

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Ciências Químicas, farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

**Efeito da Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC)
sobre parâmetros comportamentais, morfológicos, e bioquímicos em
modelo experimental de dor induzida por inflamação crônica**

Sabrina Pereira Silva

Pelotas, 2016.

SABRINA PEREIRA SILVA

Efeito da Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) sobre parâmetros comportamentais, morfológicos, e bioquímicos em modelo experimental de dor induzida por inflamação crônica

Dissertação apresentado ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

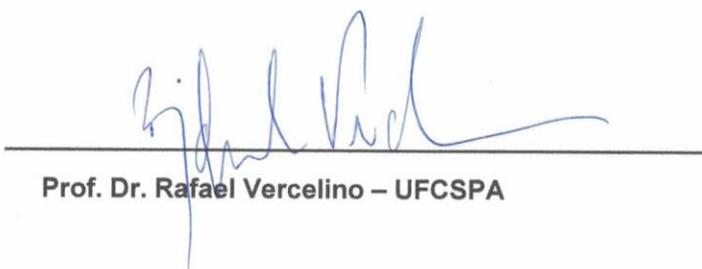
Orientadora: Prof. Dr. Izabel Cristina Custódio de Souza

Pelotas, 2016

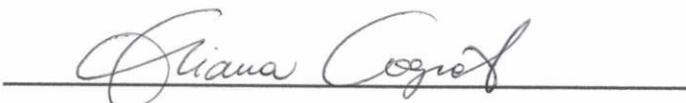
BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Izabel Cristina Custódio de Souza - UFPel (Orientadora)



Prof. Dr. Rafael Vercelino – UFCSPA



Profª. Drª. Giana de Paula Cognato - UFPel

**Dedico este trabalho aos meus pais, minha avó,
meus amigos e orientadora.**

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas me auxiliaram em cada uma das etapas deste trabalho. A todos gostaria de expressar meu profundo agradecimento.

Aos meus pais, pela minha existência, apoio e grande incentivo para que eu não desistisse dos meus sonhos.

A minha avó, pelo amor e dedicação em estar sempre ao meu lado me incentivando. Aos meus amigos, por toda ajuda e compreensão nos momentos difíceis.

Aos colegas do laboratório Neurocell e Neurocan, pela ajuda nos experimentos.

Aos colegas do grupo de pesquisa Farmacologia da Dor e Neuromodulação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por conceder o aparelho de eletroestimulação e pelo suporte dado durante o desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas do laboratório de histologia do departamento de morfologia da Universidade Federal de Pelotas pela colaboração nos experimentos.

À minha orientadora, pelo carinho e incentivo, na qual muito me espelhei para dar continuidade e finalizar este trabalho.

Aos funcionários do biotério, por todo o carinho e colaboração durante a fase de desenvolvimento do projeto.

À família, pela compreensão em não conseguir participar de momentos importantes.

E a Deus pela força, no qual me motivou a vencer obstáculos e realizar a conclusão de mais uma etapa da minha jornada acadêmica.

Obrigada.

“A forma mais elevada da inteligência humana é a capacidade de observar sem julgar”.

(Jiddu Krishnamurti)

Resumo

Fatores que levam a alterações fisiológicas cognitivas, de apetite, bem como, estresse crônico, insônia, aumento de ansiedade e manifestações de irritabilidade, na maioria das vezes, estão relacionados ao processo de dor crônica. Acarretando, desta forma, em restrições na execução de atividades profissionais e sociais. O desequilíbrio do sistema nociceptivo desencadeia a liberação de mediadores e moduladores inflamatórios por ativação de células gliais. Moléculas estas, como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), proteínas quinases, neurotransmissores e citocinas pré e/ou pós- inflamatórias, as quais participam ativamente do mecanismo da dor crônica inflamatória. Estudos mostram que, métodos não farmacológicos, não invasivos e que atuam no sistema nervoso central por meio de estímulo elétrico, são excelentes ferramentas no tratamento de enfermidades como dor crônica. A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC), é um método capaz de promover modulação de marcadores envolvidos na sinalização dos processos inflamatórios. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da ETCC sobre parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos em ratos Wistar submetidos a um modelo de inflamação crônica. Este estudo teve caráter experimental no qual 54 ratos Wistar foram divididos em dois grandes grupos: Grupo Controle e Grupo CFA. Estes dois grupos foram subdivididos em total, sham-ETCC e ETCC. Assim, o grupo controle recebeu injeção de salina e grupo CFA foi submetido à inflamação crônica induzida por adjuvante de Freund, em 7 dias e posteriormente foram tratados por 8 dias com estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC). Os parâmetros comportamentais como o teste de Von Frey e de placa quente, foram avaliados imediatamente, 24h e 8 dias após o tratamento, enquanto que o edema de peso dos animais, apenas imediatamente e após 8 dias de tratamento. Os aspectos morfológicos foram avaliados por técnicas histológicas e os ensaios bioquímicos ocorreram por meio de kits comerciais analisados pelo método de ELISA. Assim, no teste Von Frey, todos os animais que receberam CFA apresentaram redução do limiar nociceptivo. Porém, os animais do grupo CFA ETCC, mostraram um aumento do limiar nociceptivo imediatamente após última sessão de ETCC, perdurando de 24hs a 8 dias da última sessão de ETCC. Os níveis de BDNF mensurados no córtex pré-frontal e hipocampo não apresentaram diferença significativa entre os grupos, porém, em níveis séricos, foi possível observar diferença do grupo CFA Sham-ETCC e CFA ETCC em relação ao grupo Controle ETCC. Este trabalho buscou um melhor entendimento do envolvimento de ETCC na sinalização da dor crônica inflamatória.

Palavras-chave: Estimulação Transcraniana Por Corrente Contínua, Dor Crônica Inflamatória, Fator neurotrófico derivado do cérebro, ETCC.

Abstract

The chronic pain process is, in the most part of the times, related to factors that lead to changes in cognition, appetite, as well as chronic stress, insomnia, increased anxiety, irritability manifestations. Therefore, it results in restrictions on the execution of professional and social activities. The imbalance of the nociceptive system triggers the release of inflammatory mediators and modulators activation of glial cells. Molecules such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), protein kinases, cytokines, neurotransmitters and pre and / or post-inflammatory, which actively participate in the mechanism of chronic inflammatory pain. Studies show that non-pharmacological methods, non-invasive and that act on the central nervous system through electrical stimulation are excellent tools in the treatment of diseases such as chronic pain. The transcranial direct-current stimulation (tDCS) is a modulation method capable of promoting the markers involved in the signaling of inflammatory processes. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of tDCS on behavioral, morphological and biochemical parameters in rats subjected to a chronic inflammation model. This experimental study used 54 Wistar rats, which were divided into two groups (control group and CFA group). Thus, the control group received saline injection and CFA group was submitted to chronic inflammation induced by Freund's adjuvant, and later to 7 days were treated with tDCS. The behavioral parameters such as the von Frey and the hot plate were evaluated immediately, 24 hours and 8 days after treatment, whereas the size of the paw edema and weight of the animals only once and 8 days of treatment. The morphological features were assessed by histological techniques and biochemical assays occurred through commercial kits analyzed by ELISA. Thus, the von Frey test, all animals receiving CFA decreased the nociceptive threshold. However, the animals of group CFA tDCS showed an increase of nociceptive threshold immediately after last session of tDCS, lasting from 24 hours to 8 days of the last tDCS session. BDNF levels measured in the prefrontal cortex and hippocampus showed no significant difference between the groups, but in serum levels was observed significant difference in group CFA Sham- ETTC and CFA tDCS compared to tDCS control group. This study aimed to better understand the involvement of tDCS in signaling chronic inflammatory pain.

Key words: Transcranial Direct Current Stimulation, Chronic Inflammatory Pain, brain-derived neurotrophic factor, tDCS.

Lista de imagens

- Imagem 1 - Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. **Página 19**
- Imagem 2 – Mecanismo da via ascendente envolvida no processo e modulação da percepção dolorosa. **Página 21**
- Imagem 3 – Liberação de mediadores envolvidos no processo doloroso. **Página 23**
- Imagem 4 – Mecanismo de ativação de micróglia concomitante com astrócito. **Página 24**
- Imagem 5 – Manutenção de dor crônica por meio de ativação do nociceptor. **Página 27**
- Imagem 6- Material utilizado para aplicação de ETCC em humanos. **Página 28**
- Imagem 7- Posicionamento dos eletrodos na aplicação de ETCC em humanos. **Página 29**
- Imagem 8- A- Posicionamento dos eletrodos e B- Realização do tratamento com ETCC em modelo animal. **Página 29**
- Imagem 9- Linha do tempo demonstrando delineamento experimental. **Página 33**
- Imagem 10- Avaliação do peso em diferentes tempos: basal, 7 dias após indução da Inflamação, imediatamente e 8 dias após a última sessão de ETCC. **Página 37**
- Imagem 11- Avaliação do limiar mecânico, por meio de Von Frey em diferentes: basal, 7 dias após indução da inflamação com CFA, imediatamente, 24 horas e 8 dias após a última sessão de ETCC. **Página 38**
- Imagem 12- Avaliação do limiar nociceptivo mecânico dos grupos experimentais por meio da comparação entre os tempos de tratamento com ETCC. **Página 39**
- Imagem 13- Indução da hiperalgesia térmica avaliada 7 dias após injeção de CFA na pata de ratos Wistar. **Página 40**
- Imagem 14- Resultado do efeito da ETCC sobre a resposta hiperalgésica térmica, por meio do teste da Placa Quente. **Página 40**
- Imagem 15- Volume da pata mensurado por paquímetro 7 dias após indução da inflamação por CFA. **Página 41**
- Imagem 16- Avaliação do edema da pata, por meio de paquímetro em diferentes tempos de tratamento: basal, 7 dias após CFA, imediatamente após tratamento e 8 dias após a última sessão de ETCC. **Página 42**
- Imagem 17- Níveis de BDNF mensurados no córtex pré-frontal (CPF) de ratos. **Página 43**
- Imagem 18- Níveis de BDNF mensurados em Hipocampo de ratos. **Página 43**

- Imagem 19- Níveis séricos de BDNF. **Página 44**
- Imagem 20- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle total (A-1) e CFA total (B-1). 1 região társica do rato. **Página 44**
- Imagem 21- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle total (C-2) e CFA total (D-2). 2 região do coxim do rato. **Página 45**
- Imagem 22- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle total (E-3) e CFA total (F-3). 3 região do calcanhar do rato. **Página 45**
- Imagem 23- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle Sham- ETCC (G-1) e CFA Sham- ETCC (H-1). 1 região társica do rato. **Página 46**
- Imagem 24- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle Sham-ETCC (I-2) e CFA Sham- ETCC (J-2). 2 região do coxim do rato. **Página 46**
- Imagem 25- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle Sham-ETCC (L-3) e CFA Sham- ETCC (M-3). 3 região do calcanhar do rato. **Página 47**
- Imagem 26- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle ETCC (N-1) e CFA ETCC (O-1). 1 região társica do rato. **Página 47**
- Imagem 27- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle ETCC (P-2) e CFA ETCC (Q-2). 2 região coxim do rato. **Página 48**
- Imagem 28- Fotomicrografia representativas das lâminas histológicas do grupo controle ETCC (R-3) e CFA ETCC (S-3). 3 região do calcanhar do rato. **Página 48**

Lista de abreviaturas

ATK	Serina/treonina Quinase
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPAR	alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico ligado a moléculas
ATP	Trifosfato de Adenosina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CaMKII α	Ca ²⁺ /calmodulina, ativada por proteína quinase II α
CPEB	Proteína Citoplasmática de ligação ao elemento de Poliadenilação
CREB	Proteína de ligação ao Elemento Responsivo a AMPc
DAG	1,2 diacilglicerol
DRG	Gânglio da Medula Dorsal
ERK	Quinase Reguladora por Fator Extracelular
ETCC	Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua
ECC	Estimulação por Corrente Contínua
eIF4A	Fator de Iniciação Eucariotico 4 ^a
eIF4E	Fator 4E de Tradução de Iniciação Eucariótico
eIF4G	Fator de Iniciação Eucariotico 4G
GDP	Difosfato de Guanosina
Glu	Glutamato
GRB2	Receptor de Fator de Crescimento ligado à Proteína 2
GTP	Trifosfato de Guanosina
IGRs	Receptores Ionotrópicos de Glutamato
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-10	Interleucina 10
IP3	1,4,5 trifosfato de inositol
LTD	Potencial de Curta Duração
LTP	Potencial de Longa Duração

MEK	Quinase Ativadora de Map Quinase
mGluR	Receptor Metabotrópico de Glutamato
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
mTOR	Proteína-alvo da ação da Rapamicina em Mamíferos
NFkB	Fator Nuclear Kappa B
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
NT-3	Neurofina 3
NMDA	N-metil-D-aspartato
PABP	Poli A ligada a Proteína
PDK	Proteína Quinase dependente de fosfoinosítideos
Pep2m	Proteína Quinase M Zeta
PI3K	Fosfoinositol 3-Quinase
PIP2	Fosfotidilinositol 4-5 Bifosfato
PIP3	Fosfotidilinositol 3,4,5-Trifosfato
PKB	Proteína Quinase B
PKC	Proteína Quinase C
α PKC	Isoforma de Proteína Quinase C
PKM ζ / PKC λ	Isoforma de α PKC
P2X4	Receptor Purinérgico 4
p38MAPK	P38 Proteínas quinases ativadas por mitógenos
P75NTR	Receptor Neurotrófico p75
Raf	Proteína Raf
Ras	Proteína Ras
Ret C	Proto-Oncogene ligado a receptor de tirosina Quinase
Rheb	Homólogo de Ras enriquecido no Cérebro
SOS	Fator de Troca de Nucleotídeo Guanina
SP	Substância P
TNF α	Fator de Necrose Tumoral

TrKA	Receptor de Tirosina Quinase A
TrKB	Tropomiosina ligada a quinase-B
TrKC	Receptor de Tirosina Quinase C
TSC1/2	Complexo Tuberoso ½
4EBPs	Fator 4E ligado a proteína

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	166
2.	OBJETIVOS	188
	OBJETIVO GERAL	18
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	188
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	199
	DOR CRÔNICA INFLAMATÓRIA	20
	RELAÇÃO BDNF - DOR CRÔNICA INFLAMATÓRIA ETRATAMENTO POR ETCC	222
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	322
	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	322
	TAMANHO DA AMOSTRA	322
	GRUPO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	333
	AVALIAÇÃO DO PESO	333
	CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA INDUZIDA PELO CFA	344
	TRATAMENTO COM ETCC.....	344
	APARELHO DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA	344
	AVALIAÇÃO DOS TESTES COMPORTAMENTAIS	344
	AVALIAÇÃO DE HIPERALGESIA MECÂNICA.....	344
	AVALIAÇÃO DE HIPERALGESIA TÉRMICA.....	355
	AVALIAÇÃO DE EDEMA DE PATA	355
	COLETA DE AMOSTRA	355
	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	366
	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	366
	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	366
5.	RESULTADOS	377
	PESO DOS ANIMAIS	377
	TESTES COMPORTAMENTAIS	377
	HIPERALGESIA MECÂNICA	377
	HIPERALGESIA TÉRMICA.....	398
	EDEMA DE PATA	411
	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	422
	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	444
6.	DISCUSSÃO.....	499

7. CONCLUSÃO.....	511
8. REFERÊNCIAS	522

1. Introdução

Problemas como insônia, ansiedade, irritabilidade, alterações cognitivas e de apetite estão associadas ao estresse crônico e restringem a execução de atividades sócio profissionais, comprometendo o bem-estar geral da sociedade. Tais alterações fisiológicas crescem constantemente, em resposta na maioria das vezes, ao processo de dor crônica (WANG et al., 2015; EMIR et al., 2015).

A estimulação do sistema nociceptivo ocasionado pelos fatores mencionados acima (FRANÇOIS et al., 2014) desencadeia a ativação de células gliais, principalmente, astrócitos e microglias, promovendo a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e neurotransmissores como o glutamato (VALLEJO et al., 2010). Estas moléculas exercem um papel importante na manutenção do mecanismo da dor crônica inflamatória (DELL'OSSO et al., 2015).

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, propiciando o processo de cicatrização. No entanto, uma instabilidade homeostática manifesta-se sistemicamente a partir da produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias em casos de injúria. (MIZOKAMI et al., 2016).

As neurotrofinas têm um papel fundamental na função, sobrevivência, plasticidade e desenvolvimento neuronal, sendo as principais o fator de crescimento nervoso (NGF), o BDNF e neurotrofina-3 (NT-3). O BDNF exógeno aumenta a despolarização de receptores NMDA em neurônios de medula espinhal *in vitro*, atuando na manutenção da sensibilização hiperalgésica a níveis centrais. (HUANG e REICHARDT, 2001; BOYCE e MENDELL, 2014). Mais precisamente, o BDNF controla o potencial de longa duração (LTP) dos estímulos nociceptivos propagados nos neurônios do corno dorsal, local no qual os estímulos sensitivos são recebidos, induzindo plasticidade nessas regiões da medula espinhal.

Ademais, essa mediação na plasticidade da dor é evidenciada por sua atuação em receptores de tropomiosina ligada a quinase-B (TrKB) pré e pós-sinápticos (LISPKY e MARINI, 2007) e ativação do fosfoinositol 3 quinase (PI3K) e serina/treonina quinase (Akt), essencial para a sobrevivência de neurônios *in vitro*. A via PI3K/Akt ativa a quinase alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que por sua vez, promove a conservação

neuronal por meio do controle da síntese de proteínas, função mitocondrial e autofagia (SMITH et al., 2014).

Por fim, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do cérebro e da medula espinhal, e a sua concentração aumenta na região do corno dorsal durante a dor crônica. Ele, assim como o BDNF, atua em receptores NMDA (mecanismo de sensibilização álgica central), promovendo um influxo de Ca^{++} em astrócitos, células reguladoras do sistema glutamatérgico. Esse influxo é importante na sinalização da dor, já que o Ca^{++} promove a liberação de neurotransmissores por alterar a excitabilidade da membrana (VALLEJO et al., 2010).

Atualmente, intervenções terapêuticas não farmacológicas são pesquisadas e utilizadas como alternativa no tratamento de dor crônica. Estudos mostram o envolvimento de estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC), no tratamento de enfermidades como dor crônica. A ETCC é um método não invasivo que atua no sistema nervoso central por meio de estímulo elétrico, promovendo modulação da excitabilidade cortical e conseqüentemente alívio de dor (FILHO et al., 2016). Na literatura existem evidências que demonstram que o ETCC provoca modulação de marcadores inflamatórios (interleucina 1β (IL- 1β), interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF α)), porém seu mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido (CIOATO et al., 2015).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ETCC em ratos Wistar submetidos a um modelo de inflamação crônica. As análises foram realizadas por meio de parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos. Este trabalho busca um melhor entendimento de mecanismos no envolvimento de ETCC na dor crônica inflamatória.

2. Objetivos

Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da ETCC sobre parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos em ratos Wistar submetidos a um modelo de inflamação crônica.

Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar se a dor crônica inflamatória interferiu no peso do animal, medidas realizadas por meio de balança digital;
- ✓ Avaliar aspectos de efetividade antinoceptiva via periférica por meio do método de Von Frey eletrônico;
- ✓ Avaliar aspectos de efetividade antinoceptiva via central por meio do método de placa quente;
- ✓ Avaliar o edema causado nos ratos Wistar por meio de paquímetro, inferindo o tamanho da pata;
- ✓ Avaliar os níveis de BDNF em córtex pré-frontal, hipocampo e soro pelo método de ELISA.
- ✓ Avaliar a inflamação local dos ratos Wistar por meio de imagens histológicas obtidas em microscópio óptico de luz;

3. Revisão de Literatura

Na revisão da literatura, pretende-se apresentar os aspectos de possíveis marcadores de plasticidade envolvidos no processo de dor crônica por meio de inflamação induzida, tratada com estimulação transcraniana por corrente contínua. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE, PUBMED e CAPES PERIÓDICOS.

Nos sites MEDLINE, PUBMED e CAPES foram realizadas buscas por meio dos termos “chronic inflammatory pain and tDCS”, “chronic inflammatory pain and BDNF”, “chronic inflammatory pain”, “chronic inflammatory pain and tDCS and BDNF”. Em relação ao termo “chronic inflammatory pain and tDCS” foram encontrados 0 artigos no MEDLINE, 2 no PUBMED e 0 no CAPES. Usando os termos “chronic inflammatory pain and BDNF”, foram localizados 0 artigos no MEDLINE, 53 no PUBMED e 353 no CAPES. Em relação a “chronic inflammatory pain and tDCS and BDNF” foi encontrado 0 artigos no MEDLINE, 0 artigos no PUBMED e 0 artigos no CAPES. Para apresentar o tema, foi usada a revisão sistemática esquematizada na Figura 1.

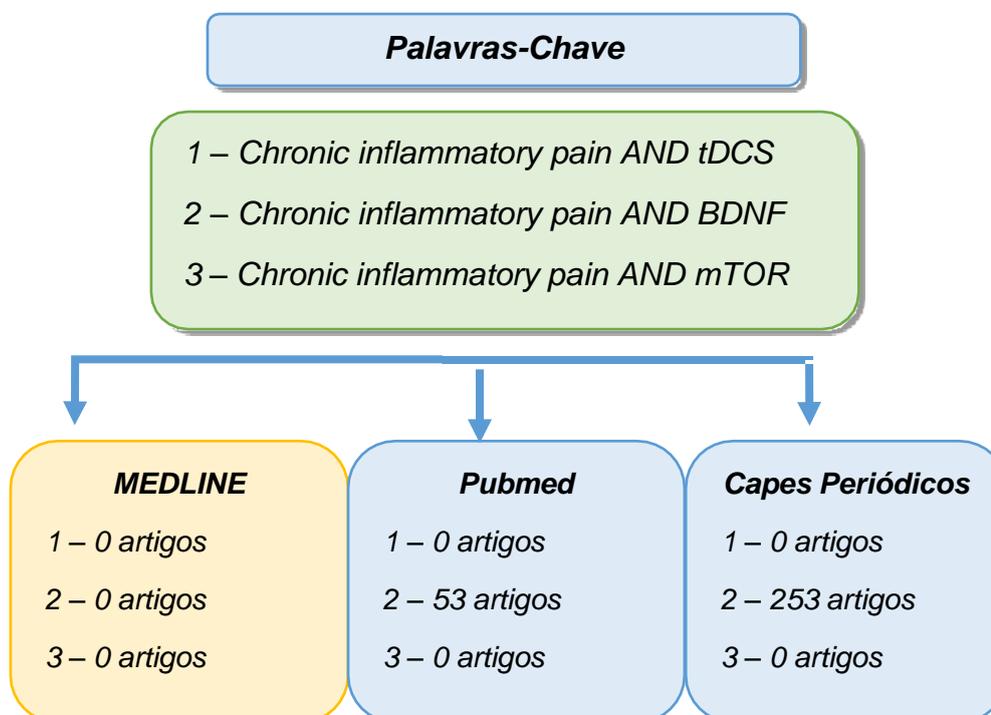


Figura 1 - Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo.

Dor Crônica Inflamatória

A dor crônica em humanos é definida por persistir por mais de três meses, além do tempo esperado para cura da condição ou lesão (MANCHIKANTI et al., 2009), por outro lado, em modelo animal é caracterizada por ter duração de no mínimo sete dias (RUSCHEWEYH et al., 2011). O mecanismo nociceptivo é regulado por vias descendentes antinoceptiva com papel inibitório. Assim, o trajeto da via descendente percorre partindo da substância cinzenta periaquedutal até medula rostromedial, no qual desempenha papéis de modulação da dor a nível de sistema nervoso central (FRANÇOIS et al., 2014).

O estímulo doloroso é incidido ao cérebro por via ascendente, como é possível observar na Figura 2. Portanto, este estímulo é detectado pelas terminações nervosas sensoriais dos neurônios sensitivos, propagando-se ao gânglio da medula dorsal (DRG), do sistema nervoso periférico. Estes neurônios apresentam fibras de amplo espectro, detectando estímulos dolorosos e levando-os ao corno dorsal espinhal (lâminas I e II), desencadeando uma primeira sinapse. Diversos neurônios sensoriais do gânglio da medula dorsal, são diferenciados pela expressão dos receptores neurotróficos, bem como receptores TrKB, entre outros. Sendo assim, os receptores TrKB e TrKC conduzem estímulos por meio da fibra A (mielinizada, sendo TrKB por meio da fibra A δ e TrKC por meio de fibra A $\alpha\beta$), a qual possui a função de identificar a dor aguda (FRANÇOIS et al., 2014). Os receptores TrKA e Ret-c positivo conduzem estímulos pela fibra C (não mielinizada), e são responsáveis pela identificação da dor crônica (FITZGERALD, 2005).

A informação sensorial é processada no circuito neuronal. Assim, após a primeira sinapse o estímulo doloroso percorre o trajeto da via ascendente até o tálamo para detecção da informação nociceptiva. Os interneurônios excitatórios e inibitórios das laminas I e II incidem informações sensoriais diretamente ao centro da dor no cérebro, incluindo tálamo, área parabraquial lateral e substância cinzenta periaquedutal (FRANÇOIS et al., 2014). Ainda, outras regiões do sistema nervoso central, bem como, hipocampo, amígdala e córtex cingulado anterior estão envolvidos no processo e modulação da percepção dolorosa (RUSCHEWEYH et al., 2011). Portanto, a dor, principalmente em processos crônicos, é evidenciada pela plasticidade e sensibilização no sistema nervoso central e periférico (LASTE et al., 2012).

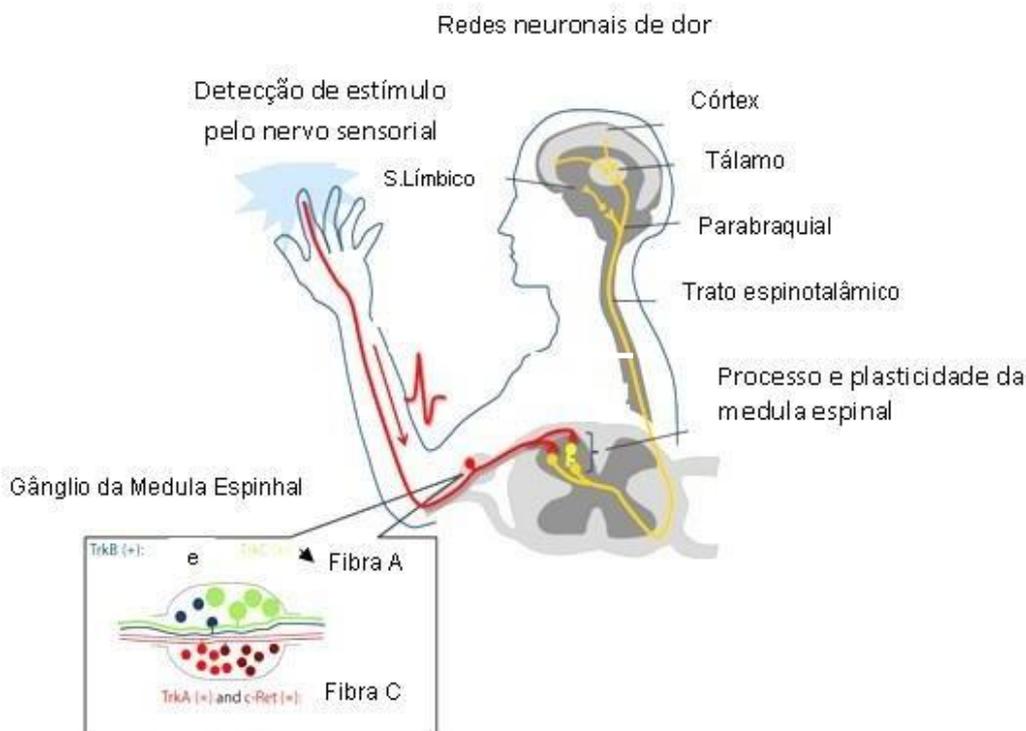


Figura 2 – Mecanismo da via ascendente envolvida no processo e modulação da percepção dolorosa.
Fonte: Adaptado de François et al., (2014).

A dor crônica está associada ao aumento de cálcio intracelular (HOGAN et al., 2007; ZHUANG et al., 2015), o qual pode ativar vários efetores, incluindo proteína quinase C e cálcio/calmodulina dependente de quinase que são importantes para iniciação de dor crônica inflamatória (ZHUANG et al., 2015). Essas proteínas ativam fatores de transcrição nuclear como fator nuclear kappa B (NFkB) e proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc (CREB). A ativação destes fatores de transcrição aumenta a transcrição do segmento de mRNA do BDNF, por meio do éxon 4 do gene (LIPSKY MARINI, 2007). O BDNF, que possui aumento de sua atividade na dor crônica inflamatória (VALLEJO et al., 2010), ativa suas cascatas de sinalização (LIPSKY MARINI, 2007) aumentando a expressão do gene desta neurotrofina (TAKEI e NAWA, 2014) em neurônios sensoriais (PRICE e INYANG, 2015).

Estudos relatam, o envolvimento do polimorfismo no gene de BDNF (Val66Met) em dor crônica. O polimorfismo afeta a sequência de polipeptídeo importante para tradução de BDNF, promovendo redução de secreção e prejuízo na sinalização do mesmo, através da diminuição da síntese do BDNF no hipocampo (EGAN et al., 2003). De acordo

com dados de Chen et al., (2006) em estudo animal, compararam relação do aumento do gene Val66Met com diminuição do volume na região do hipocampo, podendo ocasionar diminuição de viabilidade neuronal (CHEN et al., 2006) e afetar o processamento de dor crônica (VOSSEN et al., 2010). O Puri et al., (2015) relatam que a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) promovem mudanças em BDNF, o comum polimorfismo do gene (Val-66Met), sugerindo que este marcador poderia ser utilizado para avaliar o efeito antinociceptivo promovido pelo ETCC.

A ETCC é um método não invasivo, que utiliza eletrodos de ECG (1,5 cm²) por uma bateria de estimulador de corrente constante com intensidade 0,5 mA em animais (LASTE et al., 2012), sendo utilizado em humanos com intensidade geralmente de 1 mA (VOLZ et al., 2016). No tratamento de dor crônica o ânodo é colocado sobre o córtex parietal e o catodo sobre a área supraorbital contralateral. Esta posição do eletrodo tem sido mostrada previamente por promover a excitabilidade do córtex motor primário efetivamente por induzir o alívio de dor (LASTE et al, 2012).

RELAÇÃO BDNF - DOR CRÔNICA INFLAMATÓRIA E TRATAMENTO POR ETCC

Em condições patológicas a microglia é ativada após liberação de trifosfato de adenosina (ATP) pelos neurônios aferentes primários nociceptivos. Assim, as células microgliais ativadas começam a liberar vários agentes inflamatórios que sensibilizam os neurônios aferentes primários nociceptivos. Pode-se observar na Figura 3 este mecanismo, através do ATP liberado pelos neurônios aferentes primários nociceptivos que se liga aos receptores purinérgicos (P2X₄), localizados na superfície da microglia levando ao influxo de cálcio. O influxo de cálcio resulta na translocação do fator NFκB para o núcleo da célula (microglia) e indução da atividade de P38 proteínas quinases ativadas por mitógenos (p38MAPk). Após esse fato inicia-se a liberação de vários agentes neuro-inflamatórios como citocinas, neurotransmissores e fatores neurotróficos. O glutamato se liga a receptores como N-metil-D-aspartato (NMDA) e alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) aumentando Ca⁺⁺ e Cl⁻ dentro do neurônio, promovendo despolarização e sensibilização do mesmo. O BDNF (fator neurotrófico) se liga nos tropomiosina ligada a quinase-B (TrKB) e inibe o efluxo de Cl⁻, ou seja, a saída do Cl⁻ para fora do neurônio. Com isso aumenta Cl⁻ dentro do neurônio provocando

também a despolarização e a sensibilização do mesmo. Portanto, esse mecanismo causa a elevação da dor (VALLEJO et al., 2010).

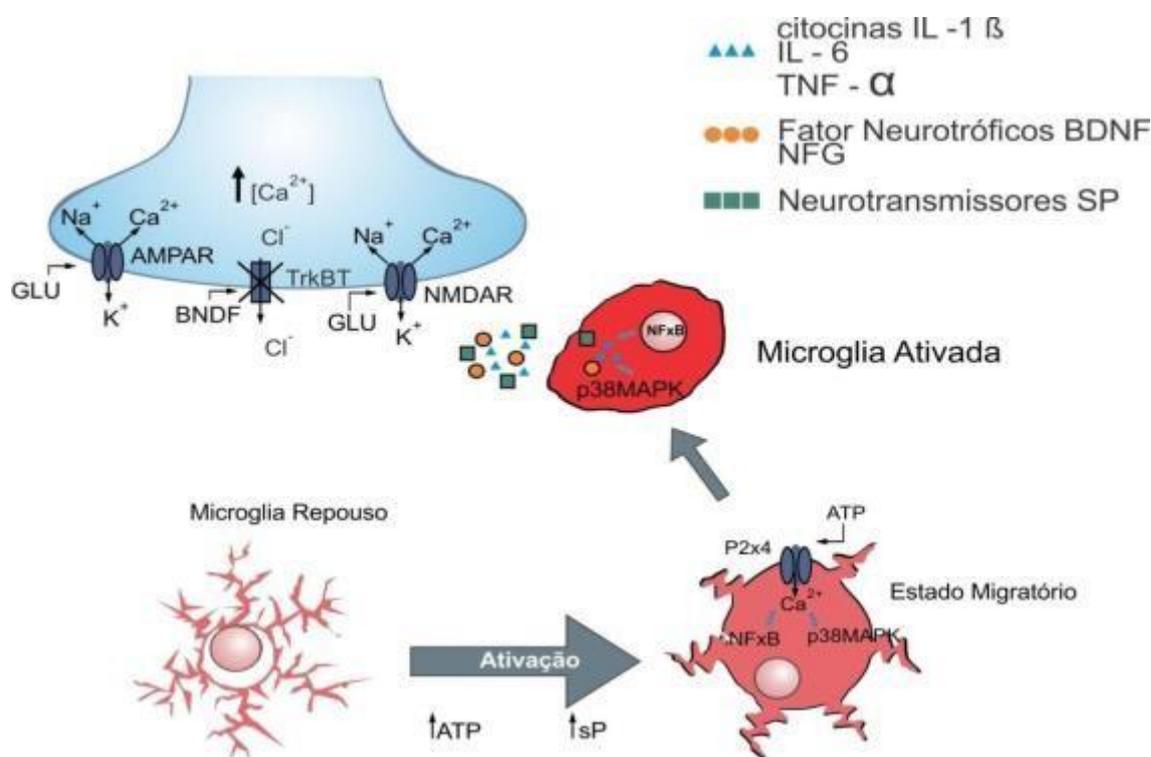


Figura 3 – Liberação de mediadores envolvidos no processo doloroso. Fonte: Adaptado de Vallejo et al., (2010).

Como é possível observar na Figura 4, as células microgлияis podem causar expressão na síntese de óxido nítrico dentro do neurônio pré-sináptico provocando a ativação de astrócito e resultando no influxo de cálcio. O aumento de níveis de cálcio intracelular resulta na translocação do NF κ B para o núcleo do astrócito, induz a atividade de p38MAPK e liberação de glutamato. Após os astrócitos serem ativados sofrem mudanças morfológicas que aumentam a produção de agentes neuro-inflamatórios que são secretados dentro da fenda sináptica. A ativação de astrócito concomitante com a ativação da microglia favorece a despolarização do neurônio aumentando a sensibilidade e potencializando o estado de dor (VALLEJO et al.,2010).

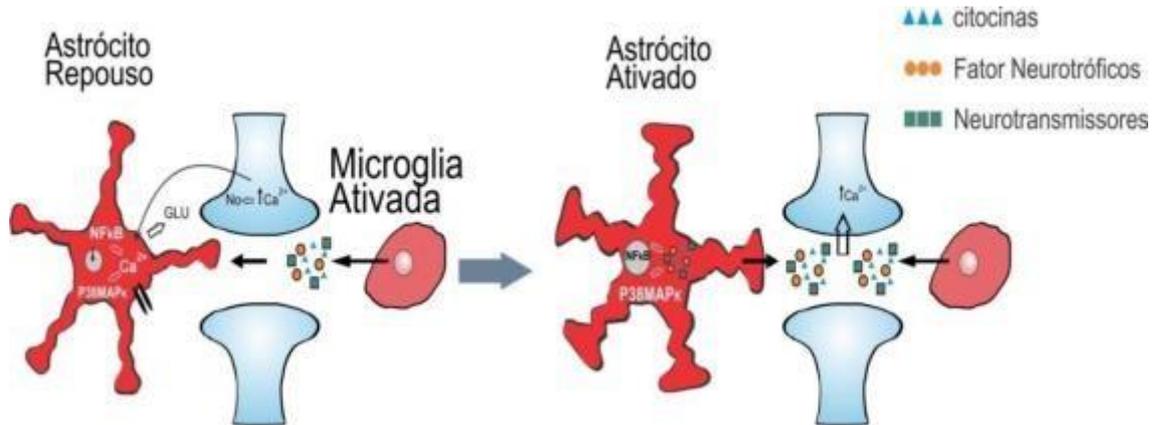


Figura 4 – Mecanismo de ativação de microglia concomitante com astrócito. Fonte: Adaptado de Vallejo et al., (2010).

Além disso, a ativação concomitante de microglia e astrócito promove aumento da liberação de mediadores envolvidos em dor crônica inflamatória (VALLEJO et al., 2010). As células gliais possuem sistemas de receptores e de transdutores de sinal que permitem uma interação dinâmica na amplificação da resposta neuronal à agressão periférica ou central. Conseqüentemente, a persistência do estímulo agressivo local, desencadeia uma resposta glial de não manter adequadamente a homeostase bioquímica, acarretando disfunção celular e apoptose neuronal. Portanto, uma lesão tissular, ativa as células endoteliais, a microglia e os astrócitos, com conseqüente infiltração de células do sistema imune no local da agressão, e a produção de citocinas e de quimiocinas (FOSTER et al., 2014).

Após dano tecidual, ocorre aumento de vários transdutores, há a fosforilação destes transdutores e ativação dos receptores, tais como potencial receptor transiente tipo V1 (TRPV1) resulta em um aumento de atividade do canal e sensibilidade a estímulos nocivos (sensibilização). Por exemplo, mudanças na expressão e distribuição de canais de Na⁺ após lesão de nervo ou inflamação contribuem para oscilações instáveis do potencial de membrana, disparo anormal, e a geração de atividade ectópica em nervos aferentes (WANG et al., 2004; AMIR et al., 2002). Esses neurônios podem exibir transmissão efática tanto entre as fibras periféricas e como em seus corpos celulares dentro do gânglio da raiz dorsal. Junto com as mudanças dentro das fibras nociceptivas eferentes simpáticas tornam-se capazes de ativar fibras nociceptivas via alfa-adrenoceptores. Cinco eventos são necessários para um nociceptor transmitir informação sobre a dor para o SNC: transdução de sinal, geração do potencial de ação, transmissão do potencial de ação para o SNC, ativação do neurônio de segunda ordem

para transmitir o sinal para o tálamo, e terceira ordem de transmissão neuronal do sinal para o córtex cerebral, onde o estímulo nociceptivo é percebido como dor (VOSCOPOULOS et al., 2010).

O sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) coordena processos adaptativos às diferentes demandas do meio. Este sistema implica na geração e perpetuação de vários processos patológicos, incluindo a dor crônica musculoesquelética. Dentre as vias conhecidas, que expressam a participação do SNAS nos quadros álgicos, constam o acoplamento das fibras C polimodais e C autonômicas que sensibilizam o sistema nociceptivo (ativam núcleos do tronco cerebral que regulam a função autonômica simpática) e pelas vias noradrenérgicas descendentes inibidoras da dor (DEVOR, 2006). Também a ativação do sistema imunológico envolve a ação do SNAS na manutenção da dor, uma vez que a ativação de receptores $\alpha 1$ induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, as quais ativam nociceptores.

Os nociceptores são quimiosensores que reagem a danos celulares por responder a uma ampla gama de moléculas inflamatórias. Essas moléculas incluem adenosina-5'-trifosfato (ATP) que inibe a liberação de glutamato e estimula a liberação de GABA em neurônios hipocâmpais, mas em altas concentrações contribui para a fisiopatologia iniciada pelo trauma, fator de crescimento neural (NGF), fator de necrose tumoral (TNF), prostaglandinas, bradicinina E2, serotonina, e prótons (H^+), que são liberadas por células epiteliais, mastócitos, macrófagos, entre outras (TODD et al., 2002). Assim, outros marcadores estão envolvidos no processo de dor como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), no qual é um tipo de neurotrofina (LIPSKY e MARINI, 2007).

As neurotrofinas são proteínas de estruturas similares com função de desenvolvimento neuronal, sobrevivência e plasticidade, subdivididas em quatro tipos, se ligam em dois tipos de receptores como tropomiosina ligada à quinase (TrKs) e receptor neurotrófico p75 (p75NTR). Os receptores TrKs são subdivididos em 3 tipos como TrKA, TrKB e TrKC, no qual o TrKB apresenta grande afinidade pelo BDNF, através do processamento do pré-mRNA que consiste na transcrição do segmento do gene do receptor TrKB, sendo este segmento transferido pela enzima específica a mRNA. Assim, o processo final da transcrição ocorre pela inclusão de 9 exon e codificação de 11 aminoácidos, formando o código para síntese do receptor, na região extracelular de justamembrana, entretanto a alteração dos exons facilita a ativação de outras neurotrofinas (LIPSKY e MARINI, 2007).

Na dor crônica o BDNF se encontra aumentado em células neuronais centrais (VOSSEN et al., 2010), através da ativação dos receptores AMPA pelo glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, no qual encontra-se aumentado na medula espinhal em dor crônica (STAUD, 2015). Os receptores AMPA induzem despolarização da membrana, ativam receptores NMDA promovendo influxo de cálcio. A localização e a subunidade dos receptores NMDA e outros receptores ionotrópicos de glutamato (IGRs) afetam a função e a viabilidade neuronal. Assim como, os receptores metabotrópicos de glutamato de subunidade 1 e 5 (mGluR1 e mGluR5) que secretam BDNF por mecanismo de ação autócrino. Este mecanismo de ação ocorre através da ativação do segundo mensageiro adenilatociclase que hidrolisa fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2), em 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG). O IP3 promove liberação de cálcio no retículo endoplasmático enquanto DAG ativa proteína quinase C (Pkc) e esta ativa cascatas de sinalização para síntese de BDNF. Após síntese o BDNF se liga nos receptores específicos do próprio neurônio que foi secretado, portanto a proteína quinase C (LIPSKY e MARINI, 2007) apresenta importante papel na manutenção da dor crônica (PRICE e INYANG, 2014).

Em suma, o mecanismo de manutenção de dor crônica nos neurônios sensitivos da medula espinhal, está envolvido com PKC especificamente isoforma chamada de PKM ζ e PKC λ , no qual provocam sensibilização persistente nos neurônios sensitivos espinhais (PRICE e INYANG, 2015). Esta sensibilização ocorre por meio de BDNF que induz fosforilação e ativa vias de sinalização que promovem tradução das duas isoformas de PKC, (PKM ζ e PKC λ) (MELEMEDJIAN et al., 2013). Estudo demonstra que PKC fosforilam receptores AMPA, levando o aumento da sinalização de glutamato pós-sináptico em neurônios aferentes (SACKTOR, 2011), promovendo aumento da síntese de BDNF (LIPSKY e MARINI, 2007). O BDNF no sistema nervoso periférico é expressado nos neurônios sensitivos dos gânglios da medula espinhal (DRG) e liberado nos neurônios do corno da medula espinhal, ligando em receptores específicos pré e pós-sinápticos e conseqüentemente promovendo a dor crônica pela despolarização e sensibilização dos neurônios do corno da medula espinhal. O BDNF poderia ser molécula alvo, para reverter o estado de manutenção persistente por meio da regulação das isoformas de PKC (PRICE e INYAANG, 2015). Asiedu et al., (2011) relatam que injeção intratecal de proteína quinase M zeta (pep2m) promovem redução na manutenção de

hiperalgesia, por meio de bloqueio dos receptores AMPA, sugerindo que α PKC regula receptores AMPA no qual apresentam papel em estado de dor crônica.

Pode-se observar na Figura 5, a manutenção de dor crônica por meio de ativação do nociceptor, levando aumento de BDNF no corno da medula espinhal, e este se liga em receptor específico pós- sináptico promovendo ativação de PI3K (PRICE e INYANG, 2015) e mTOR (LAPLANTE e SABATINI, 2013) que sintetiza proteína quinase C (α PKC), este fosforila e aumenta atividade de receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolproiónico ligado a moléculas (AMPA) pós-sinápticos promovendo estabilidade na sensibilização. A sensibilização parece ser regulada pela sinalização de BDNF via BDNF/TrKB, através da liberação de BDNF no dendrito pós-sináptico (mecanismo autócrino) mantendo o estado de sensibilização persistente. Os TrKBs também estão ativados pelo aumento da liberação de BDNF (PRICE e INYANG, 2015).

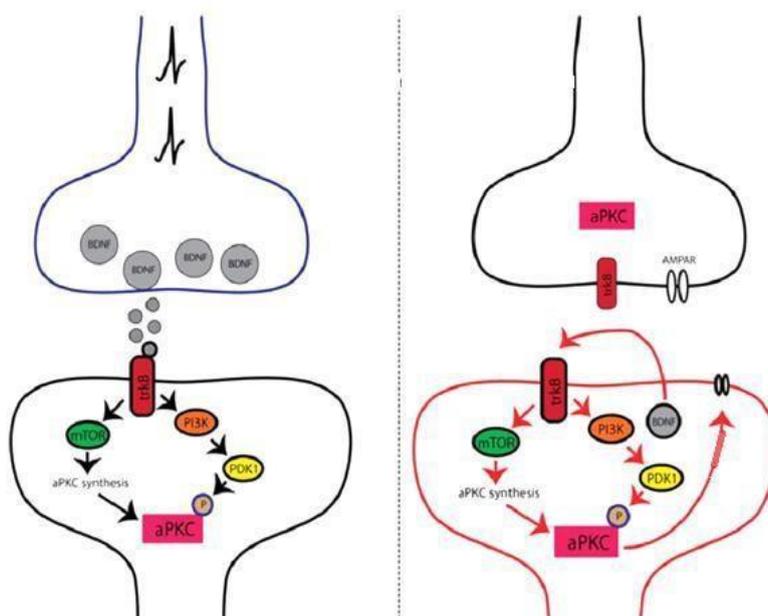


Figura 5 – Manutenção de dor crônica por meio de ativação do nociceptor. Fonte: Adaptado de Price e Inyang, (2015)

O BDNF apresenta importante papel em plasticidade de redes nociceptivas do sistema nervoso central (LIPSKY e MARINI, 2007; TAKEI e NAWA, 2014). Desta maneira, tem-se a necessidade de opções terapêuticas de base central para tratamento de dor crônica, assim como ETCC.

A ETCC é alvo de pesquisadores em estudos de modelos experimentais em humanos e cultura de células com intenção de descobrir o real mecanismo da mesma em diversas patologias. A ETCC é utilizada em patologias como depressão, dor crônica e doença de Parkinson, promovendo a modulação de excitabilidade cortical (MEDEIROS et al., 2012). É possível observar na Figura 6 o material utilizado para aplicação de ETCC em estudos de modelo humano.

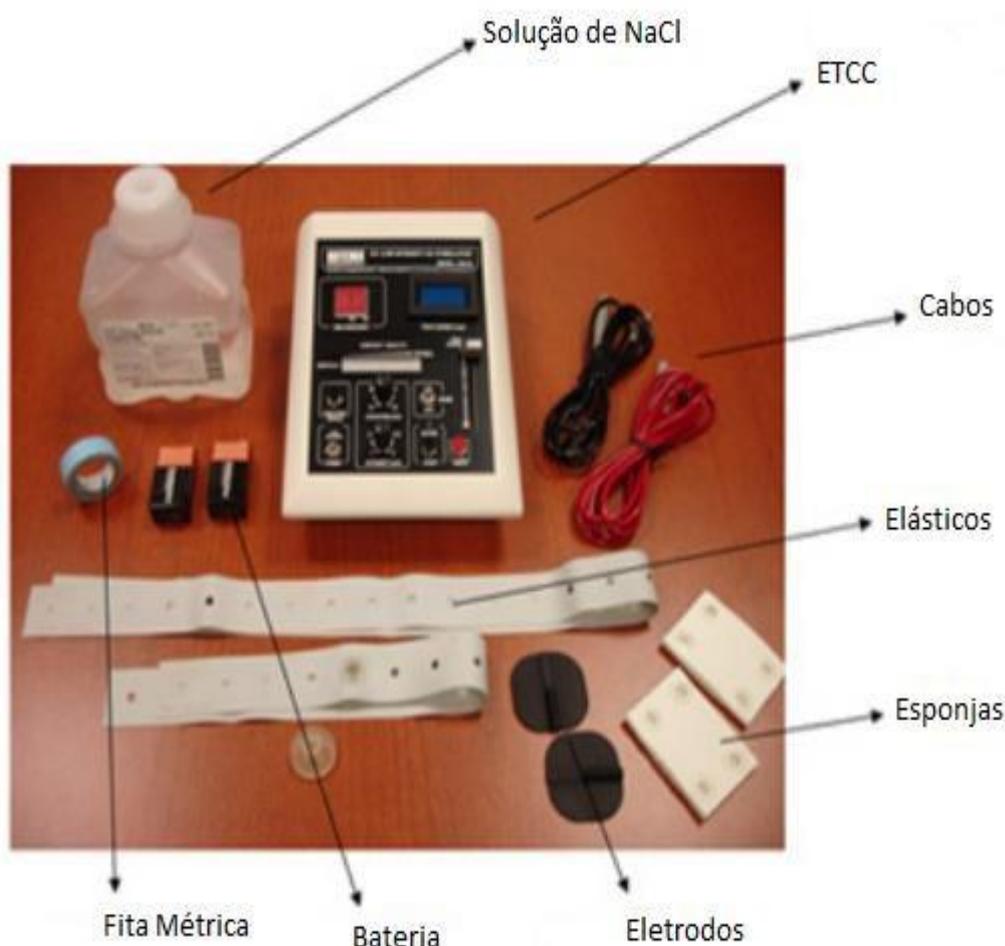


Figura 6 – Material utilizado para aplicação de ETCC em humanos.

Fonte: Adaptado de Da Silva et al., (2011).

A ETCC é aplicada em humanos através de eletrodos não metálicos de 25 a 35 cm² e inclusos dentro de borracha perfurada com solução salina ou água. Como é possível observar na Figura 7, o catodo, eletrodo de pólo positivo é colocado no córtex pré-frontal e o anodo, eletrodo de pólo negativo é colocado no córtex parietal. Este

posicionamento tem sido utilizado para tratamento de dor crônica, por meio de estimulação anodal. Os eletrodos são aplicados por cerca de 20 minutos e transmitem uma corrente elétrica contínua de 1-2 mA, gerada por meio de uma bateria.



Figura 7 – Posicionamento dos eletrodos na aplicação de ETCC em humanos.

Fonte: Adaptado de Da Silva et al., (2011).

Por outro lado, em modelos experimentais a ETCC é aplicado por eletrodos de gel condutor, por meio de catodo (pólo positivo) e anodo (polo negativo). Os eletrodos são conectados a uma bateria por 20 minutos, gerando corrente elétrica contínua constante com intensidade de 0,5 mA. O posicionamento do eletrodo é utilizado de acordo com o mesmo estabelecido em humanos. Na Figura 8 A mostra o posicionamento do eletrodo e na 8 B, a realização do tratamento com ETCC em modelo animal (LASTE et al., 2012).

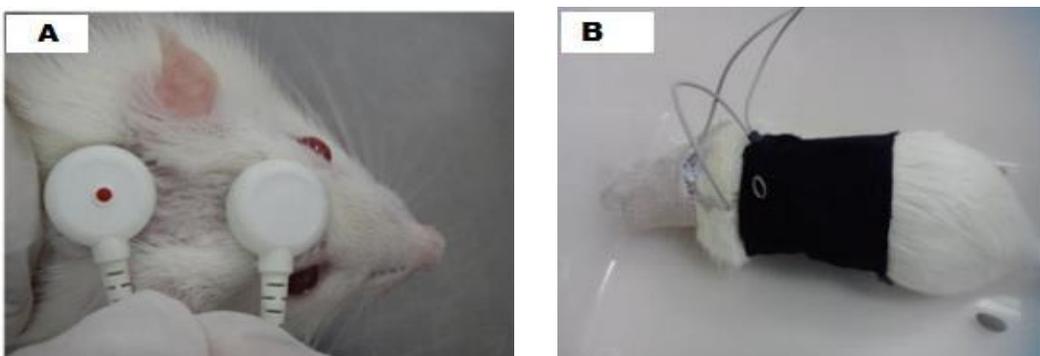


Figura 8 – A- Posicionamento dos eletrodos e B- Realização do tratamento com ETCC em modelo animal.

Fonte: Adaptado de Laste et al., (2012).

O procedimento comumente utilizado consiste de dois eletrodos colocados próximos para completar o circuito, em posição determinada por estudos realizados em humanos e em animais. O posicionamento do eletrodo é primordial para determinar a direção e a distribuição espacial da corrente e eficácia da técnica (DA SILVA et al., 2011). Esta técnica pode aumentar ou diminuir a excitabilidade neuronal, dependendo do fluxo da corrente. Em estímulo anodal promove aumento da excitabilidade neuronal (despolarização), no entanto em estímulo catodal leva a diminuição da excitabilidade neuronal (hiperpolarização), resultando no efeito caracterizado potencial de longa duração (LTP) ou potencial de curta duração (LTD). Na dor crônica como em outras patologias o efeito de curta ou longa duração depende de vários fatores como: o tamanho, polaridade, posição dos eletrodos, a intensidade, densidade, duração do tratamento com estimulação e da propriedade do tecido da área estimulada (MEDEIROS et al., 2012).

O mecanismo de ação da ETCC envolvido na dor crônica ainda não está esclarecido, no entanto, o efeito parece ser multifatorial promovendo alterações fisiológicas que resultariam em mudanças plásticas locais ou distantes, envolvendo a regulação de neurotransmissores como dopamina, acetilcolina e serotonina (NITSCHKE et al., 2009; MONTE-SILVA et al., 2009) e afetando canais de membrana neuronal, como cálcio e sódio.

Contudo é possível afirmar que o efeito de ETCC está associado com modulação sináptica, sendo chamada de técnica moduladora do sistema nervoso (NITSCHKE et al., 2003). De acordo com Volz et al., (2016), o tratamento realizado em humanos com ETCC por 5 sessões consecutivas de 20 minutos é capaz de produzir efeito antinociceptivo na dor crônica. Por outro lado, em modelo animal o protocolo de tratamento é realizado por 8 dias consecutivos com sessões de 20 minutos (LASTE et al., 2012). Os pesquisadores estão utilizando intervenções farmacológicas em humanos, no objetivo de esclarecer o mecanismo de ação da técnica de neuromodulação (ETCC), avaliando tratamento de curto e longo prazo. O uso de medicamentos que interagem em sistemas, tal como GABAérgico e Serotoninérgico podem contribuir para o entendimento do mecanismo de ação de ETCC na dor crônica, por meio da modulação no balanço entre os neurotransmissores excitatórios e inibitórios (MEDEIROS et al., 2012).

Atualmente, existem estudos demonstrando modulação de BDNF em amostras de soro, plasma e estruturas cerebrais como córtex total e medula espinhal em modelo

animal de dor neuropática induzida. Os resultados demonstraram redução do BDNF no córtex total e soro e aumento na medula espinhal depois de 7 dias de tratamento (FILHO et al., 2016). Recentemente, estudos com implantação epicraniana de eletrodos sobre córtex motor primário por meio de cirurgia estereotáxica para tratamento com estimulação por corrente contínua (ECC), em modelo animal demonstraram modulação do gene *egr-1*, que são induzidos em estímulos neuronais de despolarização. Os resultados demonstraram redução significativa do gene *erg-1* nos hemisférios direito e esquerdo, depois de 7 dias da intervenção cirúrgica (DIMOV et al., 2016). Outros estudos demonstraram modulação de citocinas (Interleucina 1β , Interleucina -10, Fator de Necrose Tumoral- α) pró e anti-inflamatórias, na medula espinhal com a utilização de ETCC bimodal em modelo animal de dor neuropática. Os resultados demonstraram alívio da dor comportamental podendo estar relacionada a neuroimunomodulação das citocinas avaliadas (CIOATO et al., 2015).

Sobretudo o auxílio de diversos métodos neurofarmacológicos ou neurofisiológicos podem melhorar o entendimento do mecanismo neurobiológico envolvidos no efeito terapêutico de ETCC. Contudo o conhecimento sobre o efeito de neurotransmissores e marcadores neuroquímicos ainda são incompletos (MEDEIROS et al., 2012). Estudos que utilizam outras vias de sinalização, que tenham o papel crucial na modulação neural, como as proteínas quinases (MAIXNER et al., 2015) podem contribuir no entendimento do mecanismo de ação de ETCC na dor crônica e na possível modulação de BDNF.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 54 ratos Wistar machos de 60 dias de idade ($\geq 250\text{g}$), provenientes do biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os animais foram mantidos no biotério central, e alocados 4 por caixas moradias, medindo (49X34X16cm) com o assoalho recoberto por maravalha. Os animais permaneceram com um ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura controlada ($\pm 21^\circ\text{C}$) e com acesso livre a água e ração. Foram realizados todos os procedimentos necessários para reduzir dor e desconforto. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEA) da UFPel sob o número 4538.

TAMANHO DA AMOSTRA

Foram alocados 9 animais por grupo para o experimento comportamental, com base em estudos prévios da literatura utilizando os mesmos materiais e métodos propostos nesse projeto (LASTE et al., 2012). Para as análises bioquímicas foram utilizados seis animais por grupo, sendo essa proporção de animais necessária para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de efeito grande), considerando $\alpha=0,05$ e poder de confiança de 95% (FILHO et al., 2016).

GRUPO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

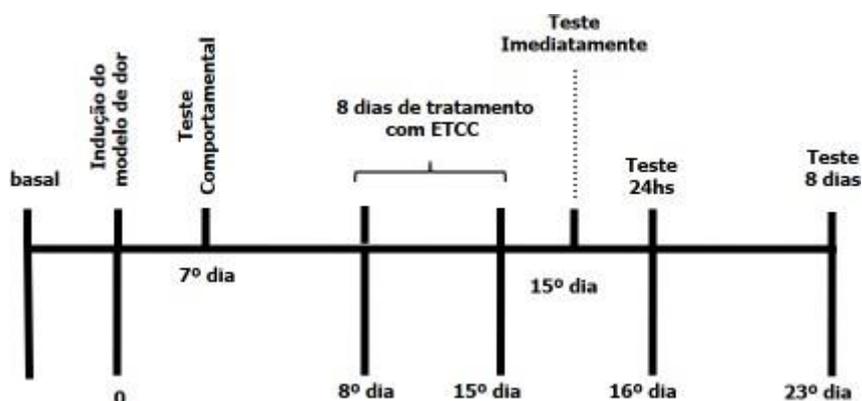


Figura 9 – Linha do tempo demonstrando delineamento experimental.

É possível observar na figura 10 o delineamento experimental deste projeto, no qual os 54 ratos foram divididos dentro de 6 grupos: Controle Total, Controle Sham-ETCC, Controle ETCC, CFA Total, CFA Sham-ETCC, CFA ETCC. Os animais foram ambientados em sala experimental por uma semana antes da avaliação do basal, para evitar analgesia pela novidade do ambiente. Após o estabelecimento do modelo de dor inflamatória crônica, os animais receberam tratamento com ETCC durante 8 dias consecutivos. Os testes nociceptivos (Von Frey e Placa Quente) foram realizados, antes da indução do modelo (Basal), 7 dias após inflamação, imediatamente, 24h e 8 dias após tratamento com ETCC. Os ratos Wistar foram eutanasiados por decapitação no 8º dia após tratamento.

AVALIAÇÃO DO PESO

Para determinação do peso foi utilizado balança digital (Modelo 9094, Toledo, Rio Grande do Sul, Brasil) com auxílio de uma cuba plástica. Os animais foram colocados na cuba e o peso foi determinado em gramas. Antes do início dos experimentos os animais foram randomizados por peso.

CARACTERIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA INDUZIDA PELO CFA

O edema na pata posterior direita, foi induzido por meio de injeção via intraplantar de 0,1 mL do adjuvante completo de Freund's (CFA). Os animais foram anestesiados com isoflurano para a indução da inflamação. A fase crônica da inflamação foi estabelecida em 7 dias.

TRATAMENTO COM ETCC

O tratamento foi realizado por meio de estimulação bimodal utilizando eletrodos de eletroencefalograma (1,5 cm²) por estimulador de corrente constante impulsionado por uma bateria para aplicação de correntes contínuas em pequenos mamíferos de intensidade 0,5 mA. O ânodo foi colocado sobre o córtex parietal e o cátodo sobre a área supraorbital contralateral. Essa posição dos eletrodos mostrou previamente aumentar a excitabilidade do córtex motor primário efetivamente e induzir o alívio da dor. Os eletrodos foram colocados na cabeça dos animais por 20 min durante 8 dias consecutivos com uma corrente constante de intensidade de 0,5 mA. Para a estimulação sham, os eletrodos foram colocados nas mesmas posições da estimulação real, no entanto, aparelho permaneceu desligado (LASTE et al, 2012 e CIOATO et al., 2015).

APARELHO DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA

A estimulação elétrica foi realizada por meio de Aparelho de Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua produzido pelo Laboratório de Engenharia Biomédica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

AVALIAÇÃO DOS TESTES COMPORTAMENTAIS

AVALIAÇÃO DE HIPERALGESIA MECÂNICA

O teste Von Frey eletrônico se baseia em verificar a hiperalgesia mecânica. Para avaliação deste procedimento foi utilizada analgesímetro eletrônico (Modelo EFF 301, Insight, São Paulo, Brasil), adicionado a uma ponteira descartável de polipropileno, no qual foi aplicada uma força em ordem crescente na precisão de 0,1g a 80g na pata traseira direita (ipsilateral) dos animais. Os animais foram colocados em caixas de

acrílico (12X20X17cm) com base formada de redes. Um dia anterior ao teste, os animais permaneceram nas caixas por 15 minutos para habituação. Os estímulos de força foram aplicados até a obtenção de três medidas nítidas, pela resposta de retirada da pata (CIOATO et al, 2015).

AVALIAÇÃO DE HIPERALGESIA TÉRMICA

O teste de placa quente (Modelo EFF 36, Insight, São Paulo, Brasil) foi utilizado para avaliar o limiar nociceptivo térmico. Os ratos foram habituados um dia antes da realização do teste, por 5 minutos para evitar analgesia induzida pela novidade do aparelho. A superfície da placa quente foi pré-aquecida e mantida numa temperatura constante de ± 50 °C. Os animais foram colocados dentro de uma cuba de vidro ligada a uma superfície aquecida, o tempo foi cronometrado de no máximo 20 segundos, a fim de evitar lesão tecidual pelo teste. A resposta ao estímulo térmico foi caracterizada como lambe patas traseiras e/ou sapatear sobre a placa térmica.

AVALIAÇÃO DE EDEMA DE PATA

Para determinação do aumento de volume relacionado com inflamação foi utilizado paquímetro universal (Modelo 125, Starrett, São Paulo, Brasil). Este aparelho consiste de uma régua graduada ligada a um aparato, no qual desliza um cursor que se ajusta a régua, permite medir dimensões menores com precisão. O edema de pata dos animais foi avaliado pela altura e largura.

COLETA DE AMOSTRA

Os animais foram eutanasiados em 8 dias após última sessão de tratamento com ETCC, o córtex pré-frontal, hipocampo, a pata direita e o sangue foram coletados. As amostras (estruturas cerebrais) foram armazenadas no freezer -80 °C, o sangue foi centrifugado por 10 minutos em 4.500 rpm para obtenção do soro e a pata foi colocada em paraformol 10%.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os níveis de BDNF foram determinados no córtex pré-frontal, hipocampo e soro, por meio de Kits comerciais, seguido de acordo com protocolo dos fabricantes, a leitura foi realizada pelo método de ELISA (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) absorvância no comprimento de onda em 450nm. A proteína foi medida pelo método de Bradford, usando albumina de soro bovino como padrão.

ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Após coleta as amostras foram fixadas em solução de paraformol a 10% por um período mínimo de três horas. Posteriormente, ocorreu o procedimento de descalcificação química com HNO₃ a 5% por 30 dias, sendo intervalo de troca da solução de 2 dias. As análises foram realizadas com fragmentos de tecido da região plantar obtidos dos animais dos grupos, controle total, controle sham-ETCC, controle ETCC, CFA total, CFA sham-ETCC, CFA ETCC. Os fragmentos foram processados conforme as técnicas histológicas de rotina até a inclusão em parafina. Foram feitos 3 cortes histológicos para cada lâmina, 3 lâminas para cada grupo animal, total de 18 lâminas e 36 cortes com a espessura de 5micras, corados por Hematoxilina- Eosina. Os cortes foram analisados por meio de microscópio óptico de luz (Nikon Eclipse E200) no aumento de 100x. As imagens foram capturadas ao acaso em 3 áreas de cada uma das lâminas e analisadas por meio do programa, Motic Images Plus 2.0. Estes cortes foram digitalizados com câmera digital (Moticam 5.0 mp) acoplada ao microscópio óptico de luz com uma resolução de 2048 x 1536 pixels, conforme calibração obtida pelo uso de uma escala padrão.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média± erro padrão da média. Para os testes comportamentais, os dados foram submetidos ao teste de equações de estimativas generalizadas (GEE) seguido do teste Post Hoc Bonferroni, com significância de $P < 0,05$. A análise estatística para os dados bioquímicos foi por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste Student-Newman-Keuls (SNK), com significância de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SPSS versão 20.0.

5. RESULTADOS

PESO DOS ANIMAIS

O peso dos animais foi mensurado desde o basal até 8 dias após a última sessão de ETCC. Observamos uma interação entre tempo versus grupo (GEE, $p < 0.05$), ou seja, todos os animais aumentaram o seu peso com o passar do tempo em relação ao basal.

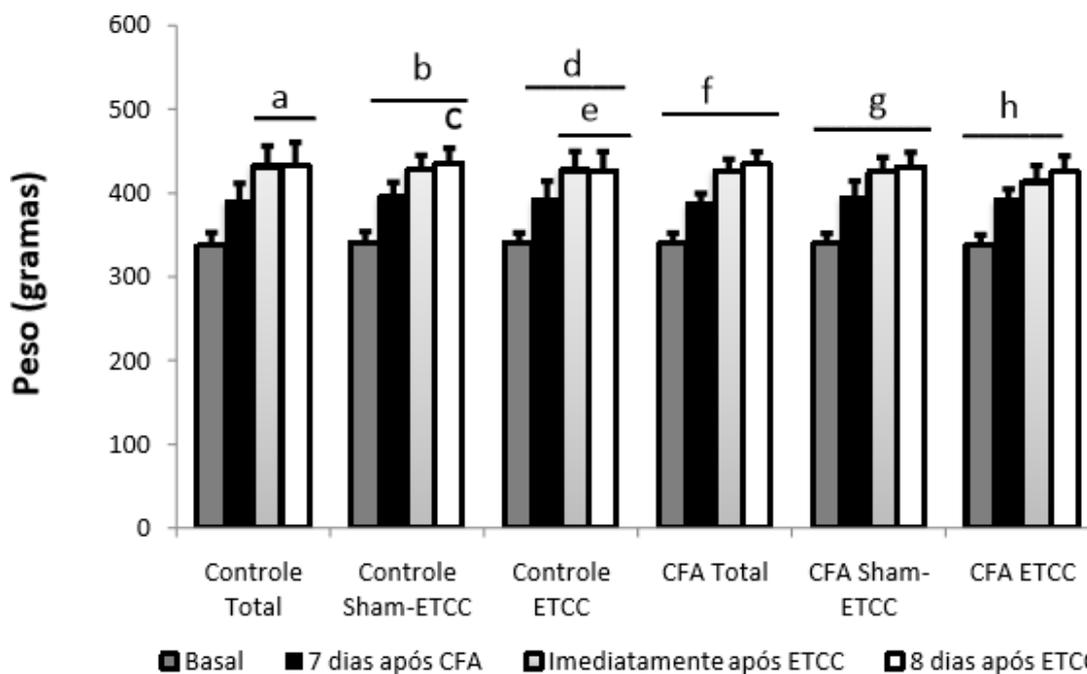


Imagem 10- Avaliação do peso em diferentes tempos: basal, 7 dias após indução da Inflamação, imediatamente e 8 dias após a última sessão de ETCC. As barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de peso em gramas (g). * Diferença significativa (GEE, $p < 0.05$; $n = 9$). a) diferente basal e 7 dias no grupo Controle total; b) diferente do basal no grupo Controle Sham-ETCC; c) diferente do 7 dias após CFA e imediatamente após ETCC no grupo Controle Sham-ETCC; d) diferente do basal no grupo Controle ETCC; e) diferente do 7 dias após CFA no grupo Controle ETCC; f) diferença entre todos no grupo CFA total; g) diferença entre todos no grupo CFA Sham-ETCC; h) diferença entre todos no grupo ETCC.

TESTES COMPORTAMENTAIS

HIPERALGESIA MECÂNICA

Neste estudo, um grupo de animais foram submetidos à um modelo de inflamação induzida com injeção de 100 μ l de adjuvante de Freund's (grupo CFA: Total, Sham-ETCC e ETCC) e grupo Controle, onde os animais receberam apenas salina (grupo

CONTROLE: Total, Sham-ETCC e ETCC). No teste Von Frey, todos os animais que receberam CFA apresentaram redução do limiar nociceptivo. Porém, os animais do grupo CFA ETCC, mostraram um aumento do limiar nociceptivo imediatamente após última sessão de ETCC, sendo que no tempo de 24hs e 8 dias após a última sessão de ETCC, o limiar de retirada da pata dos animais deste grupo não diferem do tempo Basal, mostrando assim uma completa reversão do limiar mecânico (Imagem 9).

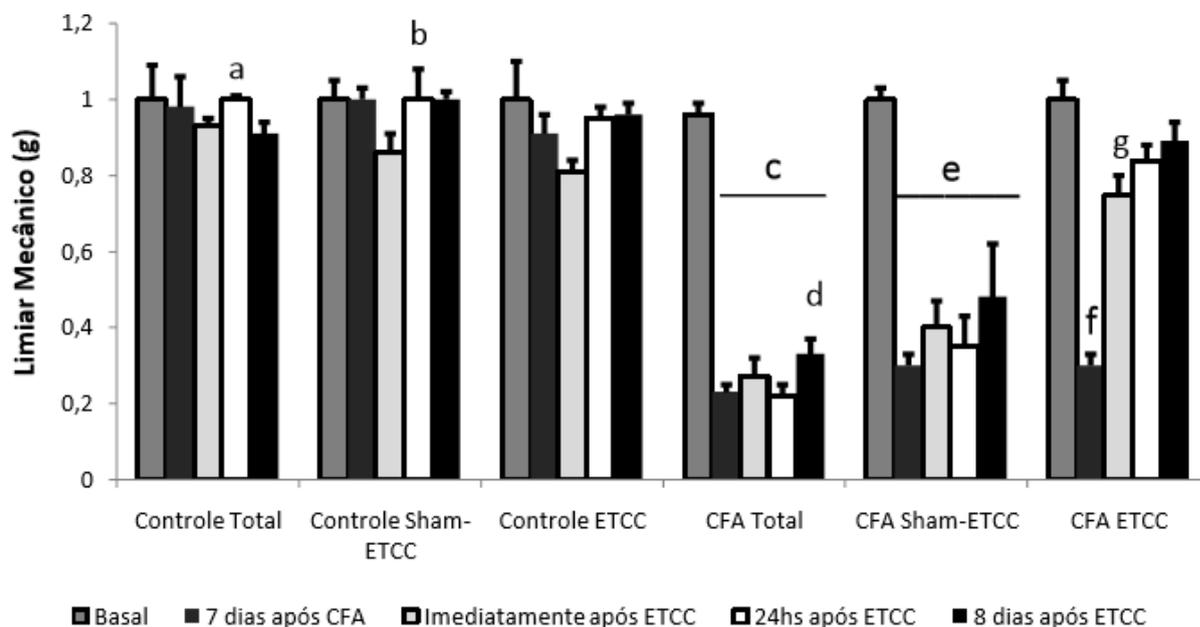


Imagem 11 - Avaliação do limiar mecânico, por meio de Von Frey em diferentes: basal, 7 dias após indução da inflamação com CFA, imediatamente, 24 horas e 8 dias após a última sessão de ETCC. As barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de limiar de retirada da pata em gramas (g). Houve importante interação tempo versus grupo (GEE, $p < 0.05$; $n = 9$). a diferente do imediatamente e 8 dias após ETCC no grupo Controle Total; b diferente do imediatamente após ETCC no grupo Controle Sham-ETCC; c diferente do basal no grupo CFA Total; d diferente do 7 dias após CFA e 24hs após ETCC no grupo CFA Total; e diferente do basal no grupo CFA Sham-ETCC; f diferente dos demais tempos no grupo CFA ETCC; g diferente do basal no grupo CFA ETCC (GEE, $p < 0.05$).

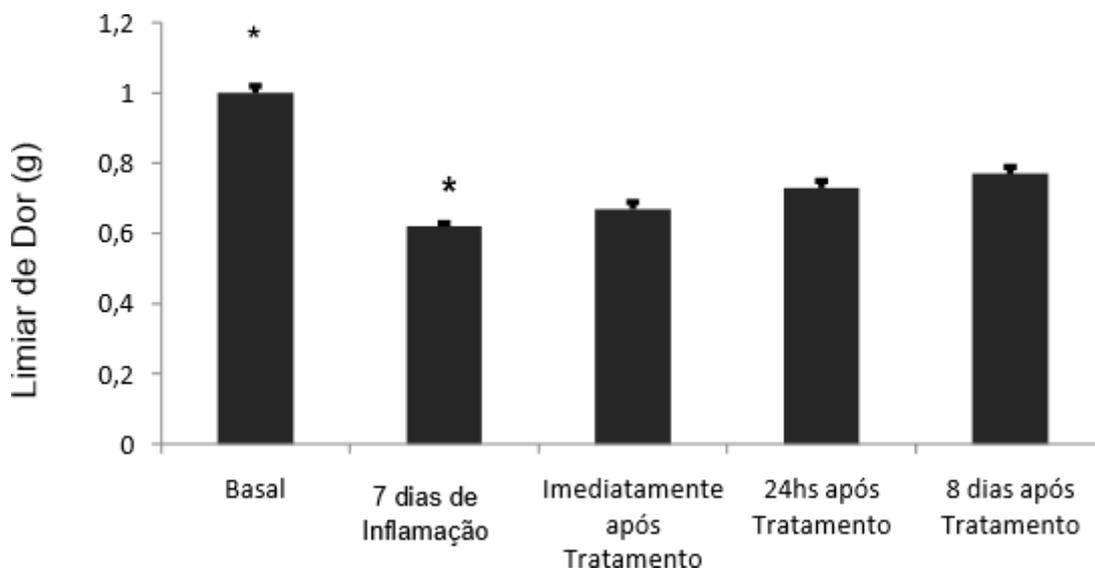


Imagem 12 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico dos grupos experimentais por meio da comparação entre os tempos de tratamento com ETCC: Basal, 7 dias de Inflamação, imediatamente após Tratamento, 24hs após Tratamento, 8 dias após Tratamento. * Diferença significativa entre basal e 7 dias após Inflamação com outros tempos (GEE, $p < 0.05$; $n=9$).

HIPERALGESIA TÉRMICA

Adicionalmente, nós observamos a indução da hiperalgesia térmica 7 dias após administração de CFA (teste t de Student, $p < 0.05$, figura 11), confirmando o bom funcionamento do modelo, e após os animais iniciaram o tratamento com ETCC, de acordo com os respectivos grupos.

Após o término do tratamento, nós observamos uma importante interação entre tempo versus grupo na hiperalgesia térmica no teste da placa quente (GEE, $p < 0.05$). Foi observado que no grupo CFA ETCC, a redução do limiar de dor induzido pelo CFA foi revertida parcialmente em relação ao basal. Enquanto que nos demais grupos que receberam CFA (total e sham-ETCC), não foi observada alguma melhora na resposta hiperalgésica, confirmando assim o efeito antinociceptivo da ETCC. Por outro lado, observamos uma redução do limiar nociceptivo nos grupos controles (total, sham-ETCC e ETCC) em relação ao tempo basal (Imagem 12).

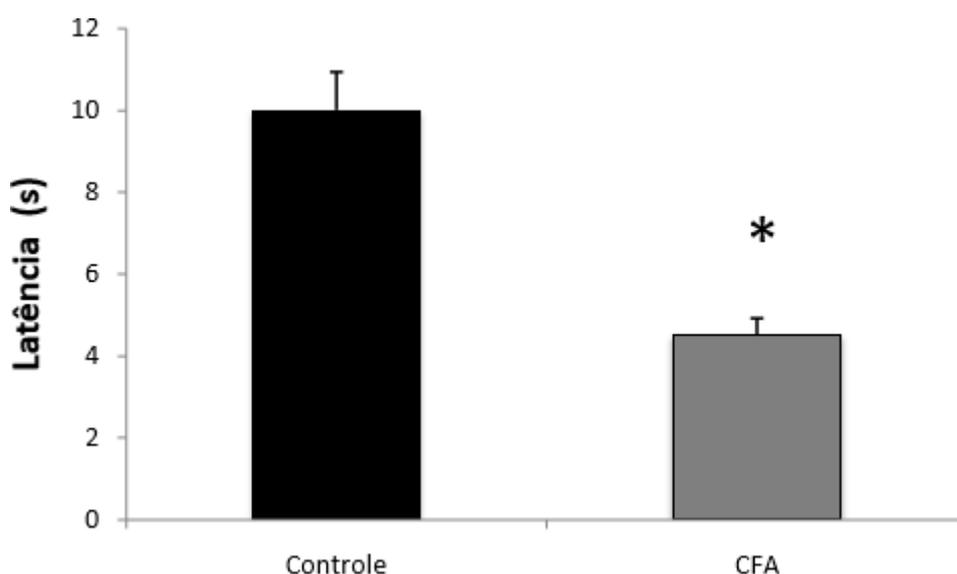


Imagem 13- Indução da hiperalgesia térmica avaliada 7 dias após injeção de CFA na pata de ratos Wistar. As barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de latência de retirada da pata em segundos (s). *diferente do grupo controle (teste t de Student, $p < 0.05$).

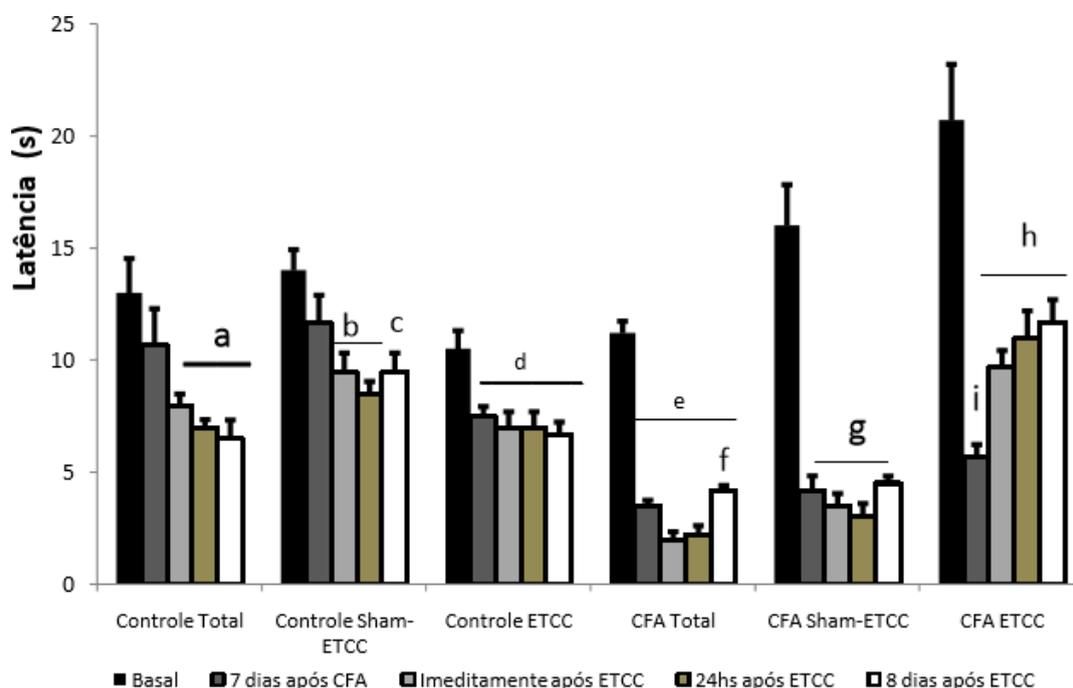


Imagem 14- Resultado do efeito da ETCC sobre a resposta hiperalgésica térmica, por meio do teste da Placa Quente. As barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de latência de retirada da pata em segundos (s). Houve importante interação entre grupo e tempo (GEE, $p < 0.05$; $n = 4$). a) diferente do basal e 7 dias após CFA no grupo Controle Total; b) diferente do basal e 7 dias após CFA no grupo Controle Sham-ETCC; c) diferente do basal e 24 hs após ETCC; d) diferente do basal no grupo Controle ETCC; e) diferente do basal no grupo CFA total; f) diferente do imediatamente e 24 hs após ETCC; g) diferente do basal no grupo CFA Sham-ETCC; h) diferente do basal no grupo CFA ETCC; i) diferente do imediatamente, 24hs e 8 dias após ETCC.

EDEMA DE PATA

Observou-se um aumento significativo no volume da pata de ratos que foram submetidos a injeção de CFA, 7 dias após, em comparação com grupo Controle (teste t de Student, $p < 0.05$, figura 23). Após ao final do tratamento com ETCC, observamos uma interação entre tempo versus grupo (GEE, $p < 0.05$). (Imagem14). Observamos um aumento no volume da pata nos animais que receberam CFA (total, sham-ETCC e ETCC) e este aumento foi parcialmente revertido imediatamente e 24 horas após ETCC. No grupo controle (sham-ETCC e ETCC), observamos uma pequena variação do volume da pata ao longo do tempo.

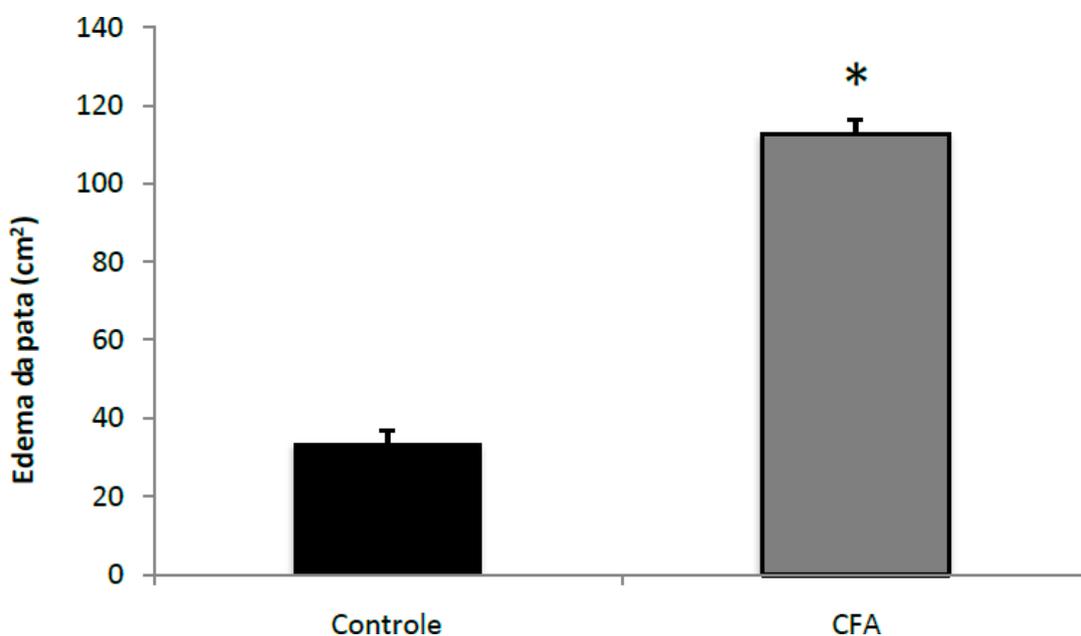


Imagem 15 - Volume da pata mensurado por paquímetro 7 dias após indução da inflamação por CFA. As barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de tamanho da pata em centímetros (cm).

* diferença significativa do controle (teste t de Student, $p < 0.05$).

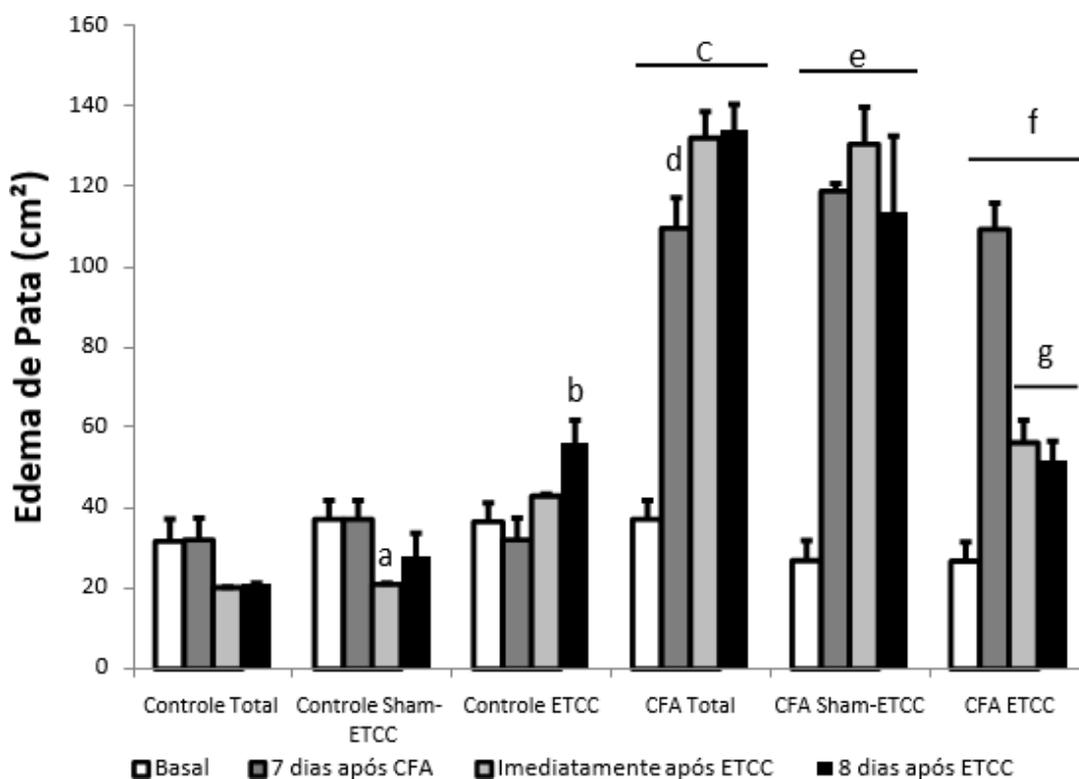


Imagem 16 - Avaliação do edema da pata, por meio de paquímetro em diferentes tempos de tratamento: basal, 7 dias após CFA, imediatamente após tratamento e 8 dias após a última sessão de ETCC. As barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de tamanho da pata em centímetros (cm). * Interação tempo versus grupo (GEE, $p < 0.05$; $n = 9$). a) diferente do basal e 7 dias após CFA no grupo controle Sham-ETCC; b) diferente do basal e 7 dias após CFA no grupo Controle ETCC; c) diferente do basal no grupo CFA total; d) diferente do imediatamente e 8 dias após ETCC; e) diferente do basal no grupo CFA Sham-ETCC; f) diferente do basal no grupo CFA ETCC; g) diferente do 7 dias após CFA no grupo CFA ETCC.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os níveis de BDNF mensurados no córtex pré-frontal e hipocampo não apresentaram diferença significativa entre os grupos, conforme as figuras 17 e 18. No entanto em níveis séricos, os grupos CFA Sham-ETCC e CFA ETCC apresentaram uma diminuição significativa em relação ao grupo Controle ETCC (ANOVA de uma via/SNK, $p < 0.05$, Imagem 19).

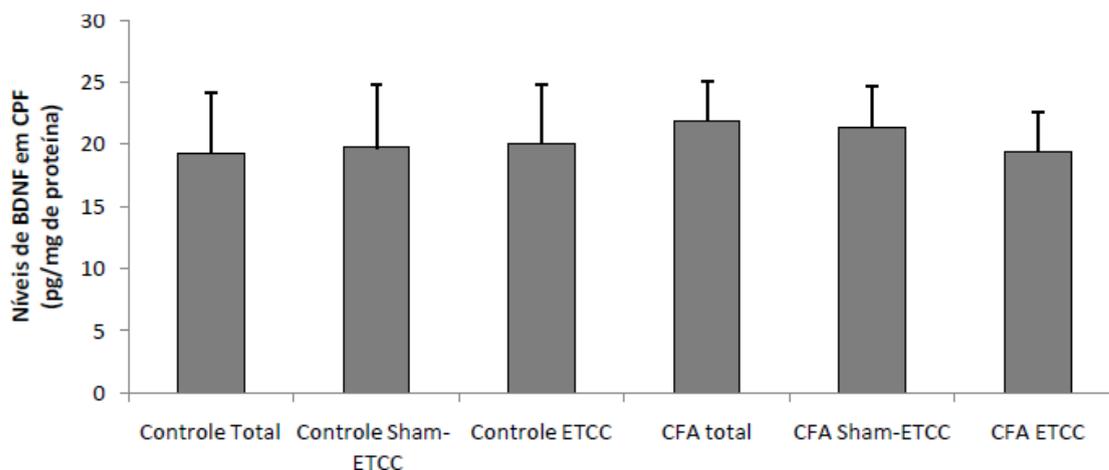


Imagem 17 - Níveis de BDNF mensurados no córtex pré-frontal (CPF) de ratos. As barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de níveis de BDNF (pg/mg de proteína). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via/SNK, $p > 0.05$; $n = 5-6$).

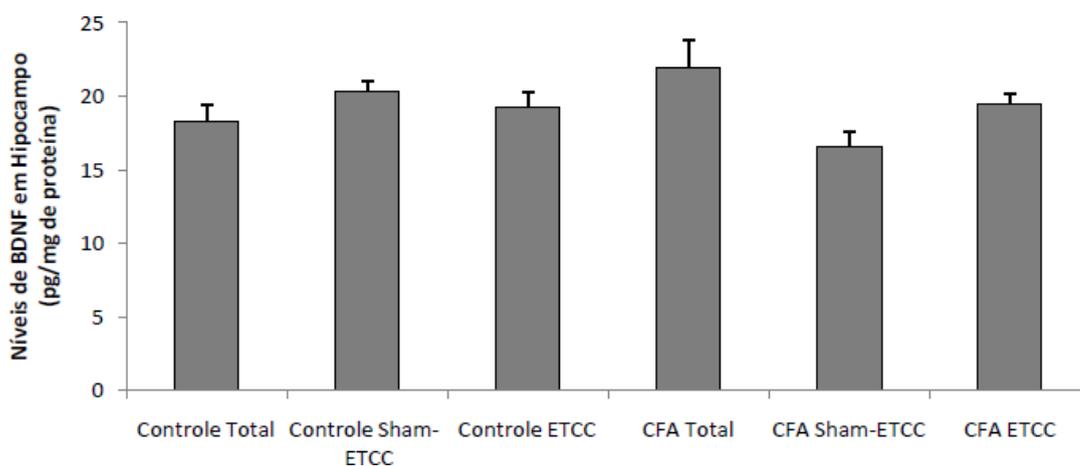


Imagem 18 - Níveis de BDNF mensurados em Hipocampo de ratos. As barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de níveis de BDNF (pg/mg de proteína). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via/SNK, $p > 0.05$; $n = 5-6$).

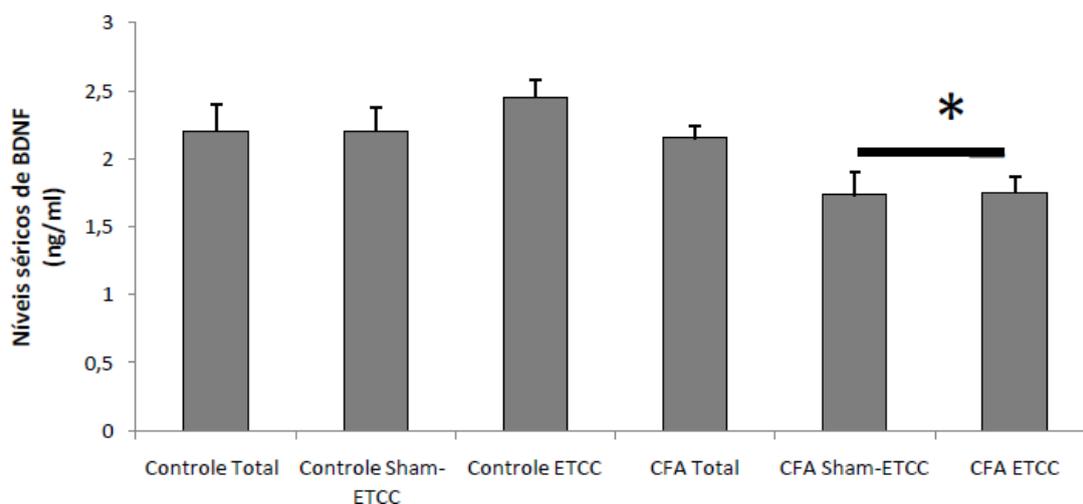


Imagem 19- Níveis séricos de BDNF. As barras verticais representam as médias \pm erro padrão da média de níveis de BDNF (ng/ml). * Diferença significativa em relação ao grupo Controle ETCC (ANOVA de uma via/SNK, $p < 0.05$; $n = 5-6$).

ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Na avaliação histológica (figuras 20 A-1, 21 C-2 e 22 E-3), no grupo controle total não foi observado nenhum processo inflamatório. No entanto nas figuras (20 B- 1, 21 D-2 e 22 F-3) do grupo CFA total demonstraram presença de células inflamatórias, grande infiltração e vascularização característica de processo inflamatório. Por outro lado, nas figuras 26 O-1 e 28 S-3 demonstraram menor infiltração e vascularização, evidenciando redução inflamatória.

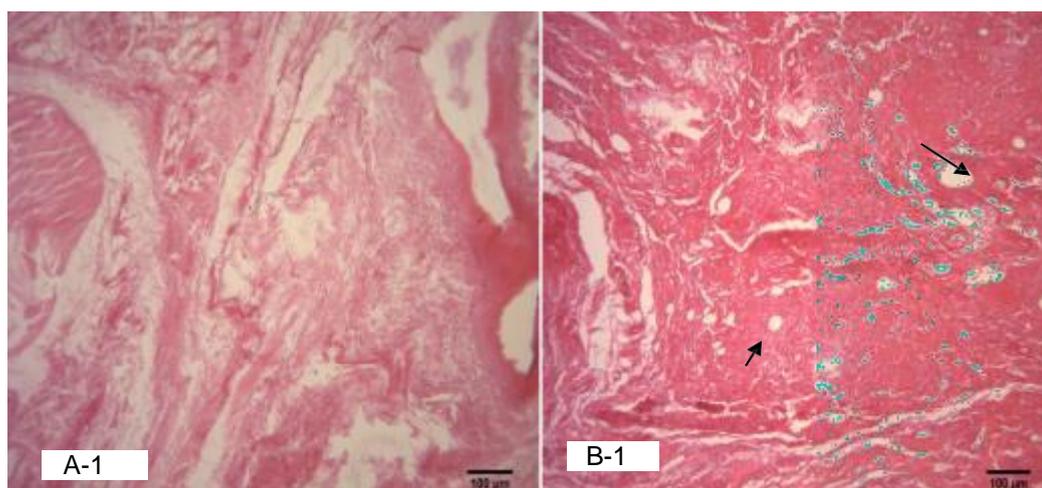


Imagem 20 - Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle total (A-1) e CFA total (B-1). 1 região társica do rato. Observa-se ausência de células inflamatórias em A-1, no entanto em B-1 a seta maior indica vascularização e a seta menor infiltração, característico de processo inflamatório. H.E em 100X de aumento.

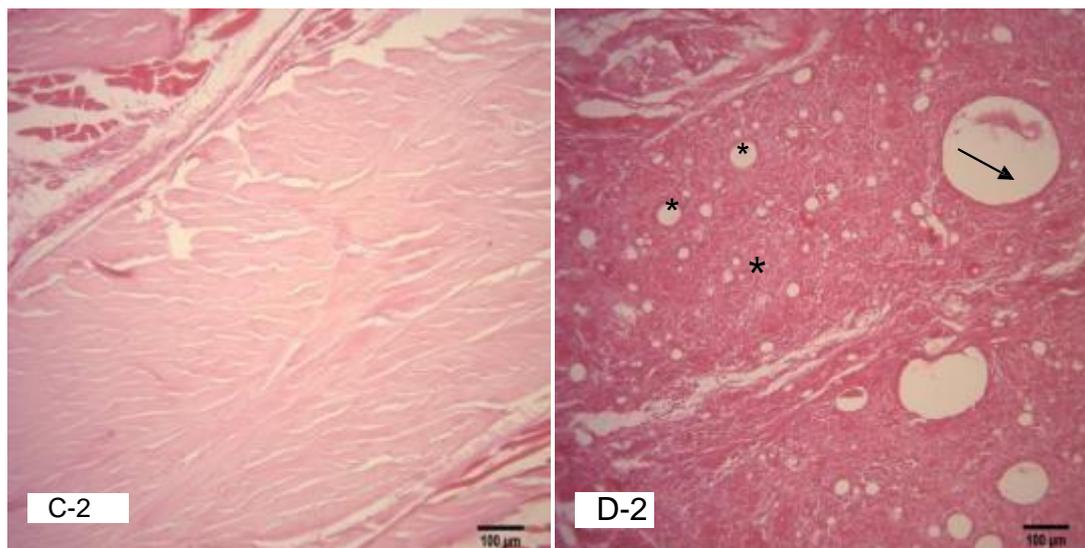


Imagem 21 - Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle total (C-2) e CFA total (D-2). 2) região do coxim do rato. Observa-se aparência normal histológica em C-2). Em D-2 a seta indica aumento do capilar e o asterisco grande infiltração característico de processo inflamatório. Coloração em Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100X.

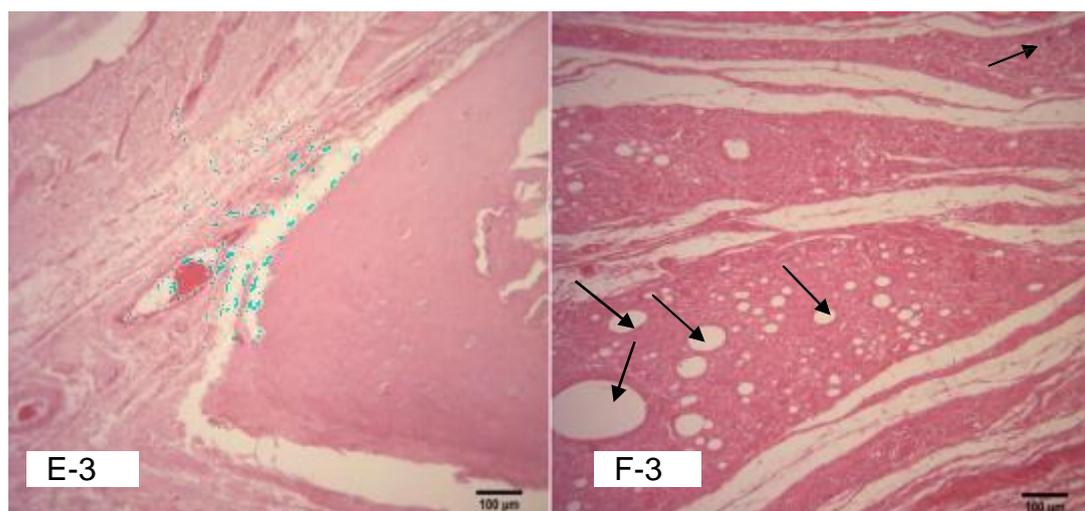


Imagem22 - Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle total (E-3) e CFA total (F-3). 3) região do calcâneo do rato. Observa-se ausência de inflamação em E-3. No entanto em F-3 observa-se presença de célula inflamatória, indicado pela seta. Coloração em Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100X.

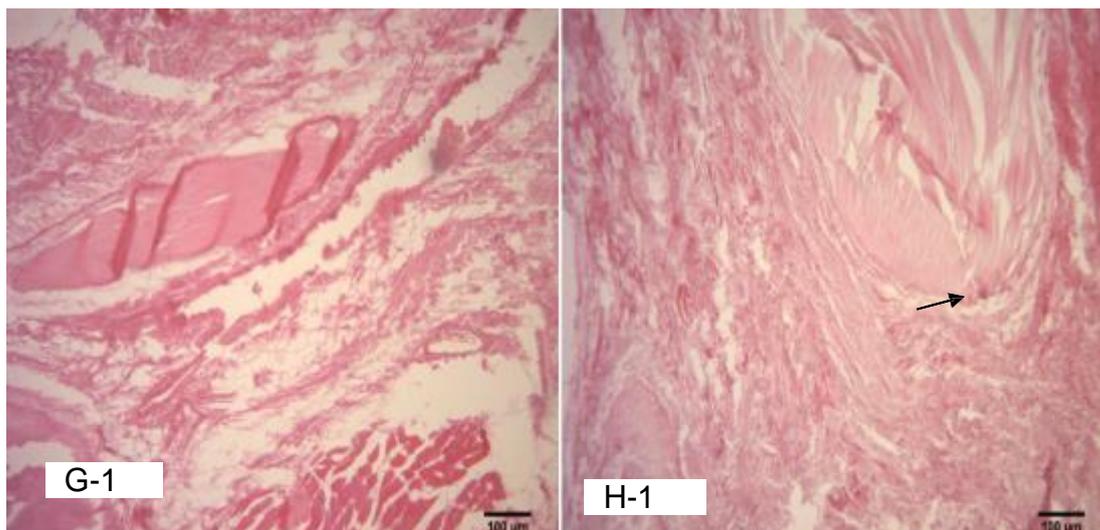


Imagem23- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle Sham- ETCC (G-1) e CFA Sham-ETCC (H-1). 1 região társica do rato. Observa-se presença de leucócito indicado pela seta em H-1. Coloração em Hematoxilina- Eosina. Aumento de 100X.

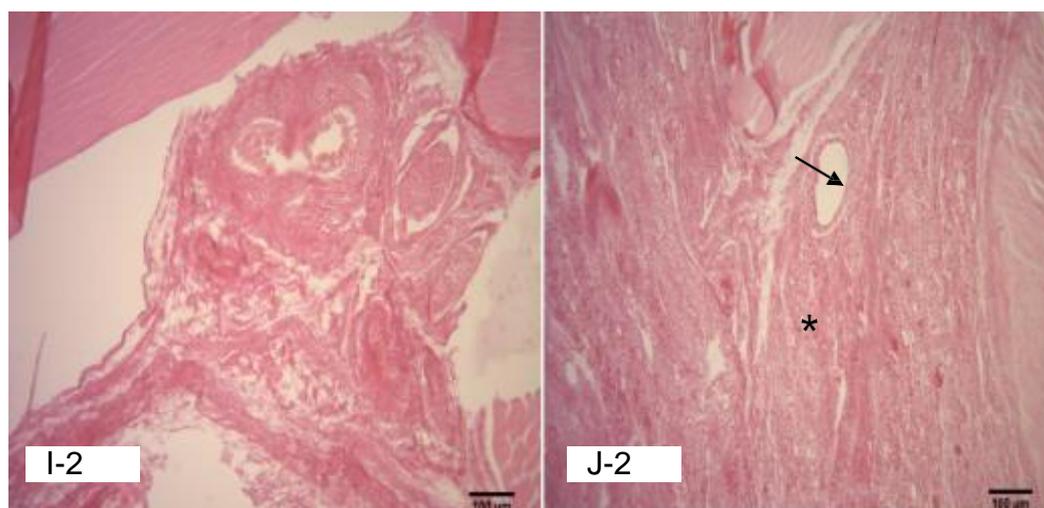


Imagem 24 - Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle Sham-ETCC (I-2) e CFA Sham-ETCC (J-2). 2 região do coxim do rato. Observa-se na imagem J-2, seta indicando aumento do capilar e o asterisco grande infiltração característico de processo inflamatório. Coloração em Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100X.

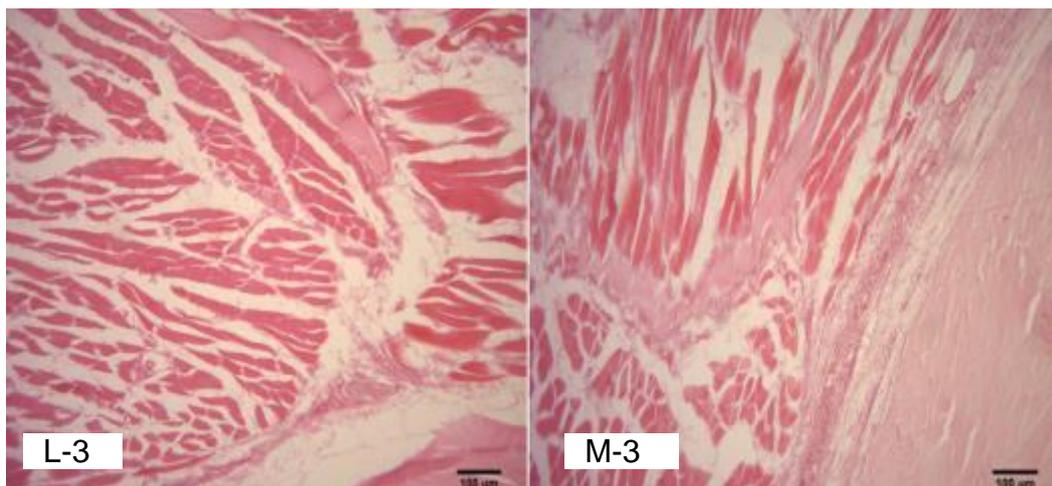


Imagem 25- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle Sham-ETCC (L-3) e CFA Sham-ETCC (M-3). 3) região do calcanhar do rato. Coloração em Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100X.

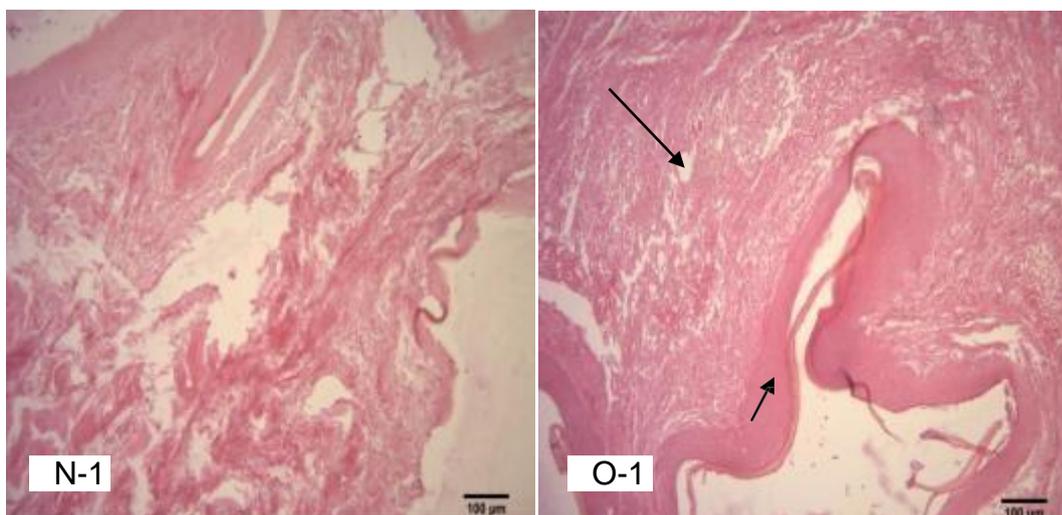


Imagem 26- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle ETCC (N-1) e CFA ETCC (O-1). 1) região társica do rato. Observa-se na imagem Q-1 diminuição de infiltração e tecido epitelial indicado pela seta. Coloração em Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100X.

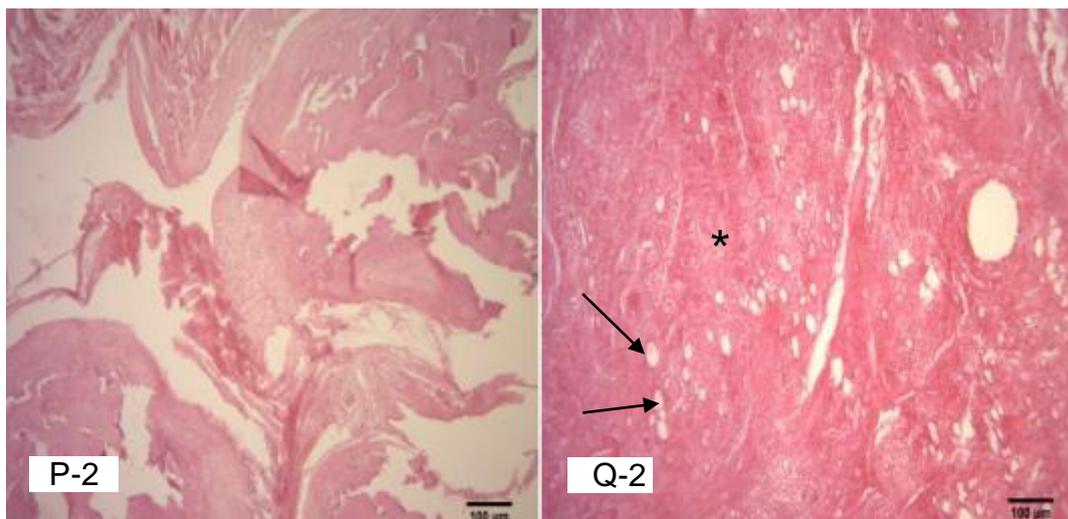


Figura 27- Fotomicrografia das lâminas histológicas do grupo controle ETCC (P-2) e CFA ETCC (Q-2). 2) região coxim do rato. Observa-se na imagem Q-2 infiltração de células indicado pelo asterisco. Coloração em Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100X.

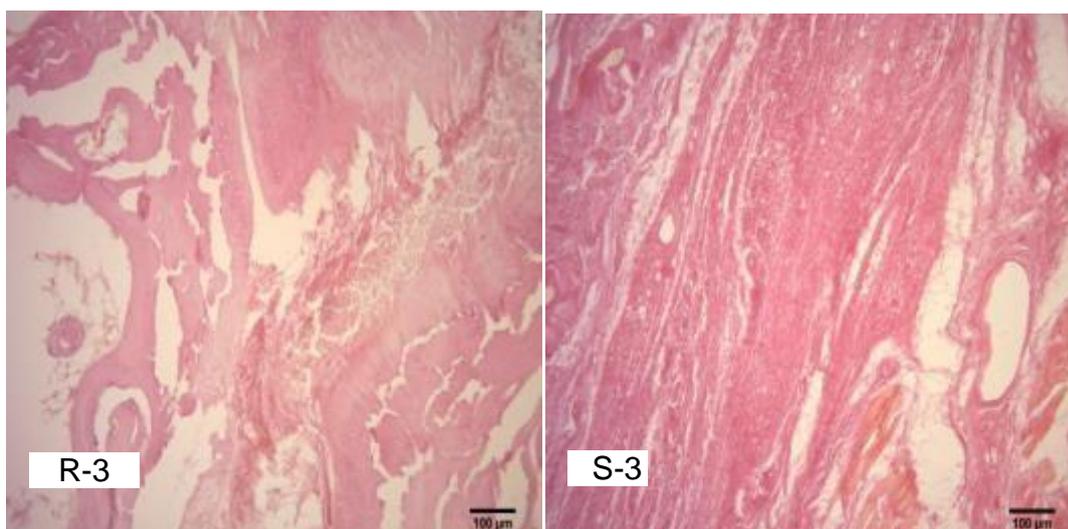


Imagem 28 - fotomicrografias representativas das lâminas histológicas do grupo controle ETCC (R-3) e CFA ETCC (S-3). 3 região do calcânhar do rato. Observa-se em S-3 ausência de células inflamatórias e diminuição da vascularização, em comparação com imagem F-3 (CFA total, de região do calcânhar). Coloração em Hematoxilina-Eosina. Aumento de 100X.

6. DISCUSSÃO

Os dados reportados nesse estudo indicam que o efeito do ETCC em ratos Wistar em um modelo de dor crônica inflamatória induzida, apresentam possíveis perfis de resposta antinociceptiva frente a diferentes testes comportamentais.

Após 8 dias da última sessão de ETCC, observou-se um possível efeito antinociceptivo, avaliados por meio dos testes Von Frey e placa quente (estímulos mecânicos e térmicos respectivamente). O efeito antinociceptivo, sobre a hiperalgesia mecânica, parece perdurar por 8 dias após tratamento, comparado com 7 dias de inflamação (estabelecimento do modelo de dor crônica inflamatória), no grupo CFA ETCC. Entretanto, no grupo CFA total e sham-ETCC não apresentaram um efeito antinociceptivo, permanecendo com limiar reduzido.

Por outro lado, na avaliação de hiperalgesia térmica, observou-se um possível retorno aos níveis do basal (medida antes da indução do modelo), o efeito antinociceptivo comparado aos das medidas realizadas após tratamento. Estudos que utilizaram ratos Wistar, em modelo de dor neuropática estabelecido por 14 dias, mostraram que 7 dias após tratamento com ETCC, tanto na avaliação hiperalgésica térmica e mecânica houve uma diminuição do limiar de dor (CIONATO et al., 2015). Em outro estudo, em que foi utilizado o modelo de dor inflamatória crônica induzida por CFA (estabelecimento em 14 dias) foi evidenciado aumento de limiar de dor em imediatamente e 24hs após tratamento com ETCC no teste comportamental de placa quente. Entretanto, no teste de Von Frey foi demonstrado aumento de limiar em 24hs após tratamento com ETCC (LASTE et al., 2012). No entanto, em nosso estudo, o estabelecimento de dor inflamatória crônica foi de 7 dias, no qual a redução do limiar de dor foi observada em teste Von Frey e Placa Quente, demonstrando diferença estatisticamente significativa.

Além disso, observamos que imediatamente após tratamento com ETCC, ocorreu uma diminuição do edema de pata, no qual perpetuou a 8 dias após tratamento, comparado com 7 dias de inflamação no grupo CFA ETCC, e também foi possível observar redução da inflamação nas análises morfológicas da pata direita dos animais, em comparação com grupo CFA ETCC, mostrando um possível envolvimento da ETCC no processo inflamatório. Existem evidências da modulação de mediadores inflamatórios (Interleucina 1β (IL- 1β) e Fator de necrose tumoral α (TNF α)) (CIONATO et al., 2015) e neurotransmissores (GABA e Serotonina entre outros) pela ETCC (MEDEIROS et al., 2012) em modelo de dor neuropática (CIONATO et al., 2015).

Estudos demonstraram modulação de outros marcadores envolvido na dor crônica, bem como, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em dor neuropática. Assim, neste estudo relataram aumento de BDNF na medula espinhal em 7 dias após tratamento com ETCC, e diminuição do mesmo em níveis séricos e plasma também 7 dias após tratamento com ETCC (FILHO et al., 2016).

Em nosso estudo, foi possível observar redução de BDNF em níveis séricos entre os grupos CFA Sham-ETCC e CFA ETCC comparado ao controle ETCC, possivelmente esse resultado no grupo Sham-ETCC tenha sido pelo efeito placebo do tratamento. Existem evidências na literatura que 5 dias de tratamento com estimulação magnética transcraniana repetitiva (EMTr) ocorre mudanças em vias de sinalização de BDNF/TrkB promovendo aumento de linfócitos (WANG et al., 2011). Assim, os receptores tropomiosina ligada a quinase-B (TrkB) estão presentes em linfócitos, e ativação deste receptor por BDNF promove maturação do sistema imunológico, bem como desenvolvimento, manutenção e sobrevivências de linfócitos (SCHUHMANN et al., 2005). Em outro estudo sugerem que indução de plasticidade por meio de estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) (LASTE et al., 2012) ligado a dor inflamatória são mediadas por efeito regulatório de BDNF relacionado ao sistema imunológico (DONZIS e TRONSON, 2014).

Em contrapartida, existem estudos demonstrando que os níveis de BDNF em córtex pré-frontal não apresentam diferença significativa estatisticamente quando tratados com ETCC (FILHO et al., 2016). Desta forma, em nosso estudo não foi possível observar diferença significativa do BDNF no hipocampo, córtex pré-frontal, na comparação entre os grupos controle (controle total, controle sham-ETCC, controle ETCC) com grupo CFA (CFA total, CFA sham-ETCC, CFA ETCC) possivelmente pelo BDNF apresentar polimorfismo. O polimorfismo consiste na substituição de valina por metionina no códon 66, afetando a sequência de polipeptídeo importante para tradução de BDNF. Assim, a diminuição de BDNF por meio de tratamento com ETCC, em estruturas envolvidas no processo de dor, está associada possivelmente pela modulação do polimorfismo de BDNF (Vall66Met) (CHEN et al., 2006). Portanto, o tratamento com ETCC induz mudanças neuronais centrais, em vias de sinalizações onde promovem diminuição de dor inflamatória.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo indica que a estimulação transcraniana por corrente contínua possivelmente provoca alterações comportamentais induzidas pelo modelo de dor inflamatória. Em contraste, não foi possível observar mudanças na avaliação de parâmetros bioquímicos para BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo. Porém, em níveis séricos foi apresentada a redução deste marcador. Assim, torna-se necessário mais estudos com marcadores na modulação do efeito da ETCC na dor crônica inflamatória.

8. REFERÊNCIAS

1. ASIEDU, M.N. et al. Spinal protein kinase M ζ underlies the maintenance mechanism of persistent nociceptive sensitization. **Journal Neuroscience**, Tucson, n. 18, p. 6646- 53, 2011.
2. BOYCE, V.S.; MENDELL, L.M. Neurotrophins and spinal circuit function. **Frontiers in neural circuits**, Texas, n. 59, p. 1-7, 2014.
3. CIOATO, S.G et al. Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the reversal of hyperalgesia and cytokine alterations induced by the neuropathic pain model. **BrainStimulation**, PortoAlegre, n. 2015, p. 1-9, 2015.
4. CHEN, Z-Y. et al. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphis alters anxiety-related behavior. **Science**, NovaYork, n.314, p. 140-143, 2006.
5. DA SILVA, A. F. et al. Electrode Position ingand Montage in Transcranial Direct Current Stimulation. **Journal of Visualized Experiments**, NovaYork, n.51, p.1-11, 2011.
6. DELL' OSSO, L. et al. The inflammatory hypothesis of mood spectrum broadened to fibromyalgia and chron ic fatigue sundrome. **Clin Exp Rheumatology**, Itália, n. 88, p. 109-116, 2015.
7. DEVOR, M. Centralization, central sensitization and neuropathic pain. Focus on "sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons". **Journal of Neurophysiology**, Jerusalém, n. 2, p. 522-523, 2006.
8. DIMOV, L.F. et al.Top-Down Effect of Direct Current Stimulation on the Nociceptive Response of Rats. **Plos One**, São Paulo, n. 4, p. 1-15, 2016.
9. DONZIS, E.J.; TRONSON, N. C. Modulation of learning and memory by cytokines: signaling mechanisms and long term consequences. **Neurobiol Learn Mem**, Michigan, n.0, p.68–77, 2014.
10. EGAN, M.F. et al. BDNF Val66Met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. **Cell**, Japão, n.112, p.257-269, 2003.
11. EMIR, B. et al. Electronic medical record data to identify variables associated with a fibromyalgia diagnosis: importance of health care resource utilization. **Journal of Pain Research**, Los Angeles, n. 8, p. 277-288, 2015.
12. FITZGERALD, M. The Development of Nociceptive Circuits. **Nature**, London, n. 1701, p. 507-520, 2005.
13. FILHO, P.R.M. et al. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavior alterations and brain stem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long lasting effect. **Progress in Neuro-Psychopharmacology e Biological Psychiatry**, Porto Alegre, n. 2016, p44-51, 2015.
14. FOSTER, A.M. et al. Reduction of chronic abdominal pain in patients with inflammatory bowel disease through transcranial direct current stimulation: a randomized controlled trial. **Journal of Immunology**, Michigan, n. 12, p. 6053-61, 2014.

15. FRANÇOIS, A.; LAFFRAY, S.; PIZZOCCARO, A.T. Type calcium channels in chronic pain: mouse models and specific blockers. **European Journal Physiol**, França, n.466, p. 707-717, 2014.
16. HOGAN, Q.H. et al. Contribution of calcium channel subtypes to the intracellular calcium signal in sensory neurons: the effect of injury. **Anesthesiology**, Graz, n. 1, p. 117-127, 2007.
17. HUANG, E.J; REICHARDT, L.F. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. **Annu Rev Neurosci**, California, n. 24, p. 677-736, 2001.
18. LAPLANTE, M.; SABATINI, D.M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, Cambridge, n. 2, p. 274-293, 2013.
19. LASTE, G. et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. **Exp Brain Res**, Porto Alegre, n.221, p. 75-83, 2012.
20. LIPSKY, R.H.; MARINI, A.M. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neuronal Survival and Behavior-Related Plasticity. **Academy of Sciences**, New York, n.1122, p.130-143, 2007.
21. MAIXNER, D.W. et al. Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase Regulates Interleukin-1 β Expression and Glial Glutamate Transporter Function in Rodents with Neuropathic Pain. **Anesthesiology**, Wuhan, n. 6, p. 1401-13, 2015.
22. MANCHIKANTI, L. et al. Comprehensive Review of Epidemiology, Scope, and Impact of Spinal Pain. **Pain Physician**, Boston, n. 12, p. E35-70, 2009.
23. MEDEIROS, L.F. et al. Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: a review. **Frontiers In Psychiatry**, Porto Alegre, n. 110, p. 1-11, 2012.
24. MELEMEDJIAN, O.K. et al. IL-6 and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the EIF4F complex. **Journal Neuroscience**, Tucson, n. 45, p. 113-123, 2013.
25. MIZOKAMI, S.S. et al. Pimaradienoic Acid Inhibits Carrageenan-Induced Inflammatory Leukocyte Recruitment and Edema in Mice: Inhibition of Oxidative Stress, Nitric Oxide and Cytokine Production. **PlosOne**, Londrina, n. 2, p. 1-17, 2016.
26. MONTE-SILVA, K. et al. Dosage-dependent non-linear effect of L-dopa on human motor cortex plasticity. **Journal Physiological**, Brasil, n. 18, p. 3415-3424, 2009.
27. NITSCHKE, M.A. et al. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. **Journal Physiological**, Germany, n. 1, p. 293-301, 2003.
28. NITSCHKE, M.A. et al. D1-Receptor Impact on Neuroplasticity in Humans. **The Journal of Neuroscience**, Germany, n. 8, p.2648-2653, 2009.
29. PRICE, T.J.; INYANG, K.E. Commonalities between pain and memory mechanisms and their meaning for understanding chronic pain. **Prog Mol Biol Transl Sci**, Texas, n.131, p. 409-434, 2015.

30. PURI, R. et al. Duration-dependent effects of the BDNF Val66Met polymorphism on anodal tDCS induced motor cortex plasticity in older adults: a group and individual perspective. **Frontiers**, Russia, n. 107, p. 1-10, 2015.
31. RUSCHEWEYH, R. et al. Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy. **Molecular Pain**, Austria, n. 7, p. 1-37, 2011.
32. SACKTOR, T.C. How does PKM θ maintain long-term memory?. **Nature Reviews Neuroscience**, Nova lorque, n. 1, p. 9-15, 2011.
33. SCHUNMANN, B. et al. A role for brain derived neurotrophic factor in B cell development. **J Neuroimmunol**, n. 163, p.15-23, 2005.
34. SMITH, E.D. et al. Rapamycin and Interleukin-1 β impair Brain-derived Neurotrophic Factor-dependent Neuron Survival by modulating autophagy. **JBiolChem**, n. 30, p. 20615-29, 2014.
35. STAUD, R. Cytokine and Immune System abnormalities in Fibromyalgia and other Central Sensitivity Syndromes. **Curr Rheumatol Rev**, Gainesville, n. 2, p. 109- 115, 2015.
36. TAKEI, N.; NAWA, H. TOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. **Molecular Neuroscience**, Japan, n. 28, p. 1-12, 2014.
37. TODD, A.J. et al. Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance p-containing afferents and respond to noxious stimulation. **The Journal of Neuroscience**, Glasgow, n. 10, p. 4103-13, 2002.
38. VALLEJO, R. et al. The Role of Glia and the Immune System in the Development and Maintenance of Neuropathic Pain. **Pain Practice**, Estados Unidos, n.3, p.167-184, 2010.
39. VOLZ, M.S. et al. Reduction of chronic abdominal pain in patients with inflammatory bowel disease through transcranial direct current stimulation: a randomized controlled trial. **Pain**, Berlin, n. 2, p. 429-437, 2016.
40. VOSCOPOULOS, C; LEMA, M. When does acute pain become chronic?. **British Journal of Anaesthesia**, Nova lorque, n. 105, p. i69–i85, 2010.
41. VOSSSEN, H. et al. The Genetic Influence on the Cortical Processing of Experimental Pain and the Moderating Effect of Pain Status. **Plos ONE**, Germany, n.10, p.1-6, 2010.
42. WANG, H.Y. et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation enhances BDNF-TrkB signaling in both brain and lymphocyte. **J Neuroscience**, n. 30, p. 11044-11054, 2011.
43. WANG, S.M. et al. Fibromyalgia diagnosis: a review of the past, present and future. **Expert Review of neuro therapeutics**, n. 6, p. 667-679, 2015.
44. ZHUANG, G.Z. et al. Carbonic Anhydrase-8 Regulates Inflammatory Pain by Inhibiting the ITPR1- Cytosolic Free Calcium Pathway. **Plos ONE**, Estados Unidos, n.3, p. 1-24, 2015.

Manuscript Number:

Title: Evidence of Anti-inflammatory effect of Transcranial Direct Current Stimulation in a Chronic Inflammatory Pain model induced by CFA in Wistar rats

Article Type: Research paper

Section/Category: Systems Neuroscience and Behavior

Keywords: inflammatory pain model; CFA; tDCS; BDNF; IL-6; IL10.

Corresponding Author: Dr. Izabel Cristina Custodio de Souza, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Pelotas

First Author: Liciane Medeiros, PhD

Order of Authors: Liciane Medeiros, PhD; Sabrina Pereira Silva, Ms; Otavio Garcia Martins, Graduation; Priscila Centeno Crespo, Ms; Carlus Augustu Tavares do Couto, Ms; Amanda Morástico, Graduation; Joice Soares de Freitas, Ms; Andressa de Souza, Dr; Paulo Roberto Sanches Stefan, Dr; Wolnei Caumo, Dr; Giovana Duzzo Gamaro, Dr; Iraci Lucena da Silva Torres, Dr; Izabel Cristina Custodio de Souza, PhD

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Chronic inflammatory pain is a high prevalence condition around the world for this reason, it is important to study new techniques that can use to treat or relief pain in chronic inflammatory conditions. In the present study was evaluate the effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) in rats submitted to a chronic inflammatory model, indexed by nociceptive response, biomarkers levels (BDNF and IL-6 and IL-10), and histological parameters in the paw edema. tDCS effects showed a complete reversion of this response 24h and 8 days after last session in the Von Frey test (mechanical nociceptive test). However, in the hot plate (nociceptive termal test), a partial pain reversion ocurred in all timepoints assessed after the end of tDCS treatment. The serum BDNF levels decreased in groups that received CFA (CFA + sham-tDCS and CFA + tDCS) compared to control groups. The control group submitted to tDCS presented an increase in the serum IL-6 levels in relation to other all groups. In addition, there was a significant decrease of IL-10 striatum levels in control + tDCS, CFA and CFA + sham-tDCS in relation to control group. The histology of paw edema showed tDCS effects in decreasing on lymphocytic infiltration followed by neovascularization and tissue regeneration.in the animals exposure to CFA, a The tDCS treatment was able to decrease mechanical pain threshold and inflammatory parameters in a chronic inflammatory pain model. Thus, we can propose that the analgesic tDCS mechanisms may be related to tissue repair by modulation of inflammatory process

Pelotas, December 14th, 2016.

Editor in Chief

Matthew J. LaVoie
Brain Research

Dear Editor,

We are sending you the manuscript “**Evidence of Anti-inflammatory effect of Transcranial Direct Current Stimulation in a Chronic Inflammatory Pain model induced by CFA in Wistar rats**”, by Medeiros LM, Silva SP and colleagues to be submitted for publication in Brain Research (ISSN: 0006-8993).

The protocol was approved by the Research Ethics Committee at the Universidade Federal de Pelotas (UFPel)/ Rio Grande do Sul/Brasil (Nº.#4538, Medeiros is a Postgraduate Research in the Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation/ Pharmacology Department of Universidade Federal do Rio Grande do Sul. This manuscript has not and will not be published in whole or in part in any other journal. The authors declare that are no conflicts of interest.

I will await your guidance on the manuscript.

Sincerely,

Izabel Cristina Custodio de Souza, PhD
Professor and Research in Universidade Federal de Pelotas
Biology Institute / Department of Morphology
250 Duque de Caxias Av. Pelotas, RS 96030000
Phone: 55 53 3221-1044

HIGHLIGHTS

- The transcranial direct current stimulation (tDCS) relief pain in chronic inflammatory conditions.
- tDCS modulates inflammatory process triggering tissue repair.
- tDCS modulates central IL-10 and peripheral IL-6 levels.
- The striatum is modulated by tDCS in chronic inflammatory pain.
- Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines can be modulated by tDCS.

1. Alexandre da Silva Quevedo

E-mail: quevedoalexandre@hotmail.com

Professor and Research of Department of Surgery and Orthopedics, Faculty of Dentistry

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Specialist in Modulation of pain perception by peripheral or central mechanisms

2. Adair Roberto Soares dos Santos

E-mail: adair.santos@ufsc.br

Laboratory of Physiological Sciences of Universidade Federal de Santa Catarina

Specialist in Neurobiology of pain and inflammation

3. André Russowsky Brunoni

E-mail: brunoni@usp.br

Department and Institute of Psychiatry/ Laboratory of Neuroscience of Universidade de São

Paulo

Specialist in tDCS and Neuroscience

**Evidence of Anti-inflammatory effect of Transcranial Direct Current Stimulation
in a Chronic Inflammatory Pain model induced by CFA in Wistar rats**

Liciane Fernandes Medeiros^{1#}, Sabrina Pereira Silva^{2,3#}, Otavio Garcia Martins², Priscila Centeno Crespo^{2,3}, Carlus Augustu Tavares do Couto^{3,2}, Joice Soares de Freitas¹, Andressa de Souza¹, Paulo Roberto Sanches Stefani⁴, Wolnei Caumo⁵, Giovana Duzzo Gamaro^{2,3}, Iraci Lucena da Silva Torres^{1,5}, Izabel Cristina Custodio de Souza^{*2,3}

¹Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Preclinical Researches, Pharmacology Department, Health Basic Sciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90050-170, Brazil.

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

³Postgraduate Program in Bioprospecting and Biochemistry, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil.

⁴Biomedical Engineering of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

⁵Postgraduate Program in Medicine - Medical Sciences – Medicine School - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil.

both are first authors

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:

Izabel Cristina Custódio de Souza

Professor – Universidade Federal de Pelotas

Biology Institute / Department of Morphology

250 Duque de Caxias Av. - Pelotas, RS 96030000

Phone: 55 53 3221-1044

Email: izabel.souza@ufpel.edu.br

ABSTRACT

Chronic inflammatory pain is a high prevalence condition around the world for this reason, it is important to study new techniques that can use to treat or relief pain in chronic inflammatory conditions. In the present study was evaluate the effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) in rats submitted to a chronic inflammatory model, indexed by nociceptive response, biomarkers levels (BDNF and IL-6 and IL-10), and histological parameters in the paw edema. tDCS effects showed a complete reversion of this response 24h and 8 days after last session in the Von Frey test (mechanical nociceptive test). However, in the hot plate (nociceptive termal test), a partial pain reversion occurred in all timepoints assessed after the end of tDCS treatment. The serum BDNF levels decreased in groups that received CFA (CFA + sham-tDCS and CFA + tDCS) compared to control groups. The control group submitted to tDCS presented an increase in the serum IL-6 levels in relation to other all groups. In addition, there was a significant decrease of IL-10 striatum levels in control + tDCS, CFA and CFA + sham-tDCS in relation to control group. The histology of paw edema showed tDCS effects in decreasing on lymphocytic infiltration followed by neovascularization and tissue regeneration.in the animals exposure to CFA, a The tDCS treatment was able to decrease mechanical pain threshold and inflammatory parameters in a chronic inflammatory pain model. Thus, we can propose that the analgesic tDCS mechanisms may be related to tissue repair by modulation of inflammatory process

KEYWORDS: inflammatory pain model, CFA, tDCS, thermal hyperalgesia, mechanical allodynia, BDNF, IL-6, IL10.

Complete Freund's Adjuvant (CFA), Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS), Brain-Derived Factor (BDNF), Interleukins-6 (IL-6), Interleukins-10 (IL-10)

1. INTRODUCTION

Chronic inflammatory pain is a significant prevalence condition around the world (Bert et al., 2016; Karabis et al., 2016; Wodarski et al., 2016). This is related to several conditions and diseases, for example cancers, atherosclerosis, pain dysfunction syndrome, arthritis, and traumas. Chronic inflammatory process is a result of a complex response of the organism involved of some cells and mediator kind. For example, tumor necrosis factor (TNF- α), interleukins, as IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, and IL-10, and growth and neurotrophic factors, as neurotrophic growth factor (NGF) and brain-derived factor (BDNF), respectively (Honorati et al., 2006; Moalem and Tracey, 2006; Zhu and Paul, 2011; Zhu et al., 2015).

The traditional anti-inflammatory and analgesics treatments available for chronic pain conditions are related to side effects. Previous studies from our research group showed the antinociceptive effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) in rats pain conditions, like hyperalgesia induced by chronic stress (Spezia Adachi et al., 2012), and neuropathy induced by chronic constriction injury (CCI)(Cioato et al., 2016). Interestingly, we showed that tDCS could be a promising technique to treat pain associated with inflammatory conditions with short and medium-lasting effects (Laste et al., 2012). The tDCS analgesic effect observed in neurophatic pain model in rats was associate to a reduction of IL-1 β and IL-10 levels in the spinal cord (Cioato et al., 2016). In addition, we showed the hyperalgesia induced by chronic stress reversion and decrease of hippocampal TNF α levels by tDCS treatment (Spezia Adachi et al., 2012), no alteration in central levels of BDNF (Spezia et al., 2015). On the other hand, a recent study using naïve rats showed that tDCS did not affect the thermal nociceptive threshold. However, it increased the mechanical nociceptive threshold of both hind

paws (Dimov et al., 2016), suggesting that the tDCS effect depends of the basal state of the rats and the modulation of different pathways.

The mechanism of tDCS is not fully understood. A recent study showed that tDCS reduces chronic abdominal pain in patients with inflammatory bowel disease; however, without changes in the inflammatory markers and disease activity (M.S. and A., 2016). In contrast, Rueger and colleagues (2012) showed that repeated tDCS is capable to elicit inflammatory and regenerative processes in rat brain, linked to upregulation of Iba1-positive activated microglia after both cathodal and anodal tDCS, and cathodal tDCS increased number of endogenous neural stem cells (NSC) in the cortex. In addition, studies in vitro using direct current electric fields (DCEFs) has been demonstrated effects on the inflammatory response, for example, inducing acceleration and polarization in the migration of several types of peripheral immune cells, including lymphocytes, monocytes, neutrophils, macrophages, and polymorphonuclear cells (Pelletier et al., 2015).

Cytokines are often released in cascade, starting by TNF followed primarily by IL-1 and IL-6. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine, selectively suppresses the synthesis and release of proinflammatory cytokines, upregulates the production of other anti-inflammatory substances, and downregulates the expression of proinflammatory cytokine receptors (Wieseler-Frank et al., 2005).

Thus, considering the relevance of issue, the main objective of the present study was to evaluate the effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) in rats submitted to a chronic inflammatory model, indexed by nociceptive response, central and peripheral biomarkers levels (BDNF and interleukins IL-6 and IL-10), and histological parameter in the paw edema.

2. RESULTS

Mechanical allodynia - Von Frey Test

We observed an important reduction in the paw withdrawal threshold at 7 days after CFA injection, showing the establishment of the inflammatory model where the rats presented mechanical allodynia (Student t test, $P < 0.05$, Figure 2A).

In the test of mechanical allodynia by electronic Von Frey test, it was observed interaction group X time (Wald $\chi^2 = 1;18$), $P < 0.05$, $n = 5$ per group, Figure 2B). The inflammatory pain model was able to induce hypersensitive response 7 days after the CFA administration and this behavior remained for up to fifteen days after CFA. On the other hand, the tDCS was able to increase the paw withdrawal threshold immediately after the last session, and it showed a total reversion of the hypernociceptive behavior 24h and 8 days after the last session of tDCS.

Thermal hyperalgesia - Hot plate test

We observed an important reduction in the paw withdrawal threshold at 7 days after CFA injection, showing the establishment of the inflammatory model where the rats presented thermal hyperalgesia (Student t test, $P < 0.05$, Figure 3A).

In the hot plate test, it was observed interaction treatment X time (Wald $\chi^2 = 6.04;27$), $P < 0.05$, $n = 4$ per group, Figure 3B), the animals exposed to inflammatory pain showed decreased latency withdrawal 7 days after CFA injection and this behavior remained for up to fifteen days after CFA. On the other hand, the tDCS was able to increase the paw withdrawal threshold immediately, 24hs and 8 days after the last session of tDCS, however it was only a partially reversion of the hypernociceptive behavior.

BDNF levels

In pre-frontal cortex and hippocampus there was no significant difference between groups in the the BDNF levels (one-way ANOVA, $P > 0.05$; $n = 5-6$). However, we found a decreased serum BDNF levels in the CFA + sham-tDCS and CFA + tDCS groups in relation to control + tDCS (one way ANOVA/SNK, $P < 0.05$; $n= 5-6$, Figure 4).

IL-6 levels

In prefrontal cortex and striatum there was not significant difference between groups in the IL-6 levels (one way ANOVA, $P > 0.05$, $F(5,17)=1.357$ and 1.045 , respectively, $n=3-4$). However, the control + tDCS group presented increased serum IL-6 levels in relation to other groups (one way ANOVA/SNK, $P < 0.05$, $F(5,28)=3.391$, $n=3-4$, Figure 5).

IL-10 levels

We observed a significant difference between groups in the IL-10 striatum levels (one way ANOVA/SNK, $P < 0.05$, $F(5,17)=3.161$, $n = 3-4$), where the control + tDCS, CFA and CFA+sham-tDCS presented lower levels of IL-10 in relation to control group. It is important to highlight that the CFA+tDCS group returned to control level, demonstrating tDCS effect. We did not find any alterations in the IL-10 levels in serum and prefrontal cortex between groups (one way ANOVA, $P > 0.05$, $F(5,28)=2.176$ and $F(5,17)=1.828$, $n=3-4$, Figure 6).

Histological analysis

Analyses were performed with tissue fragments of the plantar region obtained from animal groups: total control, control + sham-tDCS, control + tDCS, total CFA, CFA + sham-tDCS, CFA + tDCS. The animals CFA group showed inflammatory characteristics as well increase paw volume, lymphocytic infiltration and increase vascularization. The after tDCS treatment, the inflammatory characteristics was reversed partially. For histological analysis, we used Image-J software to compare the degree of inflammation (Figure 7 and 8).

3. DISCUSSION

This study demonstrates that tDCS is an effective technique to relief pain in a rat model of chronic inflammatory pain induced by CFA corroborating data of previous study of group (Laste et al., 2012). tDCS treatment reverts completely the mechanical allodynia and partially, the thermal hyperalgesia induced by inflammatory chronic pain. It is important to highlight that the tDCS effect induces a long-lasting analgesic effect, at least, 8 days after last tDCS session in a chronic inflammatory process. In this study, there was not a relationship between the analgesic effect of tDCS and BDNF and IL-6 central or peripheral levels. However, we showed that the inflammatory pain groups presented a decrease in the IL-10 striatum levels, and that this effect was reverted by tDCS treatment returning to control group levels. Associated to this, we observed an anti-inflammatory tDCS effect upon histological analysis of hind paw of rats submitted to chronic inflammation by CFA. Immediately and 24 hours after tDCS treatment there was partial reversal of paw edema, until 8 days. We observed that immediately after tDCS treatment there was a decrease in lymphocytic infiltration and tissue repair in paw

edema. These results indicate the involvement of the tDCS in the inflammatory process. Pre-clinical and clinical studies have described the analgesic effect of tDCS (Cioato et al., 2016; Laste et al., 2012; M.S. and A., 2016; Spezia Adachi et al., 2012), and some authors suggest that the action mechanism can be involved with a top-down modulation and involvement of structures that are linked directly to pain modulation (Ayache et al., 2016; Dimov et al., 2016; Knotkova et al., 2013; M.S. and A., 2016), or not directly linked to, as prefrontal cortex (Valle et al., 2009). It is known that anodal stimulation promotes depolarization while cathodal stimulation, hyperpolarization (Brunoni et al., 2013); in our study both electrodes were positioned in the scalp, thus we consider a bicephalic stimulation. Our previous study described analgesic effect of tDCS in a neuropathic pain model using the bicephalic electrodes montage (Cioato et al., 2016). The exactly action mechanism of tDCS is not known; however, it has been suggested that its actions are directly related to polarity of electrodes and application site or somatotopic effect. Considering that bicephalic stimulation was used in the present study, both anodal and cathodal polarity can contribute to analgesia, and its effects are widespread into deep regions of brain, such as thalamus and striatum (Polanía et al., 2012). tDCS anodal stimulation applied upon primary motor cortex (M1) or dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) promotes pain relief (Valle et al., 2009); while tDCS cathodal stimulation over somatosensory cortex reduced experimentally-induced pain (Antal et al., 2010). In our study, we observed a total reversion of mechanical allodynia and partial reversion of thermal hyperalgesia.

Recently, data of our group showed that bicephalic tDCS promotes antinoceptive behavior in neuropathic pain and modulates specific cytokine levels (IL-1 β , IL-10 and TNF- α). Bicephalic tDCS reduces IL-1 β and IL-10 levels in spinal cord but not in cerebral cortex in rats submitted to neuropathic pain (Cioato et al., 2016). tDCS

stimulation reverses hyperalgesia and allodynia induced by chronic stress model associate to decrease in the TNF- α levels in hippocampus and no alterations in serum IL-1 β levels (Spezia Adachi et al., 2012). In addition, we showed that tDCS induces a long-lasting effect on chronic pain in a model of peripheral inflammation in rats (Laste et al., 2012). In the present study, we observed a possible relationship between the analgesic tDCS effect and decrease of the striatum IL-10 levels in the groups submitted to chronic inflammation model, and this effect was reverted by tDCS treatment. On the other hand, we showed that the control group submitted to tDCS treatment presented striatum IL-10 levels similar to CFA groups (total and sham-tDCS). This result suggested that the tDCS effects occur according to basal state of animal, since tDCS treatment induced opposite results in the naïve and CFA groups. This data corroborate our previous data that describes decrease in the BDNF levels (spinal cord and brainstem) in naive animals submitted to tDCS treatment (Spezia et al., 2015).

It is important highlight that cytokines present a pleiotropic action, since they exert antagonistic or synergistic actions in the inflammatory process. In addition, one cytokine may increase or decrease the production of another cytokine. Therefore, different cytokines when active simultaneously can induce qualitatively different responses in target cells. In some cases overlaps (Yiu et al., 2012). IL-10 is an anti-inflammatory cytokine released by immune and glia cells during inflammation process (Moore et al., 2001). Furthermore, the neuroprotective IL-10 effect, it does not depend on the inflammatory microglial responses (Zhou et al., 2010; Zhu et al., 2015). Cytokines play new functions and consequently influence regulatory pathways and metabolic homeostasis, which difficult in the understanding of their regulation.

The tissue damage persistent can induce to a process of tissue necrosis leading to the simultaneous repair with involvement of the immune system (Sonnenberg; and

Artis, 2009). In this study, we observed histologically a tissue repair following treatment with tDCS overlying the lymphoid cells. The migration of leukocytes from blood vessels injured tissue and secreting inflammatory cytokines that enhance or inhibit the inflammatory response. Several cytokines act in the inflammatory process activating macrophages, endothelial cells and tissue, for example, INF- γ , TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10 (Pestka et al., 2004; Zhou et al., 2016). In addition, cytokines respond quickly to extracellular signals possibly by adaptive immunity (Sonnenberg; and Artis, 2009).

In the present study, we showed a decrease in the IL-10 central levels induced by inflammation. It is important highlight that the IL-10 receptors when activated, in response to innate immune cells, inhibits the release of many inflammatory cytokines such as TNF, IL-6, and others (Kwilasz et al., 2015). It is known that external signals regulate the expression of cytokine receptors; however, it little is known about the family of immune cells, as well innate and specific interaction with other cell types with regard to favoring and resolving the inflammatory process (Sonnenberg; and Artis, 2009). The complexity of stimuli could signal through a few intracellular pathways to generate multiple and specific cellular responses, but there are many synthetic target modulators and their effects on the processes both in vitro and in vivo (Braun et al., 2013; Rigamonti et al., 2014).

Our surveys show that IL-10 levels decrease in striatum whereas IL-6 levels increase in serum in the tDCS-control group. These responses to tDCS treatment can be associated with inhibition of glial cells in the central systems inactivating IL-6 receptors. Physiologically, IL-6 has a paracrine action, because when IL-6 levels are very high and they exceed sIL-6R levels in the bloodstream, the IL-6 systemic activity and the trans-signaling of this cytokine respond to stress to homeostasis imbalances. IL-

6 acts by two different pathways, one involving membrane binding and the other with soluble IL-6R (Schaper and Rose-John, 2015; Zhou et al., 2016). Many immune cell types stimulate one of this way to mediate tissue remodeling and repair, through either direct cell-to-cell contact or the secretion of soluble factors (Braun et al., 2013; Schaper and Rose-John, 2015; Scheller et al., 2011). Signaling of the same molecule may paradoxically exhibit pro-and anti-inflammatory properties such as IL-6 and IL-10. These cell responses suggest that IL-10 by the short activation of STAT3 responds as IL-6. Both IL-6 and IL-10 are encoded from the transient activation of STAT3 with pro and anti-inflammatory responses (Braun et al., 2013; Kwilasz et al., 2015; Scheller et al., 2011).

We note clearly the reduction of lymphocyte infiltration, neovascularization and tissue repair in histological analyzes in the animals' paw, but it is not clear the mechanism that explains this effect. In another study paw edema did not respond to transcutaneous electrical stimulation (TENS) varying frequencies in 130 and 10 Hz with 130 μ s pulse duration for 20 min applied to the local edema in single day but effective for inflammatory pain relief (Resende et al., 2004). This study showing that endogenous opioids on TENS- induced analgesia in low but not high frequency (Resende et al., 2004). Recent study describes that vagus nerve stimulation inhibits peripheral blood production of TNF, IL-1 β , and IL-6 in epilepsy patients and TNF production for up to 84 days in rheumatoid arthritis patients (Koopman et al., 2016). Evidences of anti-inflammatory effect of tDCS is scarce; however in vitro and in vivo assays suggest that according to direction and intensity of electric field, pro-inflammatory or anti-inflammatory effects may be involved in tDCS actions (Pelletier et al., 2015)

Considering the increase of IL-6 in peripheral plasma levels and decrease of IL-10 in striatum, we hypothesized that IL-6 is involved not only in the activation of the

immune system as well as regenerative processes in paw edema and the maintenance homeostasis. In addition, IL-10 can be associated to decrease in the central activation of microglia/macrophages. We can suggest that the release of inflammatory mediators may contribute to the anti-inflammatory tDCS effect observed in the animals submitted chronic inflammatory pain model.

One interesting finding of present study was the decrease of BDNF serum levels in the CFA groups in relation to control+tDCS. BDNF appears to increase in situations of inflammation (Correa et al., 2014; Grimsholm et al., 2008; Simão et al., 2014), but in our study, we did not able shown it. In according of our study, a study showed a decrease in the BDNF and IL-10 serum levels of patients with Steinert Myotonic Dystrophy, and an increase of IL-1 β serum levels. Thus, this neurotrophin can bridge the inflammatory process (Calabrese et al., 2014), and our study point to the possibility that the inflammatory parameters evaluated can be modulated by peripheral BDNF levels.

In summary, our findings show that tDCS is effective to promote analgesia and short- and medium-term in rats with chronic inflammatory pain process induced by CFA. Additionally, an important local anti-inflammatory effect was indexed by reduced lymphocytic infiltration, neovascularization and presence of tissue repair. Despite the exactly mechanism of tDCS is not well characterized, we can hypothesized that it could involve, at least in part, with the central levels of IL-10, as well as peripheral IL-6. In addition, the tDCS treatment was able to revert mechanical pain and to decrease inflammatory parameter in a chronic inflammatory pain model. Thus, we can propose that the analgesic tDCS mechanisms may be related to tissue repair by modulation of inflammatory process (Figure 8). However, further studies are necessary to increase knowledge in action mechanism of tDCS in different pain conditions.

4. EXPERIMENTAL PROCEDURE

Animals

Sixty-day old male Wistar rats weighing 250–300 g were used in this study. The animals (N = 54) were randomized by weight, and four animals per home were housed in cages made of polypropylene material (49 x 34 x 16 cm) with the floor covered with sawdust. All of the animals were maintained in a controlled environment ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), under a standard light-dark cycle (lights-on at 07:00 h and lights-off at 19:00 h) with water and chow provided ad libitum. All experiments and procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use (UFPEL #4538) and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 8th ed. 2011. The maintenance of the animals followed law 11.794 (Brazil), which establishes procedures for the scientific use of animals. The experimental protocol complied with the ethical and methodological standards of the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010). The experiment used the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

Experimental groups and design

The animals were randomized into six groups: total control, control + sham-tDCS, control +active tDCS, CFA total, CFA + sham-tDCS and CFA + active tDCS. All animals were acclimated in the experimental environment for one week to avoid analgesia induced by novelty. After the establishment of inflammatory pain, the animals were submitted to treatment protocol for 8 consecutively days, according to the experimental group. The nociceptive tests (Von Frey and Hot Plate) were assessed in: baseline, 7 days after CFA injection, and immediately, 24h and 8 days after the end of

tDCS treatment. Rats were killed by decapitation at 8 days after the end of tDCS treatment, and the blood serum and central nervous structures were collected (Figure 1).

Chronic inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant (CFA)

An inflammatory process in animal models was performed by Complete Freund's Adjuvant (CFA) inducing nociceptive process, with a consequent reduction in the threshold of perception of painful stimuli (5). Complete Freund's Adjuvant (CFA) induces chronic inflammatory process in rats linked directly to the amount of CFA injected and site of injection (Laste et al., 2012). Initially, the rats were anesthetized with isoflurane (5% for induction, 2.5% for maintenance). After, chronic inflammation was induced by intradermal administration into the right posterior paw of 0.1mL of CFA (Sigma St Louis) (Mycobacterium tuberculosis). Sham animals received 100µL of a 0.9% saline solution, these doses were based on previous reports. The establishment of inflammatory pain was considered 7 days after CFA injection, when the animals presented reduced pain threshold in both nociceptive tests.

tDCS treatment

After the establishment of inflammatory pain, the animals in the active treatment groups underwent a 20-minute session of bicephalic tDCS for eight days, as described by Cioato et al., 2016 (Cioato et al., 2016). A constant direct current of 0.5 mA was delivered from a battery-powered stimulator using electrocardiogram electrodes with conductive adhesive hydrogel. The rats' heads were shaved for firmer adherence and the electrodes were trimmed to 1.5 cm² for better fit. The electrodes were fixed to the head

with adhesive tape (Micropore™) and covered with a protective mesh to prevent removal.

The cathode was positioned at the midpoint between the lateral angles of both eyes (supraorbital area) and the anode was placed on the head using landmarks of the neck and shoulder lines as a guide (the anterior and posterior regions in the midline between the two hemispheres of the parietal cortex, as described by Takano et al. (2011) (Takano et al., 2011). For sham stimulation, the electrodes were placed and fixed in the same position as for actual stimulation; however, the stimulator remained in the “off” position throughout the procedure.

Von Frey Test

Mechanical hyperalgesia was assessed at baseline, 7 days after CFA injection, as well as immediately, 24 hours, and 8 days after the last tDCS session using an automatic von Frey aesthesiometer (Insight, São Paulo, Brazil) according with described by Cioato and colleagues (Cioato et al., 2016). The rats were placed in 12×20×17 cm polypropylene cages with wire grid flooring and habituated to that environment for 10 minutes, 24 hours prior to the test, to prevent the analgesia induced by the novelty of the apparatus (Netto et al., 1987).

For testing, a polypropylene tip was inserted perpendicularly from underneath the floor grid and applied to one of the five distal footpads of the rats at gradually increasing pressure. A tilted mirror below the grid provided a clear view of the animal's right hind paw. The test consisted of poking the hind paw to provoke a flexion reflex followed by a clear flinch response after paw withdrawal. The intensity of the stimulus was automatically recorded as the paw was withdrawn. Three successive von Frey readings were averaged and the interval between measures was at least 5 seconds. Those

averages were used as the final measurements and the paw withdrawal threshold was expressed in grams (g) (Vivancos et al., 2004).

Hot plate test

The hot plate (HP) test was carried out to confirm the effectiveness of neuropathic pain (NP) induction and to assess the effects of tDCS on the thermal nociceptive threshold (Woolfe and Macdonald, 1944). This test was conducted at baseline, 7 days after CFA injection, as well as immediately, 24 hours, and 8 days after the last tDCS session. We used the HP test to determine changes in latency as an indicator of modifications in the supraspinal pain process (Ossipov et al., 1995), such as licking or jumping responses, which result from supraspinal sensory integration (Caggiula et al., 1995; Rubinstein et al., 1996).

All rats were exposed to the HP for 5 minutes, 24 hours prior to testing in order to avoid the analgesia induced by the novelty of the apparatus (Netto et al., 1987). The surface of the HP was pre-heated and kept at a constant temperature of $50 \pm 0.1^\circ\text{C}$. The animals were placed inside glass funnels on the heated surface and the time in seconds between placement of the rat and the first response (foot-licking, jumping, or rapidly removing paws) was recorded as the latency of nociceptive response. The cut-off time was 20 seconds to prevent tissue damage. This methodology was described by Cioato and colleagues (Cioato et al., 2016).

Blood sampling and tissue collection

The animals were killed by decapitation 8 days after the end of tDCS treatment. Trunk blood was drawn, and blood samples were centrifuged in plastic tubes for 5 min at 10000 rpm at room temperature. The prefrontal cortex, striatum and hippocampus were collected and stored at -80°C for later analysis.

Biochemical assays

BDNF, IL-6, and IL-10 analyses were performed in brain structures using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for rats (BDNF – Millipore, - R&D Systems, Minneapolis, United States). The total protein was measured by Bradford's method using bovine serum albumin as the standard. The values were expressed in pg/mg of protein. The brain structures were homogenized with a hand-held homogenizer in 1:10 Tris-buffered saline and centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. The results were expressed as pg/mg of protein.

Histological analysis

After collection, the specimens were fixed in paraformol solution to 10% for a minimum period of three hours. Later, there was the chemical descaling procedure with HNO₃ 5% for 30 days, and change interval of 2 days' solution. Analyses were performed with tissue fragments of the plantar region obtained from animal groups: total control, control + sham-tDCS, control + tDCS, total CFA, CFA + sham-tDCS, CFA + tDCS. 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 (18 blades and 36 thickness of 5µm), 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. To compare the degree of inflammation of histological images was used Image-J software. The figures showed that had typical inflammatory characteristics, such as lymphocytic infiltrate and neovascularization were analyzed and compared between the CFA total and tDCS CFA groups.

Statistical analysis

A Generalized Estimating Equation (GEE) followed by Bonferroni was performed to analyze the behavioral measures. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls (SNK) was performed to compare the biochemical data of all of the 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 was used for the statistical analysis. Morphometrics studies were analyzed the same area, the tissue and cells. Each digital image has a color map, resulting in the representation of an array of pixels. Pixel analyzes were performed, the limited areas. We used Image-J software to compare inflammation and normal tissue.

Acknowledgements

Histology Laboratory /Department of Morphology /Biology Institute /
Universidade Federal de Pelotas (Eliane Freire Anthonisen, Luis Augusto Xavier Cruz
and Luis Otavio Lobo Centeno). National Council for Scientific and Technological
Development - CNPq (I.L.S. Torres, J.S. Freitas);

Funding

This research was supported by grants from following Brazilian agencies:
Committee for the Development of Higher Education Personnel – CAPES (L.F.
Medeiros); MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 (Izabel Cristina Custodio de Souza);
Biomedical Engineering Sector HCPA - MCT/FINEP – COENG/2013 (Paulo Roberto
Stefani Sanches).

REFERENCES

- 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
- Ayache, S.S., Palm, U., Chalah, M.A., Al-Ani, T., Brigno, A., Abdellaoui, M., Dimitri, D., Sorel, M., Créange, A., Lefaucheur, J.P., 2016. Prefrontal tDCS decreases pain in patients with multiple sclerosis. *Front. Neurosci.* 10, 1–12. doi:10.3389/fnins.2016.00147
- Bert, J., Mahowald, M.L., Frizelle, S., Dorman, C.W., Funkenbusch, S.C., Krug, H.E., 2016. The Effect of Treatment with Resiniferatoxin and Capsaicin on Dynamic Weight Bearing Measures and Evoked Pain Responses in a Chronic Inflammatory Arthritis Murine Model 124, 1–6. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.069633.Changes
- Braun, D., Fribourg, M., Sealfon, S., 2013. Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. *J. Biol. Chem.* 288, 2986–93. doi:10.1074/jbc.M112.386573
- Brunoni, A.R., Nitsche, M.A., Bolognini, N., Bikson, M., Wagner, T., Merabet, L., Edwards, D.J., Valero-Cabre, A., Rotenberg, A., Pascual-Leone, A., Ferrucci, R., Priori, A., Boggio, P.S., Fregni, F., Paulo, S., Nitsche, M.A., Bolognini, N., 2013. Clinical Research with Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS): Challenges and Future Directions. *Brain Stimul.* 5, 175–195. doi:10.1016/j.brs.2011.03.002.Clinical
- Caggiula, A.R., Epstein, L.H., Perkins, K.A., Saylor, S., 1995. Different methods of assessing nicotine-induced antinociception may engage different neural

- mechanisms. *Psychopharmacology* (Berl). 122, 301–306.
doi:10.1007/BF02246552
- Calabrese, F., Rossetti, A.C., Racagni, G., Gass, P., Riva, M.A., Molteni, R., 2014. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 430. doi:10.3389/fncel.2014.00430
- Cioato, S.G., Medeiros, L.F., Marques Filho, P.R., Vercelino, R., de Souza, A., Scarabelot, V.L., de Oliveira, C., Adachi, L.N.S., Fregni, F., Caumo, W., Torres, I.L.S., 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. doi:10.1016/j.brs.2015.12.001
- Correa, J.D., Pereira, D.S., Madeira, M.F.M., Queiroz-Junior, C.M., Souza, D.G., Teixeira, M.M., Costa, J.E., Teixeira, A.L., da Silva, T.A., 2014. Brain-derived neurotrophic factor in chronic periodontitis. *Mediators Inflamm.* 2014, 373765. doi:10.1155/2014/373765
- Dimov, L.F., Franciosi, A.C., Pinheiro Campos, A.C., Brunoni, A.R., Pagano, R.L., 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
- Grimsholm, O., Rantapää-Dahlqvist, S., Dalén, T., Forsgren, S., 2008. BDNF in RA: Downregulated in plasma following anti-TNF treatment but no correlation with inflammatory parameters. *Clin. Rheumatol.* 27, 1289–1297. doi:10.1007/s10067-008-0910-4
- Honorati, M.C., Neri, S., Cattini, L., Facchini, A., 2006. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthr. Cartil.* 14, 345–352. doi:10.1016/j.joca.2005.10.004
- Karabis, A., Nikolakopoulos, S., Pandhi, S., Papadimitropoulou, K., Nixon, R., Chaves,

- R.L., Moore, R.A., 2016. High correlation of VAS pain scores after 2 and 6 weeks of treatment with VAS pain scores at 12 weeks in randomised controlled trials in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: meta-analysis and implications. *Arthritis Res. Ther.* 18, 73. doi:10.1186/s13075-016-0972-7
- Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., 2010. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.* 8, e1000412.
- Knotkova, H., Portenoy, R.K., Cruciani, R.A., 2013. Transcranial direct current stimulation (tDCS) relieved itching in a patient with chronic neuropathic pain. *Clin. J. Pain* 29, 621–2.
- Koopman, F.A., Chavan, S.S., Miljko, S., Grazio, S., Sokolovic, S., Schuurman, P.R., Mehta, A.D., Levine, Y.A., Faltys, M., Zitnik, R., Tracey, K.J., Tak, P.P., 2016. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 8284–9. doi:10.1073/pnas.1605635113
- Kwilasz, A.J., Grace, P.M., Serbedzija, P., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2015. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology* 55–69. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.10.020
- Laste, G., Caumo, W., Adachi, L.N.S., Rozisky, J.R., De MacEdo, I.C., Filho, P.R.M., Partata, W.A., Fregni, F., Torres, I.L.S., 2012. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp. Brain Res.* 221, 75–83. doi:10.1007/s00221-012-3149-x
- M.S., V., A., F., 2016. Reduction of chronic abdominal pain in patients with inflammatory bowel disease through transcranial direct current stimulation: A randomized controlled trial. *Pain.*

- Moalem, G., Tracey, D.J., 2006. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res. Rev.* doi:10.1016/j.brainresrev.2005.11.004
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683–765. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683
- Netto, C.A., 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
- Ossipov, M.H., Kovelowski, C.J., Nichols, M.L., Hruby, V.J., Porreca, F., 1995. Characterization of supraspinal antinociceptive actions of opioid delta agonists in the rat. *Pain* 62, 287–293. doi:10.1016/0304-3959(94)00231-3
- Pelletier, S.J., Lagace, M., St-Amour, I., Arsenault, D., Cisbani, G., Chabrat, A., Fecteau, S., Levesque, M., Cicchetti, F., 2015. The Morphological and Molecular Changes of Brain Cells Exposed to Direct Current Electric Field Stimulation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18, pyu090-pyu090. doi:10.1093/ijnp/pyu090
- Pestka, S., Krause, C.D., Sarkar, D., Walter, M.R., Shi, Y., Fisher, P.B., 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 929–79. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622
- Polanía, R., Paulus, W., Nitsche, M.A., 2012. Modulating cortico-striatal and thalamo-cortical functional connectivity with transcranial direct current stimulation. *Hum. Brain Mapp.* 33, 2499–2508. doi:10.1002/hbm.21380
- Resende, M.A., Sabino, G.G., Cândido, C.R.M., Pereira, L.S.M., Francischi, J.N., 2004. Local transcutaneous electrical stimulation (TENS) effects in experimental inflammatory edema and pain. *Eur. J. Pharmacol.* 504, 217–222. doi:10.1016/j.ejphar.2004.09.055

- Rigamonti, E., Zordan, P., Sciorati, C., Rovere-Querini, P., Brunelli, S., 2014. Macrophage plasticity in skeletal muscle repair. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/560629
- Rubinstein, M., Mogil, J.S., Japón, M., Chan, E.C., Allen, R.G., Low, M.J., 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
- Schaper, F., Rose-John, S., 2015. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 475–87.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S., 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
- Simão, A.P., Mendonça, V.A., De Oliveira Almeida, T.M., Santos, S.A., Gomes, W.F., Coimbra, C.C., Lacerda, A.C.R., 2014. Involvement of BDNF in knee osteoarthritis: The relationship with inflammation and clinical parameters. *Rheumatol. Int.* 34, 1153–1157. doi:10.1007/s00296-013-2943-5
- Sonnenberg, G.F., Artis, D., 2009. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *J. Cell. Biochem.* 108, 1039–1046. doi:10.1002/jcb.22351
- Spezia, L.N., Quevedo, A.S., De Souza, A., Scarabelot, V.L., Rozisky, J.R., de Oliveira, C., Marques Filho, P.R., Medeiros, L.F., Fregni, F., Caumo, W., Torres, I.L.S., 2015. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Exp. Brain Res.* 233, 1377–1389.
- Spezia Adachi, L.N., Caumo, W., Laste, G., Fernandes Medeiros, L., Ripoll Rozisky, J.,

- De Souza, A., Fregni, F., Torres, I.L.S., 2012. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res.* 1489, 17–26. doi:10.1016/j.brainres.2012.10.009
- Takano, Y., Yokawa, T., Masuda, A., Niimi, J., Tanaka, S., Hironaka, N., 2011. A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. *Neurosci. Lett.* 491, 40–43. doi:10.1016/j.neulet.2011.01.004
- Valle, A., Roizenblatt, S., Botte, S., Zaghi, S., Riberto, M., Tufik, S., Boggio, P.S., Fregni, F., 2009. Efficacy of anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) for the treatment of fibromyalgia: results of a randomized, sham-controlled longitudinal clinical trial. *J. Pain Manag.* 2, 353–361. doi:10.1080/13576500701566727.Auditory
- Vivancos, G.G., Verri, W.A., Cunha, T.M., Schivo, I.R.S., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 37, 391–399. doi:10.1590/S0100-879X2004000300018
- Wieseler-Frank, J., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2005. Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. *NeuroSignals* 14, 166–174. doi:10.1159/000087655
- Wodarski, R., Delaney, A., Ultenius, C., Morland, R., Andrews, N., Baastrup, C., Kennedy, J.D., Koyama, S., Li, D., Ligocki, M., Lindsten, A., Machin, I., 2016. Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: a prospective multicentre study. *Pain* 157, 2350–2365.
- Woolfe, G., Macdonald, A., 1944. The Evaluation of the Analgesic Action of Pethidine Hydrochloride (Demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 80, 300–307.

- Yiu, H.H., Graham, A.L., Stengel, R.F., 2012. Dynamics of a Cytokine Storm. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0045027
- Zhou, Y.-Q., Liu, Z., Liu, Z.-H., Chen, S.-P., Li, M., Shahveranov, A., Ye, D.-W., Tian, Y.-K., 2016. Interleukin-6: an emerging regulator of pathological pain. *J. Neuroinflammation* 13, 141. doi:10.1186/s12974-016-0607-6
- Zhou, Z., Peng, X., Insolera, R., Fink, D.J., Mata, M., 2010. Interleukin-10 provides direct trophic support to neurons. *J. Neurosci.* 110, 1617–1627. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06263.x.Interleukin-10
- Zhu, J., Paul, W.E., 2011. Peripheral CD4 T cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Allergy* 238, 247–262. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x.Peripheral
- Zhu, Y., Chen, X., Liu, Z., Peng, Y.P., Qiu, Y.H., 2015. Interleukin-10 protection against lipopolysaccharide-induced neuro-inflammation and neurotoxicity in ventral mesencephalic cultures. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–15. doi:10.3390/ijms17010025

CAPTIONS

Figure 1. Experimental design.

Figure 2. Nociceptive behavioral assessments using Von frey test. Bars represent mean±S.E.M. of paw latency withdrawal (g). Panel A. Induction of mechanical allodynia 7 days after CFA injection in the posterior right paw of Wistar rats. *different from control group (Student t test, P<0.05). Panel B. Paw latency threshold in different timepoints: baseline, 7 days after CFA injection, immediately, 24h and 8 days after last session of tDCS. Interaction between time *versus* group (Wald $\chi^2 = 1;18$), P<0.05, n= 6 per group).

a different from immediately and 8 days after last session of tDCS in the total control group;

b different from immediately after tDCS in the control +sham-tDCS;

c different from baseline in the total CFA group;

d different from 7 days after CFA and 24h after last session of tDCS in the total CFA group;

e different from baseline in the CFA + sham-tDCS;

f different from all other timepoints in the CFA+tDCS;

g different from baseline in the CFA+tDCS.

Figure 3. Nociceptive behavioral assessments using Hot Plate test. Bars represent mean±S.E.M. of paw latency withdrawal (s). Panel A. Induction of thermal hyperalgesia 7 days after CFA injection in the posterior right paw of Wistar rats. *different from control group (Student t test, P<0.05). Panel B. Paw latency threshold in different timepoints: baseline, 7 days after CFA injection, immediately, 24h and 8 days after last session of tDCS. Interaction between time *versus* group (Wald $\chi^2 = 1;18$), P<0.05, n= 4 per group).

a different from baseline and 7 days after CFA injection in the total control group;

b different from baseline and 7 days after CFA injection in the control +sham-tDCS;

c different from baseline and 24h after tDCS in the control+sham-tDCS;

d different from baseline in the control+tDCS group;

e different from baseline in the total CFA group;

f different from immediately and 24h after last session of tDCS in the total CFA group;

g different from baseline in the CFA +sham tDCS group;

h different from baseline in the CFA + tDCS group;

i different from immediately, 24h and 8 days after last tDCS session in the CFA+ tDCS group.

Figure 4. Biochemical analysis of BDNF levels. Bars represent mean±S.E.M. of BDNF levels (pg/mg of protein for brain structures and ng/ml for serum). Panel A. BDNF levels in pre-frontal cortex of rats. No differences were found (one-way ANOVA, P> 0.05; n= 5-6). Panel B. BDNF levels in hippocampus of rats. No differences were found (one-way ANOVA, P> 0.05; n= 5-6). Panel C. Serum BDNF levels in rats. * different from control tDCS group (one way ANOVA/SNK, P< 0.05; n= 5-6).

Figure 5. Biochemical analysis of IL-6 levels. Bars represent mean±S.E.M. of IL-6 levels (pg/mg of protein for brain structures and ng/ml for serum). Panel A. IL-6 levels in pre-frontal cortex of rats. No differences were found (one-way ANOVA, $P > 0.05$; $n = 3-4$). **Panel B. IL-6 levels in striatum of rats.** No differences were found (one-way ANOVA, $P > 0.05$; $n = 3-4$). **Panel C. Serum IL-6 levels in rats.** * different from other groups (one way ANOVA/SNK, $P < 0.05$; $n = 3-4$).

Figure 6. Biochemical analysis of IL-10 levels. Bars represent mean±S.E.M. of IL-10 levels (pg/mg of protein for brain structures and ng/ml for serum). Panel A. IL-10 levels in pre-frontal cortex of rats. No differences were found (one-way ANOVA, $P > 0.05$; $n = 3-4$). **Panel B. IL-10 levels in striatum of rats.** No differences were found (one-way ANOVA, $P > 0.05$; $n = 3-4$). **Panel C. Serum IL-10 levels in rats.** * different from total control group (one way ANOVA/SNK, $P < 0.05$; $n = 3-4$).

Figure 7. Histological aspects of the hind paw of rats subjected to chronic inflammatory process after CFA injection. Staining with hematoxylin-eosin. 100X **A.** Photomicrograph of the histological slides of paw from Total CFA and CFA + tDCS groups. It was observed reduced swelling size in CFA + tDCS and non-pathological appearance, mainly showing muscle tissue and connective tissue, compared to the total CFA, and reduction of inflammatory infiltrate in the CFA + tDCS group. **B.** Photomicrograph of the histological slides of Total Control Group rat pad region. It was observed no pathological appearance, mainly showing muscle tissue and connective tissue, and no inflammatory infiltrate. **C.** Photomicrograph of the histological slides of Control + Sham tDCS Group rat pad region. It was observed absence of inflammatory infiltrate, demonstrating muscle tissue without histological changes. **D.** Photomicrograph of the histological slides of Control + tDCS rat pad region. It was observed absence of inflammatory infiltrate, demonstrating muscle tissue without histological changes. **E.** Photomicrograph of the histological slides of Total CFA group rat pad region. The asterisks indicate increased vascularization and the large extension inflammatory infiltrate characteristic of the inflammatory process. **F.** Photomicrograph of the histological slides of CFA + Sham-tDCS group rat pad region. It was observed increased vascularization and large inflammatory infiltrate. **G.** Photomicrograph of the histological slides of the CFA+ tDCS group rat pad region. It was observed decreased caliber of the capillaries and the fine line around of connective tissue on the previous inflammatory infiltrate. In comparison to Total CFA Group, there was a 64% reduction in inflammatory area of the same histological rat region.

Figure 8. Schematic representation of the possible tDCS effect on the anti-inflammatory mechanism and tissue repair

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

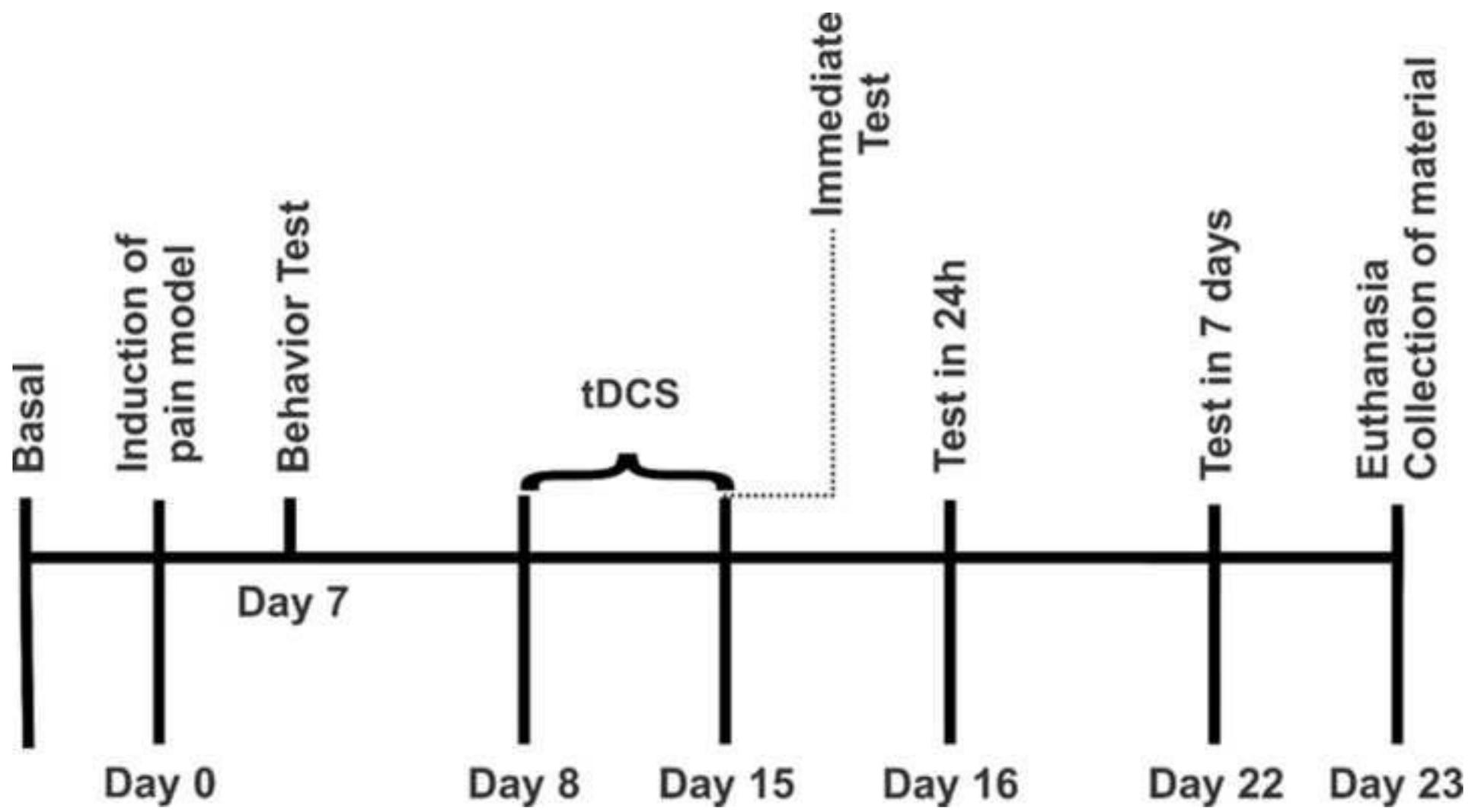


Figure 2B
[Click here to download high resolution image](#)

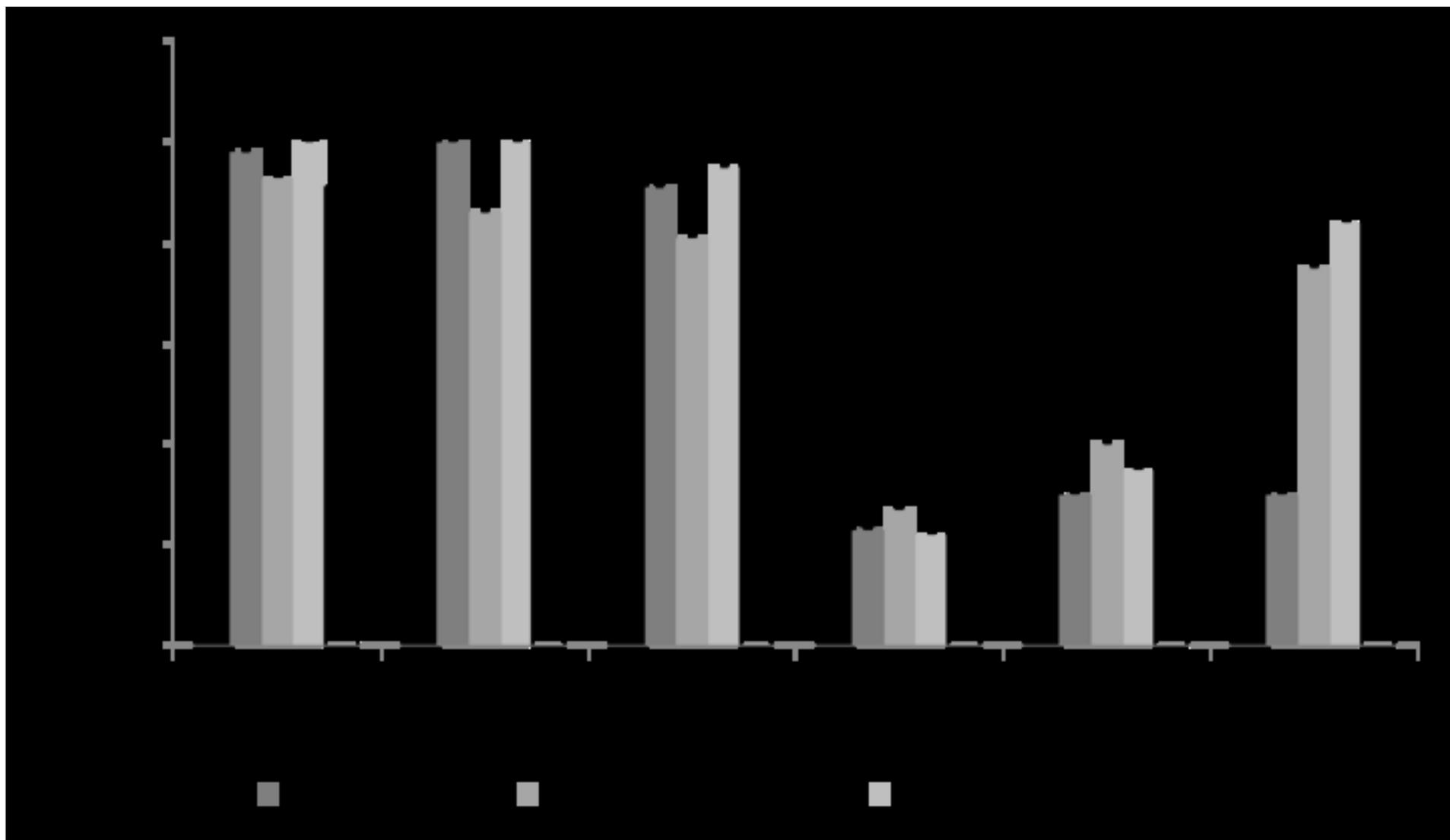


Figure 3A
[Click here to download high resolution image](#)

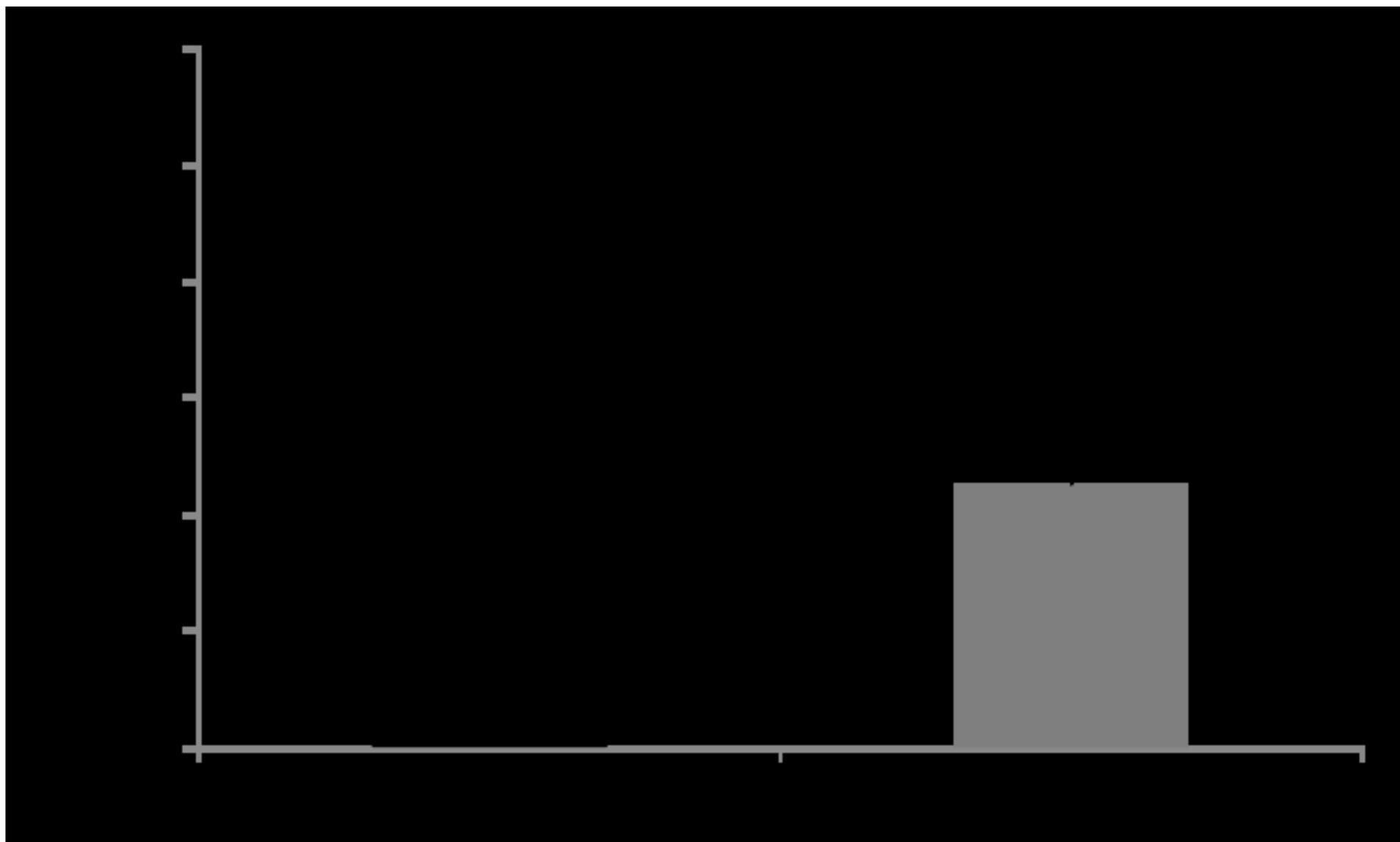


Figure 3B
[Click here to download high resolution image](#)

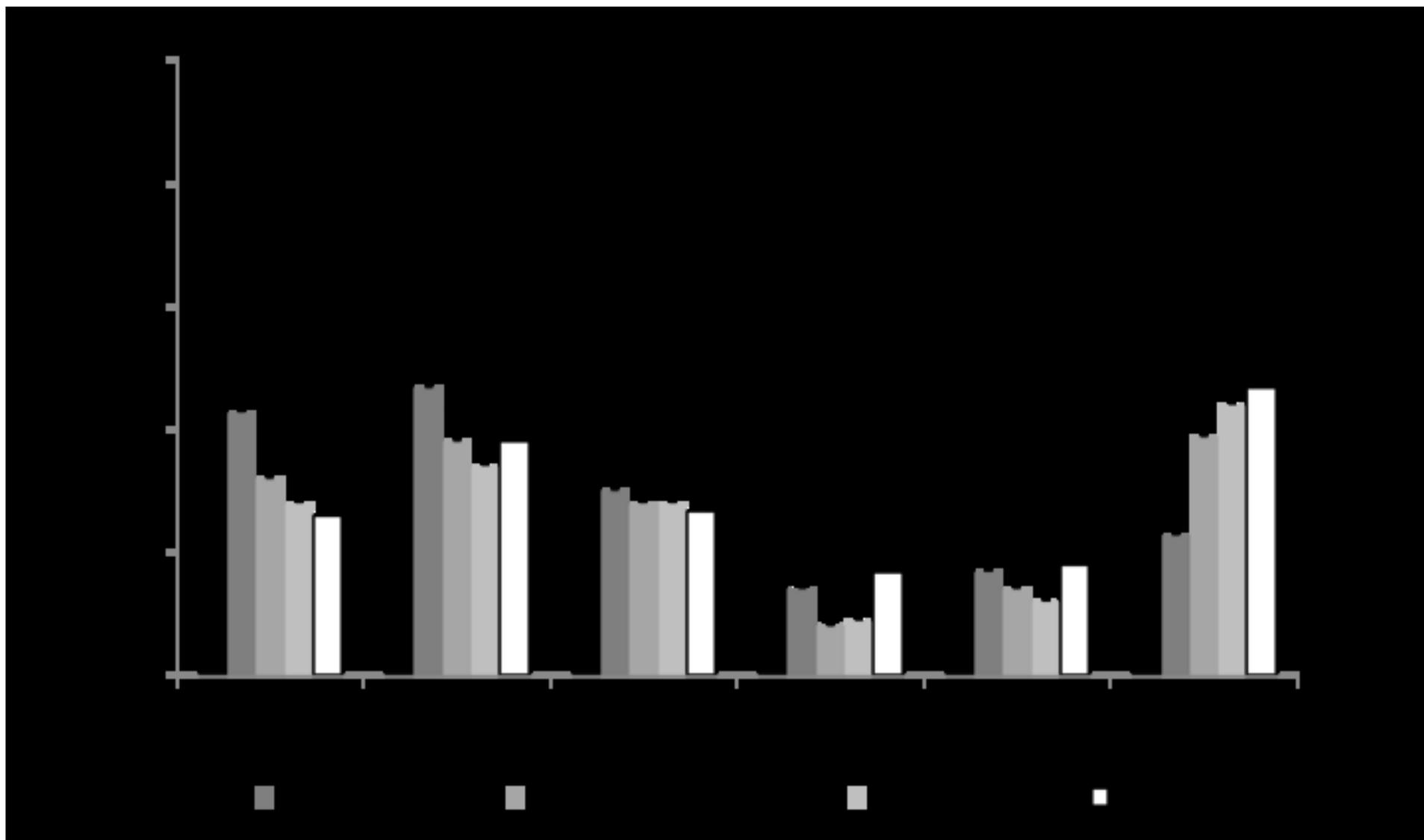


Figure 4A
[Click here to download high resolution image](#)

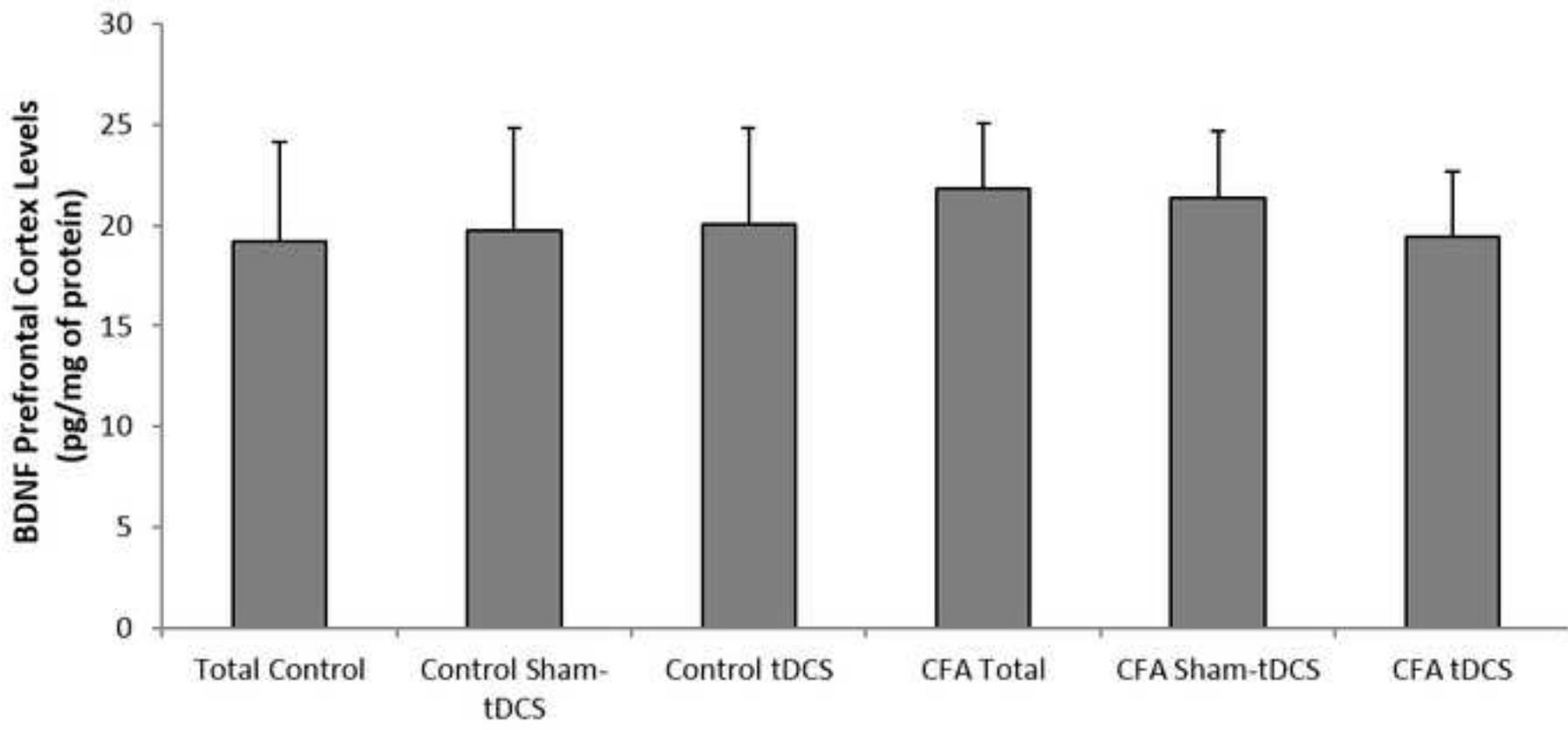


Figure 4B
[Click here to download high resolution image](#)

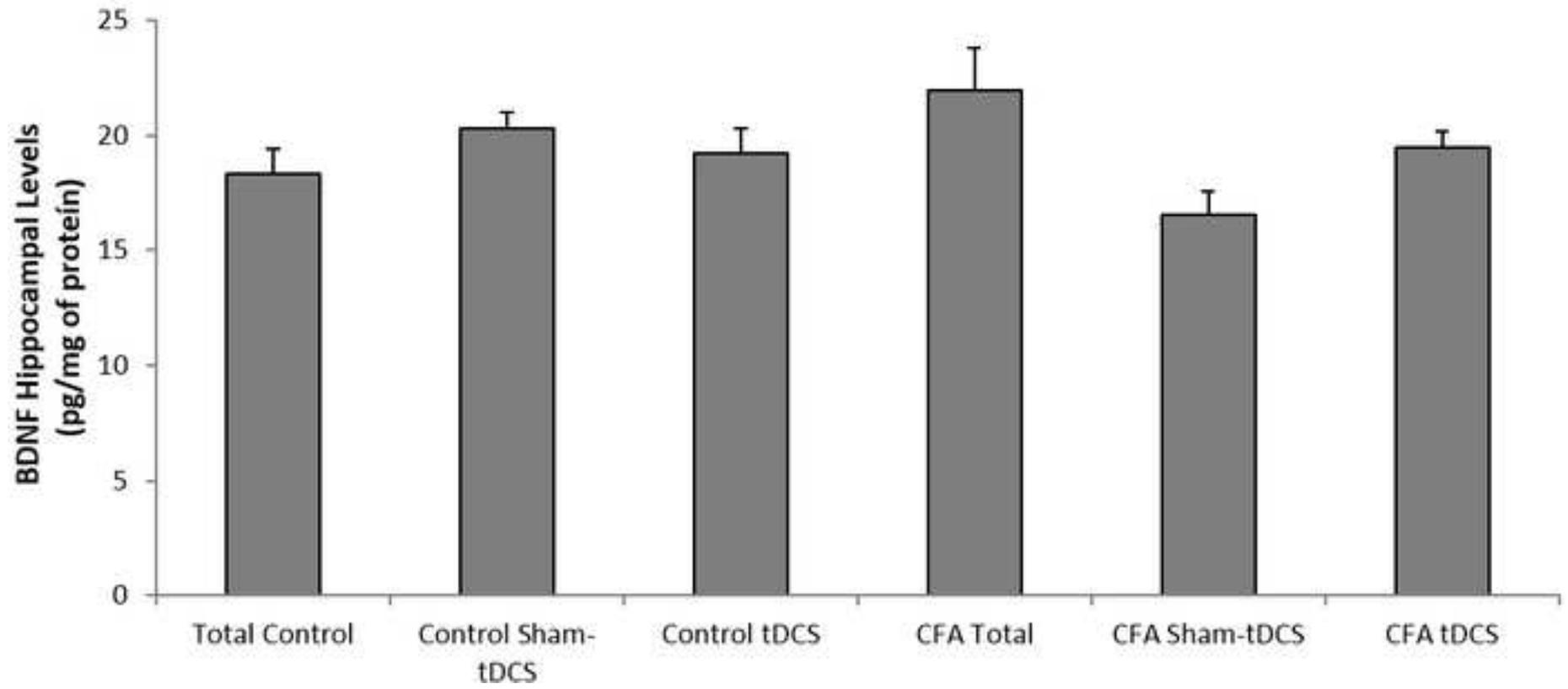


Figure 4C
[Click here to download high resolution image](#)

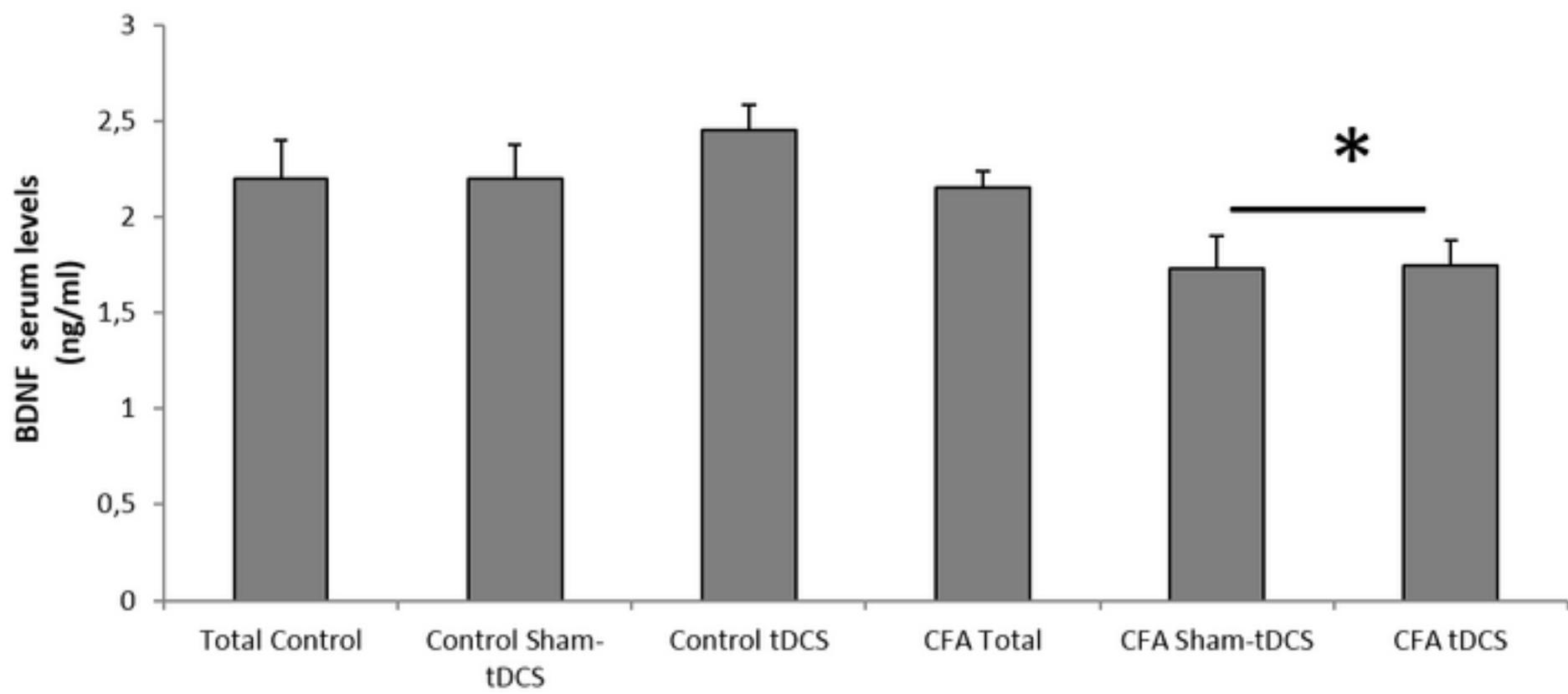


Figure 5A
[Click here to download high resolution image](#)

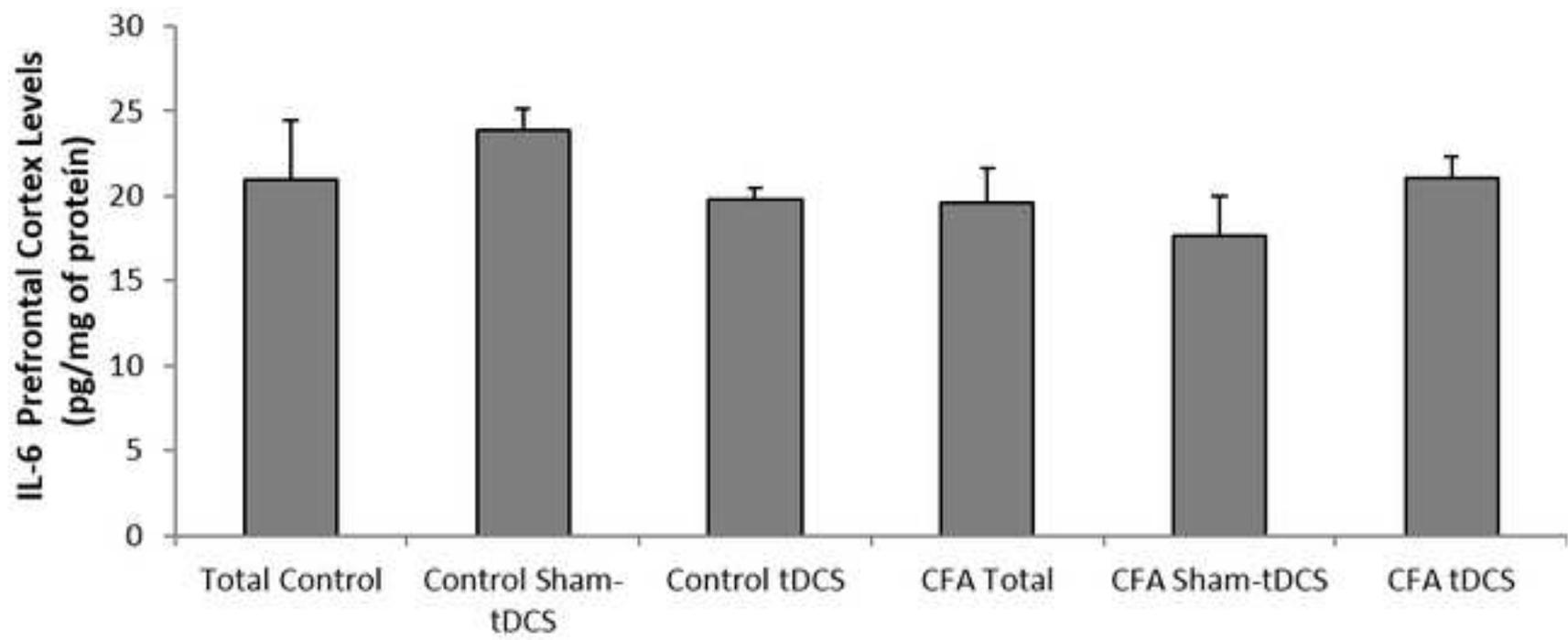


Figure 5B
[Click here to download high resolution image](#)

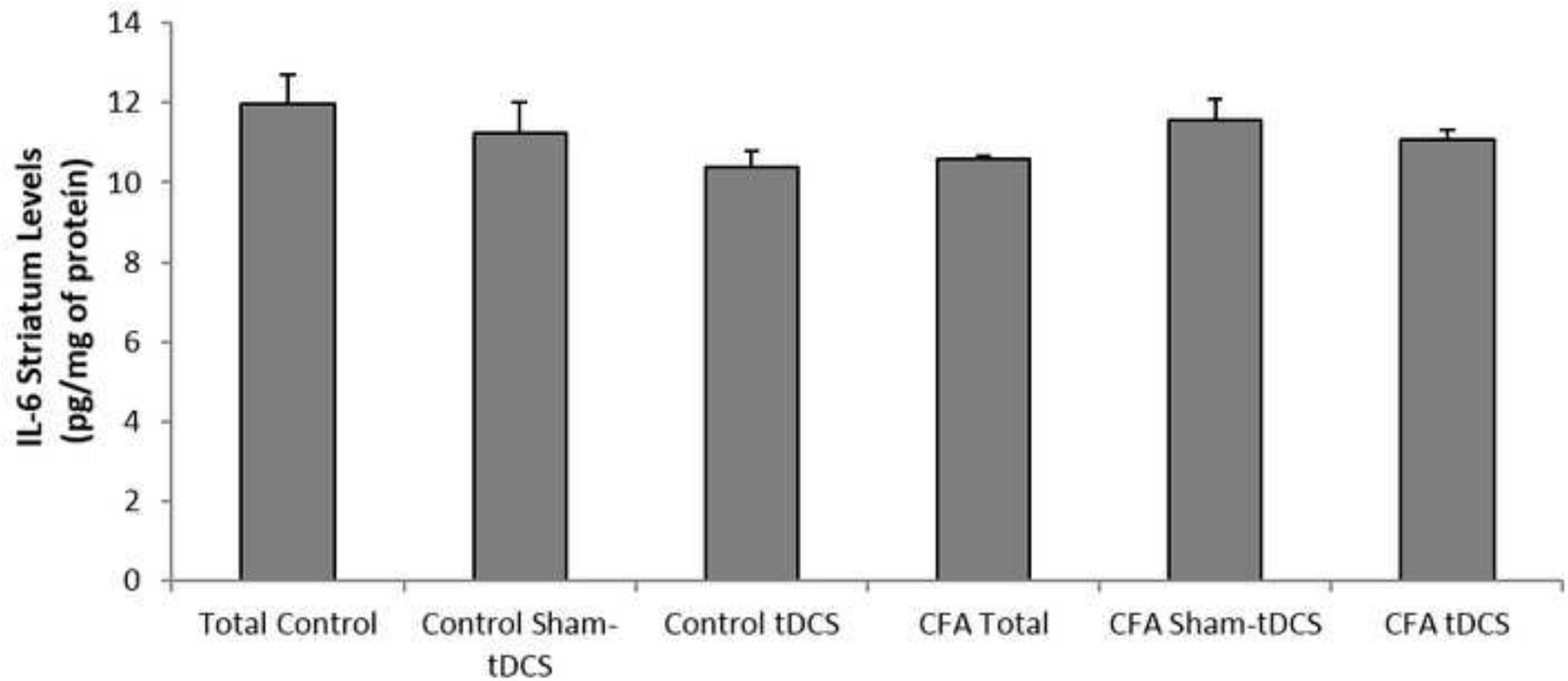


Figure 5C
[Click here to download high resolution image](#)

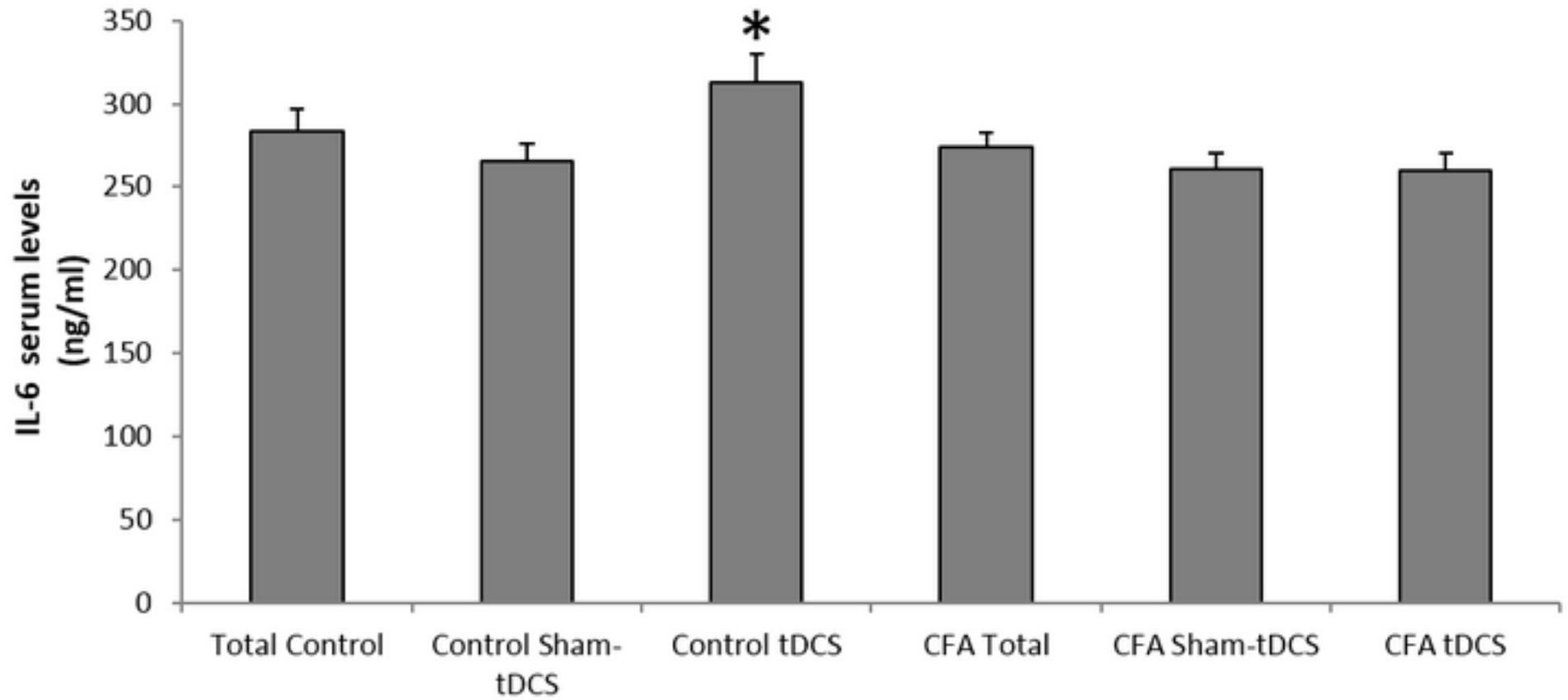


Figure 6A
[Click here to download high resolution image](#)

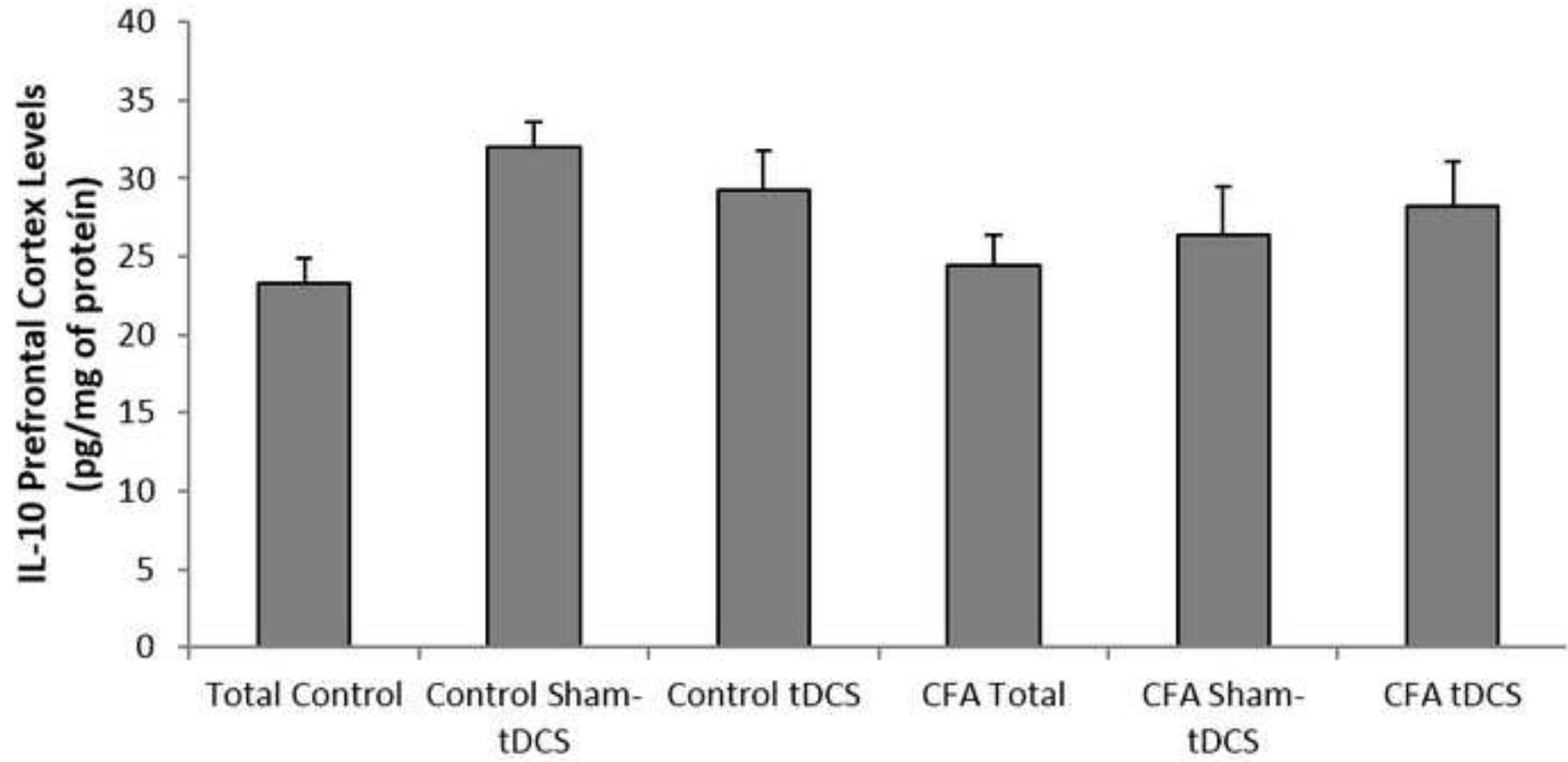


Figure 6B
[Click here to download high resolution image](#)

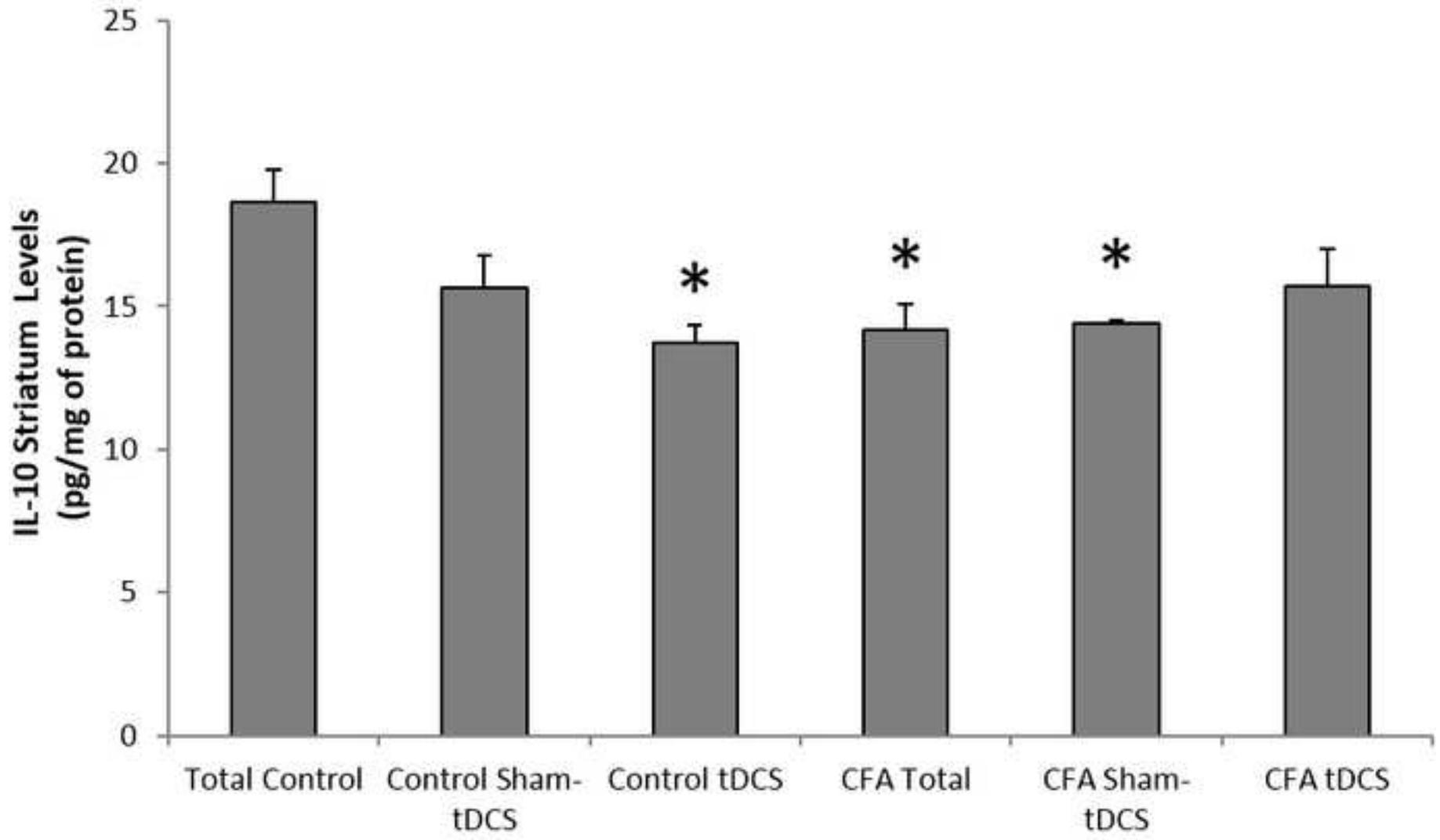


Figure 6C
[Click here to download high resolution image](#)

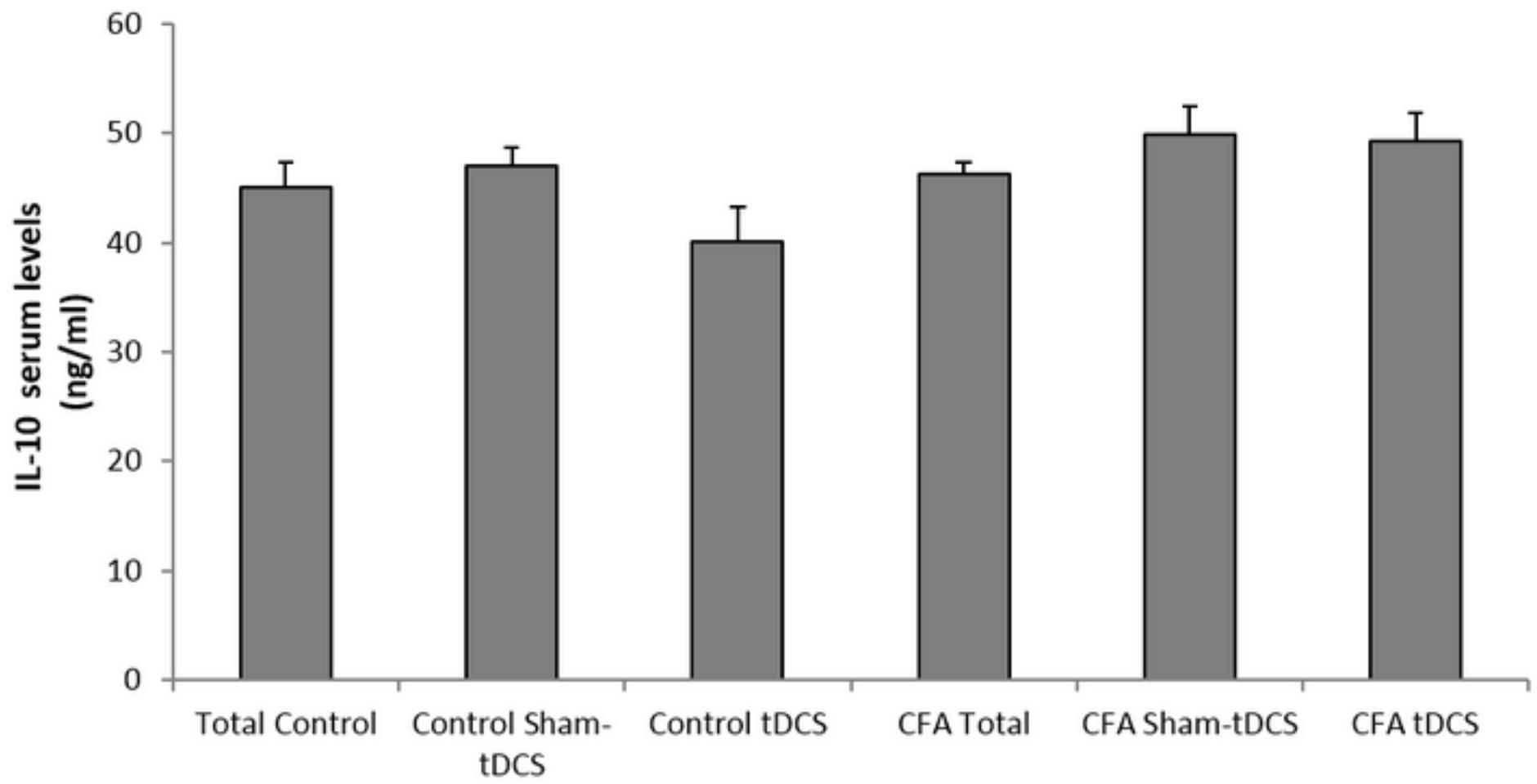
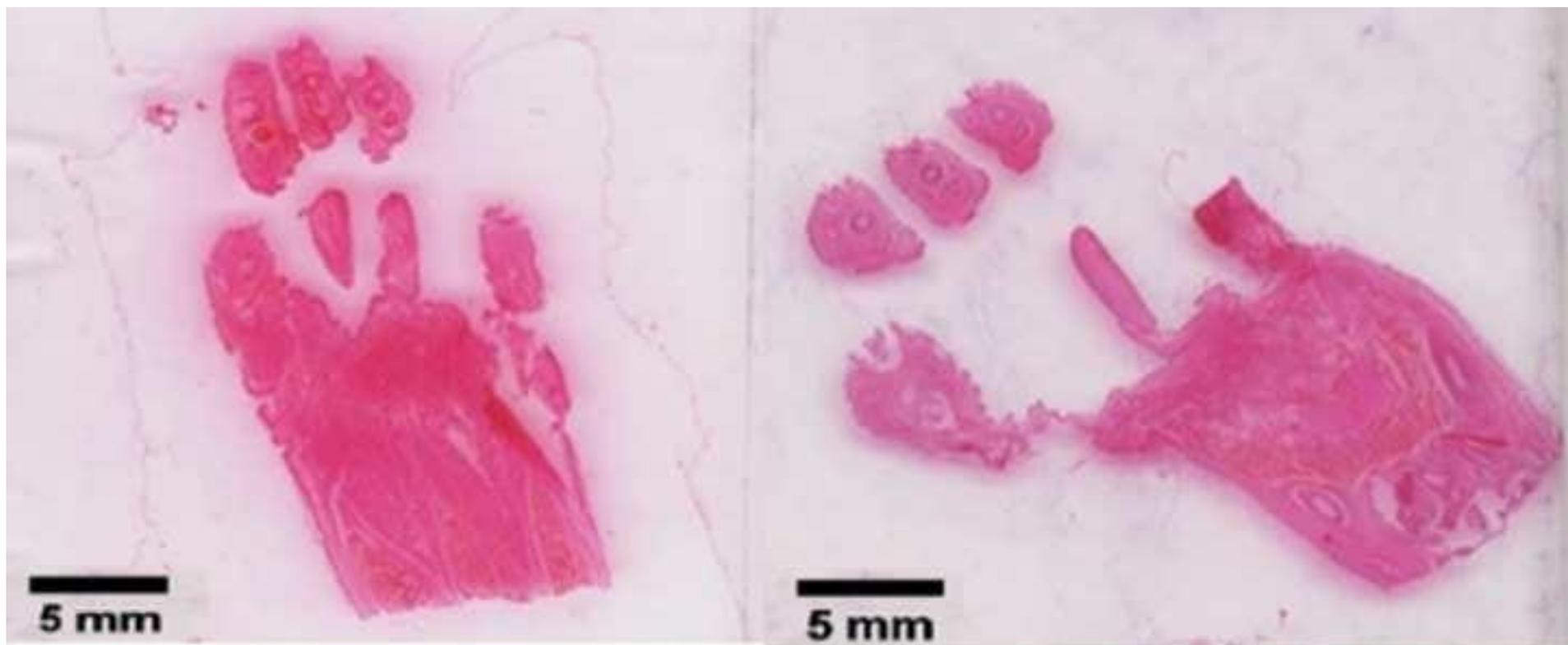


Figure 7A
[Click here to download high resolution image](#)



CFA

CFA tDCS

Figure 7BCDEFG
[Click here to download high resolution image](#)

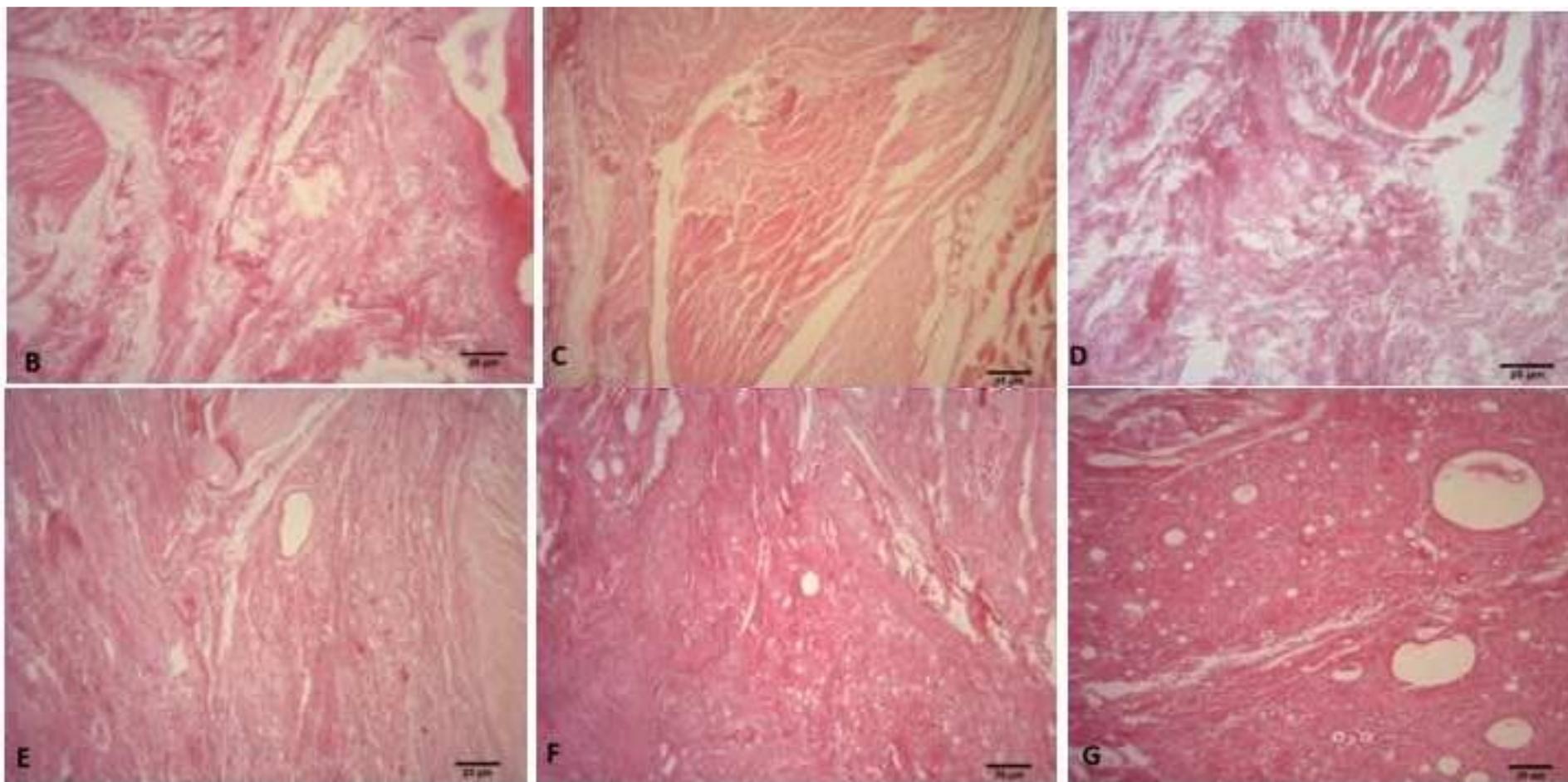


Figure 8
[Click here to download high resolution image](#)

