia pela Universidade do Rio Grande do Sul

Dedico este trabalho aos meus pais e as minhas
irmãs.

Agradecimentos:

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me presenteado com esta oportunidade e por estar ao meu lado em todos os momentos, proporcionando a conclusão dessa jornada.

Aos meus pais, por me apoiarem em todas as minhas escolhas, por estarem sempre ao meu lado, por acreditarem em mim e me subsidiarem da melhor maneira possível na concretização desse projeto.

As minhas irmãs, pelo apoio constante, pelo carinho, pela força e pela fé.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, em especial à Veterinária Anelize Felix e aos demais funcionários do local pelo atendimento prestado e pelo acolhimento.

Ao laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, pelo espaço concedido.

Ao grupo de estudos Neurocell e a todos os colegas do grupo que participaram do projeto, pelo auxílio e empenho na realização dos experimentos.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, que de alguma forma, contribuíram para a minha formação.

Ao apoio prestado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A minha orientadora, Dra. Izabel Cristina Custódio de Souza, que me aceitou como aluna, me acompanhou e orientou durante o curso, me mostrando os caminhos pelos quais eu deveria trilhar para realizar esta jornada.

E, por fim, a minha co-orientadora, Dra. Giovana Duzzo Gamaro pelo acompanhamento, carinho e dedicação prestados, e por estar sempre presente auxiliando no que fosse necessário.

Resumo

CRESPO, Priscila Centeno. **Avaliação dos efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua em um modelo de constrição crônica do nervo ciático em ratos Wistar jovens e adultos.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A dor neuropática é caracterizada por ser uma dor persistente, que pode ser ocasionada por uma lesão no sistema nervoso central ou periférico e, em muitos casos, refratária ao tratamento. A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) é um método não invasivo e inovador, o qual vem sendo utilizado como uma alternativa para o tratamento da dor. Estudos em humanos revelaram alívio da dor após tratamento seriado com ETCC, em pacientes portadores de dor crônica. No entanto, os mecanismos que levam a estimulação elétrica a promover o alívio da dor não estão claros, abrindo espaço para que a pesquisa com animais possa nos auxiliar na descoberta dessas respostas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações comportamentais em ratos com dor neuropática induzida, submetidos e não submetidos aos efeitos da aplicação de ETCC em duas fases distintas da neurogênese (30 e 60 dias de idade). Os resultados desta análise demonstraram que o tratamento com ETCC foi capaz de aumentar o limiar de dor em ratos de 30 e 60 dias promovendo alívio da dor em ratos jovens em curto prazo e em adultos a longo prazo. Os níveis de BDNF diminuíram na medula espinal, mas não se alteraram no córtex pré-frontal e no soro 8 dias depois do final do tratamento com tDCS.

Palavras-chave: estimulação cerebral não invasiva; dor neuropática; neurogênese; fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

Abstract

CRESPO, Priscila Centeno. **Evaluation of the effects of transcranial direct current stimulation in a sciatic nerve chronic constriction injury model in Wistar young and adult rats.**2016. Dissertation (Master degree) – Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospection. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Neuropathic pain is characterized by a persistent pain that can be caused by injury to the central or peripheral nervous system, and in many cases is refractory to treatment. The transcranial direct-current stimulation (tDCS) is a noninvasive and innovative method that has been used as an alternative for treat pain. Human studies have shown that chronic pain patients achieved pain relief after treatment of consecutive sessions with tDCS. However, the mechanisms that lead to electrical stimulation to promote the alleviation of pain is unclear. Animal research can help us in finding those answers. Thus, the aim of this study was to evaluate the behavioral changes in rats with induced neuropathic pain, submitted and not submitted to the effects of the application of tDCS in two distinct stages of neurogenesis (30 and 60 days old). The results of this analysis demonstrated that treatment with tDCS was able to increase the pain threshold in rats at 30 and 60 days promoting pain relief in young rats in the short and in the adult at long term.

Key words: non-invasive brain stimulation; neuropathic pain; neurogenesis; brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

Lista de Figuras

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 Ferramentas utilizadas para busca de artigos científicos utilizados como base na revisão.....	16
---	----

MANUSCRITO

Figure 1 Time-line of the experimental desing.....	50
Figure 2 Image of the right constricted sciatic nerve of an adult rat.....	51
Figure 3 Evaluation of thermal hyperalgesia induced by chronic constriction injury 14 days after injury using hot plate test.....	52
Figure 4 Effect of tDCS on the mechanical allodynia response by the Von Frey eletronics test.....	53
Figure 5 BDNF levels of young neuropathic pain rats treated with tDCS	55

Lista de Abreviaturas

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca ⁺²	Cálcio
CCL-21	Quimiocina motivo C-C ligante 21
CRGP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
ETCC	Estimulação transcraniana por corrente contínua
IFN- α	Interferon alfa
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
K ⁺	Potássio
LTP	Potenciação de longa duração
LTD	Depressão de longa duração
mA	Miliampere
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito atraente 1
Na ⁺	Sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
p38-MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno p 38
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
tDCS	Transcranial direct current stimulation
TMS	Estimulação transcraniana magnética
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	14
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1. <i>Dor neuropática.....</i>	16
3.1.1. <i>Fisiopatologia da dor neuropática - mecanismos desencadeadores .</i>	18
Sensibilização Periférica	18
Alterações na Conexão Aferente	18
Sensibilização central	18
3.1.2. <i>Modelos animais de dor neuropática</i>	20
Axotomia	20
Ligação parcial do nervo ciático	20
Lesão nervosa	21
Lesão por constrição crônica	21
3.2. <i>Estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) e os efeitos na dor neuropática</i>	22
3.3. <i>Papel do BDNF na dor neuropática e na ETCC</i>	25
4. MANUSCRITO	29
5. CONCLUSÃO	60
Perspectivas	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO A	66
ANEXO B	67

1. INTRODUÇÃO

A percepção dolorosa, frente a um estímulo nocivo, tem a função protetora de evitar uma lesão tecidual, configurando um mecanismo fisiológico importante. Nesse mecanismo, para que um estímulo nocivo seja interpretado no cérebro como dor, há a interação com outros fatores, como aspectos comportamentais, para que a partir disso, se gere reflexo de retirada do membro afetado com a finalidade de evitar a ocorrência de dano ou trauma (NARO et al., 2016).

Na presença de lesão, ocorre sensibilização do sistema somatossensorial, ocasionando alterações plásticas, adaptativas, estruturais e funcionais, as quais ocasionalmente podem gerar uma resposta aumentada aos estímulos, independentemente deles serem inócuos ou nocivos. Nesse caso, a dor deixa de apresentar características protetivas, induzindo um mecanismo de ativação de mediadores químicos, os quais levam à cronificação do processo, passando a constituir, portanto, uma expressão da plasticidade maladaptativa do sistema nociceptivo (COSTIGAN et al., 2009; NARO et al., 2016).

Dentre as alterações negativas geradas por esses processos, se encontra a dor neuropática (NIZARD et al., 2014; TIWARI; GUAN; RAJA, 2014), caracterizada por sensações de alodinia (dor produzida por estímulo normalmente não doloroso) e hiperalgesia (dor excessiva por estímulo nocivo) (TIWARI; GUAN; RAJA, 2014).

Ademais, a dor causada pelo dano tecidual pode se estender em diversas regiões do sistema nervoso, atingindo o cérebro e a medula espinal no sistema nervoso central (SNC) e as raízes nervosas, os gânglios sensoriais ou plexos no sistema nervoso periférico (SNP). No SNC os principais desencadeadores de dor neuropática são: a lesão da medula espinal, o acidente vascular cerebral e a esclerose múltipla. Da mesma forma, trauma mecânico, doenças metabólicas, substâncias químicas neurotóxicas, infecções e tumores invasivos são as principais causas de dor neuropática no SNP (COSTIGAN et al., 2009; NIZARD et al., 2014).

Contudo, o risco de desenvolvimento de dor neuropática por mais de dois anos, varia de acordo com a complexidade e tamanho da estrutura afetada, por exemplo: o chance de haver dor sob tais parâmetros por lesão do nervo ilioinguinal (considerado de menor porte) é de aproximadamente 5%, enquanto, a lesão do nervo ciático (considerado de maior porte) pode gerar dor neuropática persistente em 30 a 60% dos pacientes (COSTIGAN et al., 2009).

Além disso, a dor crônica persistente, em muitos casos, pode ser de difícil tratamento. Apenas 40 a 60% (TIWARI; GUAN; RAJA, 2014) dos pacientes respondem ao tratamento farmacológico, e ainda assim, parcialmente (ALM; DREIMANIS, 2013; TIWARI; GUAN; RAJA, 2014). Em função deste fato, foram desenvolvidas novas formas de tratamento, sendo assim, a neuromodulação por estimulação elétrica passou a ser estudada como uma alternativa. A estimulação elétrica pode ser realizada por meio de diferentes técnicas de aplicação, dentre elas a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) (ALM; DREIMANIS, 2013; FUJIYAMA et al., 2014).

A ETCC é um método não invasivo e inovador, os estímulos induzem um potencial neuronal transmembrana capaz de alterar a excitabilidade cortical (FRITSCH et al., 2010; FUJIYAMA et al., 2014; RANIERI et al., 2012), a qual é polaridade-dependente, ou seja, aumenta com estímulo anodal e diminui com estímulo catodal (ALM; DREIMANIS, 2013; FUJIYAMA et al., 2014; RANIERI et al., 2012; ARUL-ANADAM; LOO; SACHDEV, 2009).

Estudos sugerem que a ETCC ocorra, em parte, pela alteração do potencial de membrana em repouso, afetando os canais de sódio (Na^+) (FUJIYAMA et al., 2014; ARUL-ANADAM; LOO; SACHDEV, 2009) e de potássio (K^+) (FUJIYAMA et al., 2014). Essas alterações nos canais iônicos, por sua vez, desencadeiam alterações específicas e duradouras na atividade neuronal (RANIERI et al., 2012), caracterizando, portanto, plasticidade sináptica, mais especificamente, no potencial de longa duração (LTP) e na depressão de longa duração (LTD) (FUJIYAMA et al., 2014; RANIERI et al., 2012). Contudo, a indução da LTP depende da ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e da secreção de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (FUJIYAMA et al., 2014; RANIERI et al., 2012).

O BDNF regula a atividade sináptica, sendo um fator fundamental na neuroplasticidade e na neurogênese (FUJIYAMA et al., 2014). A expressão de BDNF aumenta nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal na ocorrência de lesão no nervo ou nos tecidos periféricos (CHEN et al., 2014).

No cérebro de ratos, camundongos e primatas saudáveis, diversos biomarcadores apresentam um aumento relacionado à idade principalmente as citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1β (IL- 1β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) que encontram-se aumentadas em ratos mais velhos. Além disso, um atraso da resolução do quadro

de dor tem sido reportado em animais senescentes após indução de lesão no nervo, apresentando ainda, resposta neuro-imunológica exacerbada (GALBAVY et al., 2015).

Nesse contexto, mediadores químicos e inflamatórios envolvidos na modulação da dor e nos processos nociceptivos que interferem nos mecanismos pelos quais ETCC age precisam ser elucidados. Tendo em vista essa necessidade, a avaliação desses mediadores em animais submetidos a modelos de dor neuropática tem se mostrado suficiente para mimetizar aspectos importantes do desenvolvimento de dor (GALBAVY et al., 2015). Trabalhos realizados em humanos avaliam e comprovam a eficácia de ETCC em reduzir a dor, porém, a avaliação de determinados parâmetros morfológicos e bioquímicos do sistema nervoso central se tornam inviáveis. Por esta razão, estudos em modelos animais são necessários por permitirem a avaliação desses fatores, bem como o estudo de alterações comportamentais e relacionadas ao desenvolvimento.

Dessa forma, essa pesquisa teve, por um lado, como objeto de estudo o modelo animal de dor neuropática induzida por lesão constritiva crônica do nervo ciático, primeiramente descrito por Bennet e Xie, e por outro o teste da eficácia da ETCC em ratos jovens e adultos, uma vez que a literatura é rica em relatos da eficácia da ETCC nos últimos, ao mesmo tempo em que são inexistentes estudos envolvendo os primeiros. Simplificadamente, este estudo avaliou os efeitos da ETCC na neurogênese e na dor neuropática de ratos Wistar jovens e adultos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar a resposta nociceptiva em animais submetidos ao modelo de dor neuropática induzida (Bennet and Xie, 1988), submetidos e não submetidos aos efeitos da aplicação de ETCC em duas fases distintas da neurogênese (30 e 60 dias de idade).

2.2. Objetivos Específicos

- a) Verificar a homogeneidade do limiar de dor dos animais de 30 e 60 dias pelo teste mecânico de retirada da pata por meio do aparelho de Von Frey eletrônico na medida basal.
- b) Induzir a constrição do nervo ciático direito dos ratos de ambas as idades pelo método de Bennet and Xie (1988).
- c) Mensurar a alodinia 14 dias após a indução da lesão utilizando Von frey eletrônico nos ratos com idade de 30 e 60 dias.
- d) Iniciar o tratamento com ETCC, após o estabelecimento da dor, em 8 sessões consecutivas de estimulação, com duração de 20 minutos cada sessão.
- e) Avaliar a capacidade da ETCC em promover alívio da dor a curto prazo (24h após o tratamento).
- f) Determinar se a redução da dor permanece a longo prazo após a aplicação de ETCC (7 dias após o final do tratamento).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão foram abordados aspectos da fisiopatologia da dor neuropática e dos efeitos da aplicação de ETCC em humanos e em animais. Para tanto, foi necessária a pesquisa de referências bibliográficas em três bases de dados, Pubmed, Lilacs e Scielo. Foram utilizadas as palavras-chave “neuropathic pain” = dor neuropática, “tDCS” (transcranial direct current stimulation) = ETCC (estimulação transcraniana por corrente contínua), “BDNF” = fator neurotrófico derivado do cérebro, e a combinação desses termos. Como resultado, foram encontrados 26.022 artigos relacionados ao termo dor neuropática no PUBMED, 222 no LILACS e 211 no SCIELO. Para a palavra-chave “tDCS” foram encontrados 2.817 no PUBMED, 16 no LILACS e 18 no SCIELO. Utilizando a palavra-chave BDNF foram encontrados 18.516 no PUBMED, 65 no LILACS e 48 no SCIELO e com a combinação dos termos “neuropathic pain AND tDCS” foram encontrados 50 artigos no PUBMED, 28 no LILACS e nenhum no SCIELO e combinando os termos “neuropathic pain AND tDCS AND BDNF” foram encontrados 1 artigo no PUBMED, nenhum no LILACS e nenhum no SCIELO.

A partir da análise desses artigos foi possível observar que a ETCC vem ressurgindo no meio científico como uma alternativa de tratamento para os quadros de dores crônicas, essa técnica vem sendo utilizada em diferenciados tipos de dor apresentando resultados promissores. Além disso, os estudos contemplam resultados, que demonstram efeitos divergentes da ETCC de acordo com o posicionamento dos eletrodos no couro cabeludo, bem como com a utilização de diferentes intensidades, tempos e frequências de estimulação.

Ademais, as técnicas de estimulação transcraniana vêm sendo utilizadas para tratar diversos tipos de dores crônicas com resultados satisfatórios. Todavia, apesar de alguns mecanismos sugeridos por alguns autores, os artigos não elucidam totalmente nem os mecanismos pelos quais a ETCC reduz a dor e nem quais marcadores estão envolvidos nesse processo.

É importante ressaltar ainda que até o presente momento há apenas um artigo relacionando dor neuropática, eletroestimulação e fator neurotrófico derivado do cérebro, estudo este realizado em ratos adultos. Portanto, não existem dados correlacionado esses três fatores em modelos de ratos jovens, como propõe nosso estudo

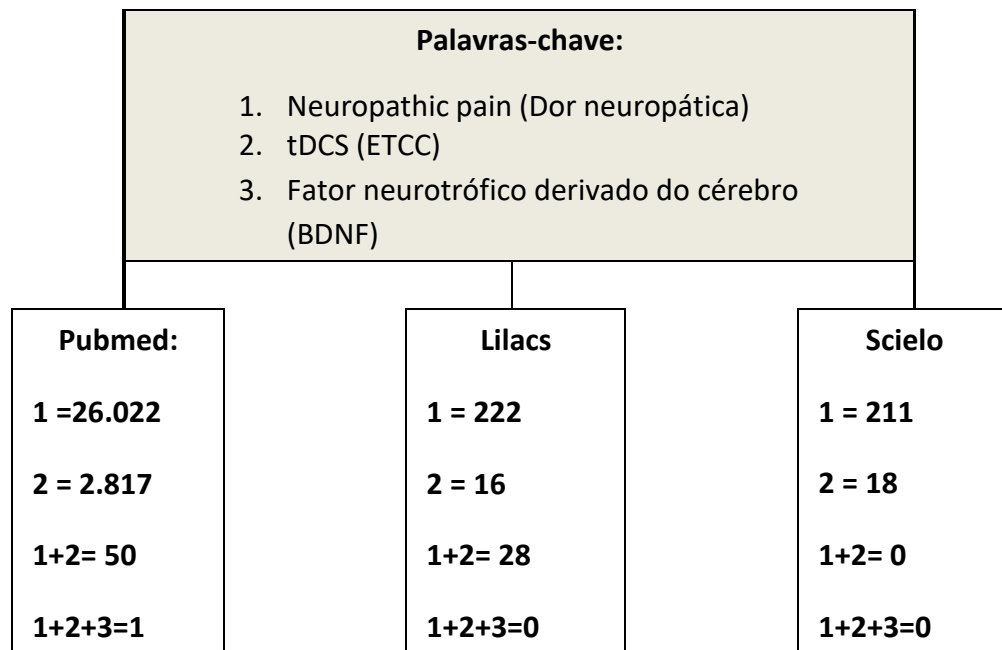


Figura 1: Ferramentas utilizadas para busca de artigos científicos utilizados como base nesta revisão.

3.1. DOR NEUROPÁTICA

A dor neuropática é um dos problemas mais comuns que acarretam em incapacidade no mundo todo, impactando negativamente a qualidade de vida daqueles afetados por ela (NGERNYAM et al., 2013; SOLLER et al., 2010). Se associa a isso o fato de que a dor neuropática geralmente é refratária ao tratamento farmacológico convencional, proporcionando um número significativo de pacientes que continuam com dor mesmo recebendo a medicação apropriada e terapia física (ALM; DREIMANIS, 2013; NGERNYAM et al., 2013; TIWARI; GUAN; RAJA, 2014) e, dentre aqueles que possuem esse sintoma, apenas 40% apresentam respostas satisfatórias aos referidos tratamentos (ALM; DREIMANIS, 2013; NGERNYAM et al., 2013; TIWARI; GUAN; RAJA, 2014).

Embora a lesão nervosa seja necessária, ela não é suficiente para gerar dor neuropática, pois existem outros fatores contribuintes como: polimorfismo genético, sexo e idade, os quais influenciam o risco de desenvolvimento de dor neuropática persistente (COSTIGAN et al., 2009).

Dados da literatura têm demonstrado que a dor crônica desencadeia uma reorganização estrutural e funcional nas regiões corticais e subcorticais em humanos

e animais de laboratório, promovendo transformações neuro-anatômicas e neuroquímicas no sistema nervoso central (MUTSO et al., 2012; TIWARI; GUAN; RAJA, 2014). Essas alterações incluem geração de potenciais de ação, facilitação da transmissão sináptica, perda da conectividade sináptica, formação de novos circuitos sinápticos e interações neuro-imunes (COSTIGAN et al., 2009).

Embora exista uma relação entre neuroplasticidade e dor, aprendizagem e presença de lesão, demonstrada pelas alterações nos neurônios aferentes sensoriais, em resposta à doença ativa ou à manipulação experimental, levando à reorganização cortical de cérebros maduros, (BICK-SANDER et.al., 2006; BRASIL NETO, 2016), estudos recentes sugerem que há uma discrepância substancial entre o grande número de alterações anatômicas e a capacidade de plasticidade neural . Tendo isso em mente, existe a hipótese de que a neurogênese também esteja envolvida nessa atividade (RUSANESCU; MAO, 2016).

A neurogênese é definida pelo processo no qual células-tronco multipotentes se diferenciam originando células neuronais e gliais maduras (URBÁN; GUILLEMOT, 2014). Células-tronco neurais que apresentam potencial neurogênico in vitro podem ser isoladas de diversas regiões do cérebro maduro. Se por um lado a neurogênese parece ser mais abundante em tecidos jovens, por outro o envelhecimento do cérebro é marcado pelo decréscimo dessa renovação celular, possivelmente, devido à redução do número de células-tronco neurais decorrente da idade (KAPOOR et. al., 2015; KARALAY et. al., 2011; URBÁN; GUILLEMOT, 2014).

Uma lesão na periferia pode desencadear um aumento da excitabilidade no corno dorsal, caracterizando sensibilização central (SMITH, P., 2014), esse processo se inicia com a ativação da resposta imune inata nos gânglios da raiz dorsal e na medula espinal. Após a lesão, os níveis de citocinas como a interleucina (IL) 1 beta (1β), o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), o interferon alfa ($IFN\ \alpha$) e as quimiocinas aumentam, assim como marcadores da microglia ativada (macrófagos, astrócitos e células-T). $TNF\alpha$ e $IFN\ \alpha$ apresentam importância clínica no desenvolvimento do processo de dor neuropática (GALBAVY et al., 2015).

O desenvolvimento de dor também é afetado pelo aumento de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e a IL-4 que auxiliam na ativação da microglia para fenótipos reparatórios e imunossupressores que acarretam provavelmente no estabelecimento da dor neuropática (GALBAVY et al., 2015).

a) FISIOPATOLOGIA DA DOR NEUROPÁTICA - MECANISMOS DESENCADEADORES

O processo de desenvolvimento da dor envolve mecanismos de ativação periférica e central e alterações nas conexões aferentes. Esses mecanismos são fundamentais na iniciação e na manutenção desse processo e estão descritos a seguir:

Sensibilização Periférica:

Quando o sistema nervoso periférico é lesionado, mediadores celulares são liberados no local do trauma e agem sensibilizando os nociceptores locais, ocasionando a entrada de substâncias nos terminais neurais. Esse processo altera o número e a localização de canais iônicos, principalmente os canais de sódio, nas fibras nociceptivas lesionadas e nos respectivos gânglios da raiz dorsal, como resultado o limiar de despolarização diminui, e podem ocorrer descargas espontâneas anormais em determinados locais e, conseqüentemente, ocorre aumento da resposta nociceptiva a estímulos térmicos e mecânicos(NGERNYAM et al., 2013).

Alterações na Conexão Aferente:

Os circuitos do sistema nervoso lesado geram impulsos nociceptivos alterados, que são interpretados pelo cérebro como dor. O circuito integrativo talâmico pode gerar e amplificar os sinais nociceptivos. A alteração sensorial após a lesão do sistema nervoso induz uma reorganização profunda e duradoura das zonas sensoriais corticais e subcorticais no cérebro. Essas conseqüências fisiopatológicas dessa plasticidade cortical podem ser a base de desenvolvimento da dor neuropática (NGERNYAM et al., 2013).

Sensibilização central:

Os mecanismos que levam à sensibilização central não estão totalmente elucidados (SMITH, P., 2014), no entanto, um dos possíveis mecanismos se baseia na desregulação talâmica, a qual inibe o sistema de modulação da dor natural no tálamo (NGERNYAM et al., 2013). Isso ocorre em decorrência da perda ou supressão da via inibitória ou modulatória, resultando no aumento anormal da excitabilidade de neurônios centrais (NGERNYAM et al., 2013).

Outra hipótese associada é a de que a liberação de mediadores químicos como: citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, no local do dano, possam desencadear o processo, esses mediadores agem diretamente nos axônios dos neurônios aferentes primários não lesionados, aumentando a excitabilidade. Por vez, tal aumento leva à liberação de mais mediadores nos terminais neuronais no corno dorsal da medula espinal (SMITH, P., 2014; NARO et al., 2016), exemplos dessas substâncias incluem: a quimiocina motivo C-C ligante 21 (CCL-21), proteína quimiotática de monócito atraente 1 (MCP-1) e a fractalcina (BEGGS; SALTER, 2013).

Uma das repercussões da interação dessas quimiocinas com os receptores na microglia quiescente, é a expressão do receptor purinérgico P2X4, passando a estar em conformidade com a microglia previamente ativa (SMITH, P. 2014). O influxo de Cálcio (Ca^{+2}) através dos receptores P2X4R estimula a fosforilação e ativação da proteína cinase ativada por mitógeno p 38 (p38-MAPK) a qual promove a síntese de BDNF e sua liberação pela microglia (BEGGS; SALTER, 2013; FERRINI; KONINCK, 2013).

Essas alterações acarretam no desenvolvimento lento de alterações na atividade de neurônios de segunda ordem presentes na lâmina I e na lâmina II do corno dorsal da medula espinal, acarretando no aumento geral da excitabilidade neuronal, responsável pelo mecanismo de sensibilização central (NARO et al., 2016). A microglia pode estar envolvida nos processos iniciais de desenvolvimento da dor persistente. A manutenção da dor neuropática parece ser dependente da ativação dos astrócitos e da contínua ativação da microglia (ZHANG; DEKONINCK, 2006; VACCA et al., 2014).

Essas mudanças ocasionam a diminuição do limiar de ativação, aumentando a resposta a estímulos, em relação a sua magnitude e duração, o que resulta no aumento da excitabilidade e da sensibilidade nos neurônios da medula espinal (NGERNYAM et al., 2013).

Por outro lado, estudos em modelos animais demonstraram que a inibição de células gliais na medula espinal pode atenuar ou bloquear efetivamente o desenvolvimento de dor neuropática (SMITH, H., 2010).

A reversão ou a modulação do sistema somatossensorial neural após lesão podem ser restabelecidos por meio da utilização de técnicas de estimulação cerebral não invasiva como a ETCC (NGERNYAM et al., 2013).

b) MODELOS ANIMAIS DE DOR NEUROPÁTICA

Os modelos animais são imprescindíveis para o entendimento da dor neuropática e para o desenvolvimento de terapias eficazes (JAGGI et al., 2011). Esses modelos, geralmente, envolvem a lesão cirúrgica dos nervos periféricos (BOADA et. al. 2014). JAGGI et al., 2011 citam alguns destes modelos conforme os que estão listados a seguir:

Axotomia

É o modelo mais antigo utilizado para produzir dor neuropática e consiste na transecção completa do nervo. Após anestesia do animal e exposição do nervo, o tecido conjuntivo é removido e o nervo ciático é fortemente amarrado com fio de sutura de nylon fazendo duas ligaduras, próximo à bifurcação nas divisões tibial e peroneal com cerca de 1 cm de distância. A seguir, o nervo é completamente transeccionado entre o par de ligaduras e 5mm do nervo, localizado entre as ligaduras, é removido para evitar regeneração. Esse modelo produz dor na região afetada na ausência de qualquer tipo de estímulo e pode ocasionar automutilação, a qual possui origem ambígua, uma vez que, não se tem certeza se ela é decorrente da dor neuropática ou pela ausência de resposta sensorial. A desvantagem desse método é infrequência de pacientes com lesão transeccional completa do nervo ciático na prática clínica.

Ligação parcial do nervo ciático

É um modelo frequentemente utilizado, que consiste na dissecação da pata traseira esquerda para expor o nervo ao nível da coxa, assim é possível ligar fortemente do terço dorsal até a metade do nervo ciático utilizando fio de sutura seda 8-0. São observados sinais comportamentais de dor espontânea na forma de proteção e lambida da pata no lado da lesão. Alodínia e hiperalgesia mecânica ocorrem dentro de uma semana após a cirurgia e a maioria das alterações persistem por 6 semanas. A magnitude e a duração das respostas à dor variam em função do fio de sutura utilizado e da espécie em estudo. É um modelo relevante para a compreensão da lesão neuropática de distúrbios da dor causal em humanos.

Lesão nervosa

É um modelo novo, no qual o rato é submetido à exposição dos três ramos femorais do nervo ciático, através da dissecação do músculo femoral, após, 2 desses ramos são ligados firmemente com seda 5-0 seguido por axotomia, o terceiro ramo permanece intacto. Hiperalgesia mecânica e térmica e alodínia são observadas em 4 dias após o procedimento persistindo por semanas até 6 meses. Esse modelo permite a comparação das diferenças de sensibilidades mecânicas e térmicas das áreas intactas e das áreas denervadas. O modelo contribui para estudos de fisiopatologia da dor, destacando-se no estudo de neurônios não lesionados no desenvolvimento de dor neuropática.

Lesão por constrição crônica

Desenvolvido por Bennet and Xie, 1988, é um dos modelos animais mais comumente utilizados e consiste na lesão por constrição crônica do nervo ciático. Sob anestesia é realizada uma incisão de cerca de 3 cm de comprimento sobre a área entre os músculos glúteo e bíceps femoral, através dessa secção, em torno de 7 milímetros de nervo ciático são expostos próximo à trifurcação ciática. A partir disso, são realizadas 3 ou 4 ligaduras soltas ao redor do nervo ciático com em torno de 1 milímetro de distância entre si, utilizando fio de sutura catgut cromado 4-0 ou seda 4-0, a amarradura deve ser executada até a observação de uma breve contração muscular. Cuidado deve ser tomado para que não ocorra interrupção do fluxo sanguíneo epineural. Esse tipo de constrição está associado a edema, isquemia e degeneração, sendo importante observar os sinais comportamentais de dor espontânea, como autotomia leve a moderada, lambida excessiva, movimentos anormais da pata traseira. As mudanças comportamentais de alodínia, hiperalgesia mecânica e térmica se desenvolvem dentro de uma semana, através de comportamentos relacionados à dor e assimetrias posturais, todos os quais têm manifestação máxima durante a segunda semana pós cirurgia, sendo que as alterações de dor persistem por pelo menos 7 semanas após o procedimento cirúrgico. Ocorre diminuição na velocidade da condução nervosa e maior dano em axônios mielinizados do que em axônios não mielinizados, havendo mononeuropatia periférica unilateral. A desvantagem do modelo é a ocorrência de algum grau de

variabilidade dolorosa decorrente da discrepância de pressão realizada no momento da amarradura. Além disso, o tipo de material de sutura e as diferentes espécies de ratos também podem contribuir para divergências na aplicação deste modelo. Apesar disso, o modelo tem contribuído para maiores investigações sobre os mecanismos de desenvolvimento da dor neuropática e para se buscar tratamentos novos e eficazes para a ela, por esses motivos, e pela fácil execução, associada ao vasto todo do modelo, o qual trouxe resultados positivos para a pesquisa da dor neuropática, o modelo de lesão por constrição crônica foi escolhido para ser utilizado neste estudo.

3.2. ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC) E OS EFEITOS NA DOR NEUROPÁTICA

A estimulação cerebral é uma técnica muito antiga utilizada há mais de 200 anos. Essa técnica foi reintroduzida há cerca de 30 anos e sua utilização vem emergindo nos últimos anos como alternativa de tratamento em diversas áreas (NGERNYAM et al., 2013). Desde seu ressurgimento como ferramenta terapêutica para melhora da dor, as técnicas de estimulação elétrica têm demonstrado resultados promissores no alívio da dor crônica (BRASIL NETO, 2016).

Dentre as formas existentes de estimulação elétrica, há aquelas que o fazem de maneira invasiva, através do implante de eletrodos epidurais ou subdurais nos pacientes, essa forma de tratamento tem proporcionado bons resultados, no entanto, em razão dos riscos relacionados à cirurgia de implante da estimulação invasiva, as técnicas não-invasivas vêm sendo melhor estudadas, demonstrando resultados promissores (BRASIL NETO, 2016).

Nos últimos 15 anos, houve evolução dos estudos voltados para o entendimento da neuropatologia e de parâmetros da estimulação como: área de aplicação da estimulação, o tamanho e posição dos eletrodos, bem como a intensidade e duração dos estímulos, permitindo o aprimoramento das técnicas de aplicação da estimulação cerebral (ARUL-ANADAM; LOO; SACHDEV, 2009).

Entre as diversas técnicas existentes para aplicação da estimulação não invasiva, podemos citar a estimulação transcraniana magnética (TMS) e a ETCC como as mais utilizadas, no entanto, técnicas como a TMS são de disponibilidade limitada, principalmente em países em desenvolvimento. Em contrapartida, a ETCC

é mais segura, barata, acessível e de mais fácil aplicação e, por isso, vem sendo utilizada atualmente (NARDONE et al., 2014; NGERNYAM et al., 2013). Além disso, os efeitos colaterais são incomuns e relativamente mínimos, sendo que os relatos mais frequentes incluem dores de cabeça, irritação cutânea e coceira no local da aplicação(O'NEILL, F.; SACCO, P.; NURMIKKO, T., 2015).

A ETCC é um método não invasivo e inovador que consiste na aplicação de correntes elétricas de baixa intensidade, que variam de 1-2 miliamperes (mA), em humanos (ARUL-ANADAM; LOO; SACHDEV, 2009; DOS SANTOS et al., 2012). Os eletrodos geram uma corrente elétrica de baixa amplitude em direção ao córtex, a qual atravessa o couro cabeludo e o crânio. Esses eletrodos se dividem em ânodo e cátodo, sendo que aquele dispara carga positiva e este carga negativa. As correntes contínuas produzidas pela aplicação de ETCC são capazes de modificar a excitabilidade cortical por alterar o potencial de membrana da rede neuronal (O'NEILL, F.; SACCO, P.; NURMIKKO, T., 2015).

De acordo com a polaridade dos estímulos é possível observar aumento ou diminuição da excitabilidade (ALM; DREIMANIS, 2013; FRITSCH et al., 2010; FUJIYAMA et al., 2014; NGERNYAM et al., 2013; RANIERI et al., 2012), a estimulação anodal promove diminuição da excitabilidade cortical, levando o potencial de membrana em repouso à despolarização e ao aumento do disparo neuronal espontâneo. Enquanto, a estimulação catodal promove aumento da excitabilidade de neurônios corticais, ocasionando alteração do potencial de membrana em repouso, hiperpolarização e diminuição do disparo neuronal espontâneo(ARUL-ANADAM; LOO; SACHDEV, 2009; NARO et al. 2016).

Vários locais de aplicação de ETCC têm sido utilizados, incluindo o córtex motor, o córtex pré-frontal dorsolateral, o córtex visual e o córtex somatossensorial (NGERNYAM et al., 2013). No entanto, ETCC apresenta resultados mais eficazes se o córtex motor recebe estimulação anodal, se o cátodo é colocado sobre a região M1, pois assim a analgesia ocorre (NARO et al. 2016). Por esse motivo, o córtex motor tem sido a área alvo mais frequentemente utilizada na maioria dos estudos (BRASIL NETO, 2016).

Os mecanismos sugeridos para os efeitos benéficos da ETCC incluem: em maior intensidade a estimulação paralela das fibras envolvidas no controle da modulação de percepção da dor que a estimulação direta de neurônios motores; a estimulação indireta das áreas distantes da área estimulada; a restauração do

sistema inibitório intracortical no córtex motor de pacientes com dor crônica; a liberação de opióides endógenos e as alterações em vários neurotransmissores no córtex motor, no estriado e no sistema límbico (BRASIL NETO, 2016). Os efeitos analgésicos produzidos pela ETCC podem resultar na modulação de estruturas neurais envolvidas em aspectos sensoriais, cognitivos e emocionais da dor crônica (NARO et al. 2016). Todas essas alterações específicas e duradouras na atividade neuronal, desencadeadas pela aplicação de ETCC, caracterizam plasticidade sináptica (FUJIYAMA et al., 2014; RANIERI et al., 2012).

Exames de imagem, como ressonância magnética funcional, sugerem que as mudanças ocasionadas no fluxo sanguíneo regional, na neurotransmissão glutamatérgica e nas funções da membrana, após a aplicação de ETCC, ocorrem também em regiões cerebrais subcorticais. De fato, parece que a ETCC é capaz de alterar o disparo neuronal espontâneo sem produzir potencial de ação durante a estimulação. As densidades das correntes produzidas pela ETCC no córtex são menores que o limiar do potencial de ação para neurônios corticais, (ARULANADAM; LOO; SACHDEV, 2009) o que explica a não indução do potencial de ação durante a aplicação de ETCC.

ANTAL e colaboradores (2010) comprovaram a eficácia da ETCC em tratar a dor crônica ocasionada por lesão medular espinal, o modelo experimental utilizado por eles consistiu na estimulação anodal sobre o córtex motor primário com aplicação de ETCC de 2mA durante 20 minutos. Interessantemente, os efeitos analgésicos foram cumulativos com diminuição do quadro de dor após as 5 sessões de tratamento. As diferenças entre os escores de dor no grupo que não recebeu ETCC e no grupo com estimulação ativa permaneceu até 2 semanas após o final do tratamento.

Esses resultados estão em concordância com estudos efetuados em pacientes expostos a estimulação anodal sobre o córtex motor com intensidade de 1mA por 20 minutos durante 5 dias, no qual foi possível observar uma redução na dor crônica, que se estendeu por várias semanas após o tratamento, podendo refletir as alterações plásticas nas sinapses neuronais (O'NEILL, F.; SACCO, P.; NURMIKKO, T., 2015).

Além disso, como mencionado anteriormente, os efeitos da ETCC se estendem a locais distantes ao local de aplicação da estimulação, esses efeitos atingem estruturas subcorticais e ocorrem, provavelmente, em função das conexões

interneurais entre esses locais. Estudos por análise de imagens em humanos indicam que a estimulação cortical pode reduzir a dor ou por modular a atividade nas redes cerebrais envolvidas no processo de dor, como o tálamo, ou pelo favorecimento dos mecanismos inibitórios descendentes (O'NEILL, F.; SACCO, P.; NURMIKKO, T., 2015).

3.3. PAPEL DO BDNF NA DOR NEUROPÁTICA E NA ETCC

O BDNF é pertencente a uma família de proteínas denominadas de fatores neurotróficos, os quais são responsáveis por diversas ações do desenvolvimento do SNC e do SNP. Essas substâncias são secretadas por células como neurônios, astrócitos e microglia e regulam as sinapses aferentes, através da promoção da sobrevivência de células neuronais. Além disso, são importantes reguladoras do crescimento e diferenciação celular, possuindo também a capacidade de regular a morte celular e o estado fisiopatológico (SINISCALCO et al., 2011).

O BDNF aumenta a densidade das espinhas sinápticas, o crescimento e ramificação axonal, facilitando assim a expressão de proteínas (FUZSINA et al., 2014). No entanto, baixos níveis na secreção de BDNF estão relacionados à disfunção do metabolismo cerebral que pode ocorrer na idade avançada ocasionando alterações na conectividade sináptica que acarretam em maior vulnerabilidade à degeneração (KAR; WRIGHT, 2013).

O BDNF inicialmente é produzido como pró-BDNF, o qual após clivagem resulta no BDNF. A taxa intra-sináptica de quebra de BDNF a pró-BDNF pode ter relação com a facilidade de produzir aumentos ou decréscimos na eficácia sináptica (CHEERAN et al., 2008). O pró-BDNF se liga ao receptor de neurotrofina p75, com a função de regular a morte celular (SMITH, 2014). Já o BDNF se liga ao receptor de tropomiosina-quinase B (TrkB) para ativar as vias de sinalização, que iniciam os processos de aumento da duração da resposta aos estímulos (*Wind up*), sensibilização central e diminuição do limiar de ativação dos neurônios no corno dorsal da medula espinal (WU et al., 2013).

Esse envolvimento no processo de sensibilização central e na plasticidade da medula espinal leva ao desenvolvimento e à manutenção da dor neuropática. Aumentos na expressão de BDNF no corno dorsal da medula espinal e na raiz

dorsal da medula espinal estão associados à indução da dor neuropática nos estágios iniciais de lesão no nervo (SINISCALCO et al., 2011).

Em humanos, um polimorfismo pode ser observado onde a valina da posição 66 é substituída por uma metionina (Val66Met BDNF), esse polimorfismo parecer ter relação com diversos efeitos, incluindo modificações cerebrais moleculares, estruturais e celulares. Existe a possibilidade de que indivíduos com essa alteração tenham maior probabilidade de apresentar resposta maladaptativa, esse é um fator importante, considerando que portadores dessa variação podem ser mais propensos a desenvolver dor neuropática em resposta à lesão nervosa (SMITH, 2014).

Ademais, pacientes que apresentam polimorfismo do BDNF podem apresentar diferentes respostas às intervenções modulatórias da plasticidade cerebral, incluindo as técnicas de estimulação não invasiva (FUJIYAMA et al., 2014). Além disso, essas pessoas podem apresentar resposta diminuída à aplicação de protocolos de estimulação que alteram a excitabilidade cortical (CHEERAN et al., 2008). Por outro lado, estudos em fatias de córtex de ratos submetidos à ETCC anodal demonstraram aumento na secreção de BDNF (FRITSCH et al., 2010).

Da mesma forma, os efeitos a longo prazo resultantes da aplicação da ETCC podem ser resultado das modificações persistentes na eficácia sináptica, similares as que ocorrem na potenciação de longa duração e na depressão de longa duração da atividade sináptica demonstrada, tanto em estudos experimentais, quanto em humanos (RANIERI et al., 2012). O BDNF modula os receptores NMDA LTP e LTD dependentes, logo os efeitos da ETCC podem influenciar os mecanismos de ação do BDNF (CHEERAN et al., 2008).

Considerando os fatos mencionados, esse estudo visou buscar respostas para aspectos comportamentais e bioquímicos, que envolvem os aspectos da dor e da neuromodulação, em fases distintas da neurogênese, que carecem esclarecimento, além de tentar elucidar o possível envolvimento do BDNF nesse processo.

4. MANUSCRITO

Os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de manuscrito submetido ao periódico *Experimental Brain Research*.

Dear Dr Custodio de Souza,

Thank you for submitting your manuscript,
"Evaluation of the effects of Transcranial Direct Current Stimulation
in an animal model of chronic constriction injury in young and adult
rats", to Experimental Brain Research

The submission id is: EXBR-D-17-00111

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your
manuscript by accessing the following web site:

<http://exbr.edmgr.com/>

Your username is: izabel.souza@ufpel.edu.br

Your password is: available at this

link [http://exbr.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstnam
e=Izabel+Cristina&lastname=Custodio+de+Souza&email_address=izabel.sou
za@ufpel.edu.br](http://exbr.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Izabel+Cristina&lastname=Custodio+de+Souza&email_address=izabel.souza@ufpel.edu.br)

With kind regards,

Journals Editorial Office EXBR
Springer

Experimental Brain Research

Evaluation of the effects of Transcranial Direct Current Stimulation in an animal model of chronic constriction injury in young and adult rats

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Evaluation of the effects of Transcranial Direct Current Stimulation in an animal model of chronic constriction injury in young and adult rats
Article Type:	Research Article
Funding Information:	
Abstract:	Background: Neuropathic pain (NP) is caused by a lesion that triggers pain chronification and central sensitization and recent studies have demonstrated the efficacy of transcranial direct current stimulation (tDCS) for treating NP. According to our knowledge, this is the first study that describes the tDCS application in young and adult rats neuropathic pain model. Aims: Male Wistar rats at 30 and 60 days-old were divided in nine groups: Total Control (CT); Control-Sham tDCS (CS); Control-tDCS (CE); Sham surgery (ST); Sham surgery-sham tDCS (SS); Sham-tDCS (SE); Lesion (LT); Lesion-Sham tDCS (LS); Lesion-tDCS (LE). Rats were submitted to chronic constriction injury (CCI) or sham-operation. After the establishment of pain, rats were subjected to 20 minutes of prefrontal cortex anodal tDCS for 8 consecutive days. Nociceptive behavior was assessed using Hot Plate and von Frey tests, at the following time points: baseline, fourteen days after surgery, 24h after tDCS and 7 days after tDCS. The BDNF levels were measured at spinal cord and serum 8 days after last session of tDCS using ELISA assay. Histological analyses were made in the right sciatic nerve. Results: At the end of treatment we observe an increase in pain threshold at short term in young rats and at long term for adult rats. In young rats, spinal cord BDNF levels were decreased in spinal cord although prefrontal cortex and serum BDNF levels were not altered at long term. Conclusion: The tDCS is an effective technique to relief nociceptive behavior in young and adults rats with neuropathic pain.
Corresponding Author:	Izabel Cristina Custodio de Souza, PhD Universidade Federal de Pelotas Pelotas, Rio Grande do Sul BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Pelotas
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Priscila Centeno Crespo
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Priscila Centeno Crespo
	Vanessa Leal Scarabelot
	Otávio Garcia Martins
	Clara Camacho dos Reis
	Giovana Duzzo Gamaro
	Iraci Lucena da Silva Torres
	Sabrina Pereira Silva
	Marcos Roberto de Oliveira
	Paulo Roberto Stefani Sanches

	Liciane Fernandes Medeiros
	Izabel Cristina Custodio de Souza, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	
Suggested Reviewers:	Rafael Vercelino Professor and Researcher, Universidade Federal de Ciencias da Saude de Porto Alegre rvercelino@gmail.com Expertise in neuroscience, pain physiology and rehabilitation medicine Wolnei Caumo Professor and Researcher, Universidade Federal do Rio Grande do Sul wcaumo@hcpa.edu.br Expertise in neuromodulation of pain , pain treatment and anesthesia André Russowsky Brunoni Universidade de Sao Paulo brunoni@usp.br Expertise in tDCS and Neuroscience Luciana Paula Cadore Stefani Professor, Hospital de Clinicas de Porto Alegre lpstefani@hcpa.edu.br Expertise in Pain Treatment and neuromodulation of pain and anesthesia Alexandre da Silva Quevedo Professor and Researcher, Universidade Federal do Rio Grande do Sul quevedoalexandre@hotmail.com Expertise in Modulation of pain perception by peripheral or central mechanisms

Evaluation of the effects of Transcranial Direct Current Stimulation in an animal model of chronic constriction injury in young and adult rats

Priscila Centeno Crespo^{1,2,3}, Vanessa Leal Scarabelot^{4,5}, Otávio Garcia Martins², Clara Camacho Dos Reis², Liciane Fernandes Medeiros⁴, Giovana Duzzo Gamaro³, Sabrina Pereira Silva³, Marcos Roberto De Oliveira⁶, Iraci Lucena Da Silva Torres⁵, Paulo Robert Stefani Sanches⁷, Izabel Cristina Custódio De Souza ^{*2,3}

¹Postgraduate Program in Bioprospecting and Biochemistry, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil.

²Laboratory of Cell Neuromodulation: Basic Researches, Biology Institute - Department of Morphology, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, 96030-000, Brazil

³Program in Bioprospecting and Biochemistry, UFPel, Pelotas, RS, 96030-000, Brazil.

⁴Postgraduate Program in Medicine - Medical Sciences – Medicine School - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

⁵Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Preclinical Researches, Pharmacology Department, Health Basic Sciences Institute, UFRGS, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

⁶Department of Chemistry, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367, Cuiabá, MT, 78060-900, Brazil

⁷Biomedical Engineering of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, 90035-003, 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:

Corresponding author: Izabel Cristina Custódio de Souza

Izabel Cristina Custodio de Souza, PhD

Professor - Federal University of Pelotas

Biology Institute / Department of Morphology

250 Duque de Caxias Av. Pelotas, RS 96030000

Phone: 55 53 3221-1044

ORCID: 0000-0002-6117-1810

Abstract

Background: Neuropathic pain (NP) is caused by a lesion that triggers pain chronification and central sensitization and recent studies have demonstrated the efficacy of transcranial direct current stimulation (tDCS) for treating NP. According to our knowledge, this is the first study that describes the tDCS application in young and adult rats neuropathic pain model.

Aims: Male *Wistar* rats at 30 and 60 days-old were divided in nine groups: Total Control (CT); Control-Sham tDCS (CS); Control-tDCS (CE); Sham surgery (ST); Sham surgery-sham tDCS (SS); Sham-tDCS (SE); Lesion (LT); Lesion-Sham tDCS (LS); Lesion-tDCS (LE). Rats were submitted to chronic constriction injury (CCI) or sham-operation. After the establishment of pain, rats were subjected to 20 minutes of prefrontal cortex anodal tDCS for 8 consecutive days. Nociceptive behavior was assessed using Hot Plate and von Frey tests, at the following time points: baseline, fourteen days after surgery, 24h after tDCS and 7 days after tDCS. The BDNF levels were measured at spinal cord and serum 8 days after last session of tDCS using ELISA assay. Histological analyses were made in the right sciatic nerve.

Results: At the end of treatment we observe an increase in pain threshold at short term in young rats and at long term for adult rats. In young rats, spinal cord BDNF levels were decreased in spinal cord although prefrontal cortex and serum BDNF levels were not altered at long term.

Conclusion: The tDCS is an effective technique to relief nociceptive behavior in young and adults rats with neuropathic pain.

Key words: neuropathic pain, non-invasive brain stimulation, tDCS, neurogenesis, BDNF

Introduction

Neuropathic pain (NP) is a complex syndrome that affects the somatosensory system and can occur due trauma or lesion to the peripheral or central nervous system (Dos Santos et al., 2012). NP is a consequence of multiple altered mechanisms, such as functional reorganization and hyper-excitability of somatosensory and motor cortex (Cioato et al., 2016). NP is uncommon in young humans however it can be developed in young subjects as well in adults, however in young NP drives to a faster resolution. Interestingly, in animal model, before four weeks of development, NP does not develop in rats using the spared nerve injury or the chronic constriction injury models. (Vega-Avelaire et al., 2009).

NP patients are often refractory to pharmacological treatment, although several studies have demonstrated that the application of weak electrical currents upon cortex alleviates these symptoms in neuropathic pain conditions (Boldt et al., 2014; Cioato et al., 2016). Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) is a non-invasive, safe and well-tolerated technique (Antal et al., 2010; Liu et al., 2015) that consists in the application of weak electric current upon cortex (Dimov et al., 2016) and can modulates cortical excitability in humans (Antal et al., 2010; Rjosk et al., 2016) and rats (Dockery et al., 2011). Studies have revealed that the tDCS effects can be extended to subcortical structures (Dimov et al., 2016).

Several studies have described tDCS effects in neuropathic pain in humans (Palm et al., 2016) and some studies in rats (Cioato et al., 2016; Filho et al., 2016). The mechanisms underlie the effects of tDCS upon neuropathic pain remain unclear; however previous studies showed that analgesic effect of tDCS can be linked to a reduction of interleukin (IL) -1 β and IL-10 levels in the spinal cord (Cioato et al., 2016) and to decrease in the BDNF levels in spinal cord and brainstem (Spezia et al., 2015).

It is known that the Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) has a crucial role in neuroplasticity (Fujiyama et al., 2014). And according to previous studies can be related to

tDCS effects on neuropathic pain in some central nervous structures (Ayache et al., 2016;; Knotkova et al., 2013; Volz et al., 2016). On the other hand, this neurotrophins presents an important role in central nervous system (CNS) development and neurogenesis (Khan, 2015), and, low rate of BDNF secretion age-related could leads to synaptic connectivity alterations and degeneration vulnerability (Kar et at., 2013).

Considering the importance of age in the development of neuropathic pain after chronic constriction injury (CCI) and probably changes in the analgesic response of tDCS, the objective of the present manuscript was to evaluate the tDCS effects in young and adult rats subjected to the injury (CCI) upon nociceptive behavior, take into account age (30 or 60 days-old rats), and BDNF nervous system levels.

Methods

Animals

A total of 85 male *Wistar* rats 30 days old (young rats) weighting 75-100g and 88 male *Wistar* rats 60 days old (adult rats) weighting 200–250 g provided by the Central Vivarium of Federal University of Pelotas (UFPel) were used. The animals were randomized by weight and grouped in three to four per cage. Each cage was measuring 65 cm x 25 cm x 15 cm, covered with wood shavings floor. These animals were maintained in a controlled environment with light-dark cycle of 12 hours at room temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) with water and feed *ad libitum*. They were carried out all necessary procedures to minimize pain and discomfort. The Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEAA 10480-2014) approved all experiments and procedures and it was performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed. The number of animals used in this experiment was the minimal necessary to produce reliable scientific data.

Experimental design

Before the experiment began the rats were acclimated to the maintenance room for 5 days. The animals were divided into the following nine groups: Total Control (CT); Control-Sham tDCS (CS); Control-tDCS (CE); Sham surgery (ST); Sham surgery-sham tDCS (SS); Sham-tDCS (SE); Lesion (LT); Lesion-Sham tDCS (LS); Lesion-tDCS (LE). After the establishment of NP assessed by nociceptive tests, the rats were submitted to a daily tDCS session for eight consecutive days. The mechanical hyperalgesia were performed at baseline, 14 days after the CCI surgical procedure, 24 hours after the last session of tDCS, and 7 days after the last session of tDCS. The rats were killed by decapitation 24 hours after the end of the treatment, and central nervous system structure were collected (Fig. 1). All the animals subjected to the surgical procedure received analgesia with tramadol.

Neuropathic Pain model

For induction of NP, chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve was performed according model described by Bennett and Xie (1988). The rats were anesthetized with ketamine (80mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Briefly the right leg was shaving on the region of the procedure and the antisepsis of the skin was done with 2% iodine–alcohol. After, the incision was made and sciatic nerve was exposed and three ligatures were tied (Catgut 4.0) around it at 1mm intervals without impeding the epineural blood flow. Only one person executed the ligatures to guarantee the equal constriction in all rats. Then, the skin was sutured using Mononylon 4.0. For sham surgery, the sciatic nerve was exposed in the procedure but the nerve was not ligated, and for control group, rats were not were submitted to any surgical procedure. All the animals underwent to the surgical procedure received analgesia with tramadol 10 mg/kg (Austin et al., 2011).

Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS)

After 14 days of the surgery, the establishment NP was confirmed by nociceptive test, the rats were submitted to tDCS treatment. The application of tDCS consisted of a 20-minute session of bicephalic tDCS for 8 days, as described by Cioato et al. (2016) with minor modifications, the electrodes were positioned upon prefrontal cortex of rats. A battery powered stimulator emitted a constant direct current of 0.5 mA to the electrodes. For guarantee adherence of the electrodes, the CCI and sham rats' heads were shaved. Then, at the supraorbital area the cathodal electrode was placed and on the midline between the two hemispheres of the parietal cortex the anodal electrode was positioned. For sham stimulation, the electrodes were placed in the same position of active tDCS but the stimulation was not done. The control rats were not exposed to this procedure.

Thermal Hyperalgesia assessed by Hot plate test

This test was made in three points of experiment, on the baseline, 7 and 14 days after surgery. The rats were exposed to the hot plate for 1 minute, 24 hour before the test to avoid analgesia for novelty (Netto et al., 1987). The test was carried out after the temperature range from 55 ± 0.1 °C. The rats were exposed to the test and the latency of the time of the beginning of the test until the animal shows a response (foot-licking, jumping, or rapidly removing paws) was recorded like nociceptive response (Caggiula et al., 1995; Rubinstein et al., 1996). Twenty-four hours before the test day, the animals were habituated to the apparatus for 5 minutes to avoid analgesia induced by the novelty of apparatus (Netto et al., 1987). To avoid tissue damage in rat's paws, we used cut-off of 20 seconds.

Mechanical Allodynia assessed by electronic von Frey test

The assessment of mechanical hyperalgesia occurred at baseline, 14 days after surgery, 24 hours and 7 days after the end of the treatment. An automatic von Frey anesthesiometer (Insight, Sao Paulo, Brazil) were used. The rats were placed in polypropylene cages measuring 12 cm × 20 cm × 17 cm and one day before the test they were habituated to the cages for 20 minutes (Netto et al., 1987). In this test the pressure intensity is recorded automatically after paw withdrawal (Vivancos et al., 2004). The test comprises the application of force in grams (unit of measurement) in the animal's paw. Pain was accessed by paw withdrawal test which consists of measuring in grams the animal's pain threshold. The equipment of the force application range comprises the range 0.1 to 80 grams. The force was applied to the right paw of the animals was checked and the threshold at which the animal withdrew the paw upon application of force. Three readings of von Frey test were made and the average was used as behavior response.

Tissue collection

Eight days after the last session of tDCS, the animals were euthanized and serum, pre-frontal cortex and the spinal cord were collected were kept frozen at -80 °C until processing. The right sciatic nerve were collected and kept in formaldehyde 10% for 24 h and processed.

Histological analysis

After collection, the right sciatic nerve was fixed in paraformol solution to 10% for a minimum period of three hours. The samples were processed according to routine histological techniques to paraffin embedding. Three histological sections were made for each blade three slides for each animal group stained with hematoxylin-eosin. The sections were analyzed by optical light microscope (Nikon Eclipse E200) at 100x magnification. The images were

captured randomly in three areas of each of the blades and analyzed by the program, Motic Images Plus 2.0. These thicknesses were scanned with Digital Camera (Moticam 5.0 mp) coupled to an optical light microscope with a resolution of 2048 x 1536 pixels, as calibration obtained by using a standard scale. The figures showed that had constriction points where sciatic nerve was tied.

BDNF assay

The serum was collected and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. BDNF levels were measured using sandwich ELISA with monoclonal antibodies specific for BDNF (R&D Systems, Minneapolis, United States). Total protein was determined by Bradford's method using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

The Generalized Estimating Equation (GEE) followed by Bonferroni was performed to analyze the results of behavior tests. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls (SNK) was performed to compare the biochemical data between groups. The data were expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M) and considered significant at $P \leq 0.05$. SPSS 20.0 for Windows was used for the statistical analysis.

Results

Histological analyses

The image below show that the model of CCI successfully produced a constriction of the sciatic nerve. In this image, we can observe a constricted zone where the nerve was tied (Fig. 2).

Hot plate test

Initially, the animals were divided in three groups: total control, sham, and surgery. The hot plate test was applied twice: at baseline and 14 days after surgery. We observed interaction between time x group (Wald $\chi^2=29.28$; 6, $P<0.001$), where neuropathic pain model was established 14 days after the surgery procedure (Fig. 3).

Mechanical hyperalgesia

This study comprises two phases: phase I, the animals were 30 days at the beginning of the study. Phase II, the animals were 60 days at the beginning of the study. The animals were evaluated at different time points (baseline, 14 days after surgery, 24 h and 7 days after the end of tDCS treatment. In the phase I, the generalized estimation equation presented interaction between time x group (Wald $\chi^2=1,709.97$; 24, $P<0.001$). At baseline there was no difference between groups. Fourteen days after surgery the three groups exposed to surgery showed a significant increase in the nociceptive behavior (lower threshold) compared to control and sham-surgery groups. The tDCS group showed a significant increase in the pain threshold at 24h after end of treatment compared to pain no-tDCS groups (LT and LS), suggesting an anti-hyperalgesic effect. However, 7 days after treatment this effect is similarly to sham effect (LS) (Fig.4, Panel A). In the phase II, it was observed a different effect, there was interaction between time x group (Wald $\chi^2=857.72$; 24, $P <0.001$) and tDCS was able to increase the pain threshold only seven days after the end of treatment (Fig.4, Panel B).

BDNF assays

In the prefrontal cortex of P30 (young) rats exposed to pain model, it was observed that BDNF levels and tDCS treatment was unable to reverse this effect at long term. In addition, it was also observed in the groups submitted to sham of tDCS, indicating a possible effect of

manipulation and/or immobilization of this animals (One-way ANOVA/SNK, $F_{(5,33)}=4.10$, $P<0.05$) (Fig. 5, Panel A). On the other hand, in the spinal cord, it was observed that tDCS was able to reduce the BDNF levels compared to pain group and this reduction was higher in the animals without pain (sham tDCS group) (One-way ANOVA/SNK, $F_{(5,34)}=8.28$, $P<0.05$) (Fig. 5, Panel B). The BDNF serum levels were not modified by pain model or treatment (One-way ANOVA/SNK, $P>0.05$) (Fig. 5, Panel C).

Discussion

In this study, we used a CCI model to induce neuropathic pain in young and adult rats and according to figure 2, we could observe a constriction point in the section of right sciatic nerve, suggesting that the constricted was made successfully causing nerve narrowing and the model was well done in accordance with we expected. Furthermore, these findings are confirmed by hot plate test. If the figure 3 was observed we can see that rats of all groups submitted to the surgery of CCI model demonstrated thermal hyperalgesia 14 days after surgery compared to the baseline measure, concluding that the neuropathic pain model was established.

Fourteen days after the CCI induction, we found the rats submitted to surgery presented lower thermal threshold compared to the baseline measurement, thus characterizing thermal hyperalgesia and the neuropathic pain model was well established. In addition, we observed that mechanical allodynia presented by CCI rats was reversed 24hs after last session of tDCS. The test of hypersensitivity to the mechanical stimulus is the most common method used to measure the magnification of the neuropathological condition (Boada et. al. 2015).

A time course assessment was made at P30 and P60 using von Frey test: baseline, 14 days after surgery, 24 hour after the end of tDCS (short-term effect) and 7 days after last session of tDCS effects (long term effect). According to Figure 4 Panel A and B, we observed

that in the baseline rats presented similar threshold at P30 (young) and P60 (adult), after that the rats were subdivided into following groups. Fourteen days after neuropathic pain induction, we observed that all rats subjected to CCI surgery demonstrated decreased mechanical allodynia, since the threshold decreased statistically significant for both ages (P30 and P60). Mechanical allodynia and hyperalgesia are behavioral signs of neuropathic pain (Lu et al., 2009). Our results corroborate previous studies that used CCI model in *Wistar* rats of 55 – 65 days old (Cioato et al., 2016).

Interestingly, we noticed that bicephalic tDCS was able to reverse the hypernociceptive behavior only 24 hour after last session, and we assessed 7 days after last session the analgesic effect is lost in young rats. On the other hand, tDCS was able to reverse hypernociceptive behavior only 7 days after last session of tDCS in adult rats. It is possible observe in our results that there is an increase of mechanical threshold according to increase the age corroborating Nunes et al. 2016, in press. For the first time, we are showing tDCS effects in young rats with neuropathic pain. Our results found at P60 corroborates previous study from Cioato et. al. 2015 and Filho et. al. 2016. Repetitive tDCS was able to increase the threshold of adult *Wistar* rats (55-65 days-old) after mechanical hyperalgesia induced by a NP model, using similar tDCS protocol treatment (Cioato et al., 2016). According to our results, studies with 40 healthy human individuals adult (with medium age ranging 68 years old) and young (with medium age around 23 years) reveled that older adults exhibited a delayed response to anodal tDCS comparing to young adults (Fujiyama, 2014). Furthermore, our findings added new information that tDCS is effective to reduce hypernociceptive behavior in young rats with CCI injury, however in our data we observed that in old rats the analgesic effect is only presented at long-term assessment. Several studies showed that tDCS applied on the primary motor cortex or to the prefrontal cortex demonstrated significant reduction of pain (Da Silva, 2015). tDCS has been shown to modify cortical excitability because it provides

1 enough electrical current to the cortical and subcortical areas (Roche et al., 2009; Schestatsky
2 et al., 2013). In addition, the induced after-effects of tDCS depend on the polarity, the
3 duration and the intensity of the stimulation (Csifcsak et. al., 2009). Along with, studies have
4 shown that anodal tDCS increases corticospinal excitability of local stimulation and distant
5 areas of stimulation site and attribute this to the interconnections between these sites (Vaseghi
6 et al., 2015). The fully action mechanism of tDCS is not well understood; however evidences
7 suggest that tDCS can act through direct and indirect pathways (Coull et al., 2005). In our
8 study, we used bicephalic stimulation and BDNF levels of young rats were assessed in
9 prefrontal cortex and spinal cord structures.

10 However, prefrontal cortex BDNF levels do not presented statistically difference
11 between the LE group and LT and LS groups. It should happen because the young rats
12 demonstrated that the tDCS effects has increased the threshold of neuropathic pain rats (LE
13 group) compared with LT and LS group at short term (24 hours after the end of tDCS), but
14 not at long term (7 days after treatment). The rats were euthanized 8 days after the end of
15 treatment, so the tDCS effects were not more present in these rats and for the same reason
16 serum BDNF levels do not altered. However, BDNF is widely distributed in human brain and
17 play important role in support neuronal structure and function (Soltész et al., 2014) and a
18 variety role in development (Cheeran et al., 2008).

19 Boudes and Menigoz (2009) demonstrated that BDNF mediates changes in excitatory
20 synaptic transmission in the dorsal horn of rats with sciatic nerve injury. Furthermore, in our
21 research, spinal cord BDNF levels demonstrated statistically difference when LE group is
22 compared with LT and LS group, showing that BDNF levels were reduced in LE group.
23 Although, SE group presented the same statistically difference comparing with ST but not to
24 SS groups. Filho et. al. 2016 investigated the influence of the effects of BDNF in adult rats
25 with induced neuropathic pain. They found a decrease in the level of BDNF in serum and in

1 the cerebral cortex and an increase in spinal cord at long term in adult neuropathic pain rats,
2
3 showing that tDCS can induce and modulate neuroplasticity (Kuo et al., 2014; Pirulli et al.,
4
5 2013),
6
7

8 Concluding, biochemical analyzes of young BDNF levels were not enough to
9
10 elucidate the effects of tDCS on neuroplasticity because it was evaluated at long term, then in
11
12 future studies will be necessary to evaluate BDNF pre-frontal cortex levels at short term, we
13
14 believe that in this time point these levels will be statistically significant comparing the LE
15
16 with LT and LS groups. However, our study demonstrated the efficacy of tDCS in pain
17
18 alleviates in young and adult with induced neuropathic pain. Young rats showed effects tDCS
19
20 at short term while adult rats demonstrate this response at long term, showing tDCS can
21
22 reduce pain in both ages. However, more studies are necessary to elucidate BDNF and tDCS
23
24 effects in development and in neuropathic pain.
25
26
27
28
29
30
31

32 **Conclusion**

33
34 By the analyzing of this data was possible to conclude that the CCI model was able to
35
36 induce chronic constriction of sciatic nerve. The von Frey test showed that neuropathic pain
37
38 was induced 14 days after the surgical procedure and that tDCS promote pain alleviates in 30
39
40 and 60 days rats. These effects could be observed at short for young rats and long term for 60
41
42 rats. Furthermore, the threshold of young rats can be affected for the development. Spinal
43
44 cord BDNF levels were decreased in young rats, although prefrontal cortex and serum BDNF
45
46 levels were not altered by tDCS effects at long term in young rats showing that the tDCS
47
48 effects no remain at long term in young rats.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acknowledgements

We thank Committee Development of Higher Education Personnel (CAPES) for supporting the research and Histology Laboratory, Department in the Morphology, Biology Institute at Universidade Federal de Pelotas (Eliane Freire Anthonisen, Luis Augusto Xavier Cruz and Luis Otavio Lobo Centeno) for helping us.

Funding

This study was supported by MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 (Izabel Cristina Custodio de Souza) and Biomedical Engineering Sector HCPA - MCT/FINEP – COENG/2013 (Paulo Roberto Stefani Sanches).

References

1. Antal A, Terney D, Kühnl S, Paulus W (2010) Anodal Transcranial Direct Current Stimulation of the Motor Cortex Ameliorates Chronic Pain and Reduces Short Intracortical Inhibition. *J Pain Symptom Manage* 39:890–903. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2009.09.023
2. Austin PJ, Wu A, Moalem-Taylor G (2012) Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. *J Vis Exp* 1–6. doi: 10.3791/3393
3. Ayache SS, Palm U, Chalah MA, et al (2016) Prefrontal tDCS decreases pain in patients with multiple sclerosis. *Front Neurosci* 10:1–12. doi: 10.3389/fnins.2016.00147
4. Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result. *Pain* 33:87–107. doi: 10.1016/0304-3959(88)90209-6
5. Boada MD, Gutierrez S, Aschenbrenner CA, et al (2015) Nerve injury induces a new profile of tactile and mechanical nociceptor input from undamaged peripheral afferents. *J Neurophysiol* 113:100–9. doi: 10.1152/jn.00506.2014
6. Boldt I, Eriks-Hoogland I, Brinkhof MW, et al (2014) Non-pharmacological interventions for chronic pain in people with spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev*. doi: 10.1002/14651858.CD009177.pub2
7. Boudes M, Menigoz A (2009) Non-neuronal BDNF, a key player in development of central sensitization and neuropathic pain. *J Physiol* 587:2111–2. doi:

10.1113/jphysiol.2009.172130

8. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
9. Caggiula AR, Epstein LH, Perkins KA, Saylor S (1995) Different methods of assessing nicotine-induced antinociception may engage different neural mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 122:301–306. doi: 10.1007/BF02246552
10. Cheeran B, Talelli P, Mori F, et al (2008) A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. *J Physiol* 586:5717–5725. doi: <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.159905>
11. Cioato SG, Medeiros LF, Marques Filho PR, et al (2016) Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model. *Brain Stimul.* 209–17.
12. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ (2010) NIH Public Access. *Annu Rev Neurosci* 32:1–32. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135531.Neuropathic
13. Coull J a M, Beggs S, Boudreau D, et al (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017–1021. doi: 10.1038/nature04223
14. Csifcsak G, Antal A, Hillers F, et al (2009) Modulatory effects of transcranial direct current stimulation on laser-evoked potentials. *Pain Med* 10:122–132. doi: 10.1111/j.1526-4637.2008.00508.x
15. DaSilva AF, Volz MS, Bikson M, Fregni F (2011) Electrode positioning and montage in transcranial direct current stimulation. *J Vis Exp* e2744. doi: 10.3791/2744
16. Dimov LF, Franciosi AC, Pinheiro Campos AC, et al (2016) Top-Down Effect of Direct Current Stimulation on the Nociceptive Response of Rats. *PLoS One* 11:1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0153506
17. Dockery CA, Liebetanz D, Birbaumer N, et al (2011) Cumulative benefits of frontal transcranial direct current stimulation on visuospatial working memory training and skill learning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 96:452–460. doi: 10.1016/j.nlm.2011.06.018
18. DosSantos MF, Love TM, Martikainen IK, et al (2012) Immediate effects of tDCS on the μ -opioid system of a chronic pain patient. *Front Psychiatry* 3:1–6. doi: 10.3389/fpsyt.2012.00093
19. Filho PRM, Vercelino R, Cioato SG, et al (2016) Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 64:44–51. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.06.016

20. Fujiyama H, Hyde J, Hinder MR, et al (2014) Delayed plastic responses to anodal tDCS in older adults. *Front Aging Neurosci* 6:1–9. doi: 10.3389/fnagi.2014.00115
21. Kar K, Wright J (2014) Probing the mechanisms underlying the mitigation of cognitive aging with anodal transcranial direct current stimulation. *J Neurophysiol* 111:1397–9. doi: 10.1152/jn.00736.2013
22. Khan N, Smith MT (2015) Neurotrophins and neuropathic pain: Role in pathobiology. *Molecules* 20:10657–10688. doi: 10.3390/molecules200610657
23. Knotkova H, Portenoy RK, Cruciani RA (2013) Transcranial direct current stimulation (tDCS) relieved itching in a patient with chronic neuropathic pain. *Clin J Pain* 29:621–2.
24. Kuo MF, Paulus W, Nitsche MA (2014) Therapeutic effects of non-invasive brain stimulation with direct currents (tDCS) in neuropsychiatric diseases. *Neuroimage* 85:948–960. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.05.117
25. Liu A, Bryant A, Jefferson A, et al (2016) Exploring the efficacy of a 5-day course of transcranial direct current stimulation (TDCS) on depression and memory function in patients with well-controlled temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 55:11–20. doi: 10.1016/j.yebeh.2015.10.032
26. Lu VB, Biggs JE, Stebbing MJ, et al (2009) Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. *J Physiol* 587:1013–1032. doi: 10.1113/jphysiol.2008.166306
27. Netto CA, Siegfried B, Izquierdo I (1987) Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: Effect of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol* 48:304–309. doi: 10.1016/S0163-1047(87)90850-8
28. Nunes EA, Medeiros LF, de Freitas JS, et al (2016) Morphine Exposure during Early Life Alters Thermal and Mechanical Thresholds in Rats. *International Society for Developmental Neuroscience*
29. Palm U, Chalah MA, Padberg F, et al (2016) Effects of transcranial random noise stimulation (tRNS) on affect, pain and attention in multiple sclerosis. *Restor Neurol Neurosci* 34:189–199. doi: 10.3233/RNN-150557
30. Pirulli C, Fertonani A, Miniussi C (2013) The role of timing in the induction of neuromodulation in perceptual learning by transcranial electric stimulation. *Brain Stimul* 6:683–689. doi: 10.1016/j.brs.2012.12.005
31. Rjosk V, Kaminski E, Hoff M, et al (2016) Transcranial Alternating Current Stimulation at Beta Frequency: Lack of Immediate Effects on Excitation and Interhemispheric Inhibition of the Human Motor Cortex. *Front Hum Neurosci* 10:560. doi: 10.3389/fnhum.2016.00560
32. Roche N, Lackmy A, Achache V, et al (2011) Effects of anodal transcranial direct

- current stimulation over the leg motor area on lumbar spinal network excitability in healthy subjects. *J Physiol* 589:2813–2826. doi: 10.1113/jphysiol.2011.205161
33. Rubinstein M, Mogil JS, Japón M, et al (1996) Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking β -endorphin by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3995–4000. doi: 10.1073/pnas.93.9.3995
34. Schestatsky P, Morales-Quezada L, Fregni F (2013) Simultaneous EEG monitoring during transcranial direct current stimulation. *J Vis Exp* 1–11. doi: 10.3791/50426
35. Soltész F, Suckling J, Lawrence P, et al (2014) Identification of BDNF sensitive electrophysiological markers of synaptic activity and their structural correlates in healthy subjects using a genetic approach utilizing the functional BDNF Val66Met polymorphism. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0095558
36. Spezia LN, Quevedo AS, De Souza A, et al (2015) Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Exp Brain Res* 233:1377–1389.
37. Vaseghi B, Zoghi M, Jaberzadeh S (2015) The effects of anodal-tDCS on corticospinal excitability enhancement and its after-effects: conventional vs. unihemispheric concurrent dual-site stimulation. *Front Hum Neurosci* 9:1–13. doi: 10.3389/fnhum.2015.00533
38. Vega-Avelaira D, Géranton SM, Fitzgerald M (2009) Differential regulation of immune responses and macrophage/neuron interactions in the dorsal root ganglion in young and adult rats following nerve injury. *Mol Pain* 5:70. doi: 10.1186/1744-8069-5-70
39. Vivancos GG, Verri WA, Cunha TM, et al (2004) An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian J Med Biol Res* 37:39139–9.
40. Volz MS, Farmer A, Siegmund B (2016) Reduction of chronic abdominal pain in patients with inflammatory bowel disease through transcranial direct current stimulation: a randomized controlled trial. *Pain* 157:429–37. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000386

Captions

Fig. 1 Time-line of the experimental design

Fig. 2 Image of the right constricted sciatic nerve of an adult rat. Histological section stained with hematoxylin-eosin in magnification of 400 times

Fig. 3 Evaluation of thermal hyperalgesia induced by chronic constriction injury 14 days after injury using hot plate test. Data are presented as the Mean $\pm$ SEM. Total Control, Sham surgery, Lesion. (*) different from others groups. GEE: interaction time x group (Wald $\chi^2=29.28$; 6, $P<0.001$)

Fig. 4 Effect of tDCS on the mechanical allodynia response by the Von Frey eletronics test of young rats. Data are presented as the Mean $\pm$ SEM, (n=7-11). Total Control (CT); Control-Sham tDCS (CS); Control-tDCS (CE); Sham surgery-tDCS (ST); Sham surgery-sham tDCS (SS); Sham-tDCS (SE); Lesion (LT); Lesion-Sham tDCS (LS); Lesion-tDCS (LE). **Panel A:** P30 different letter subscripts (a through j) indicate a statistically significant difference between the groups. GEE Interaction time x group (Wald $\chi^2=1,709.97$; 24, $P<0.001$; n= 7-11/group). **Panel B:** P60 different letter subscripts (a through j) indicate a statistically significant difference between the groups GEE Interaction time x group (Wald $\chi^2=857.72$; 24, $P<0.001$; n=9-10)

Fig. 5 BDNF levels of young neuropathic pain rats treated with tDCS. Data are presented as the Mean $\pm$ SEM, (n=7-11). **Panel A: Cortex BDNF levels:** different letters subscripts (a through b) indicate a statistically significant difference between the groups (One-way

ANOVA/SNK, $F_{(5,33)}=4.10$, $P<0.05$). **Panel B: Spinal cord BDNF levels:** different letters subscripts (a through c) indicate a statistically significant difference between the groups (One-way ANOVA/SNK, $F_{(5,34)}=8.28$, $P<0.05$). **Panel C: Serum BDNF levels:** there was not differences between groups (One-way ANOVA/SNK, $P>0.05$)

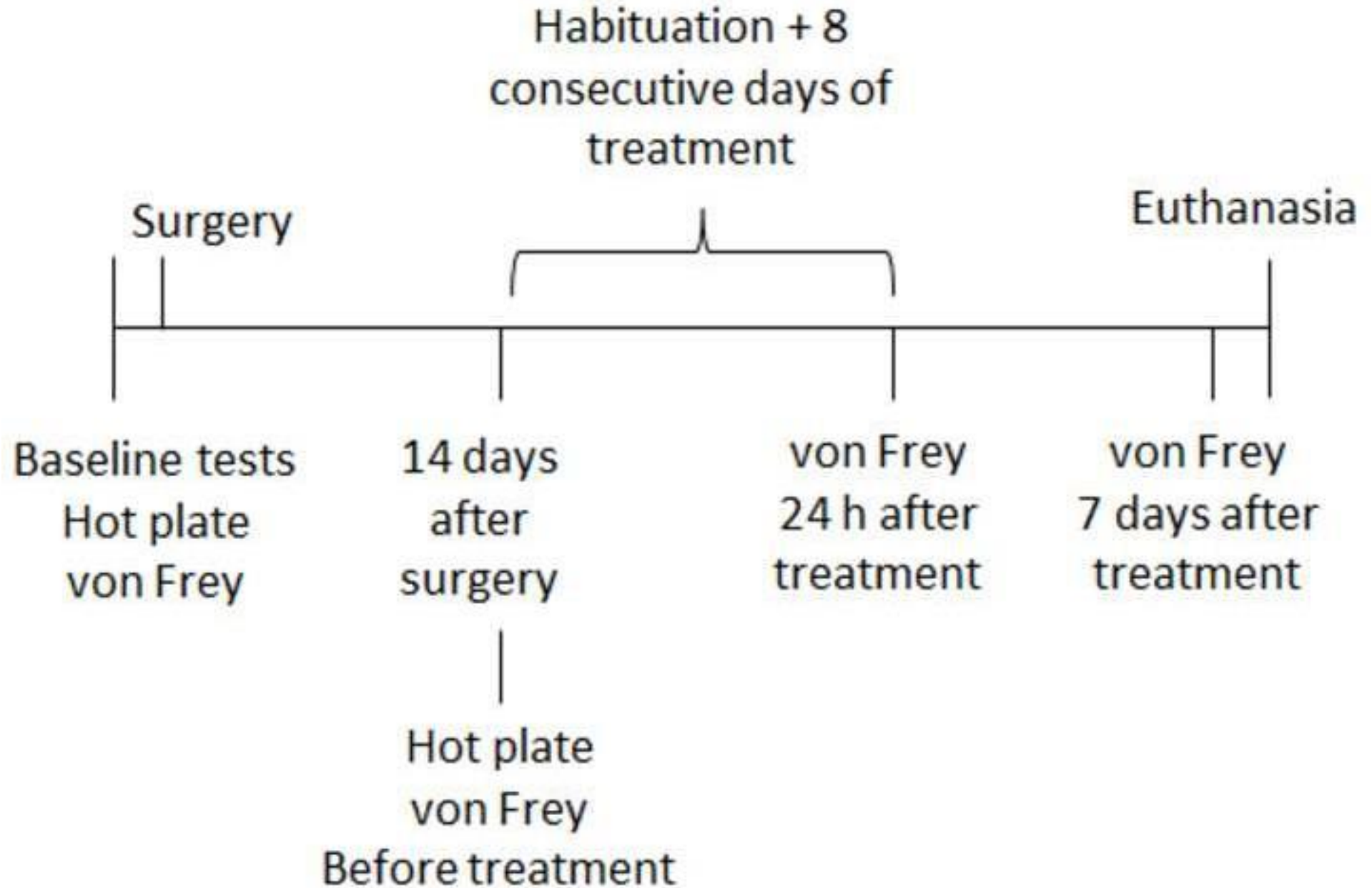
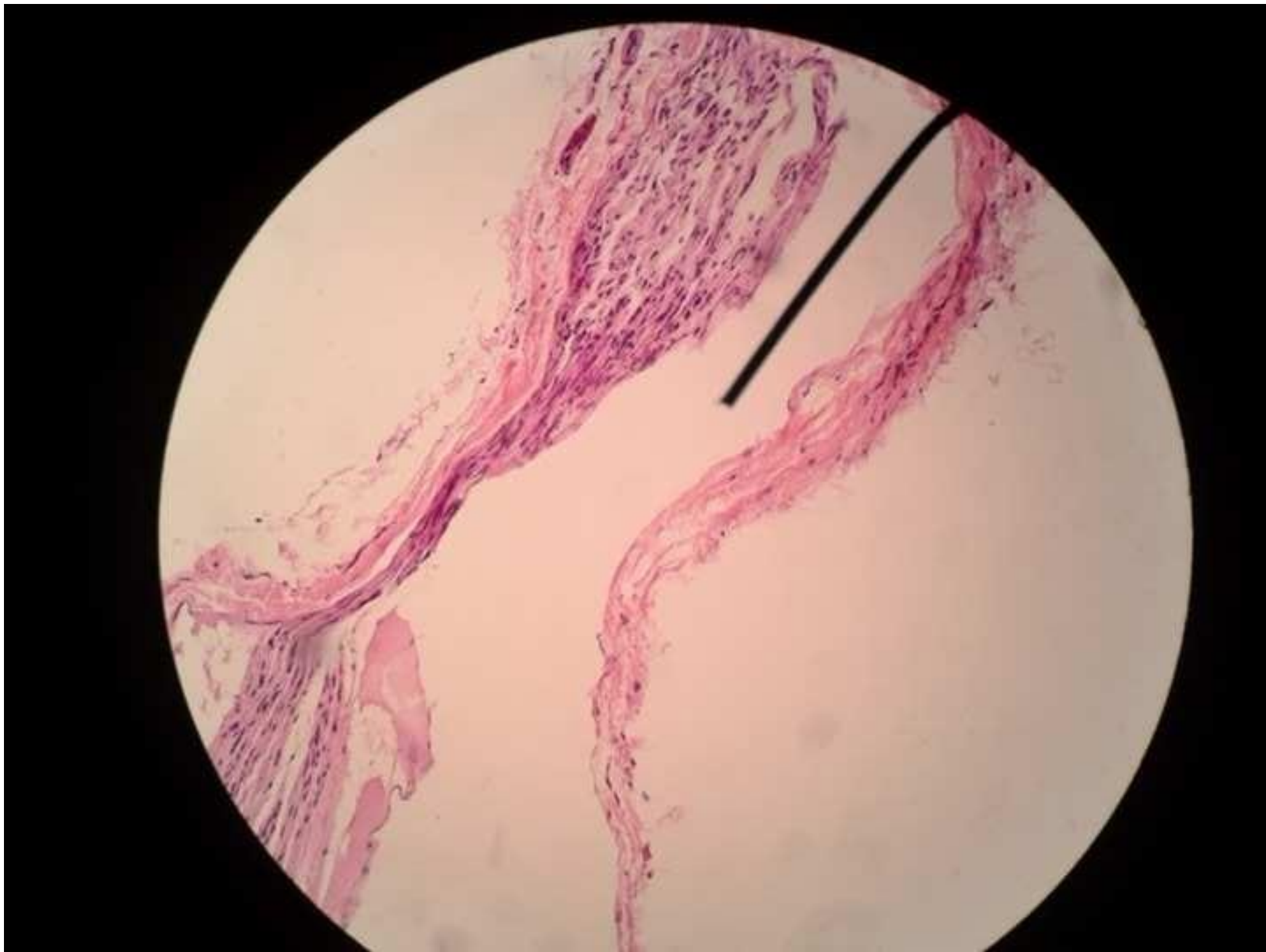


Figure 2



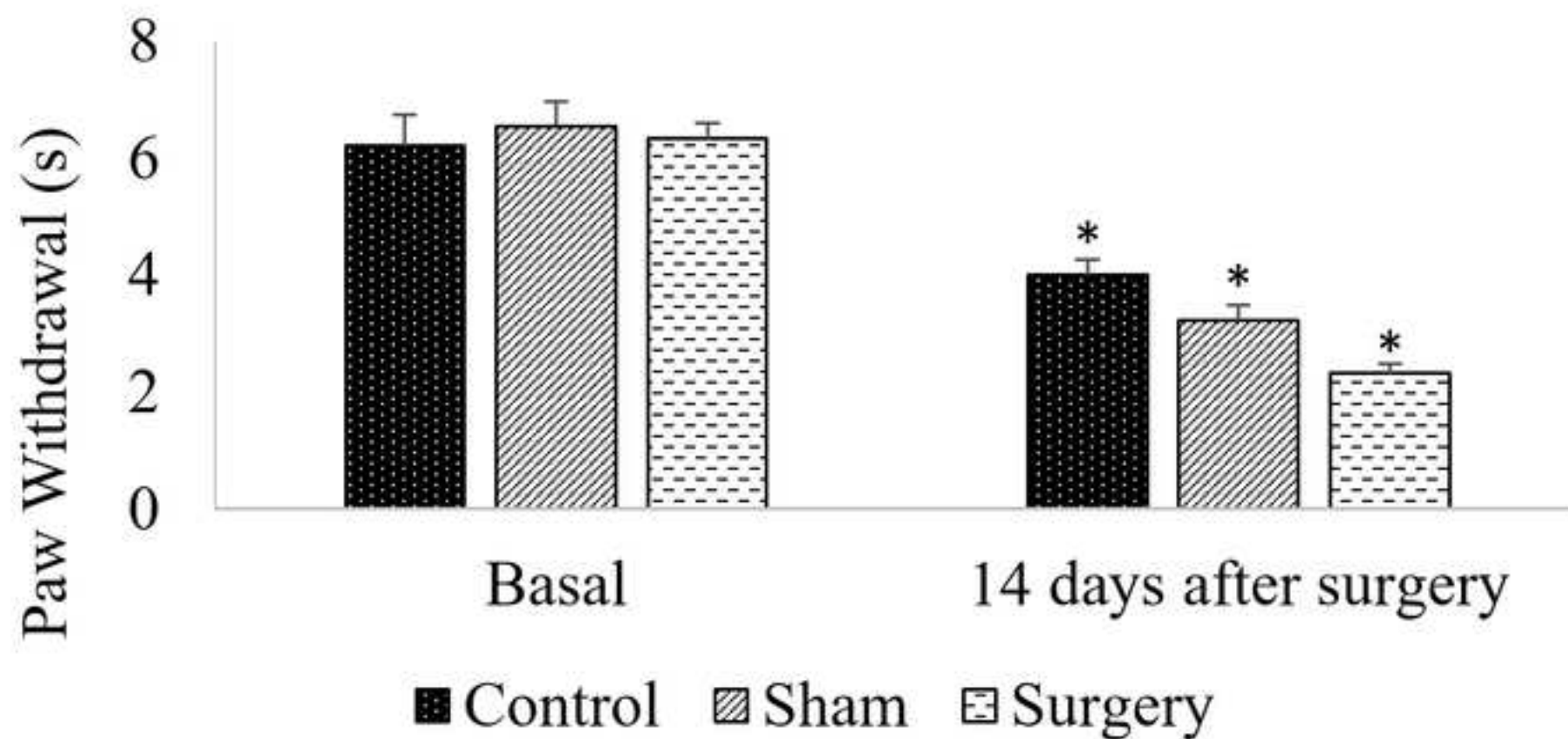


Figure 4.1

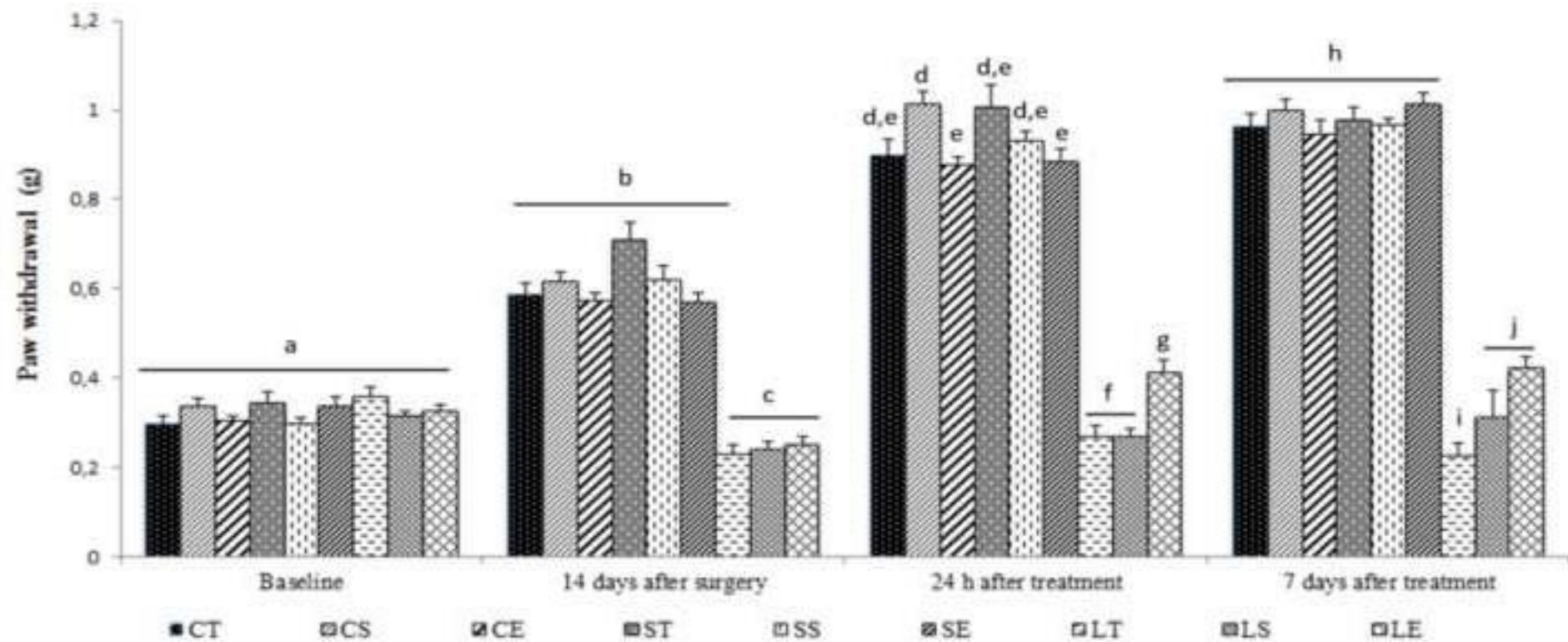
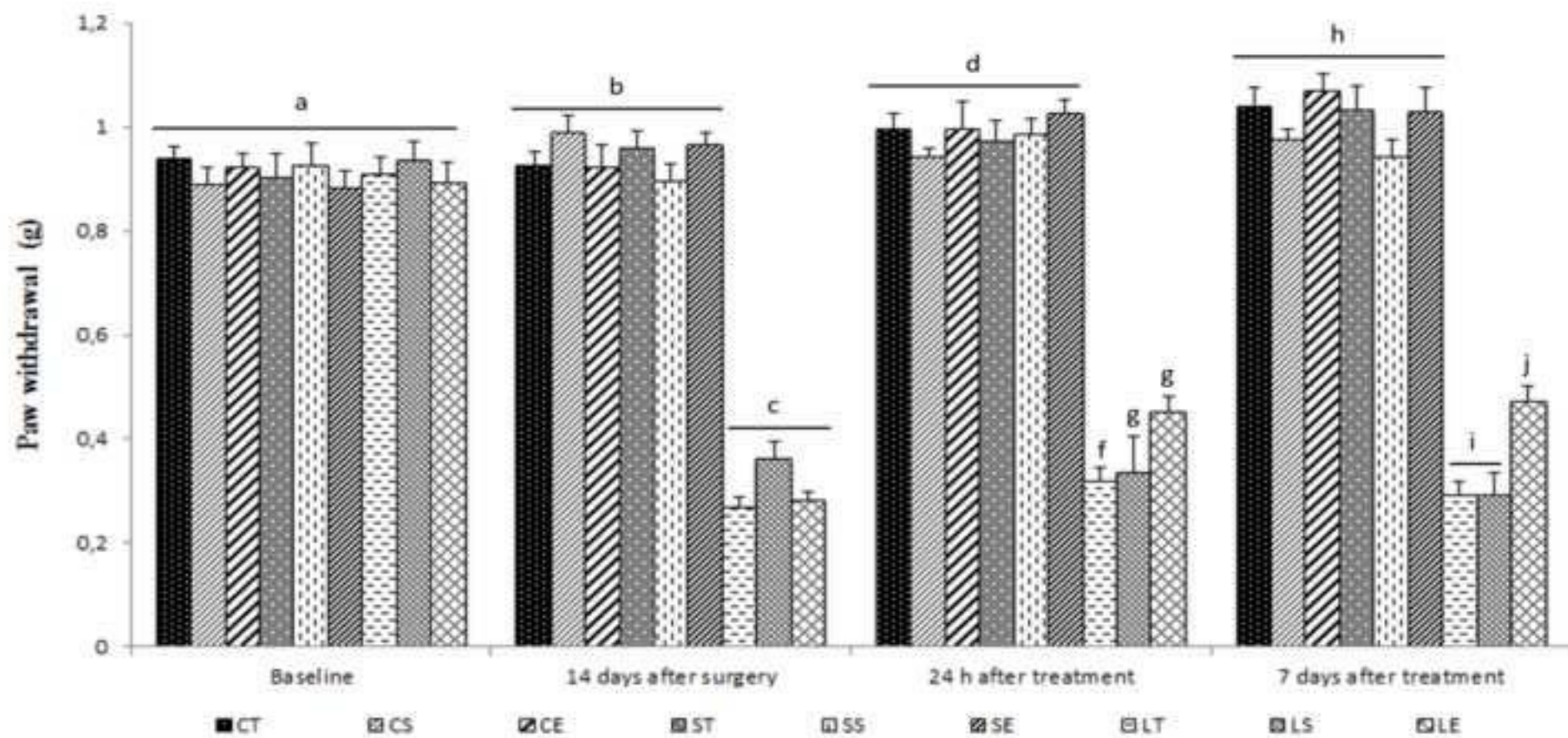
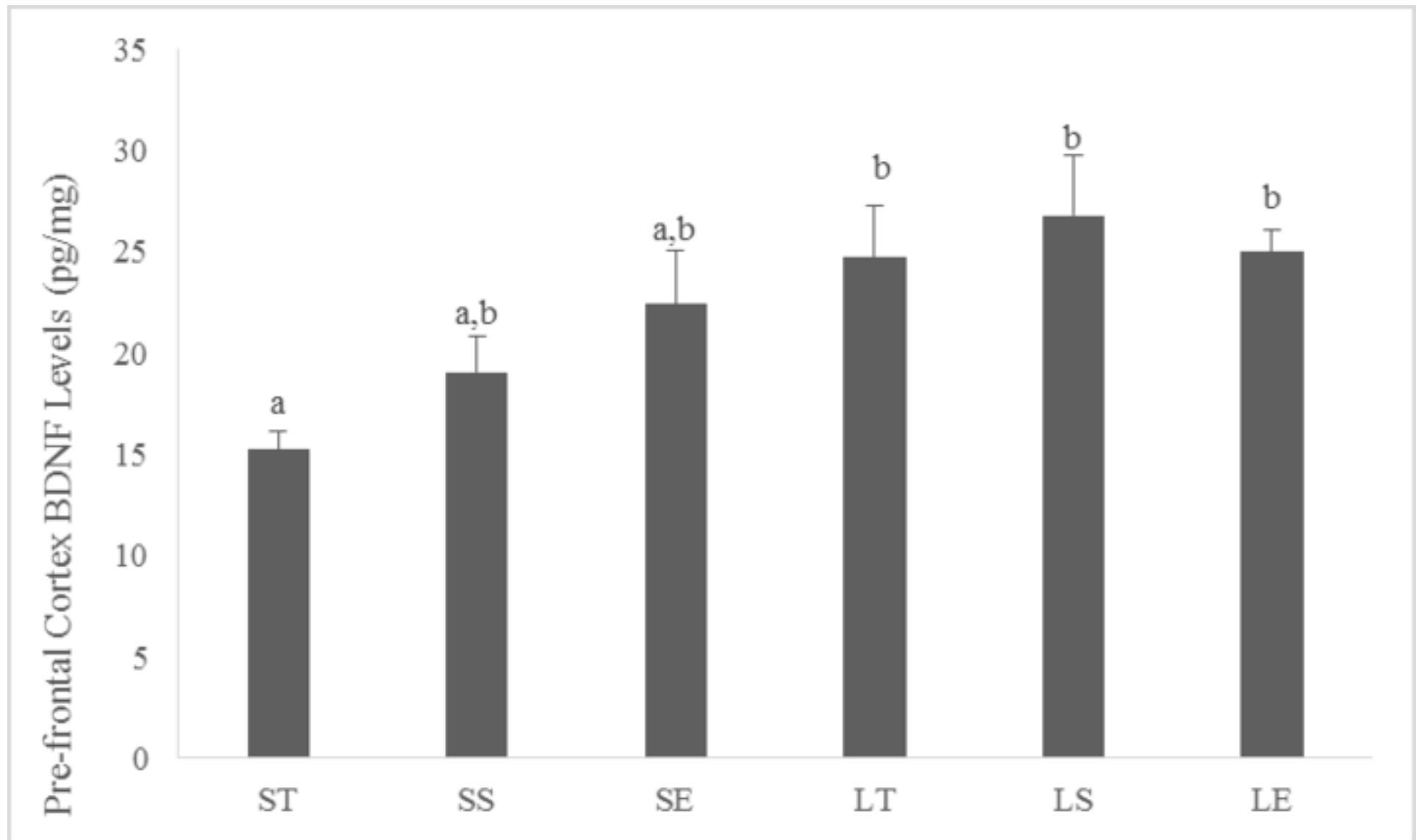
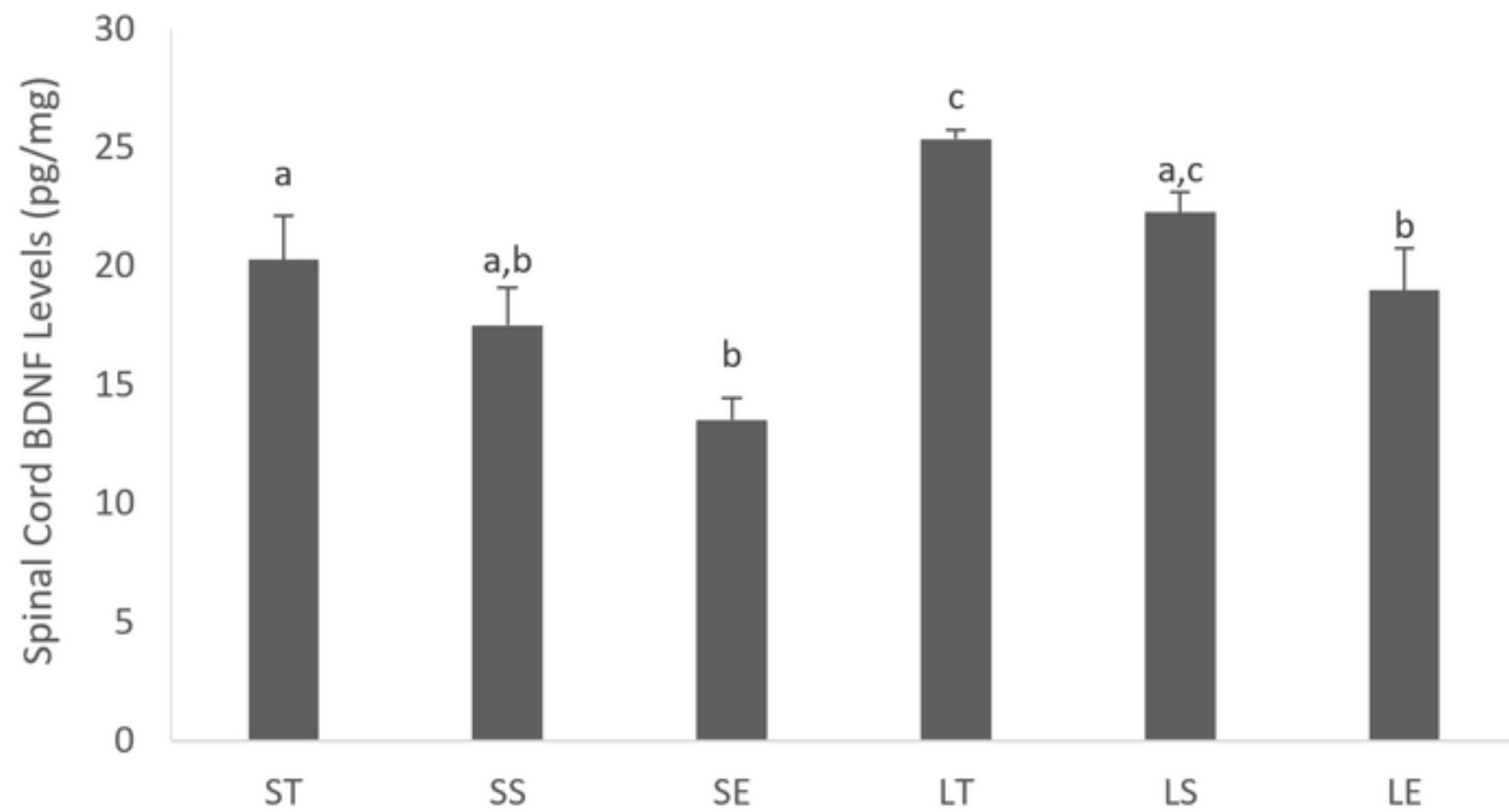
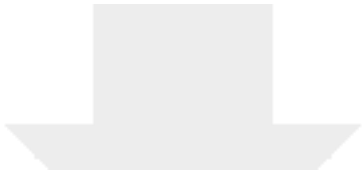


Figure 4.2

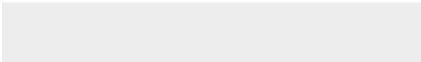
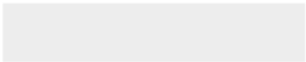








Click here to access/download
Supplementary Material
Suggested Reviewers.docx





Click here to access/download
Supplementary Material
Cover letter.doc

5. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos neste estudo foi possível observar que a aplicação de ETCC produz um aumento no limiar de dor em ratos Wistar submetidos a um modelo de dor neuropática. Foi possível observar uma diminuição na hiperalgesia a curto prazo e a longo prazo em ratos jovens (30 dias) e adultos (60 dias).

Os níveis de BDNF dos ratos jovens não se alteraram no soro, tiveram um aumento não significativo no córtex pré-frontal e uma diminuição nos níveis da medula espinal foram observados. Estes achados provavelmente ocorreram devido a ETCC não ter promovido alívio da dor a longo prazo. Além disso, fatores ligados ao tempo de desenvolvimento do animal podem influenciar o limiar de dor dos ratos de 30 dias.

Perspectivas

Além dos dados apresentados nessa dissertação, haverá ainda, outras análises a serem executadas no futuro, uma vez que, durante a execução do projeto foram coletadas estruturas do SNC (córtex pré-frontal, medula, hipocampo, hipotálamo, estriado), soro, nervo ciático direito, cérebro total de ratos de 60 dias e de 30 dias. Nessa dissertação foram expostos apenas os resultados bioquímicos da análise do BDNF obtidos das estruturas do SNC (córtex pré-frontal e medula) e soro dos animais de 30 dias, além dos dados comportamentais de dor de ambas as idades.

Para as análises futuras iremos executar as seguintes avaliações:

- ✓ Marcadores de plasticidade pelo método de imunohistoquímica do cérebro total e medula espinal de ratos de ambas as idades;
- ✓ A análise de RNAm também de marcadores de plasticidade de estruturas do SNC (córtex pré-frontal, medula, hipocampo, hipotálamo, estriado) dos animais de 30 e 60 dias;
- ✓ Análise bioquímicas das estruturas do SNC e do soro de animais de ambas as idades;
- ✓ Análise histológica dos nervos ciáticos dos ratos de 30 e 60 dias;
- ✓ Análise bioquímica dos nervos ciáticos dos ratos de 30 dias.

Obtidos esses resultados, esperamos obter maiores respostas frente aos efeitos da aplicação da eletroestimulação transcraniana na plasticidade cerebral de ratos com dor neuropática induzida e na neurogênese.

REFERÊNCIAS

- ALM, P. A.; DREIMANIS, K. Neuropathic pain: transcranial electric motor cortex stimulation using high frequency random noise. Case report of a novel treatment. ***Journal of Pain Research***, v.6, p. 479-486, 2013.
- ANTAL, A.; TERNEY, D.; KUHNL, S.; PAULUS, W.. Anodal transcranial direct current stimulation of the motor cortex ameliorates chronic pain and reduces short intracortical inhibition. ***Journal of pain and symptom management***, v. 5, p. 890 – 903, 2010.
- ARUL-ANANDAM, A. P.; LOO, C.; SACHDEV, P..Transcranial direct current stimulation - what is the evidence for its efficacy and safety? ***Medicine Reports***, v.1, p.1-4, 2009.
- BEGGS, S.; SALTER, M. W.. The know known of microglia-neuronal signaling in neuropathic pain. ***Neuroscience Letters***, v. 557, p. 37-42, 2013.
- BICK-SANDER et. al. Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. ***Proceeding of the National Academy of Science USA***, v. 10, p. 3852-3857, 2006.
- BOADA, D.; GUTIERREZ, S; ASCHENBRENNER, C.; HOULE, T.; HAYASHIDA, K.; RIRLE, D.; EISENACH, J. Nerve injury induces a new profile of tactile and mechanical nociceptor from undamaged peripheral afferents. ***Journal of neurophysiology***, v. 1, p. 100-109, 2015.
- BRASIL NETO, J. P. Motor Cortex Stimulation for Pain Relief: Do Corollary Discharges Play a Role? ***Frontiers in human neuroscience***, v. 10, p. 1-6, 2016.
- CHEERAN, B.; TALELLI, P.; MORI, F.; KOCH, G.; SUPPA, A.; EDWARDS, M.; HOULDEN, H.;BHATIA, K.; GREENWOOD, R.; ROTHWELL, J. A commom polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the responses to rTMS. ***Journal of physiology***, v.23, p. 5717-5725, 2008.
- CHEN, J. T. et. al.. Presynaptic GABAergic inhibition regulated by BDNF contributes to neuropathic pain induction. ***Nature Communications***, v. 5, p. 1-14, 2014.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLG, C. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. ***Annual reviews in neuroscience***, v. 32, p. 1-32, 2009.

DOS SANTOS, M. F.; LOVE, T. M., MARTIKAINEN, I. K., NASCIMENTO, T. D., FREGNI, F., CUMMIFORD, C., DEBOER, M. D., ZUBIETA, J-K., DA SILVA, A. F. M.. Immediate effects of tDCS on the m-opioid system of a chronic pain patient. ***Frontiers in psychiatry***, v. 3, p. 1-6, 2012.

FERRINI, F.; DE KONINCK, Y.. Microglia Control Neuronal Network Excitability via BDNF Signalling. ***Neural Plasticity***, v. 2013, p.1-11, 2013.

FRITSCH, B. et. al. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: Potential implications for motor learning. ***Journal Neuron***, v.2, p. 198-204, 2010.

FUJIYAMA, H. et. al.. Delayed plastic responses to anodal tDCS in older adults. ***Frontiers in Aging Neuroscience***, v. 6, p. 1-9, 2014.

GALBAVY, W.; KACZOCHA, M.; PUOPOLO, M.; LIU, L; REBECCHI, M.J.J. Neuroimmune and Neuropathic Responses of Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia in Middle Age. ***Plos One***, v. 8, p. 1-27, 2015.

JAGGI, S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. ***Fundamental and clinical pharmacology***, v, p.1-28, 2011.

KAPOOR, R. et. al. Perspectives on thyroid hormone action in adult neurogenesis. ***Journal Neurochemistry***, v.5, p. 599-616, 2015.

KAR, K.; WRIGHT, J. Probing the mechanisms underlying the mitigation of cognitive aging with anodal transcranial direct current stimulation. ***Journal of neurophysiology***, v. 7, p. 1397-1399, 2014.

KARALAY, O. et. al. Prospero-related homeobox 1 gene (Prox 1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. ***Proceeding of the National Academy of Science USA***, v.14, p. 5807-5812, 2011.

MUTSO, A. A. et.al.. Abnormalities in Hippocampal Functioning with Persistent Pain. ***Journal of Neuroscience***, v.17, p. 5747-5756, 2012.

NARDONE, R.; HÖLLER, Y.; LEIS, S.; HÖLLER, P.; THON, N.; TOMASCHEWSKI, A.; GOLASZEWSKI, S.; BRIGO, F.; TRINKA, E.. Invasive and non-invasive brain stimulation for treatment of neuropathic pain in patients with spinal cord injury: A review. **The journal of spinal cord medicine**, v. 1, p. 19-31, 2014.

NARO, A.; MILARDI, D.; RUSSO, M.; TERRANOVA, C.; RIZZO, V.; CACCIOLA, A.; MARINO, S.; CALABRÓ, R. S.; QUARTARONE, A.. Non-invasive Brain Stimulation, a Tool to Revert Maladaptive Plasticity in Neuropathic Pain. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 10, p. 1-9, 2016.

NGERNYAM, N.; JENSEN, M.; AUVICHAYAPAT, N.; PUNJARUK, W.; AUVICHAYAPAT, P.. Transcranial direct current stimulation in neuropathic pain. **Journal of pain relief**, v.1,p. 1-13, 2010.

NIZARD, J; LEFAUCHER, J-P; HELBERT, M; DE CHAUVIGNY, E; NGUYEN, J-P. Non-invasive pain stimulation therapies for the treatment of refractory pain. **Discovery medicine**, v.74, p. 21-31, 2014.

O'NEILL, F.; SACCO, P.; NURMIKKO, T.. Evaluation of a home-based transcranial direct current stimulation (tDCS) treatment device for chronic pain: study protocol for a randomized controlled trial. **Biomed central**, v. 16, p. 1-6, 2015.

RANIERI, F. et. al. . Modulation of LTP at rat hippocampal CA3-CA1 synapses by direct current stimulation. **Journal of Neurophysiology**, v.7, p. 1868-1880, 2012.

RUSANESCU, G; MAO,J. Peripheral nerve injury induces adult brain neurogenesis and remodeling. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 3, p. 299-314, 2017.

SINISCALCO, D.; GIORDANO, C., ROSSI, F.; MAIONE, S.;DE NOVELLIS, V. Role of neurotrophins in neuropathic pain. **Current neuropharmacology**, v.4, p. 523-529, 2011.

SMITH, P. A.. BDNF: no gain without pain? **Neuroscience**,v.283, p. 1-17, 2014.

SOLER, M. D.; KUMRU, H.; PELAYO, R.; VIDAL, J.; TORMOS, J. M.; FREGNI, F.; NAVARRO, X.; PASCUAL-LEONE, A.. Effectiveness of

transcranial direct current stimulation and visual illusion on neuropathic pain in spinal cord injury. **Brain**, v. 9, p. 2565-2577, 2010.

TIWARI, V; GUAN, Y; RAJA, S. N.. Modulation the delicate glial-neuronal interactions in neuropathic pain: Promises and potential caveats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 45, p.19-27, 2014.

URBÁN, N.; GUILLEMOT, F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regularots, different roles. **Frontiers in Celular Neuroscience**, v.8, p. 1-19, 2014.

VACCA, V.; MARNELLI, S.; PIERONI, L.; URBANI, A.; LUVISETTO, S.; PAVONE, F.. Higher pain perception and lack of recovery from neuropathic pain in females: A behavioural, immunohistochemical, and proteomic investigation on sex-related diferences in mice. **The journal of the internacional association for the study of pain**, v. 2, p. 388-402, 2014.

WU, J.; RENN, C.; FADEN, L.; DORSEY, S. TRKB.T1 contributes to neuropathic pain after spinal cord injury through regulation of cell cycle pathways. **The journal of neuroscience**, v. 30, p. 12.447-12.463, 2013.

ZHANG, J.; DE KONINCK Y.. Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 3, p. 772-783, 2006.

Pelotas, 13 de julho de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Profa. Dra. Izabel Cristina Custódio de Souza

Departamento de Morfologia – Instituto de Biologia

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “Avaliação dos efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua na neurogênese e na dor neuropática de ratos wistar”, processo nº23110.010480/2014-89 que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 10480-2014).

Vigência do Projeto: 01/08/2015 a 01/09/2016

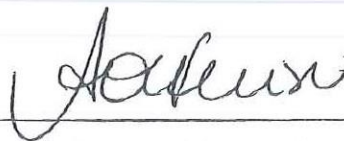
Espécie/Linhagem: *Rattus norvegicus*/Wistar

Nº de animais: 198

Idade: 10, 30 e 60 dias (66 animais de cada idade)

Sexo: Machos

Origem: Biotério Central/UFPEL

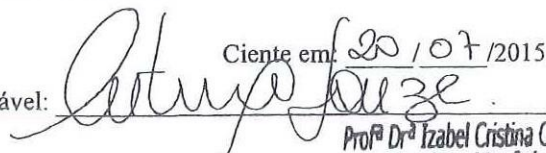


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:

Ciente em: 20/07/2015



Profª Drª Izabel Cristina C. de Souza
Depto. Morfologia
SIAPE: 1348703
1R - UFPEL

ANEXO B: Suplementação do manuscrito “*Evaluation of the effects of Transcranial Direct Current Stimulation in an animal model of chronic constriction injury in young and adult rats*”.

Figure 5, Panel C

