

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



Tese de doutorado

**Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre
parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos *Wistar*
submetidos a um modelo de dor neuropática**

Priscila Centeno Crespo

Pelotas, 2022

Priscila Centeno Crespo

**Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre
parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos *Wistar*
submetidos a um modelo de dor neuropática**

Apresentação da tese de doutorado ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Bioprospecção da
Universidade Federal de Pelotas, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Custódio de Souza

Co-orientador: Profa. Dra. Francieli Moro Stefanello

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C921e Crespo, Priscila Centeno

Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos Wistar submetidos a um modelo de dor neuropática / Priscila Centeno Crespo ; Izabel Cristina Custódio de Souza, orientadora ; Francieli Moro Stefanello, coorientadora. — Pelotas, 2022.

130 f. : il.

Tese (Doutorado) — Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Dor neuropática. 2. Estresse oxidativo. 3. BDNF. 4. ETCC. 5. Ratos. I. Souza, Izabel Cristina Custódio de, orient. II. Stefanello, Francieli Moro, coorient. III. Título.

CDD : 616.072

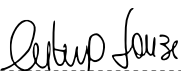
Priscila Centeno Crespo

Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos *Wistar* submetidos a um modelo de dor neuropática

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

Data da defesa: 27/06/2022

Banca examinadora:



Profa. Dra. Izabel Cristina Custódio de Souza

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



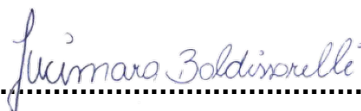
Prof. Dra. Liciane Fernandes Medeiros

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



Prof. Dr. Adriano Martimbiano de Assis

Doutor em Ciências Biológicas – Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dra. Jucimara Baldissarelli

Doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica toxicológica pela Universidade Federal de Santa Maria

Este trabalho é dedicado aos meus pais e as
minhas irmãs.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por este momento, por ter possibilitado que eu concluísse este curso e por toda a proteção oferecida durante o cumprimento dessa jornada.

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

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

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

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

Ao Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, em especial à Veterinária Anelize Felix e aos demais funcionários pelo carinho, respeito e acolhimento.

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

Aos colegas do laboratório de Histologia, do Departamento de Morfologia, pelo auxílio e conhecimento concedidos.

Aos integrantes do grupo de estudos Neurocell, pelo apoio, conhecimento e oportunidade de crescimento.

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

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

A minha orientadora, Dra. Izabel Cristina Custódio de Souza, que me apoiou, ofertou o conhecimento durante as disciplinas de docência, sendo facilitadora do crescimento profissional, intermediadora para execução do projeto de pesquisa e instigadora para busca de conhecimento. Agradeço a oportunidade.

A minha co-orientadora de mestrado, Dra. Giovana Duzzo Gamaro pelo acompanhamento, instrução, discussão, conhecimento compartilhado e reconhecimento. Obrigada pela oportunidade.

E por fim, a minha co-orientadora de doutorado, Dra. Francieli Moro Stefanello, pela instrução, empenho, conhecimento compartilhado, por possibilitar a concretização de um projeto. Agradeço a oportunidade.

Resumo

CRESPO, Priscila Centeno. **Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos Wistar submetidos a um modelo de dor neuropática.** Orientadora: Izabel Cristina Custódio de Souza. 2022. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

A dor neuropática é ocasionada por uma lesão no sistema nervoso somatossensorial, gerando grande impacto na vida de pacientes acometidos com essa condição. Estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado a eficácia da estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) em promover alívio da dor. No entanto, os efeitos produzidos pela ETCC ainda vêm sendo pesquisados. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da ETCC sobre parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos em ratos com 30 e 60 dias com constrição crônica unilateral do nervo ciático. Catorze dias após a indução da lesão, os ratos foram tratados com 8 sessões consecutivas de ETCC bimodal, com duração de 20 minutos cada sessão. O teste de hipersensibilidade mecânica foi realizado 1 dia antes do início dos experimentos, 14 dias após a indução da lesão e 24 horas e 8 dias após o final do tratamento. Oito dias após a última sessão de ETCC os ratos foram eutanasiados e o córtex pré-frontal, a medula espinal e o sangue total foram coletados. Após a realização das análises, foi possível verificar que o modelo de dor produziu hiperalgesia mecânica 14 dias após a indução da lesão em ratos de 30 e 60 dias e que a ETCC bimodal reduziu esse efeito 24 horas após o final do tratamento (a curto prazo) para os ratos de 30 dias e 7 dias após o final do tratamento (a longo prazo) para os ratos de 60 dias. Em ratos de 30 dias foi observado um efeito da dor sobre os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) da medula espinal dos ratos com dor neuropática, não ocorrendo alterações em nível cortical e sérico e nem efeito do tratamento. Em ratos de 60 dias, o modelo de dor promoveu um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e uma diminuição da atividade da superóxido dismutase (SOD) no córtex pré-frontal. Na medula espinal foi observada uma redução no conteúdo total de tióis, os quais foram revertidos pelo tratamento. Uma redução dos níveis de nitritos e da atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi observada em ratos tratados com ETCC e um efeito similar foi observado em ratos com lesão que receberam simulação do tratamento. Em nível sérico foi observado um aumento dos níveis de ERO e de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), assim como uma redução da atividade da butirilcolinesterase (BuChE), promovidos pela dor neuropática. Enfim, a dor neuropática modificou os níveis de diferentes marcadores biológicos em estudo e a ETCC demonstrou eficácia em modular esses marcadores e em proporcionar alívio da dor em ratos de diferentes fases de desenvolvimento.

Palavras-chave: Dor neuropática. Estresse oxidativo. BDNF.ETCC. Ratos.

Abstract

CRESPO, Priscila Centeno. **Effects of transcranial direct current stimulation over behavioral and biochemical parameters in *Wistar* rats submitted to an animal model of neuropathic pain.** Advisor: Izabel Cristina Custódio de Souza. 2022. 130 p. Thesis (Doctor in Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Neuropathic pain is caused by an injury to the somatosensory nervous system, generating an important impact on the lives of patients affected with this condition. Preclinical and clinical studies have demonstrated the efficacy of transcranial direct current stimulation (tDCS) in promoting pain relief. However, the effects produced by tDCS has still been researched. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of tDCS on behavioral, morphological and biochemical parameters in rats with 30 and 60 days with unilateral chronic constriction of the sciatic nerve. Fourteen days after inducing the lesion, the rats were treated with 8 consecutive sessions of bimodal tDCS, lasting 20 minutes each session. The mechanical hypersensitivity test was applied a day prior to the beginning of experiments, 14 days after the surgery and 24 hours and 8 days after the end of the treatment. Eight days after the last tDCS session, the rats were euthanized and the prefrontal cortex, spinal cord and whole blood were collected. After performing the analyses, it was possible to verify that the pain model produced mechanical hyperalgesia 14 days after induction of the lesion in rats of 30 and 60 days and that bimodal tDCS reduced this effect 24 hours after the end of treatment (short-term effect) for 30-day rats and 7 days after the end of treatment (long term effect) for 60-day rats. In 30-day-old rats, it was observed a pain effect over spinal cord brain-derived neurotrophic factor (BDNF) spinal levels of rats with neuropathic pain, with no changes in the cortical and serum levels, neither a tDCS effect. In 60-day rats, the pain model promoted an increase in reactive oxygen species (RS) levels and a decrease in superoxide dismutase (SOD) in the prefrontal cortex. In the spinal cord, an increase in the total content of the thiols were reversed by tDCS effects. A decrease in nitrite levels and in glutathione-S-transferase (GST) activity was diminished by tDCS, however, a similar effect was observed in rats with the lesion that received sham stimulation. At the serum level, an increase in RS and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels and a reduction in butyrylcholinesterase (BuChE) activity were observed, promoted by neuropathic pain. In conclusion, neuropathic pain model modified different biomarkers levels in study and tDCS demonstrated the efficacy in modulates these biomarkers e in promotes pain relief in rats of different phases of development.

Palavras-chave: Neuropathic pain. Oxidative stress. BDNF. tDCS. Rats.

Lista de figuras

Figura 1	Ferramentas utilizadas para busca de artigos científicos utilizados como base nesta revisão.....	23
Figura 2	A estrutura da medula espinal e suas raízes.....	24
Figura 3	Diferenças entre axônios aferentes primários sensoriais.....	25
Figura 4	A trajetória da sensação de toque mediada por axônios A β na medula espinal.....	25
Figura 5	Mediadores químicos periféricos da dor e da hiperalgesia.....	29
Figura 6	Conexão espinal de axônios nociceptivos.....	30
Figura 7	A teoria do portão da dor.....	31
Figura 8	Sensibilização periférica.....	36
Figura 9	Mecanismo de ativação da dor e de sensibilização central após lesão.....	39
Figura 10	Diferenças entre dor nociceptiva e dor neuropática.....	40
Figura 11	Conexões sinápticas no neurônio do corno dorsal da medula espinal.....	42
Figura 12	Potenciação de longa duração.....	43
Figura 13	Ativação das vias de sinalização pelas neurotrofinas na modulação da dor neuropática.....	45
Figura 14	Cadeia transportadora de elétrons.....	47
Figura 15 A	Reação de Fenton.....	50
Figura 15 B	Reação de Haber-Weiss.....	50
Figura 16	EROS relacionadas ao peroxinitrito.....	51
Figura 17	Síntese de óxido nítrico.....	51
Figura 18	Degradação do radical superóxido pela ação das enzimas antioxidantes.....	53
Figura 19	Mecanismo de ação de fármacos anticonvulsivantes no tratamento da dor.....	56
Figura 20	Mecanismo de ação de fármacos análogos do GABA.....	56
Figura 21	Posicionamento dos eletrodos para aplicação de ETCC.....	59

MANUSCRITO 1: Short-term effectiveness of transcranial direct current stimulation in the nociceptive behavior of neuropathic pain *Wistar* rats in development

Figura 1	Groups of research.....	84
Figura 2	Timeline of experiments.....	85
Figura 3	Effect of tDCS on the mechanical hyperalgesia response by the von Frey electronics test of rats in development	86
Figura 4	BDNF levels of rats in development at the long-term effect.....	87

MANUSCRITO 2: Transcranial direct current stimulation effects in the pain threshold and in oxidative stress parameters of neuropathic pain rats

Figura 1	Experimental groups of research.....	92
Figura 2	Timeline of the experiment.....	93
Figura 3	Effect of tDCS on the mechanical hyperalgesia response through the von Frey electronics test.....	94
Figura 4	Effect of tDCS on prefrontal cortex oxidative stress parameters of rats subjected to neuropathic pain model	96
Figura 5	Effect of tDCS on spinal cord oxidative stress parameters of rats subjected to neuropathic pain model.....	97
Figura 6	Effect of tDCS on oxidative stress parameters in serum of rats subjected to neuropathic pain model.....	99
Figura 7	Effect of tDCS on serum activity of ADA and BuChE in rats subjected to neuropathic pain model.....	100
Figura 8	Modulatory effects of neuropathic pain and tDCS on prefrontal cortex, spinal cord and serum.....	100

Lista de abreviaturas e siglas

5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
ANKTM1	Receptor do tipo anquirina com domínio transmembrana tipo 1
ATP	Adenosina tri-fosfato
β	Beta
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BuChE	Butirilcolinesterase
Ca^{2+}	Cálcio
CAT	Catalase
CCL	Lesão por constrição crônica
CCL-21	Quimiocina motivo C-C ligante 21
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CoQ	Coenzima Q
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ETCC	Estimulação transcraniana por corrente contínua
FAD	Flavina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
Fe^{2+}	Ferro II
Fe^{3+}	Ferro III
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GST	Glutathione-S-transferase
H^+	Íon de hidrogênio
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
K^+	Potássio
IFN α	Interferon alfa
mA	Miliampere
MAPK-p38	Proteína cinase ativada por mitógeno p 38
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito atraente 1
mg	Miligrama
Mg^{2+}	Magnésio

mGlu	Receptor metabotrópico de glutamato
mTOR	Alvo mamífero/mecanicista da rapamicina
Na ⁺	Sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de dicotinamida e adenina
NGF	Fator de crescimento do nervo
NK-1	Receptor de neuroquinina-1
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
nmol	Nanomol
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
p75NT	Receptor neurotrófico p75
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
SP	Substância P
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TMS	Estimulação transcraniana magnética
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
Trk	Receptor tirosina-quinase
TRPM	Canal catiônico potencial do receptor transitório de melastatina
TRPV	Canal catiônico potencial do receptor transitório de vanilóide
U	Unidade
μ L	Microlitro
μ mol	Micromol

Sumário

1 Introdução.....	16
2 Objetivos.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 Revisão da literatura.....	21
3.1 Sistema somatossensorial.....	23
3.2 Nocicepção e dor.....	26
3.3 Modelos animais de nocicepção.....	32
3.3.1 Axotomia.....	32
3.3.2 Ligação parcial do nervo ciático.....	33
3.3.3 Lesão nervosa.....	33
3.3.4 Lesão por constrição crônica.....	33
3.4 Dor neuropática.....	34
3.4.1 Sensibilização periférica.....	36
3.4.2 Sensibilização espinal.....	37
3.4.3 Sensibilização supraespinal.....	39
3.4.4 Transmissão sináptica mediada por glutamato.....	41
3.5 Biomarcadores.....	44
3.5.1 BDNF.....	44
3.5.2 Marcadores da disfunção mitocondrial.....	45
3.5.2.1 ERO.....	49
3.5.2.2 ERN.....	50
3.5.2.3. Sistema de defesa antioxidante.....	52
3.5.3 Adenosina deaminase e butirilcolinesterase.....	54
3.5.3.1 Adenosina.....	54
3.5.3.2 Butirilcolinesterase.....	55
3.6 Tratamentos na dor neuropática.....	55
3.6.1 Tratamentos farmacológicos.....	55
3.6.2 Estimulação transcraniana não invasiva.....	57
3.6.3 Efeitos da ETCC sobre a modulação neuronal, a dor neuropática e os biomarcadores mediadores da dor.....	59
4. Manuscritos.....	62
Capítulo 1.....	63
Capítulo 2.....	89
5. Discussão.....	103
6. Considerações finais.....	111
Perspectivas.....	113
Referências.....	115
Anexos.....	129

Anexo A..... 130

1 Introdução

A dor aguda é um processo fisiológico essencial e tem a finalidade de proteger contra lesões teciduais (NARO et al., 2016). Estímulos dolorosos, térmicos, mecânicos ou químicos são reconhecidos por uma subpopulação de neurônios aferentes primários os quais, após ativação, têm a função de transmitir o sinal nociceptivo aos neurônios do corno dorsal da medula espinal. A partir deste ponto, os sinais nociceptivos são organizados e enviados a nível supra espinal dando origem à sensação de dor e à resposta a estímulo (KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013).

A dor é caracterizada pelas sensações ocasionadas por um estímulo, enquanto a nocicepção é um conjunto de sinais sensoriais que são transmitidos do local da estimulação até estruturas centrais onde são processados, promovendo a sensação dolorosa (BEAR et al., 2006).

Em contraste à percepção ao estímulo doloroso nociceptivo, o dano tecidual (dor inflamatória) ou lesão do sistema nervoso somatossensorial (dor neuropática) comumente resultam em hipersensibilidade (KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013). A dor neuropática, mais especificamente, é ocasionada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP) (IASP, 2014), frequentemente, ocasionando aumento da excitabilidade de neurônios do corno dorsal da medula espinal (SINISCALCO et al., 2007).

Em quadros de dor crônica, a resposta a estímulo nocivo pode ser amplificada (hiperalgesia) e a resposta a estímulo inofensivo pode produzir percepção à dor (alodinia) e dor na ausência de qualquer estímulo (dor espontânea) (KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013). A sensibilização do sistema somatossensorial ocasionada pela progressão da lesão, promove, conseqüentemente, plasticidade adaptativa, caracterizada pela reorganização estrutural das células, bem como, de suas funções (COSTIGAN et al., 2009; NARO et al., 2016). Como resultado, esse mecanismo induz a ativação de mediadores químicos que levam à cronificação e constitui a expressão

da plasticidade mal adaptativa do sistema sensorial (COSTIGAN et al., 2009; NARO et al., 2016).

Diversos marcadores celulares e inflamatórios contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática (SOMMER et al., 2018). Os marcadores de plasticidade neuronal como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o alvo mamífero/meanicista da rapamicina (mTOR) podem modular a dor neuropática (ASANTE et al., 2010; WU et al., 2013). O BDNF é secretado por neurônios após ativação de receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Após ser secretado, o BDNF ativa a mTOR pela via de sinalização PI3/AKT/TSC/Rheb (KHAMSING et al., 2021). Por sua vez, a ativação da mTOR ocasiona um aumento da síntese proteica e do crescimento celular e um decréscimo dos processos catabólicos (FLEMING e RUBINSTEIN, 2020). A mTOR é responsável por manter a homeostase proteica relacionada à plasticidade sináptica (LIU e SABATINI, 2020).

Ademais, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (ULLAH et al., 2021) e de nitrogênio (ERN) (KIM et al., 2009) leva a alterações estruturais e funcionais celulares e danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (ULLAH et al., 2021). As células neurais possuem alta demanda de adenosina trifosfato (ATP) e oxigênio (O₂) e, por esse motivo, têm maior propensão aos efeitos deletérios induzidos pela disfunção mitocondrial (ISLAM, 2017). A adenosina é uma molécula sinalizadora liberada em condições inflamatórias, podendo apresentar atividades anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias, de acordo com o subtipo de receptor adenosinérgico e tecido envolvidos (AKKARI et al., 2006).

Adicionalmente, a atividade aumentada da butirilcolinesterase (BuChE) em soro ou plasma é indicativo de inflamação aguda ou crônica. A BuChE é uma enzima responsável por degradar a acetilcolina, um neurotransmissor que possui propriedades anti-inflamatórias. Dessa forma, a concentração aumentada de BuChE indica, de forma indireta, uma diminuição da disponibilidade de acetilcolina e, conseqüentemente, diminuição da função anti-inflamatória exercida por esta molécula (ZIVKOVIC et al., 2016).

Como mencionado, uma gama de biomoléculas e receptores celulares e mediadores inflamatórios estão envolvidos no processo de ativação e manutenção da dor neuropática. A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) tem demonstrado efeitos promissores sobre diversos marcadores neuronais, modulando, inclusivamente, a plasticidade sináptica (RANIERI et al., 2012).

Os efeitos da ETCC têm sido observados como resultados de pesquisas que avaliam parâmetros de estresse oxidativo de diferentes patologias, em estudos pré-clínicos, em modelos de demência vascular (GUO et al., 2020), na doença de Parkinson (LU et al., 2015) e no transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) (LEFFA, 2018).

A ETCC é uma técnica inovadora, segura, de baixo custo e de fácil aplicação (NARDONE et al., 2014; NGERNYAM et al., 2013) e tem demonstrado eficácia em reduzir a dor crônica quando aplicada em estudos clínicos e pré-clínicos. Em modelos animais, a lesão cirúrgica aos nervos periféricos é a mais comumente utilizada para mimetizar a dor neuropática e a avaliação da hipersensibilidade ao estímulo mecânico é de suma importância para a análise dos danos ocasionados pela lesão neuropatológica (BOADA et al., 2015).

Entretanto, há pouco entendimento sobre os mecanismos pelos quais a ETCC modifica as interações de biomarcadores na dor neuropática. Dessa forma, esclarecer o envolvimento de mediadores biológicos no processo de cronificação da dor é fundamental para nortear as pesquisas que visam entender esses mecanismos e objetivam tratamentos com maior efetividade ou que produzam efeitos adversos menos proeminentes, justificando a realização deste estudo.

Assim, nosso trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da ETCC, em ratos com dor neuropática, por meio da avaliação da sensibilidade mecânica e de marcadores de plasticidade neuronal, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a proteína alvo mamífero/mecanicista da rapamicina (mTOR) e de parâmetros de estresse oxidativo avaliando marcadores de dano tecidual como as ERO, os níveis de nitritos e as espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

(TBARS), o conteúdo total de tióis e as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), bem como a avaliação das enzimas adenosina deaminase (ADA) e BuChE.

Para realização deste estudo o método de constrição crônica do nervo ciático direito foi aplicado em ratos *Wistar* com idades de 30 dias (jovens) e 60 dias (adultos), os quais, após estabelecimento da dor neuropática (14 dias após a cirurgia), foram tratados com 8 sessões consecutivas de ETCC bimodal com duração de 20 minutos cada sessão. Após a indução da dor os ratos foram avaliados com testes comportamentais e bioquímicos. O teste de hipersensibilidade mecânica foi aplicado no dia anterior à indução da lesão, para verificação do limiar de dor basal dos ratos, 14 dias após a cirurgia para avaliar se houve redução do limiar nociceptivo pelo modelo de dor aplicado, 24 horas após aplicação de ETCC (para avaliação dos efeitos da estimulação a curto prazo) e 7 dias após a aplicação de ETCC (para verificação dos efeitos da estimulação a longo prazo). No oitavo dia após o final do tratamento, os ratos foram eutanasiados e o cérebro, a medula espinal, o nervo ciático direito e o sangue total para obtenção de soro foram coletados para realização das análises morfológicas (imuno-histoquímica para BDNF e mTOR, histologia dos nervos ciáticos) e bioquímicas (BDNF e estresse oxidativo, ADA e BuChE).

A hipótese deste estudo é que o modelo de dor promova aumento de marcadores de plasticidade (BDNF e mTOR), de marcadores de dano celular ERO, ERN, TBARS e conteúdo total de tióis e as enzimas que degradam as moléculas anti-inflamatórias acetilcolina e adenosina e reduza as enzimas do sistema de defesa antioxidante (SOD, CAT e GST). Por outro lado, a hipótese é que a ETCC bimodal module reduzindo ERO, ERN, TBARS e o conteúdo total de tióis e promova aumento de SOD, CAT e GST.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo avaliar as respostas comportamentais e bioquímicas relacionadas aos efeitos da aplicação de ETCC em animais submetidos ao modelo de dor neuropática induzida, pelo método de constrição unilateral do nervo ciático (BENNET & XIE, 1988), em ratos machos em desenvolvimento (30 dias de idade) e na fase adulta (60 dias de idade).

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o limiar de dor dos animais de 30 e 60 dias ao longo do experimento (medida basal, após a indução da lesão e, após o término do tratamento para avaliação dos efeitos da ETCC a curto prazo e a longo prazo);
- b) Verificar os níveis de BDNF em córtex pré-frontal, medula e soro de ratos de 30 dias;
- c) Avaliar os marcadores de estresse oxidativo e as enzimas antioxidantes em amostras de córtex pré-frontal, medula espinal e soro de ratos de 60 dias;
- d) Analisar as atividades das enzimas adenosina deaminase (ADA) e butirilcolinesterase (BuChE) em soro de ratos com 60 dias de idade.

3 Revisão da literatura

Nesta revisão foram abordados aspectos da fisiopatologia da dor neuropática, os efeitos da aplicação de ETCC, bem como, os conceitos relacionados aos parâmetros bioquímicos baseados em evidências científicas. Para tanto, foi necessária a pesquisa de referências bibliográficas em três bases de dados, PUBMED, LILACS e SCIELO. Foram utilizadas as palavras-chave “neuropathic pain” = dor neuropática, “tDCS” (transcranial direct current stimulation) = ETCC, “oxidative stress” = estresse oxidativo, “adenosine deaminase” = adenosina deaminase, “butyrylcholinesterase” = butirilcolinesterase, “BDNF” and “mTOR” e a combinação entre esses termos. As buscas foram realizadas no dia 22/07/2021 e não foi utilizado parâmetro limitante quanto ao período das publicações. Como resultado, com a combinação dos termos (neuropathic pain AND tDCS) foram encontrados 122 artigos no PUBMED, 99 no LILACS e 1 no SCIELO. Relacionando os termos (neuropathic pain AND oxidative stress) foram encontrados 437 no PUBMED, 421 no LILACS e 9 no SCIELO. Inserindo os termos (tDCS AND oxidative stress) foram encontrados apenas 4 artigos no PUBMED, 4 no LILACS e nenhum no SCIELO e combinando os termos (neuropathic pain AND tDCS AND oxidative stress) não foram encontrados artigos no PUBMED, no LILACS e no SCIELO. Relacionando as palavras (neuropathic pain AND adenosine deaminase) foram encontrados 8 artigos no PUBMED, 10 no LILACS e nenhum no SCIELO, com a combinação dos termos (tDCS AND adenosine deaminase) ou a combinação (neuropathic pain AND tDCS AND adenosine deaminase) a busca não encontrou artigos nas bases utilizadas. Com a inserção dos termos (neuropathic pain AND butyrylcholinesterase) foram localizados 3 artigos no PUBMED, 1 no LILACS e nenhum no SCIELO, inserindo os termos (tDCS AND butyrylcholinesterase) ou os termos (neuropathic pain AND tDCS AND butyrylcholinesterase) as buscas não localizaram artigos nas bases utilizadas. Relacionando as palavras (neuropathic pain AND BDNF) foram encontrados 376 artigos no PUBMED, 328 no LILACS e 1 no SCIELO, combinando as palavras (tDCS AND BDNF) foram

encontrados 97 artigos no PUBMED, 91 no LILACS e no 3 no SCIELO e com a combinação dos termos (neuropathic pain AND tDCS AND BDNF) foram localizados 4 artigos no PUBMED, 4 no LILACS e nenhum no SCIELO. Com a combinação dos termos (neuropathic pain AND mTOR) foram encontrados 84 estudos no PUBMED, 78 no LILACS e nenhum no SCIELO, combinando os termos (tDCS AND mTOR) foram encontrados 3 artigos no PUBMED, 3 no LILACS e nenhum no SCIELO e, finalmente com a combinação dos termos (neuropathic pain AND tDCS AND mTOR) não foram encontrados artigos nas bases de buscas utilizadas (Fig. 1).

A partir da análise dos trabalhos publicados, foi possível observar que estudos que avaliam os efeitos da ETCC sobre os quadros de dor cresceram nos últimos anos. A ETCC vem sendo utilizada como uma alternativa de tratamento para as dores crônicas, no meio científico, apresentando resultados satisfatórios. Além disso, os estudos contemplam resultados, que demonstram efeitos divergentes da ETCC de acordo com o posicionamento dos eletrodos no couro cabeludo, bem como com a utilização de diferentes intensidades, tempos e frequências de estimulação.

Todavia, apesar de alguns mecanismos sugeridos por alguns autores, os artigos não elucidam totalmente os mecanismos pelos quais a ETCC reduz a dor e quais marcadores estão envolvidos nesse processo.

Alguns estudos avaliaram os efeitos da ETCC sobre os níveis de BDNF em modelos animais de dor neuropática em ratos adultos. No entanto, não há estudos que avaliem a relação da ETCC com a dor neuropática e o BDNF e a mTOR em ratos em desenvolvimento ou com os marcadores de estresse oxidativo, ou com a ADA, ou com a BuChE, em modelos animais, como propõe nosso estudo.

Palavras-chave:		
1 Neuropathic pain		
2 tDCS		
3 BDNF		
4 mTOR		
5 Oxidative stress		
6 Adenosine deaminase		
7 Butyrylcholinesterase		
Pubmed:	Lilacs:	Scielo:
1+2 = 122	1+2 = 99	1+2 = 1
1+3 = 376	1+3 = 328	1+3 = 1
2+3 = 97	2+3 = 91	2+3 = 3
1+2+3 = 4	1+2+3 = 4	1+2+3 = 0
1+4 = 84	1+4 = 78	1+4 = 0
2+4 = 3	2+4 = 3	2+4 = 0
1+2+4 = 0	1+2+4 = 0	1+2+4 = 0
1+5 = 437	1+5 = 421	1+5 = 9
2+5 = 4	2+5 = 4	2+5 = 0
1+2+5 = 0	1+2+5 = 0	1+2+5 = 0
1+6 = 8	1+6 = 10	1+6 = 0
2+6 = 0	2+6 = 0	2+6 = 0
1+2+6 = 0	1+2+6 = 0	1+2+6 = 0
1+7 = 3	1+7 = 1	1+7 = 0
2+7 = 0	2+7 = 0	2+7 = 0
1+2+7 = 0	1+2+7 = 0	1+2+7 = 0

Figura 1: Ferramentas utilizadas para busca de artigos científicos utilizados para essa revisão.

3.1 Sistema somatossensorial

O sistema somatossensorial é sensível a diferentes tipos de estímulo como à sensação ao toque, à temperatura, à dor e ao posicionamento corporal (BEAR et al., 2006). Seus receptores são distribuídos por toda extensão corporal e são responsivos a diferentes tipos de estímulo. Um único receptor pode codificar uma combinação de estímulos como intensidade, duração, posição e, em alguns casos, direção. No entanto, um único estímulo geralmente é capaz de ativar diversos receptores. O sistema nervoso central recebe os sinais e os interpreta caracterizando a percepção (BEAR et al., 2006).

Interessantemente, a maior parte dos receptores sensoriais do sistema somatossensorial são mecanorreceptores, os quais são

sensíveis à deformidade física, como flexão ou estiramento. Eles estão presentes pela extensão corporal e monitoram o contato com a pele, a pressão no coração e dos vasos sanguíneos, o estiramento de órgãos digestivos e da bexiga urinária e a força contra os ossos (BEAR et al., 2006; STOELTING et al., 2016). No interior de cada mecanorreceptor localizam-se ramos de axônios não mielinizados. Esses axônios possuem canais iônicos sensíveis a sinais mecânicos e sua porta de entrada depende do estiramento ou de alterações na tensão da membrana circundante (BEAR et al., 2006).

Ademais, a pele é ricamente innervada por axônios que cursam através da rede de nervos periféricos no seu caminho até o SNC. Os axônios que levam a informação dos receptores somáticos sensoriais até a medula espinal ou até o tronco cerebral são neurônios aferentes primários do sistema nervoso sensorial somático. Os axônios aferentes primários penetram a medula espinal através das raízes dorsais. Seus corpos celulares se encontram nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal (Fig.2) (BEAR et al., 2006).

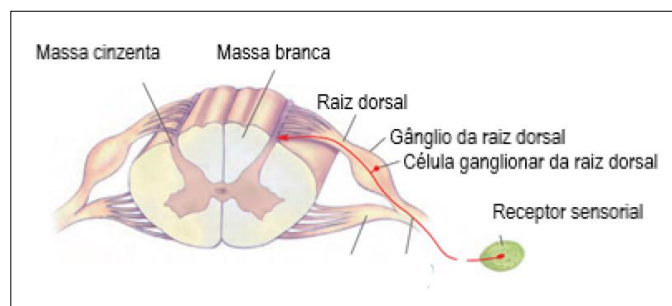


Figura 2: A estrutura da medula espinal e suas raízes.
Fonte: Traduzido de Bear et al., 2006, p.393.

Esses axônios aferentes primários possuem diâmetro variável e seus tamanhos estão correlacionados com o tipo de receptor sensorial com os quais eles são conectados. A figura 3 mostra, em ordem decrescente de tamanho, axônios de receptores sensoriais da pele os quais são designados por A β , A δ e C, respectivamente. Os axônios das fibras C são não mielinizados, enquanto os axônios das demais fibras são mielinizados. O diâmetro do axônio associado à mielina determina a velocidade de condução do potencial de ação. Os axônios das fibras C, medeiam a resposta de dor e de temperatura, possuem menor

diâmetro e não possuem mielina sendo os axônios de condução mais lenta. Por outro lado, os axônios das fibras A β e A δ conduzem mais rapidamente o sinal sensorial (BEAR et al., 2006, WOLF e MA, 2007).

Axônios na pele	A β	A δ	C
			
Diâmetro (μm)	6–12	1–5	0.2–1.5
Velocidade (m/seg)	35–75	5–30	0.5–2
Receptor sensorial	Mecanor-receptores na pele	Dor, temperatura	Dor, temperatura prurido

Figura 3: Diferenças entre axônios aferentes primários sensoriais. Legenda: Micrômetro (μm); metro (m); segundo (seg).
Fonte: Adaptado de Bear et al., 2006, p.393.

A transmissão do estímulo sensorial ocorre através da medula espinal. A medula espinal é composta por um núcleo de massa cinzenta, rodeada por uma camada de massa branca, determinada por colunas. As zonas da massa cinzenta são conhecidas como corno ventral, corno dorsal e zona intermediária, conforme demonstrado na figura 4 (BEAR et al., 2006).

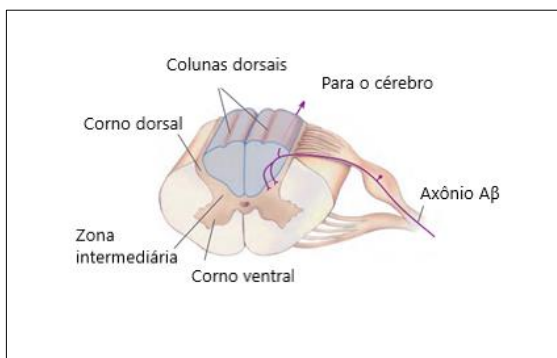


Figura 4: A trajetória da sensação de toque mediada por axônios A β na medula espinal.
Fonte: Traduzido de Bear et al., 2006, p.397.

Os neurônios que recebem o sinal sensorial dos aferentes primários são denominados neurônios sensoriais de segunda ordem. A maior parte desses neurônios se conectam no corno dorsal da medula espinal. Um axônio mielinizado A β converte informação até o corno dorsal da medula espinal. Um ramo faz sinapse com um neurônio de segunda ordem e inicia uma gama de reflexos inconscientes e outro ramo é ascendente diretamente até o cérebro, caracterizando a percepção do sinal enviado (BEAR et al., 2006).

3.2 Nocicepção e dor

A dor é um processo fisiológico que envolve uma série de processos neurais complexos e aspectos relacionados à condição física, emocional e psicológica (RIEDEL e NEECK, 2001; STOELTING et al., 2016). O sistema nociceptivo possui propriedades adaptativas, podendo ser modificado estrutural e funcionalmente por diferentes estímulos fisiológicos e patológicos (STOELTING et al., 2016).

A dor é diferente da nocicepção. A dor pode ser definida pela sensação ou percepção de irritação, prurido, latejamento ou sensação insuportável que chega de uma parte do corpo. A nocicepção é o processo sensorial que produz os sinais que levam à dor (BEAR et al., 2006).

O processamento da dor pode ser definido por etapas distintas definidas como transdução, transmissão, modulação e percepção. A transdução ocorre pela conversão de um estímulo nocivo (térmico ou mecânico) em impulso elétrico nas terminações nervosas sensoriais (STOELTING et al., 2016).

A transmissão consiste na condução desses impulsos elétricos para o SNC. A modulação é definida pela transmissão do sinal nociceptivo por meio da ativação e/ou inibição de mecanismos excitatórios e inibitórios e a percepção ocorre em nível supraespinal, mais especificamente no córtex cerebral (STOELTING et al., 2016).

Embora os nociceptores possam ser ativados de forma extrema e contínua, a dor pode ser eventual. Por outro lado, a dor pode ser agonizante mesmo na ausência da atividade dos nociceptores.

Diferentemente dos demais sistemas sensoriais, a nocicepção pode ser controlada unicamente pelo cérebro (BEAR et al., 2006).

Os nociceptores são terminações nervosas livres, ramificadas que sinalizam ao tecido corporal que está sendo danificado ou que corre o risco de ser danificado (BEAR et al., 2006; STOELTING et al., 2016). A lesão tecidual pode originar de estimulação mecânica, temperatura extrema, deprivação de oxigênio e exposição a agentes químicos, dentre outros (BEAR et al., 2006).

Os nociceptores são formados por quatro estruturas básicas: a terminação periférica que traduz o estímulo externo e inicia o potencial de ação, o axônio que é responsável por conduzir o potencial de ação, o corpo celular que mantém a integridade do neurônio e o terminal que forma o elemento pré-sináptico da primeira sinapse da via sensorial do SNC (WOLF e MA, 2007).

O simples alongamento ou curvatura da membrana do nociceptor ativa, mecanicamente, a abertura de canais iônicos que induz a célula a despolarizar e gerar potenciais de ação. Adicionalmente, as células danificadas no local da lesão podem liberar substâncias, como proteases, ATP e íons K^+ , ocasionando a abertura de canais iônicos na membrana dos nociceptores. As proteases agem promovendo a quebra de peptídeos que dão origem ao peptídeo bradicinina. A bradicinina se liga a receptores específicos que ativam a condução iônica em alguns nociceptores. O ATP se liga a canais iônicos dependentes de ATP ocasionando a despolarização desses nociceptores. Ademais, a elevação da concentração de K^+ extracelular também induz a despolarização da membrana neuronal (BEAR et al., 2006).

A transdução do estímulo doloroso ocorre nas terminações nervosas livres de fibras C não mielinizadas e nas terminações nervosas de fibras A δ finamente mielinizadas. A maioria dos nociceptores respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, sendo denominados de polimodais (BEAR et al., 2006, RIEDEL e NEECK, 2001). No entanto, alguns nociceptores podem ter maior especificidade para estímulos específicos. Os nociceptores estão

presentes na maioria dos tecidos corporais incluindo órgãos internos, vasos sanguíneos e o coração. No tecido cerebral estão presentes apenas nas meninges (BEAR et al., 2006).

Os nociceptores são ativados apenas quando o estímulo é suficiente para ocasionar danos aos tecidos (BEAR et al., 2006; STOELTING et al., 2016). Uma vez danificado, o tecido torna-se sensibilizado e apresenta maior susceptibilidade à dor no local do dano, caracterizando hiperalgesia. A hiperalgesia pode ser definida pela redução do limiar de dor, pela intensidade aumentada a estímulo doloroso e dor espontânea (BEAR et al., 2006; RIEDEL e NEECK, 2001). A hiperalgesia primária ocorre na área lesada, no entanto, o tecido ao redor da área danificada também é sensibilizado caracterizando o processo de hiperalgesia secundária (BEAR et al., 2006).

A hiperalgesia é provocada por diferentes mecanismos, incluindo a ativação de receptores periféricos e no local e ao redor do tecido lesionado e no SNC. A liberação de substâncias químicas modula a excitabilidade dos nociceptores, tornando-os mais sensíveis a estímulos mecânicos e térmicos. A bradicinina promove a despolarização dos nociceptores, estimulando alterações intracelulares duradouras, sensibilizando os canais iônicos ativados por calor. As prostaglandinas sensibilizam os nociceptores a outros tipos de estímulos e são produtos do metabolismo do ácido araquidônico pela ação da enzima ciclooxigenase. O ácido araquidônico é resultante do metabolismo de fosfolípidos, pelo rompimento da membrana plasmática desencadeado pela ação da fosfolipase A2, mediante ocorrência de lesão. A substância P é um peptídeo sintetizado apenas por nociceptores. A liberação de substância P de um ramo do axônio do nociceptor provoca a liberação de substância P por axônios vizinhos promovendo vasodilatação e liberação de histamina pelos mastócitos. A sensibilização de nociceptores próximos ao local da lesão pela substância P é uma das causas de hiperalgesia secundária. Mecanismos centrais também contribuem para a hiperalgesia secundária. Após a lesão, a ativação dos mecanorreceptores A β pelo

toque pode provocar dor (Fig. 5) (BEAR et al., 2006; TOTSCH e SORGE, 2017).

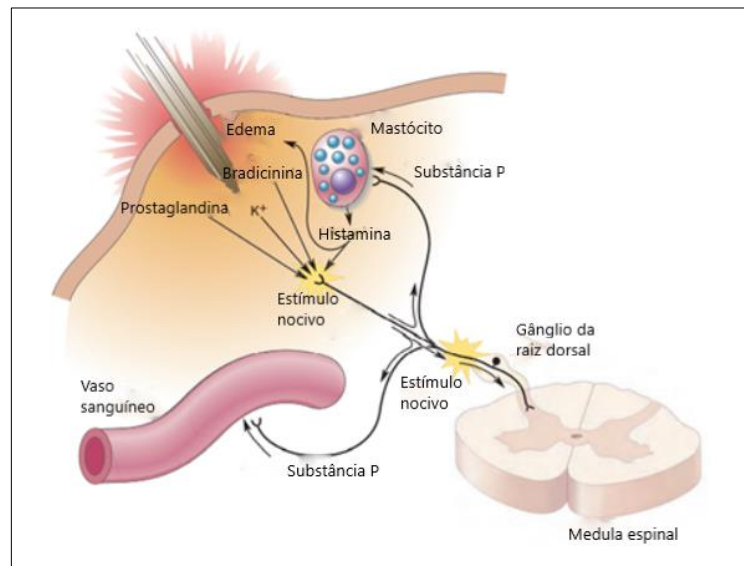


Figura 5: Mediadores químicos periféricos da dor e da hiperalgesia.
Fonte: Traduzido de Bear et al., 2006, p. 411.

As fibras aferentes de nociceptores periféricos entram na medula espinal através da raiz dorsal e fazem sinapse com neurônios do corno dorsal para integração primária da informação nociceptiva periférica. Os terminais centrais dos aferentes primários ocupam localizações espaciais altamente ordenadas no corno dorsal (STOELTING et al., 2016).

As fibras A δ e C levam informação ao SNC em diferentes velocidades, a dor inicial é ocasionada pela ativação das fibras A δ , de condução rápida e a dor duradoura é ocasionada pela ativação das fibras C, de condução lenta (TOTSCH e SORGE, 2017). Os corpos celulares das fibras de pequeno diâmetro localizam-se no gânglio da raiz dorsal, os quais penetram no corno dorsal da medula espinal. As ramificações das fibras percorrem uma curta distância na zona de Lissauer e fazem sinapse com as células da região da substância gelatinosa (BEAR et al., 2006).

Regulação ascendente:

Os axônios de segunda ordem ascendem imediatamente através do trato espinotalâmico pela região ventral da medula espinal

(Fig. 6). As fibras espinotalâmicas projetam-se pela medula espinal até o tálamo sem fazer sinapse. Após esse ponto, ocorre uma sinapse entre o tálamo e o córtex somatossensorial (BEAR et al., 2006; RIEDEL e NEECK, 2001).

Assim, as vias ascendentes do trato espinotalâmico e do trato espino-hipotalâmico ascendem da medula espinal para o tronco cerebral e o tálamo e são importantes para a percepção e a integração da informação nociceptiva. O trato espinotalâmico relaciona-se mais intimamente com a dor e a temperatura (STOELTING et al., 2016).

As variações de temperatura são detectadas por termorreceptores. Esses receptores sensíveis à temperatura são encontrados no hipotálamo, e a medula espinal é importante para manter as respostas que mantêm a temperatura corporal estável. Existem 6 tipos de termorreceptores, os receptores anquirina com domínio transmembrana tipo 1 (Anktm1) e canal catiônico de potencial do receptor transitório de melastatina (TRPM8), que detectam a sensação de frio (temperatura abaixo de 25 °C), e os receptores canais catiônicos de potencial do receptor transitório de vanilóide (TRPV) subtipos TRPV1, TRPV2, TRPV3 e TRPV4 que detectam calor (temperatura acima de 30 °C). Os receptores de baixa temperatura são acoplados às fibras A δ e C, enquanto os receptores de temperatura elevada são acoplados apenas às fibras C (BEAR et al., 2006; WOLF e MA, 2007).

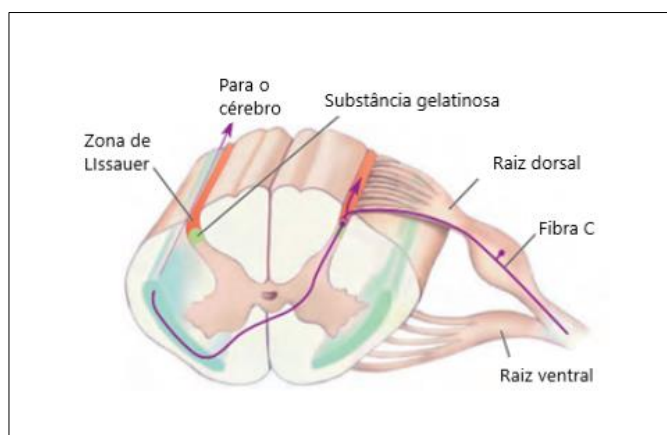


Figura 6: Conexão espinal de axônios nociceptivos.
Fonte: Traduzida de Bear et al., 2006, p.412.

Ademais, a transmissão da dor ocorre através de neurônios do corno dorsal que projetam seus axônios via trato espinotalâmico por axônios sensoriais de diâmetro largo e por axônios não mielinizados. A projeção neuronal é inibida por um interneurônio que é excitado pelos axônios sensoriais não nociceptivos e inibida pelos axônios de transmissão da dor. A atividade no axônio de transmissão da dor excita a projeção neuronal, permitindo que os sinais nociceptivos cheguem até o cérebro. No entanto, se os axônios de diâmetro largo (mecanorreceptivos) disparam ocorre ativação do interneurônio e supressão do sinal nociceptivo (Fig. 7) (BEAR et al., 2006). A teoria do portão propõe que a informação dolorosa é projetada para as regiões cerebrais supraespinais quando o portão está aberto, ao passo que o estímulo doloroso não é percebido quando o portão está fechado em decorrência de impulsos inibitórios simultâneos (STOELTING et al., 2016).

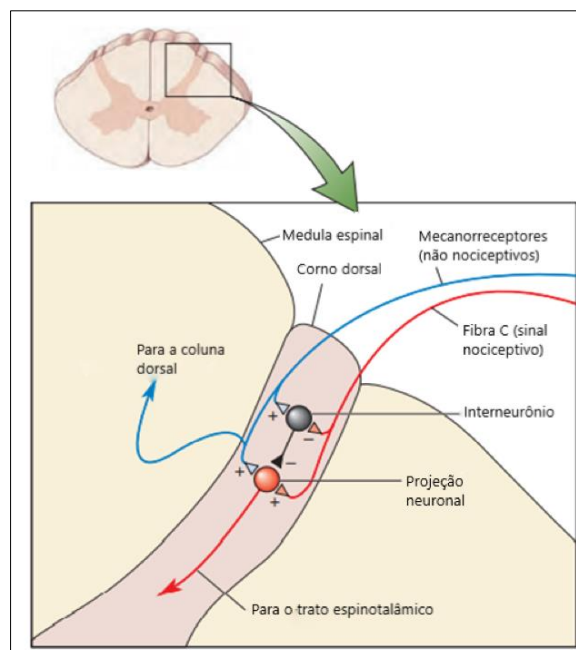


Figura 7: A teoria do portão da dor. A retransmissão do sinal nociceptivo do neurônio de projeção é bloqueada pela atividade de um interneurônio inibitório.

Fonte: Traduzido de Bear et al., 2006, p.417.

Regulação descendente:

Na modulação supraespinal da dor: diversas áreas cerebrais foram identificadas como criticamente envolvidas com a formação de

aspectos emocionais da dor e a modulação central da percepção dolorosa (STOELTING et al., 2016).

As vias descendentes para a modulação da dor originam-se de regiões supraespinais que podem promover e suprimir a transmissão nociceptiva através do corno dorsal da medula espinal (STOELTING et al., 2016).

A zona periaquedutal de massa cinzenta recebe sinais de diferentes estruturas cerebrais. Os neurônios da zona periaquedutal enviam axônios descendentes para diversas regiões da medula espinal aos núcleos da Rafe (que utiliza serotonina como neurotransmissor). Esses neurônios medulares estendem-se ao corno dorsal da medula espinal e deprimem a atividade nociceptiva neuronal (BEAR et al., 2006).

3.3 Modelos animais de nocicepção

Os modelos animais de nocicepção são imprescindíveis para o entendimento da dor neuropática e para o desenvolvimento de terapias eficazes (JAGGI et al., 2011). JAGGI et al., 2011 citam alguns destes modelos conforme descrito a seguir:

3.3.1 Axotomia

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

3.3.2 Ligação parcial do nervo ciático

Consiste na dissecação da pata traseira esquerda para expor o nervo ao nível da coxa, possibilitando ligar o terço dorsal até a metade do nervo ciático. Esse modelo produz sinais comportamentais de dor espontânea observada na forma de proteção e lambida da pata no lado da lesão. Alodinia e hiperalgesia mecânica ocorrem dentro de uma semana após a cirurgia e a maioria das alterações persistem por 6 semanas. A magnitude e a duração das respostas à dor variam em função do fio de sutura utilizado e da espécie em estudo. É um modelo relevante para a compreensão da lesão neuropática e de distúrbios da dor causal em humanos.

3.3.3 Lesão nervosa

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

3.3.4 Lesão por constrição crônica

O modelo de dor aplicado neste estudo se baseou no protótipo de constrição crônica unilateral do nervo ciático conforme previamente descrito por Bennet e Xie (1988).

Conforme descrito, o modelo consiste na realização de uma incisão cirúrgica do tecido epitelial sobre a área entre os músculos glúteo e bíceps femoral, sob anestesia. O nervo ciático é exposto através dessa secção, e 3 ou 4 amarraduras são executadas, próximo à trifurcação ciática, com distância de 1 milímetro entre as amarraduras. A sutura indicada para a constrição é categut cromado

4-0 ou seda 4-0 e deve ser realizada até a observação de uma breve contração muscular, para que a constrição seja executada de forma que não impeça o fluxo sanguíneo epineural. Os animais desenvolvem alterações comportamentais de alodinia e hiperalgesia mecânica e térmica dentro de uma semana, observadas por meio de comportamentos relacionados à dor espontânea, como autonomia leve a moderada, movimentos anormais da pata traseira e assimetrias posturais. As alterações dolorosas permanecem por pelo menos 7 semanas após o procedimento cirúrgico. Ocorre diminuição na velocidade da condução nervosa e maior dano em axônios mielinizados do que em axônios não mielinizados, havendo neuropatia periférica unilateral. Como desvantagens, o modelo apresenta um grau de variabilidade decorrente da discrepância de pressão realizada no momento da amarradura. Adicionalmente, o material da sutura e as diferentes espécies de ratos utilizadas também podem contribuir para que ocorram divergências na aplicabilidade deste modelo. Apesar disso, o modelo tem contribuído para maiores investigações sobre os mecanismos de desenvolvimento da dor neuropática e na pesquisa para avaliação de eficácia de novos tratamentos para essa condição. Pelos motivos citados, pela facilidade de execução da técnica de indução da lesão, associados às características desse modelo, o qual vem demonstrando resultados positivos para a pesquisa da dor neuropática, justifica-se a escolha de utilização da lesão por constrição crônica unilateral do nervo ciático neste estudo. De acordo com Jaggi et al. (2011), o modelo proposto pelos autores é amplamente utilizado em pesquisas que visam a utilização de modelos animais de dor neuropática. O modelo de lesão por constrição crônica do nervo periférico permite a investigação da efetividade de potenciais agentes terapêuticos que possam modificar a dor neuropática (ILARI et al., 2020).

3.4 Dor neuropática

A dor neuropática é definida pela dor que surge como consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema

nervoso somatossensorial (IASP, 2014). Esse tipo de dor pode originar no SNC ou no SNP (KHANGURA et al., 2019).

A dor neuropática central é consequência de uma lesão no SNC que resulta de lesão na medula espinal, acidente vascular cerebral ou esclerose múltipla. A dor neuropática periférica pode resultar de danos aos nervos periféricos sensoriais, motores ou autonômicos, sendo geralmente observada, em pacientes com tumores invasivos, doenças metabólicas, síndrome do disco lombar, infecções de diferentes etiologias, trauma mecânico e após procedimentos cirúrgicos (COSTIGAN et al., 2009; KHANGURA et al., 2019).

A dor persistente geralmente é gerada por uma lesão nos nervos periféricos, a qual progride ocasionando a dor crônica (SOMMER et al., 2018). Por sua vez, as alterações do comportamento doloroso são resultantes das modificações ocasionadas pela lesão (KHALIL e KHODR, 2001). Os sintomas relatados são a exacerbação das respostas nociceptivas descritas por pacientes e observadas em modelos animais, bem como, o decréscimo do limiar de dor percebido pela dor provocada por estímulo térmico ou mecânico (COSTIGAN et al., 2009; LOPES et al., 2021).

A lesão nervosa é necessária para gerar dor neuropática, no entanto, outros fatores influenciam o desenvolvimento da dor. A dor neuropática persistente é influenciada pelo polimorfismo genético, o sexo e a idade (COSTIGAN et al., 2009). Uma vez ativado o processo, a atividade neuronal exacerbada pode se desenvolver no local da lesão, no corno dorsal da medula espinal ou em regiões cerebrais que participam do processamento de informações somatossensoriais (KHANGURA et al., 2019).

Adicionalmente, adaptações estruturais e funcionais das células modificam o sistema nervoso somatossensorial em nível morfológico e neuroquímico (MUTSO et al., 2012; TIWARI; GUAN, RAJA, 2014). Essas alterações influenciam a geração de potenciais de ação ectópicos, amplificam a transmissão sináptica, promovem a perda de conexões sinápticas, bem como a formação de novos circuitos

sinápticos e de novas interações neuro-imunes (COSTIGAN et al., 2009).

Os mecanismos relacionados à dor neuropática originam de mediadores inflamatórios liberados ao redor do tecido periférico danificado e de descargas ectópicas do nervo lesionado levando ao estado de hiperexcitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula espinal. A sensibilização central é o principal fator contribuinte para o desenvolvimento da dor neuropática. Diversos mediadores e neurotransmissores participam desse processo (COSTIGAN et al., 2009).

Os mecanismos que envolvem a sensibilização neuronal estão descritos a seguir:

3.4.1 Sensibilização periférica:

A partir do momento em que o SNP é lesionado, mediadores químicos e celulares são liberados no local do trauma. Os nociceptores liberam substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que induzem células imunes, como o mastócito, a secretar histamina e atraem mais células inflamatórias da corrente sanguínea, que por sua vez liberam citocinas. Os nociceptores respondem diretamente às citocinas e a outros mediadores inflamatórios produzidos no tecido inflamado (Fig. 8) (COSTIGAN et al., 2009; NGERNYAM et al., 2013; STOELTING et al., 2016).

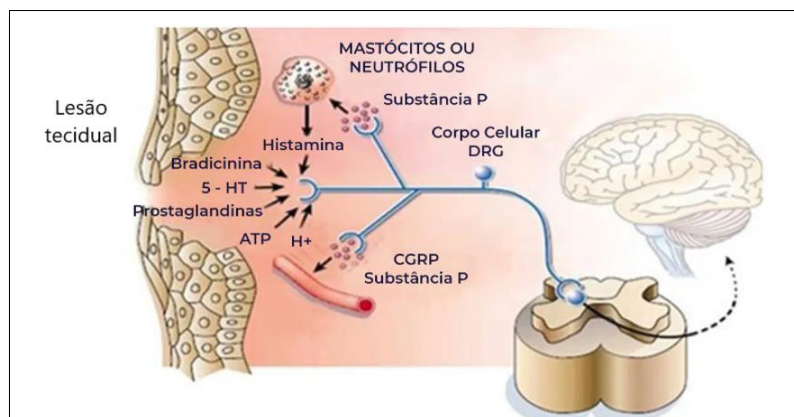


Figura 8: Sensibilização periférica. Legenda: Adenosina trifosfato (ATP); Gânglio da raiz dorsal (DRG); Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP); Serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) e íon de hidrogênio (H^+).

Fonte: Disponível em: <https://www.dorcronica.blog.br/fisiopatologia-da-dor/>. Acesso em: 10/05/2022.

A interleucina-1beta (IL-1 β), o fator de necrose tumoral (TNF), a bradicinina e o fator de crescimento do nervo (NFG) induzem a descarga do potencial de ação (COSTIGAN et al., 2009) por aumentar as correntes de sódio (Na⁺) e cálcio (Ca²⁺) no terminal do nociceptor periférico (COSTIGAN et al., 2009; NGERNYAM et al., 2013).

Os efeitos desses mediadores inflamatórios são estendidos aos axônios dos neurônios aferentes primários intactos aumentando a excitabilidade neuronal desses neurônios (revisado por SMITH, P., 2014; NARO et al., 2016). Como consequência, a ativação das vias de transdução de sinalização intracelular aumenta a produção, o transporte e a disponibilidade de canais transdutores e canais iônicos voltagem-dependentes na membrana. O limiar de ativação é reduzido e ocorre aumento da excitabilidade da membrana celular (COSTIGAN et al., 2009).

Esse processo altera o posicionamento e o quantitativo de canais iônicos, principalmente os canais de Na⁺ presentes nas fibras nociceptivas lesionadas e nos seus respectivos gânglios da raiz dorsal da medula espinal. Essas modificações diminuem o limiar de despolarização e ocasionam descargas espontâneas exacerbadas em determinados pontos e, conseqüentemente, promovem aumento da resposta nociceptiva a estímulos térmicos e mecânicos (COSTIGAN et al., 2009; NGERNYAM et al., 2013).

3.4.2 Sensibilização espinal:

Após a lesão neural, mediadores inflamatórios são liberados pela micróglia e por células imunes periféricas na medula espinal, ativando neurônios nociceptivos de segunda ordem, contribuindo para o estabelecimento da dor neuropática.

Esse processo acontece por meio da ativação da resposta imune inata nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal. Após a lesão, os níveis de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL) 1 beta (1 β), o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), o interferon alfa (IFN α) e as quimiocinas aumentam, assim como marcadores da microglia

ativada, astrócitos e células-T. TNF α e IFN α apresentam importância clínica no desenvolvimento do processo de dor neuropática (GALBAVY et al., 2015).

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

A ação desses mediadores leva à liberação de mais mediadores nos terminais neuronais no corno dorsal da medula espinal (SMITH, P., 2014; NARO et al., 2016). Essas substâncias incluem a quimiocina motivo C-C ligante 21 (CCL-21), a proteína quimiotática de monócito atraente 1 (MCP-1) e a fractalcina (BEGGS; SALTER, 2013).

A interação dessas quimiocinas com os receptores na microglia quiescente promove a expressão do receptor purinérgico P2X4. O restante da microglia passa a expressar o mesmo receptor (revisado por SMITH, P., 2014). O influxo de Ca⁺² através dos receptores purinérgicos P2X4R estimula a fosforilação e ativação da proteína cinase ativada por mitógeno p38 (MAPK-p38) a qual promove a síntese de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e sua liberação pela microglia (BEGGS; SALTER, 2013; FERRINI; DE KONINCK, 2013).

Essas alterações acarretam o desenvolvimento lento de alterações na atividade de neurônios de segunda ordem em neurônios do corno dorsal da medula espinal e acarretam um aumento geral da excitabilidade neuronal que é responsável pelo mecanismo de sensibilização central (NARO et al., 2016).

A microglia pode estar envolvida nos processos iniciais de desenvolvimento da dor persistente. A manutenção da dor neuropática parece ser dependente da ativação dos astrócitos e da contínua ativação da microglia (Fig. 9) (ZHANG; DE KONINCK, 2006; VACCA et al., 2014).

Essas mudanças ocasionam a diminuição do limiar de ativação aumentando a resposta a estímulos, em relação a sua magnitude e

duração, resultando no aumento da excitabilidade e da sensibilidade nos neurônios da medula espinal (NGERNYAM et al., 2013).

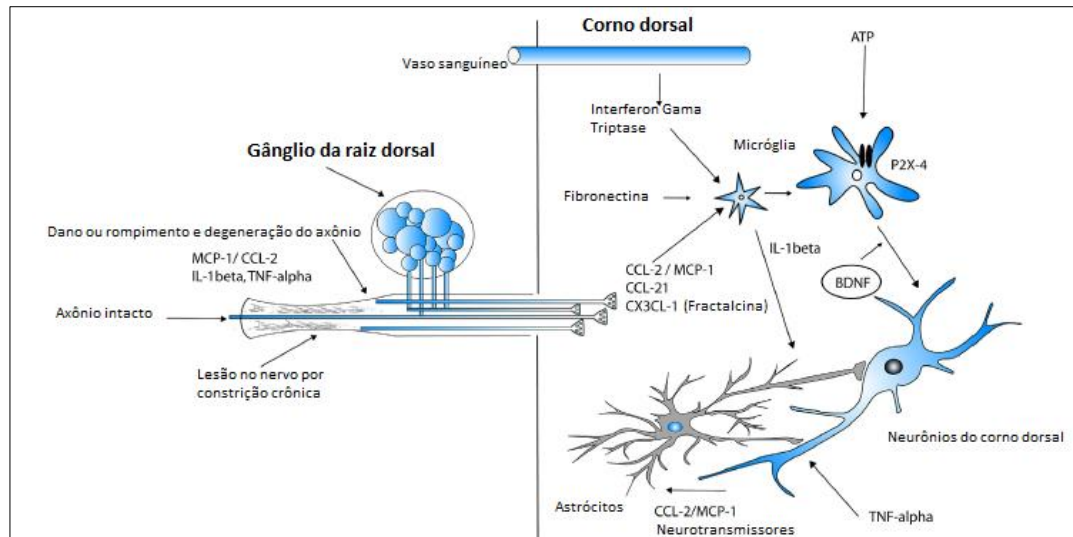


Figura 9: Mecanismo de ativação da dor e de sensibilização central após lesão.
Fonte: Adaptado de Smith, 2014, p. 4.

Na sensibilização central dos neurônios do corno dorsal, a inflamação e a lesão periférica de nervos podem alterar a eficácia sináptica e induzir a sensibilização central nos neurônios do corno dorsal, considerada como um mecanismo fundamental subjacente à indução e à manutenção da dor crônica. Uma forma de sensibilização central é o aumento da sensibilidade de neurônios do corno dorsal, um aumento progressivo e dependente de atividade de resposta de neurônios primários (fibras C) ao longa de uma cadeia de impulsos (*wind-up*). A segunda forma de sensibilização central é uma plasticidade sináptica atividade-dependente que resiste ao estímulo inicial por dezenas de minutos (STOELTING et al., 2016).

3.4.3 Sensibilização supraespinal:

Os mecanismos que levam à sensibilização central não estão totalmente esclarecidos (SMITH, P., 2014). No entanto, um dos possíveis mecanismos se baseia na desregulação talâmica que inibe o sistema de modulação da dor no tálamo (NGERNYAM et al., 2013). Esse mecanismo ocorre quando a via inibitória ou modulatória é

perdida ou suprimida, resultando no aumento anormal da excitabilidade de neurônios centrais (NGERNYAM et al., 2013).

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

Resumidamente, a figura 10 exemplifica as diferenças entre dor nociceptiva e dor neuropática.

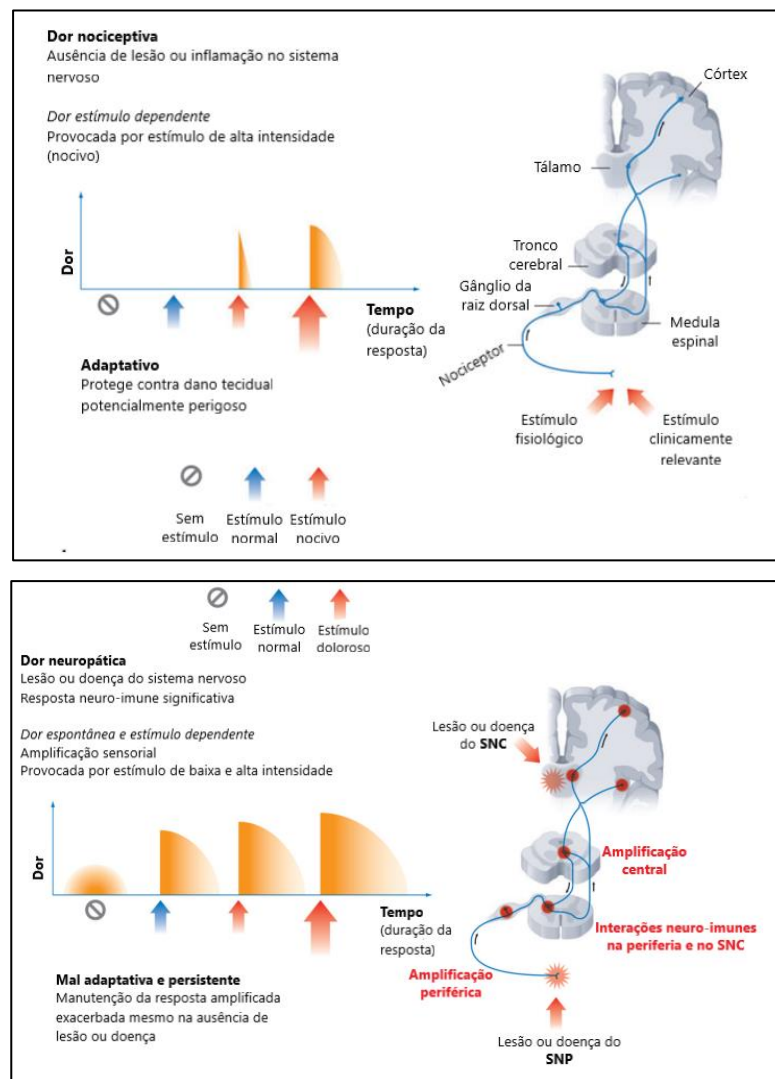


Figura 10: Diferenças entre dor nociceptiva e dor neuropática.
Fonte: Adaptado de Costigan et al., 2009, p. 25-26.

3.4.4 Transmissão sináptica mediada por glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso. Existem diferentes tipos de receptores de glutamato, amplamente divididos em metabotrópicos (acoplados à proteína G) e ionotrópicos (canais iônicos). Dentre os receptores ionotrópicos podemos citar os receptores NMDA, 3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato. Os receptores NMDA e AMPA medeiam as sinapses excitatórias rápidas no cérebro (GONÇALVES-RIBEIRO et al., 2019; WILLARD e KOOCHPKPOUR, 2013). Os receptores AMPA são permeáveis aos íons Na^+ e K^+ e, em maior parte, não permeável aos íons Ca^{2+} . Sua principal função é permitir a entrada de Na^+ para o interior da célula ocasionando despolarização. Os receptores AMPA coexistem com os receptores NMDA em uma diversidade de sinapses, assim a maior parte do potencial excitatório pós-sináptico tem envolvimento de ambos os receptores. O potencial excitatório pós-sináptico altera a excitabilidade da célula pós-sináptica, podendo ou não ser suficiente para gerar o potencial de ação e a liberação de neurotransmissores no neurônio pós-sináptico (BEAR et al., 2006).

Os receptores NMDA também são capazes de ocasionar despolarização neuronal permitindo a entrada de Na^+ para o interior da célula, mas difere dos receptores AMPA por ser permeável aos íons Ca^{2+} e por sua ativação ser voltagem-dependente. Quando o glutamato se liga ao NMDA, íons Na^+ e Ca^{2+} entram na célula e íons K^+ saem, no entanto, a magnitude como esse fluxo ocorre depende do potencial de membrana pós-sináptico. Mediante o estado negativo do potencial de membrana o Mg^{2+} bloqueia a passagem de outros íons pelo receptor NMDA, liberando a passagem apenas quando há despolarização da membrana (Fig. 11) (BEAR et al., 2006; GONÇALVES-RIBEIRO et al., 2019).

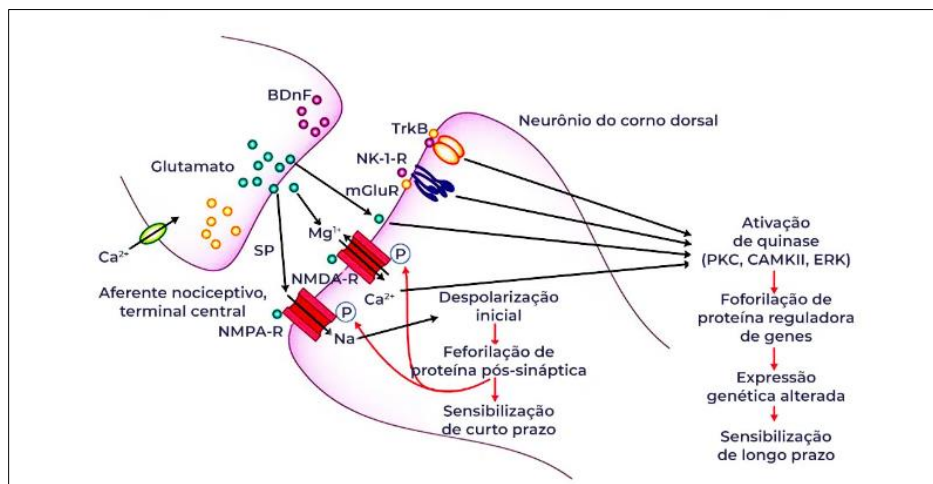


Figura 11: Conexões sinápticas no neurônio do corno dorsal da medula espinal. Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); Receptor metabotrópico de glutamato (mGluR); Receptor n-metil-D-aspartato (NMDA); Receptor tropomiosina-quinase B (TrkB); Receptor neuroquinina-1 (NK-1-R); Substância P (SP).

Fonte: Disponível em: <https://www.dorcronica.blog.br/fisiopatologia-da-dor/> Acesso em: 11/05/2022.

A extensa ativação dos receptores NMDA ocasiona o fortalecimento da transmissão sináptica. Este evento é denominado LTP. A ativação extensa do NMDA resulta em aumento da concentração de cálcio no neurônio pós-sináptico e a exposição de mais receptores AMPA na membrana sináptica, potencializando a transmissão sináptica e a formação de novas conexões sinápticas (Fig. 12). Por outro lado, em condições de baixos níveis de NMDA e baixas concentrações de Ca^{2+} , pode ocorrer uma sinapse de baixa efetividade denominada depressão de longa duração (LTD) (BEAR et al., 2006; GONÇALVES-RIBEIRO et al., 2019; WILLARD e KOOCHPKPOUR, 2013).

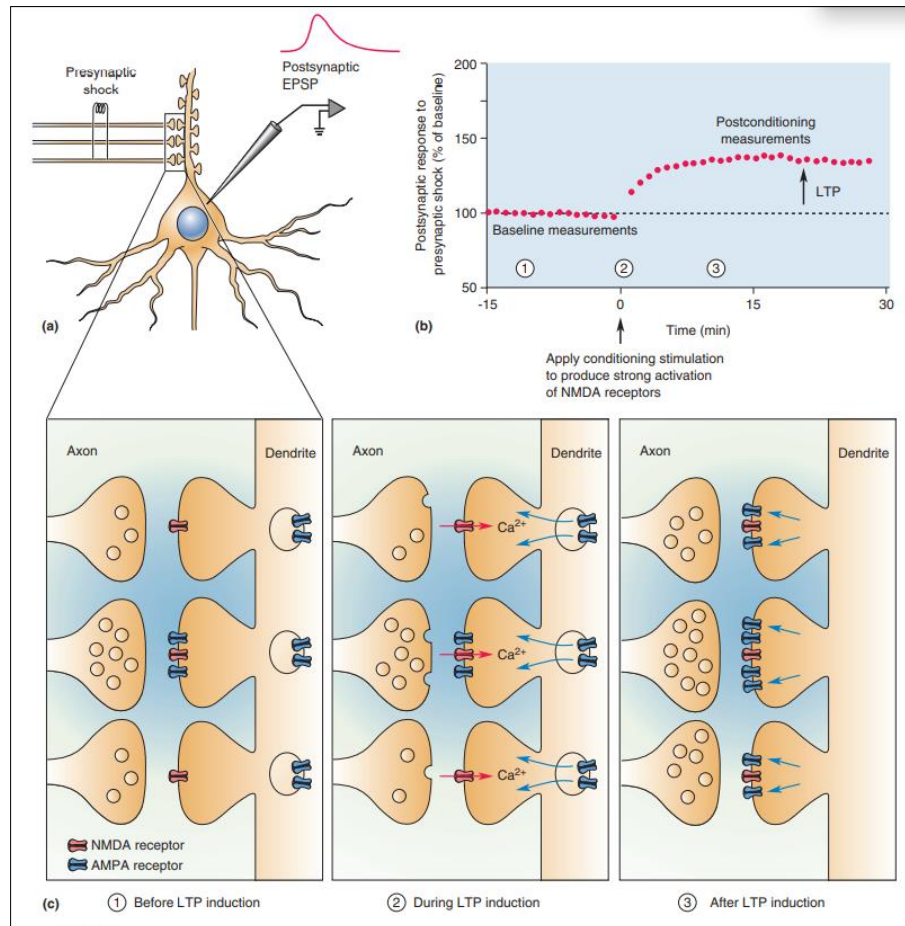


Figura 12: Potenciação de longa duração (LTP).

Fonte: BEAR et al., 2006, p. 719.

O neurotransmissor de maior importância para o sistema nervoso também pode apresentar alta toxicidade neuronal. A falta de aporte de oxigênio (O_2) pode desencadear a liberação de glutamato. A baixa disponibilidade de O_2 acarreta diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP), e da atividade das bombas iônicas, ocasionando a despolarização da membrana e a entrada de Ca^{2+} para o interior das células neuronais, e consequentemente a liberação de mais glutamato, formando um ciclo vicioso. Quando o glutamato atinge altas concentrações, os neurônios atingem um estado de hiperexcitabilidade ocasionando a morte neuronal (BEAR et al., 2006). A contínua estimulação dos receptores de glutamato e de moléculas de sinalização pós-sináptica resulta em um fenômeno chamado de excitotoxicidade glutamatérgica (WILLARD e KOOCHPKPOUR, 2013). O glutamato promove a ativação de diversos tipos de receptores acarretando altas concentrações de Na^+ , potássio (K^+) e Ca^{2+} e

aumentando o fluxo desses íons através da membrana. O receptor de glutamato do tipo NMDA apresenta papel fundamental na excitotoxicidade, pois é o intermédio principal de entrada de Ca^{2+} na célula. Como consequência, o dano ou morte neuronal ocorre devido ao aumento da absorção de Ca^{2+} e subsequente estimulação de enzimas que degradam proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (BEAR et al., 2006; GONÇALVES-RIBEIRO et al., 2019; WILLARD e KOOCHPKPOUR, 2013).

3.5 Biomarcadores

3.5.1 BDNF

As neurotrofinas são uma família de quatro proteínas estruturalmente e funcionalmente relacionadas: BDNF, fator de crescimento do nervo (NGF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4/5 (NT-4/5) e pelos receptores tirosina quinase (Trk) subtipos A, B e C e o receptor neurotrófico p75 (p75NT). Produzidas na raiz do corno dorsal da medula espinal, possuem a função de regular o crescimento, a manutenção e a apoptose de neurônios do corno dorsal em desenvolvimento ou acometidos por lesão (revisado por KHAN e SMITH, 2015), intermediando diversas formas de plasticidade sináptica (VILLAR e MIRA, 2016).

Mais especificamente, o BDNF é proveniente da clivagem de sua forma imatura, o pró-BDNF (CHEERAN et al., 2008). O BDNF se liga à forma madura de receptores TrkB e dão suporte ao crescimento, à diferenciação, à sobrevivência celular e à plasticidade, pela ativação das vias de sinalização. Por sua vez, a ligação de sua forma imatura (pró-BDNF) ao receptor p75NT resulta na ativação da sinalização pró-apoptótica, regulando dessa forma, a morte celular (BARBIERI et al., 2018; revisado por KHAN e SMITH, 2015) (Fig. 13); A ligação do BDNF ao seu receptor ativa as vias de sinalização, promovendo aumento na duração da resposta a estímulos, sensibilização central e redução do limiar de ativação dos neurônios no corno dorsal da medula espinal (revisado por KHAN e SMITH, 2015; WU et al., 2013).

Esse envolvimento no processo de sensibilização central e na plasticidade da medula espinal leva ao desenvolvimento e à manutenção da dor neuropática. Dessa forma, o aumento da expressão de BDNF no corno dorsal da medula espinal e na raiz do gânglio dorsal da medula espinal estão associados à indução da dor neuropática nos estágios iniciais de lesão no nervo ou nos tecidos periféricos (CHEN et al., 2014; SINISCALCO et al., 2011).

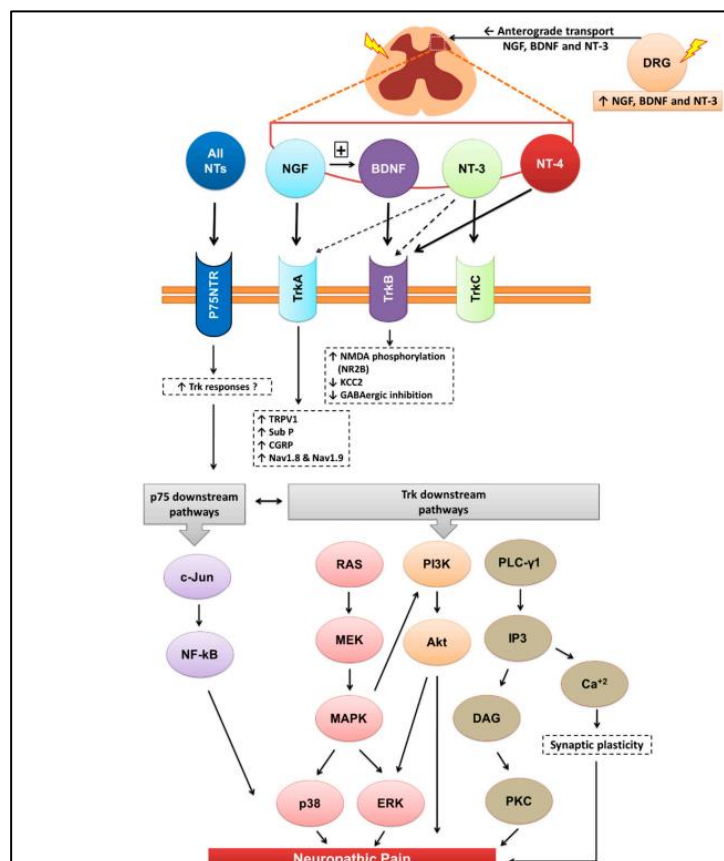


Figura 13: Ativação das vias de sinalização pelas neurotrofinas na modulação da dor neuropática. Fonte: Adaptado de KHAN e SMITH, 2015, p.10659.

3.5.2 Marcadores da disfunção mitocondrial

Em condições fisiológicas normais, a mitocôndria é responsável pela maior parte da produção de ATP neuronal (LIM et al., 2015). No entanto, situações patológicas podem gerar danos estruturais e funcionais na mitocôndria, resultando em uma série de defeitos no metabolismo celular, reduzindo a produção de ATP, aumentando a produção de ERO e ocasionando alterações no metabolismo celular,

caracterizando disfunção mitocondrial (revisado por ULLAH et al., 2021; YIN et al., 2012).

Em razão de sua natureza, as células neuronais necessitam de maior aporte de ATP e O₂ para manutenção de suas funções, tornando-se mais susceptíveis ao dano provocado pela disfunção mitocondrial (BEAR et al., 2006; revisado por ULLAH et al., 2021). Dessa forma, ficam mais propensos ao escape de elétrons da cadeia transportadora de elétrons, resultando na formação de radicais livres e induzindo o estresse oxidativo. Concomitantemente, a diminuição da eficácia do sistema de defesa antioxidante também contribui para o aumento da susceptibilidade neuronal induzido pelo dano oxidativo mitocondrial. Além disso, o aumento de radicais livres resulta em danos às biomoléculas das células neuronais, como também danifica os componentes mitocondriais, como o ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial e os componentes da cadeia transportadora de elétrons, resultando em prejuízo ao potencial eletroquímico através da membrana interna da mitocôndria ocasionando redução da produção mitocondrial de energia (revisado por ULLAH et al., 2021).

A cadeia transportadora de elétrons, também denominada de cadeia respiratória mitocondrial, consiste em 5 complexos (complexos I - dinucleotídeo de adenina e nicotinamida desidrogenase (NAD) reduzido ubiquinona oxidoreductase, II – succinato desidrogenase, III – ubiquinona citocromo c oxidoreductase, IV - citocromo c oxidase e V – ATP sintase) e é um dos maiores componentes estruturais e funcionais da mitocôndria, catalisando a fosforilação da adenosina difosfato (ADP) a ATP. Esses complexos são formados por subunidades proteicas associadas a grupos prostéticos como flavina mononucleotídeo (FMN), flavina dinucleotídeo (FAD), centros ferro-enxofre, heme e íons cobre (BRAND et al., 2013; NELSON e COX, 2010; revisado por ULLAH et al., 2021).

Os complexos I a IV constituem a cadeia transportadora de elétrons, a qual produz água (H₂O) pela oxidação do hidrogênio (derivado de ácidos orgânicos como o ácido pirúvico ou de ácidos graxos) com O₂. A produção de ATP envolve dois processos de forma

cadeira reduzem-se e ao transferir o elétron para o próximo componente, oxidam-se novamente (NELSON e COX, 2010).

Em condições fisiológicas, aproximadamente 1.5% do oxigênio é convertido em ERO, sugerindo que a maior parte das ERO são formadas na mitocôndria. A produção do radical superóxido e de outras ERO inicia nos complexos I e III. Em condições patológicas os radicais hidroxil ($\text{OH}^\cdot$), altamente reativos, podem danificar o DNA mitocondrial, as proteínas e os lipídeos, ocasionando perda funcional dos complexos I e III, promovendo a formação de radicais superóxido pelo aumento da redução do O_2 , acarretando estresse oxidativo metabólico, instabilidade genômica e dano celular (NELSON e COX, 2010, revisado por ULLAH et al., 2021).

O dano ao DNA mitocondrial pode reduzir a expressão de proteínas críticas para a cadeia transportadora de elétrons, aumentando o estresse oxidativo e a apoptose. A cadeia transportadora de elétrons também é sensível ao estresse nitrosativo, considerando que a nitração pode ocasionar alterações de proteínas mitocondriais, ocasionando modificações das funções de diversas enzimas metabólicas da cadeia transportadora de elétrons, como o NAD, o citocromo C oxidase e a ATP sintase. Além disso, a exposição aguda às ERO inativa os centros ferro-enxofre, enquanto a exposição crônica pode levar ao dano celular e de proteínas mitocondriais, lipídeos e do material genético. As ERO também ocasionam alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial. A membrana mitocondrial interna que é localizada próximo ao local de formação de ERO, é mais susceptível à peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica de fosfolipídeos pode aumentar a permeabilidade de prótons da membrana interna. O aumento da permeabilidade da membrana pode acarretar alterações da fluidez, assim como modificações das funções bioquímicas de diversos transportadores e enzimas presentes na membrana mitocondrial (revisado por ULLAH et al., 2021).

Além disso, a produção excessiva de ERO altera a homeostase do Ca^{2+} , onde o peroxinitrito inativa enzimas mitocondriais que afetam

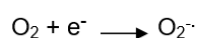
o estado de energia da célula levando à liberação de Ca^{2+} da mitocôndria. Os níveis elevados de Ca^{2+} alteram o potencial mitocondrial e resultam na produção de radicais superóxido que levam a um círculo vicioso. As alterações da permeabilidade mitocondrial do Ca^{2+} sobrecarregam a mitocôndria resultando em aumento da osmolaridade e ruptura da membrana mitocondrial externa. A produção de ERO na mitocôndria promove a recaptção do Ca^{2+} e aumenta a permeabilidade da membrana, resultando na liberação do citocromo c e iniciando o processo de apoptose (LIM et al., 2015; revisado por ULLAH et al., 2021).

3.5.2.1 ERO

As ERO ocorrem naturalmente como produto do metabolismo celular e tem importante papel na sinalização intracelular e extracelular (MUNOZ et al., 2017). Fisiologicamente, a produção de ERO ocorre em compartimentos celulares como a mitocôndria, o retículo endoplasmático, o peroxissomo e na membrana plasmática (BAE et al., 2018; MUNOZ et al., 2017).

Em geral, as ERO são formadas como intermediárias das reações de oxidação/redução resultando da conversão de O_2 em H_2O . As ERO são radicais livres como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ou não radicais derivados do O_2 , como o H_2O_2 (KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013; HSIAO et., 2019).

A produção dos radicais livres ocorre pela via de redução do oxigênio mitocondrial. A passagem de elétrons da ubiquinona reduzida (QH_2) ao complexo III e a passagem de elétrons do complexo I ao QH_2 envolvem o radical ubiquinona parcialmente reduzido ($\text{Q}^{\cdot-}$) como intermediário. Esse intermediário pode doar um elétron ao O_2 , formando $\text{O}_2^{\cdot-}$, conforme a reação:



Esse último radical é altamente reativo e sua formação também leva à produção de $\text{OH}^\cdot$, ainda mais reativo (NELSON e COX, 2010). A figura 15 demonstra a formação do $\text{OH}^\cdot$ pela reação do H_2O_2 com o Fe^{2+} e a formação de $\text{OH}^\cdot$ a partir de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$:

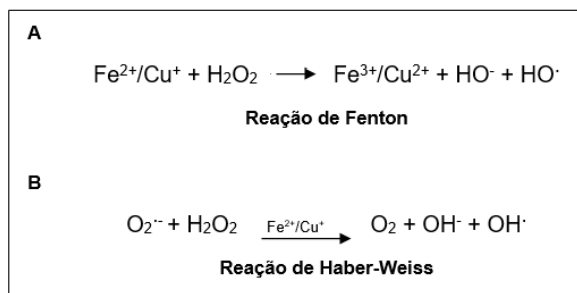


Figura 15: A) Reação de Fenton: formação de $\text{OH}^\cdot$ pela reação do H_2O_2 com o Fe^{2+} .

B) Reação de Haber-Weiss: formação de $\text{OH}^\cdot$ a partir de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Fonte: Adaptação do texto de Nelson e Cox, 2010, p. 721.

Em condições fisiológicas, as ERO funcionam como moléculas mensageiras funcionais, participando de uma gama de funções fisiológicas, atuando nas etapas de proliferação e diferenciação celular e patofisiológicas, mediando processos inflamatórios e reparatórios, incluindo o processamento da dor (KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013; HSIAO et., 2019).

Em condições patológicas, as células podem acumular altas concentrações de ERO, as quais são altamente reativas, ocasionando alterações irreversíveis em proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos (MUNOZ et al., 2017). A exposição extensiva às ERO e/ou a insuficiente capacidade celular antioxidante pode ocasionar dano celular, senescência e morte (HSIAO et., 2019).

3.5.2.2 ERN

As funções específicas das ERO parecem ser mediadas pela ação direta do $\text{O}_2^{\cdot-}$ e do H_2O_2 e, de forma indireta pelas espécies reativas de nitrogênio como o peroxinitrito que é produzido por reação do superóxido com óxido nítrico (KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013), conforme figura 16:

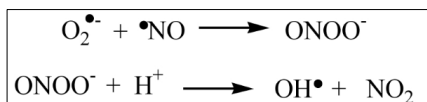


Figura 16: ERO relacionadas ao peroxinitrito.

Fonte: <http://submission.quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/2011/vol34n2/23-RV10177.pdf> Acesso em: 17/05/2020.

O óxido nítrico é um mediador gasoso e sua oxidação leva à produção de nitritos e nitratos e sua combinação com grupamentos SH à formação de tióis. O óxido nítrico possui ação citotóxica, vasodilatadora e modula reações inflamatórias e anti-inflamatórias de acordo com o estímulo. No cérebro, o óxido nítrico pode mediar respostas a aminoácidos excitatórios (revisado por CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

O óxido nítrico é produzido a partir da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e ação do fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) (Fig. 17). A NOS apresenta três isoformas: uma NOS induzida (iNOS) e duas NOS constitutivas (cNOS). A nNOS é uma forma da cNOS presente em neurônios do SNC e SNP. É produzida em resposta ao aumento da concentração de cálcio em resposta a mecanismos de transdução de sinal. A iNOS não possui regulação dependente da concentração de cálcio, pode ser induzida em resposta à IL-1 β e ao TNF- α e suprimida pela ação da IL-4, IL-10 e dos macrófagos. A iNOS tem alta relação com as propriedades citotóxicas do óxido nítrico (revisado por CERQUEIRA e YOSHIDA, 2002).

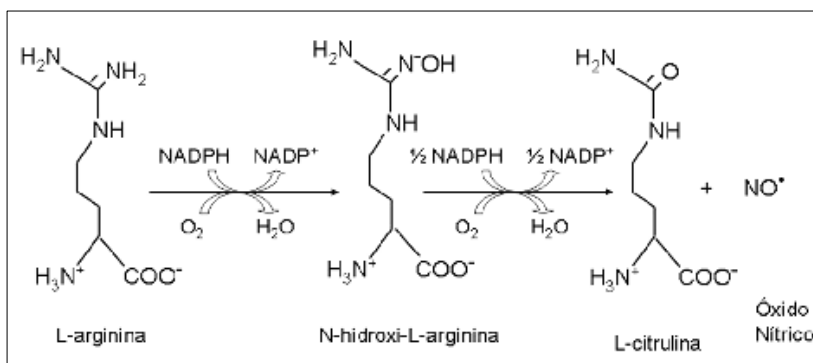


Figura 17: Síntese de óxido nítrico.

Fonte: Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Produccion-biologica-de-oxido-nitrico-catalizada-por-la-oxido-nitrico-sintasa_fig1_260318065 Acesso em: 11/05/2022.

O óxido nítrico é produzido em neurônios do corno dorsal da medula espinal em resposta à nocicepção, ocasionando aumento da liberação de neurotransmissores nos terminais aferentes primários, auxiliando no processo de sensibilização central (SINISCALCO et al., 2007), contribuindo dessa forma, para a hiperalgesia após lesão nervosa (KHALIL e DHOR, 2001).

Além disso, o peroxinitrito, resultante da combinação do óxido nítrico com o O_2^- , interfere negativamente no processo de regeneração neuronal após lesão (KHALIL e DHOR, 2001). O peroxinitrito pode interagir com estruturas celulares e inibir a enzima citocromo oxidase, provocando redução da produção de energia e da respiração mitocondrial, diminuindo conseqüentemente, a eficácia do sistema de defesa antioxidante, aumentando a formação de espécies reativas e o dano às biomoléculas (CLEETER et al., 1994).

3.5.2.3 Sistema de defesa antioxidante

O estresse oxidativo ocorre em função de um desequilíbrio entre um aumento na produção de espécies reativas e uma diminuição do sistema de defesa antioxidante (GOEKS et al., 2012). Para contrabalançar os danos celulares ocasionados pela produção exacerbada de ERO, o sistema de defesa antioxidante protege o organismo em condições fisiológicas (GOEKS et al., 2012).

O sistema de defesa é formado por componentes não enzimáticos, como o ácido ascórbico, e enzimáticos envolvendo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione-S-transferase (GST). Fatores que diminuem a velocidade de fluxo de elétrons através da cadeia respiratória, aumentam a formação de superóxido. Para impedir o dano oxidativo induzido pelo O_2^- , a SOD dismuta o O_2^- , formado por oxigênio molecular, a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por sua vez, a CAT converte H_2O_2 em água (GOEKS et al., 2012; NELSON e COX, 2010).

O H_2O_2 formado também pode ser degradado pela ação da glutathione-peroxidase. A glutathione redutase recicla a glutathione oxidada (GSSG) em sua forma reduzida, usando elétrons do NADPH

gerado pela nicotinamida-nucleotídeo-transidrogenase (na mitocôndria) ou pela via das pentoses (no citosol). A glutathiona reduzida (GSH) também mantém os grupos sulfidríla das proteínas em seu estado reduzido (SH), impedindo alguns dos efeitos deletérios do estresse oxidativo. A nicotinamida-nucleotídeo-transidrogenase é crítica neste processo, pois ela produz o NADPH, essencial para a atividade da glutathiona-redutase (GR) (Fig. 18) (NELSON e COX, 2010).

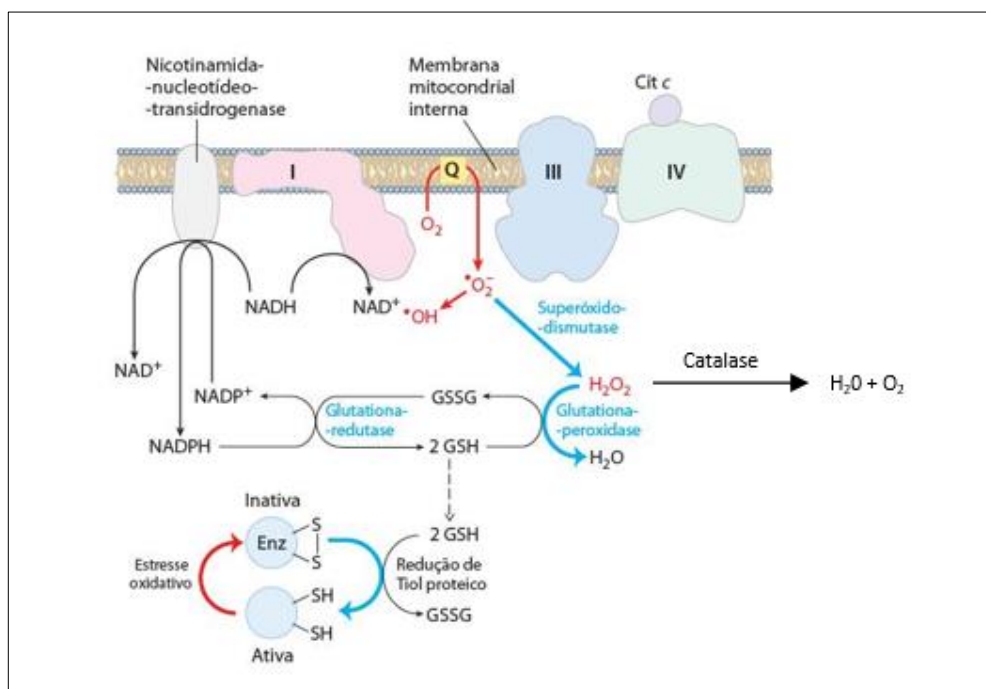


Figura 18: Degradação do radical superóxido pela ação das enzimas antioxidantes.

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2010, p. 721.

Além disso, a GST é o principal grupo de proteínas solúveis do fígado, envolvidas na detoxificação de compostos eletrofílicos, gerados intracelularmente ou encontradas na forma de xenobióticos. Sua ação detoxificante é importante na proteção contra estresse oxidativo, câncer, doenças degenerativas e doenças ligadas ao envelhecimento (BABITT, 2000). As substâncias endógenas e os xenobióticos são conjugados com diversas substâncias, dentre elas a glutathiona (GSH). A conjugação de agentes tóxicos com o tripeptídeo GSH é catalisada pela GST, que atua na fase II da biotransformação, prevenindo danos à membrana celular e a outras macromoléculas (TORRES et al., 2006).

3.5.3 Adenosina deaminase e butirilcolinesterase

3.5.3.1 Adenosina

A adenosina é uma importante molécula sinalizadora que age com importante função na neurotransmissão e na neuromodulação. Sua estrutura está presente em biomoléculas como o RNA, o DNA, o ATP, entre outras (MULLER e SCIOR, 1993).

A adenosina pode ser secretada por células neuronais e não neuronais ou pode ser formada pela degradação do ATP por enzimas extracelulares denominadas ectonucleotidases (ZIMMERMANN, 1996). No SNC, inibe a liberação de neurotransmissores excitatórios (revisado por AKKARI et al., 2006). A adenosina é removida do fluido extracelular metabolicamente ou por recaptação para o interior das células por um transportador. Em condições normais, a fosforilação à adenosina monofosfato (AMP) é o principal mecanismo de metabolização da adenosina, porém a desaminação da adenosina a inosina pela enzima adenosina deaminase também possui um papel importante no metabolismo dessa molécula (revisado por AKKARI et al., 2006; MULLER e SCIOR, 1993).

Além disso, a adenosina é liberada em condições inflamatórias, podendo apresentar atividades anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias e a contribuição dos subtipos de receptores de adenosina em diferentes órgãos e tecidos é complexa. Quatro subtipos de receptores de adenosina foram identificados: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Todos os subtipos são receptores acoplados à proteína G. Os subtipos A₁, A₃ quando ativados inibem a atividade de adenilato ciclase, resultando em diminuição da atividade intracelular. A ativação de receptores do tipo A_{2A} e A_{2B} resulta na estimulação da atividade intracelular. Os receptores do tipo A₁ quando ativados podem promover a ativação dos canais de K⁺ e o bloqueio dos canais de Ca²⁺ (revisado por AKKARI et al., 2006).

Agonistas seletivos dos receptores de adenosina do tipo A₁ demonstram atividade antinociceptiva e estão ativos em modelos animais de dor inflamatória e dor neuropática. Mecanismos indiretos que aumentam a concentração intracelular de adenosina utilizando inibidores de adenosina cinase, inibidores de adenosina deaminase e

inibidores da recaptação de adenosina aumentam a afinidade da adenosina pelos receptores do subtipo A₁ por moduladores alostéricos, aumentam a potência antinociceptiva e a atividade antiinflamatória. (revisado por AKKARI et al., 2006).

3.5.3.2 Butirilcolinesterase

As colinesterases são enzimas que catalisam a hidrólise de acetilcolina. Dentre estas temos, a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE). A AChE é amplamente distribuída no sistema nervoso, enquanto a BuChE é predominantemente encontrada no soro, no fígado e em tecidos musculares (YANG et al., 2022; ZIVKOVIC et al., 2016).

A acetilcolina é um neurotransmissor excitatório, que induz o influxo de Ca²⁺ para interior de células neuronais através de canais de Ca²⁺ controlados por ligante ou de proteína G acopladas a receptores muscarínicos de acetilcolina (PARK et al., 2022). Atua também como molécula anti-inflamatória, assim, níveis elevados de AChE e BuChE indicam diminuição dos níveis de acetilcolina e redução do seu efeito anti-inflamatório. O aumento da atividade da AChE e da BuChE indica inflamação aguda ou crônica (YANG et al., 2022; ZIVKOVIC et al., 2016).

3.6 Tratamento da dor neuropática

3.6.1 Tratamentos farmacológicos:

Os tratamentos para a dor neuropática consistem em fármacos de diferentes classes farmacológicas. Os anticonvulsivantes são utilizados no tratamento da dor por reduzirem a excitabilidade neuronal. Os anticonvulsivantes estabilizam as membranas celulares inibindo canais de Na⁺ e Ca²⁺ voltagem-dependentes (Fig. 19). A carbamazepina e a fenitoína são exemplos de fármacos dessa classe. Sua ação consiste em promover aumento da excitabilidade das sinapses inibitórias mediadas pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) e redução da excitabilidade das sinapses excitatórias mediadas pelo glutamato. No entanto, esses medicamentos apresentam interações

com diversos fármacos e produzem efeitos colaterais no sistema cardíaco, podendo induzir arritmias, são tóxicos ao sistema hematológico, produzem depressão do sistema nervoso, entre outros (BRUNTON et al., 2012).

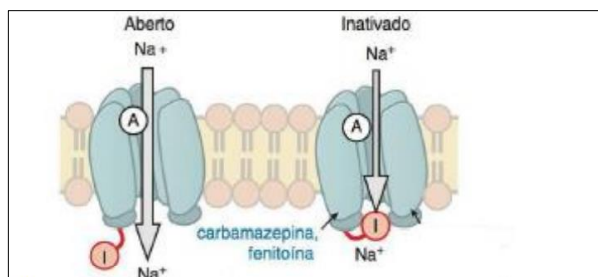


Figura 19: Mecanismo de ação de fármacos anticonvulsivantes utilizados no tratamento da dor.

Fonte: Adaptado de BRUNTON et al., 2012, p. 588.

Outra classe de medicamentos utilizadas no tratamento da dor neuropática, são os análogos do GABA, mais comumente representada pela pregabalina e pela gabapentina. Esses fármacos atuam por meio da ligação à subunidade $\alpha 2\delta$ -1 dos canais de Ca^{2+} de neurônios pré-sinápticos, inibindo a liberação de neurotransmissores excitatórios (Fig. 20). Como desvantagem, podem ocasionar efeitos como sonolência, tontura e fadiga (BRUNTON et al., 2012).

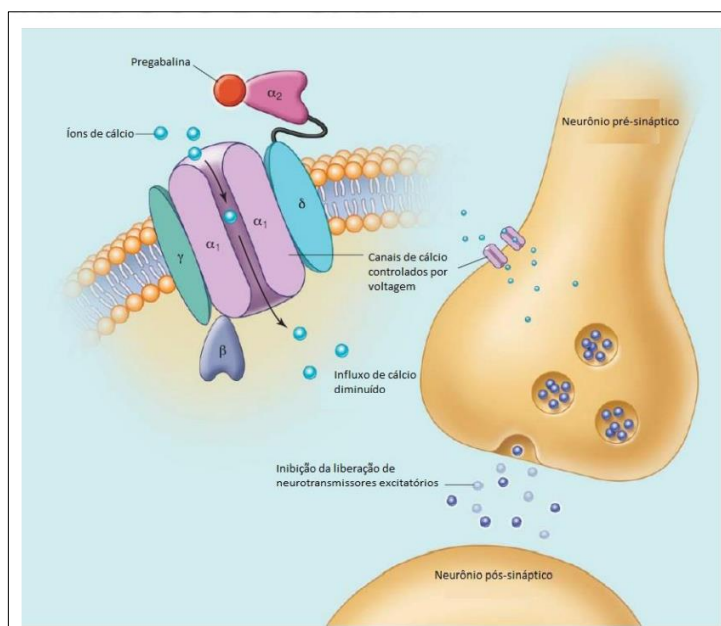


Figura 20: Mecanismo de ação de fármacos análogos do GABA.

Fonte: <http://sistema.boticamagistral.com.br/app/webroot/img/files/Anticonvulsivantes%20Estenose%20Lombar-%20Ed-converted.pdf> Acesso em: 17/05/2020.

A dor neuropática é de difícil manejo, considerando o limitado entendimento dos mecanismos que implicam na patogênese dessa condição (KHAN et al., 2021). Muitos pacientes permanecem refratários aos tratamentos farmacológicos ou sofrem com os efeitos adversos relacionados aos regimes posológicos necessários para o alívio da dor (GAN et al., 2021).

Enfim, embora existam fármacos com eficácia comprovada para o tratamento da dor neuropática, muitos desse fármacos produzem efeitos colaterais consideráveis, dificultando a adesão ao tratamento pelos pacientes. Assim, estudos que objetivem o melhor entendimento das vias de transmissão da dor e por mais opções de tratamento são fundamentais.

3.6.2 Estimulação transcraniana não-invasiva

Entre as diversas técnicas existentes para aplicação da estimulação não invasiva, podemos citar a estimulação transcraniana magnética (TMS) e a ETCC como as mais utilizadas (NARDONE et al., 2014; NGERNYAM et al., 2013). A TMS é aprovada pelo Conselho Federal de Medicina desde 2012, sendo seu uso regulamentado pela resolução CFM 1.986/2012, como ato médico privativo para utilização na prática médica nacional, com indicação para depressões uni e bipolar, alucinações auditivas nas esquizofrenias e na neurocirurgia. Para demais aplicações é permitida apenas para procedimentos experimentais.

Apesar deste fato, as técnicas como a TMS são de disponibilidade limitada, quando comparada à ETCC. A ETCC vem sendo utilizada por ser uma técnica segura e por apresentar vantagem em relação a outras técnicas por ser de fácil aplicação e acessibilidade (NARDONE et al., 2014; NGERNYAM et al., 2013) e com efeitos colaterais relativamente mínimos. Os relatos mais frequentes incluem dores de cabeça, irritação cutânea e coceira no local da aplicação (O'NEILL, F.; SACCO, P.; NURMIKKO, T., 2015).

Ademais, a evolução dos estudos voltados para o entendimento da neuropatologia e de parâmetros da estimulação, como o tamanho e

posição dos eletrodos e a área de aplicação da estimulação, bem como a intensidade e duração dos estímulos permitiu o aprimoramento das técnicas de aplicação da estimulação cerebral (ARUL-ANADAM; LOO; SACHDEV, 2009).

De acordo com o local de posicionamento dos eletrodos, os efeitos ocasionados pela estimulação podem ser diferenciados. Dentre os locais utilizados para aplicação de ETCC podemos citar o córtex motor, o córtex pré-frontal dorsolateral, o córtex visual e o córtex somatossensorial (NGERNYAM et al., 2013).

Interessantemente, os estudos desenvolvidos com o objetivo de avaliar os efeitos da estimulação sobre a dor crônica têm demonstrado resultados promissores. As técnicas não-invasivas vêm sendo melhor estudadas demonstrando resultados importantes, além de ocasionarem menores riscos ao paciente (BRASIL NETO, 2016). Estudos demonstraram que a ETCC apresenta resultados mais eficazes quando o córtex motor recebe estimulação anodal quando a analgesia é mediada pela colocação do cátodo sobre o córtex motor primário (NARO et al., 2016). Por esse motivo, o córtex motor tem sido a área alvo mais frequentemente utilizada na maioria dos estudos (BRASIL NETO, 2016).

Além disso, os efeitos analgésicos produzidos pela ETCC podem resultar da modulação de estruturas neurais envolvidas em aspectos sensoriais, cognitivos e emocionais da dor crônica (NARO et. al. 2016). Os mecanismos sugeridos para os efeitos benéficos da ETCC incluem: a estimulação de áreas envolvidas no controle da modulação de percepção da dor, bem como, a estimulação de neurônios motores. De forma indireta, pode ocorrer a estimulação das áreas distantes do local estimulado, a restauração do sistema inibitório cortical, no córtex motor de pacientes com dor crônica, a liberação de opióides endógenos e as alterações em vários neurotransmissores no córtex motor, no estriado e no sistema límbico (BRASIL NETO, 2016).

3.6.3 Efeitos da ETCC sobre a modulação neuronal, a dor neuropática e biomarcadores mediadores da dor

A ETCC consiste na aplicação de correntes elétricas de baixa intensidade que variam de 1-2 miliamperes (mA) em humanos (ARUL-ANADAM; LOO; SACHDEV, 2009; DOS SANTOS et al., 2012). A estimulação gera uma corrente elétrica de baixa amplitude em direção ao córtex, a qual atravessa o couro cabeludo e o crânio. A corrente é aplicada por meio da colocação de eletrodos, o ânodo com carga positiva e o cátodo com carga negativa (Fig. 21). As correntes contínuas produzidas pela aplicação de ETCC são capazes de modificar a excitabilidade cortical (O'NEILL, F.; SACCO, P.; NURMIKKO, T., 2015).

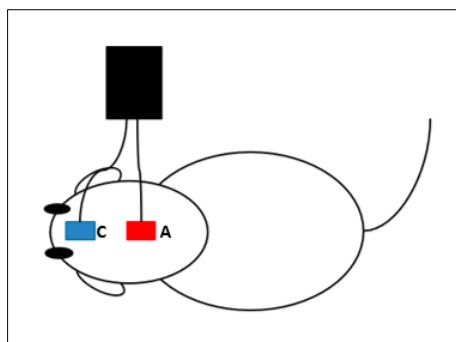


Figura 21: Posicionamento dos eletrodos para aplicação de ETCC. Ânodo (A). Cátodo (C).

Enquanto a estimulação anodal aumenta a excitabilidade, a estimulação catodal diminui a excitabilidade neuronal (ALM; DREIMANIS, 2013; FRITSCH et al., 2010; FUJIYAMA et al., 2014; NGERNYAM et al., 2013; RANIERI et al., 2012). A estimulação anodal promove aumento da excitabilidade cortical levando o potencial de membrana em repouso à despolarização. Por outro lado, a estimulação catodal promove a diminuição da excitabilidade de neurônios corticais, ocasionando na alteração do potencial de membrana em repouso à hiperpolarização (ARUL-ANADAM; LOO; SACHDEV, 2009; NARO et al. 2016).

As densidades das correntes produzidas pela ETCC no córtex são menores que o limiar do potencial de ação para neurônios corticais, o que explica a não indução do potencial de ação durante a aplicação de ETCC (ARUL-ANADAM; LOO; SACHDEV, 2009).

Estudos sugerem que a ETCC atua, em parte, pela alteração do potencial de membrana em repouso, afetando os canais de Na^+ (FUJIYAMA et al., 2014; ARUL-ANADAM; LOO; SACHDEV, 2009) e de K^+ (FUJIYAMA et al., 2014). Essas alterações nos canais iônicos, por sua vez, desencadeiam alterações específicas e duradouras na atividade neuronal (RANIERI et al., 2012), caracterizando, portanto, plasticidade sináptica, mais especificamente, na LTP e na LTD (FUJIYAMA et al., 2014; RANIERI et al., 2012). Contudo, a indução da LTP depende da ativação dos receptores NMDA e da secreção de BDNF (FUJIYAMA et al., 2014; RANIERI et al., 2012).

As alterações específicas e duradouras na atividade neuronal, desencadeadas pela aplicação de ETCC, caracterizam plasticidade sináptica (FUJIYAMA et al., 2014; RANIERI et al., 2012). A estimulação elétrica com intensidade de 10 μA pode induzir plasticidade sináptica mediada pelo aumento da secreção de BDNF e da ativação de receptores TrkB, in vitro, em regiões cerebrais de camundongos (FRITSCH et al., 2010). Adicionalmente, os efeitos da ETCC anodal estão relacionados com a modulação de interneurônios gabaérgicos. A ETCC anódica resulta em aumento da transmissão gabaérgica local, enquanto a ETCC catodal diminui os níveis de glutamato (revisado sistematicamente por MEDEIROS et al. 2016). Esses efeitos atingem estruturas subcorticais e ocorrem provavelmente em função das conexões interneuronais entre esses locais (O'NEILL, F.; SACCO, P.; NURMIKKO, T., 2015).

Além disso, estudos têm demonstrado efeitos positivos da aplicação de ETCC em modelos animais de dor crônica. Filho e colaboradores (2016) avaliaram os efeitos da ETCC em ratos com idade de 55 a 65 dias, submetidos ao modelo de constrição crônica do nervo ciático. Os pesquisadores observaram um aumento nos níveis de BDNF no tronco cerebral, na medula espinal e no soro dos ratos, 7 dias

após o final do tratamento que consistiu na aplicação de oito sessões consecutivas de ETCC, com duração de vinte minutos cada sessão. O BDNF regula a atividade sináptica, sendo um fator fundamental na neuroplasticidade e na neurogênese (FUJIYAMA et al., 2014).

Em estudo realizado por Santos et al. (2020), utilizando ratos machos *Wistar*, foi verificado um aumento da hiperalgesia térmica, imediatamente e vinte e quatro horas após o final do tratamento com ETCC, em ratos com dor neuropática. Os efeitos da ETCC foram mediados pela modulação de citocinas no córtex cerebral, marcado pelo aumento de IL-1 α , IL-1B, como também de NGF e pelo aumento dos níveis de IL-10 no tronco cerebral. Todavia, Cioato e colaboradores (2021) investigaram os efeitos da ETCC sobre os níveis de NGF em ratos de 55 a 65 dias com dor neuropática induzida pelo modelo de constrição crônica do nervo ciático. Os níveis de NGF foram modificados pelo modelo de dor encontrando-se elevados no córtex cerebral, na medula espinal e no nervo ciático, no entanto, a ETCC não demonstrou eficácia em modular esse parâmetro quarenta e horas e sete dias após o tratamento, nas estruturas avaliadas. Por fim, diversos estudos têm demonstrado a eficácia da ETCC em promover alívio da dor, comprovando o envolvimento de neurofinas, citocinas, modulação glutamatérgica e gabaérgica, entre outros.

Apesar deste fato, entender os mecanismos neurobiológicos da dor neuropática e os efeitos que a modulação da ETCC pode ocasionar modulando diversos marcadores, são necessários. Para realização desta tese, o modelo de constrição crônica do nervo ciático foi aplicado, conforme descrito a seguir, e os efeitos observados pela aplicação da estimulação elétrica transcraniana na modulação dos biomarcadores avaliados foram descritos na forma de manuscritos no próximo capítulo.

4 Manuscritos

Os resultados dessa tese estão descritos na
forma de manuscritos submetidos aos
periódicos *Experimental Brain Research* e
Neuroscience Letters

CAPÍTULO 1

O manuscrito ***“Short-term effectiveness of transcranial direct current stimulation in the nociceptive behavior of neuropathic pain Wistar rats in development”*** foi submetido à revista científica Experimental Brain Research e aguarda avaliação do editor.

----- Mensagem original -----

Assunto:EXBR-D-23-00195 - Submission Confirmation

Data:2023-04-04 15:23

De:"Experimental Brain Research"

Para:"Izabel Cristina Custodio de Souza"

Responder para:"Experimental Brain Research"

Dear Dr Custodio de Souza,

Thank you for submitting your manuscript,
"Short-term effectiveness of transcranial direct current stimulation in the nociceptive
behavior of neuropathic pain Wistar rats in development", to Experimental Brain Research

The submission id is: EXBR-D-23-00195

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing
the Journal's website.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Experimental Brain Research

Experimental Brain Research

Short-term effectiveness of transcranial direct current stimulation in the nociceptive behavior of neuropathic pain Wistar rats in development

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	EXBR-D-23-00195	
Full Title:	Short-term effectiveness of transcranial direct current stimulation in the nociceptive behavior of neuropathic pain Wistar rats in development	
Article Type:	Research Article	
Funding Information:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Finance Code 001)	Md Priscila Centeno Crespo
	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCTI/CNPQ/Universal 14/2014)	Dr Izabel Cristina Custodio de Souza
Abstract:	Neuropathic pain (NP) is caused by a lesion that triggers pain chronification and central sensitization and it can develop in a different manner that can be dependent of the age. Recent studies have demonstrated the efficacy of transcranial direct current stimulation (tDCS) for treating NP. Then, we aimed to investigate the effects of tDCS and BDNF levels in neuropathic pain rats in development, with 30 days old in the beginning of experiments. Eight-five male Wistar rats were subjected to chronic constriction injury. After establishment of NP, bimodal tDCS (20 min/8 days) was applied to the rats. Subsequently, nociceptive behavior was assessed at baseline, 14 days after surgery, 24 h and 7 days after the end of tDCS. The rats were sacrificed 8 days after the last session of tDCS. An increase in the nociceptive threshold was observed in rats in development 24 h after the end of treatment (short-term effect), but this effect was not maintained 7 days after the end of treatment (long-term effect). Furthermore, brain derived neurotrophic factor (BDNF) levels were analyzed in frontal cortex, spinal cord and serum using ELISA assay. The neuropathic pain model showed an effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the spinal cord of rats in development. There were no effects of BDNF levels of pain or tDCS in the frontal cortex or serum. Concluding, tDCS is effective technique to relieve nociceptive behavior at short-term effect in neuropathic pain rats in development and BDNF levels were not altered at long-term effect.	
Corresponding Author:	Izabel Cristina Custodio de Souza, PhD Universidade Federal de Pelotas Pelotas, Rio Grande do Sul BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Pelotas	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Priscila Centeno Crespo, Md	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Priscila Centeno Crespo, Md	
	Leo Anderson Meira Martins, Dr	
	Otávio Garcia Martins, MD	
	Clara Camacho dos Reis, MD	
	Ricardo Netto Goulart, Graduation	
	Andressa de Souza, Dr	
	Liciane Fernandes Medeiros, Dr	
	Vanessa Leal Scarabelot, Dr	

	Giovana Duzzo Gamaro, Dr
	Sabrina Pereira Silva, Md
	Marcos Roberto de Oliveira, Dr
	Iraci Lucena da Silva Torres, Dr
	Izabel Cristina Custodio de Souza, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	
Suggested Reviewers:	Alexandre de Quevedo, Dr Universidade Federal do Rio Grande do Sul alexandre.quevedo@ufrgs.br Because he is expertise in Neuroscience. Roberta Ferrucci, Dr Universita degli Studi di Milano roberta.ferrucci@unimi.it Because she is expertise in transcranial stimulation. Alexandre F. M. da Silva, Dr University of Michigan adasilva@umich.edu Because he is expertise in chronic pain and brain functions. Jia Fang, Dr Central South University 507092@csu.edu.cn Because she is expertise in neuroscience. Debapriya Garabadu, Dr GLA University debapriya.garabadu@gla.ac.in Because he is expertise in neurochemistry.



Pelotas, March 28th, 2023.

Editor –in- Chief

Dr. Winstow Byblow, Experimental Brain Research

We are sending you the manuscript **“Short-term Effectiveness of Transcranial Direct Current Stimulation in the nociceptive behavior of neuropathic pain rats in development”** by Crespo P C, and colleagues to be submitted for publication in Experimental Brain Research (ISSN:0014-4819). The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation at the Universidade Federal de Pelotas (UFPel)/ Rio Grande do Sul/Brasil (N^o.# 10480-2014). The experiments followed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the ARRIVE guidelines and the Brazilian law 11.794/08 and all procedures to minimize pain and discomfort were applied. This manuscript has not and will not be published in whole or in part in any other journal. We reinforce that our studies evaluate, under behavioral and biochemical aspects, the effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) in neuropathic pain rats in development. The results are surprising, and we believe that our study has a different approach and brings the novelty of evaluating the effect of a stimulation widely used in research, and although other studies have demonstrated the effects of tDCS in neuropathic pain this is the first study that evaluated its effects in rats in development (30-days-old at the beginning of experiments). We inform that all authors approved the final version of the manuscript. We would like to publish in Experimental Brain Research, because we know and appreciate it.

The authors declare that are no conflicts of interest.

I will await your guidance on the manuscript.

Thank you very much for your attention,

Best regards,

Izabel Cristina Custódio de Souza, PhD

Professor and Researcher at Universidade Federal de Pelotas

Biology Institute / Department of Morphology

250 Duque de Caxias Av. Pelotas, RS 96030000

Phone: 55 53 3221-1044

Short-term effectiveness of transcranial direct current stimulation in the nociceptive behavior of neuropathic pain *Wistar* rats in development

Priscila Centeno Crespo^{1,2}, Leo Anderson Meira Martins³, Otávio Garcia Martins², Clara Camacho Dos Reis², Ricardo Netto Goulart², Andressa de Souza⁵, Liciane Fernandes Medeiros^{4,5}, Vanessa Leal Scarabelot^{4,6}, Giovana Duzzo Gamaro¹, Sabrina Pereira Silva¹, Marcos Roberto de Oliveira⁷, Iraci Lucena da Silva Torres^{3,4}, Isabel Cristina Custódio de Souza^{*1,2}

¹Postgraduate Program in Bioprospecting and Biochemistry, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, 96010-900, Brazil.

²Laboratory of Cell Neuromodulation: Basic Researches, Biology Institute, Department of Morphology, UFPel, Pelotas, RS, 96030-000, Brazil.

³Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, UFRGS, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

⁴Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Preclinical Researches, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

⁵Postgraduate Program in Health and Human Development, Unilasalle, Canoas, RS, 92010-000, Brazil.

⁶Postgraduate Program in Medicine Medical Sciences, Medicine School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

⁷Department of Chemistry, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, 78060-900, Brazil

Acknowledgments

The authors thank the Committee Development of Higher Education Personnel (CAPES) for supporting this study. We thank the veterinary, Anelize Campelo Félix, and employees of Central Vivarium of UFPel for helping us, and Paulo Sanches for the development of the tDCS device used in this work, Foundation of Amparo of the Research of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the HCPA Animal Experimentation Laboratory.

* Corresponding author:

Isabel Cristina Custodio de Souza, PhD

Professor - Federal University of Pelotas

Biology Institute / Department of Morphology

250 Duque de Caxias Av. Pelotas, RS 96030000

Phone: +55 53 3221-1044

e-mail: izabel.souza@ufpel.edu.br

Abstract

Neuropathic pain (NP) is caused by a lesion that triggers pain chronification and central sensitization and it can develop in a different manner that can be dependent of the age. Recent studies have demonstrated the efficacy of transcranial direct current stimulation (tDCS) for treating NP. Then, we aimed to investigate the effects of tDCS and BDNF levels in neuropathic pain rats in development, with 30 days old in the beginning of experiments. Eight-five male *Wistar* rats were subjected to chronic constriction injury. After establishment of NP, bimodal tDCS (20 min/8 days) was applied to the rats. Subsequently, nociceptive behavior was assessed at baseline, 14 days after surgery, 24 h and 7 days after the end of tDCS. The rats were sacrificed 8 days after the last session of tDCS. An increase in the nociceptive threshold was observed in rats in development 24 h after the end of treatment (short-term effect), but this effect was not maintained 7 days after the end of treatment (long-term effect). Furthermore, brain derived neurotrophic factor (BDNF) levels were analyzed in frontal cortex, spinal cord and serum using ELISA assay. The neuropathic pain model showed an effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the spinal cord of rats in development. There were no effects of BDNF levels of pain or tDCS in the frontal cortex or serum. Concluding, tDCS is effective technique to relieve nociceptive behavior at short-term effect in neuropathic pain rats in development and BDNF levels were not altered at long-term effect.

Keywords: BDNF, development, neuropathic pain, noninvasive brain stimulation, tDCS

1. Introduction

Neuropathic pain (NP) is defined as pain that arises as a direct consequence of an injury or disease that affects the somatosensory nervous system (IASP, 2014) due to multiple altered mechanisms, such as functional reorganization and hyperexcitability of the somatosensory and motor cortices (Cioato et al., 2016). NP commonly occurs in adults, and though uncommon, has been known to develop in young patients (Vega-Avellaira et al., 2009), and aging is an important factor in NP development (Austin et al., 2012).

Additionally, several studies showed that the application of weak electrical currents to the cortex alleviates neuropathic pain symptoms (Boldt et al., 2014; Cioato et al., 2016). Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a noninvasive, safe, and well-tolerated treatment technique (Antal et al., 2010; Liu et al., 2016), consisting of the application of a weak electric current to the cortex (Dimov et al., 2016) that modulates cortical excitability. Studies have revealed that tDCS effects can be extended to subcortical structures (Dimov et al., 2016) and its effects have been described on NP in clinical (Palm et al., 2016) and preclinical studies (Cioato et al., 2016; Filho et al., 2016).

Some studies have described that the analgesic effect of tDCS is associated with a reduction in interleukin (IL)-1 β and IL-10 levels in the spinal cord (Cioato et al., 2016) and a decrease in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in the spinal cord and brainstem (Spezia et al., 2012). BDNF plays a crucial role in neuroplasticity (Fujiyama et al., 2014) and is also related to the effects of tDCS during NP in some central nervous structures (Ayache et al., 2016; Knotkova et al., 2013; Volz et al., 2016). Furthermore, BDNF plays an important role in the development (Khan et al., 2015). Low rates of age-related BDNF secretion can lead to synaptic connectivity alterations and to degeneration (Oh et al., 2016).

The effects of tDCS in the BDNF levels were describe in adult and/or older rats with neuropathic pain (55 to 65-day-old or (200-250 g or 260-320 g) in the beginning of experiments (Filho et al., 2016; Lopes et al., 2020, Lopes et al., 2021, Santos et al., 2021) and with inflammatory pain (Silva et al., 2022). However, despite of our knowledge, this is the first study that aimed to understand the effects of tDCS in rats in development (30-day-old (75-100 g) in the beginning of experiment) induced with NP through chronic constriction injury by evaluating nociceptive behaviour using the von Frey test and BDNF levels in the CNS structures and serum. In this study we hypothesize that rats in development with neuropathic pain will develop decreased nociceptive threshold and increased BDNF levels, and that tDCS treatment will increase the nociceptive threshold mediated by a reduction in the BDNF levels in rats with chronic constriction injury, at short and long-term effect.

2. Methods

2.1. Animals

Eighty-five male *Wistar* rats aged 30-day (75–100 g) were provided by the Central Vivarium of Federal University of Pelotas (UFPEl). Before the experiments, the rats were acclimatized to the maintenance room for 4 days until they reached 30-day-old. They were randomly grouped by weight into three main groups (control, sham-lesion (SL), and NP) and kept in three to four cages covered with wood shavings (65 × 25 × 15 cm). The animals were kept in a controlled environment with a light-dark cycle of 12 h at 22°C ± 2°C with water and food *ad libitum*. The Ethics Committee on Animal Experimentation approved all experiments and procedures (CEEa #10480-2014) that were performed following the Guide for Care and Use of Laboratory Animals, the Brazilian law 11.794/08, and ARRIVE guidelines, which establishes procedures for the scientific use of animals.

2.2. Mechanical hypersensitivity test

An automatic von Frey anaesthesiometer (Insight, São Paulo, Brazil) was used to detect mechanical hyperalgesia. The day before the test, the rats were placed in polypropylene cages (12 × 20 × 17 cm) and habituated for 20 min (Netto et al., 1987). The test consists of applying force to the right paw of the rats to detect the threshold at which the paw was withdrawn, which is defined as nociceptive threshold. Pressure intensity was automatically recorded after paw withdrawal (Vivancos et al., 2004). The threshold for each rat was verified three times and recorded in grams, and the average was used as a behavioral response.

2.3. Neuropathic pain model

To evaluate the homogeneity of mechanical hyperalgesia before NP induction, all rats were subjected to the von Frey test (baseline). To induce NP, chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve was induced according to the model described by Bennett and Xie (1988). Briefly, rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The right leg was shaved in the procedure region, and skin antisepsis was performed using 2% iodine-alcohol. An incision was then made to expose the sciatic nerve, and three ligatures without impeding epineural blood flow were tied (Chromic Catgut 4.0) at 1 mm intervals. Only one researcher executed the ligatures to ensure equal constriction in all rats. Subsequently, the skin was sutured with Mononylon 4.0. For sham surgery, the sciatic nerve was exposed during the procedure, but the nerve was not ligated. Rats in the control group were not subjected to any surgical procedure. All animals that underwent the surgical procedure received analgesia by subcutaneous injection of 10 mg/kg of tramadol (Austin et al., 2012) immediately at the end of the surgery.

2.4. Experimental procedures and tDCS

NP establishment was confirmed by a nociceptive test 14-day after surgery. Rats were then subdivided into the following subgroups: control (C); control+sham-tDCS (C+sham-tDCS); control+tDCS (C+tDCS); SL; SL+sham-tDCS; SL+tDCS; NP; NP+sham-tDCS; and NP+tDCS (Fig. 1). The rats were then subjected to tDCS treatment. tDCS consisted of a 20-min session of bimodal tDCS for 8 days, as described by Lopes et al. (2021) and Santos et al. (2020). The battery-powered stimulator emitted a constant direct current of 0.5 mA to the electrodes. To ensure the adherence of the electrodes, the heads of CCI and sham rats were shaved. For sham stimulation, the electrodes were placed in the same position as the active tDCS, but the electrodes were turned off. Control rats were not subjected to any surgical procedure. Subsequently, mechanical hyperalgesia was applied 24 h after the last tDCS session (short-term effect) and 7 days after the last tDCS session (long-term effect). After the end of 8 days of treatment, the rats were killed by decapitation, and the CNS structures and total blood were collected (Fig. 2). The frontal cortex, spinal cord, and total blood samples were collected for biochemical analyses. Total blood was centrifuged at 3000 g for 15 min to obtain serum. All structures were kept frozen at -80°C until processing.

2.5. BDNF assays

Only one researcher executed the biochemical analyses, and the groups of research were blinded for this one person. BDNF levels were measured using a sandwich ELISA with monoclonal antibodies specific for BDNF (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The total protein was determined with the Bradford's method, using

bovine serum albumin as the standard (Bradford, 1976). Results are expressed as pg/mg protein for central nervous structures and as ng/ml for serum.

2.6. Statistical analyses

A generalized estimating equation followed by a Bonferroni correction was used to analyze the results of the behavioral tests, considering pain measured at different times and tDCS as independent variables. For biochemical analyses, a two-way analysis of variance followed by Tukey was performed to compare the biochemical data between groups, considering pain and tDCS as independent variables. Data were expressed as the mean $\pm$ standard deviation of the mean (S.D.), using an alpha of 5% and considered significant at $P \leq 0.05$. SPSS (version 20.0) for Windows was used to process results from behavioral tests, and GraphPad Prism 8.4.3 was used to perform results from biochemical analyses.

3. Results

3.1. Mechanical hyperalgesia

Regarding the nociceptive behavior test, the generalized estimation equation presented a time effect (Wald $\chi^2=2.010.04$; 3, $P<0.001$) characterized by a significative difference between basal, 14 days after surgery, 24 h and 7 days after tDCS verifications, except comparing 24h and 7 days after tDCS treatment ($P=0.191$). A group effect (Wald $\chi^2=1.455.90$; 8, $P<0.001$) was observed comparing NP groups (exposed to the CCI model) with the C and SL groups ($P<0.0001$) and with NP+tDCS group ($P=0.007$). Additionally, it was observed an interaction time x group (Wald $\chi^2=1.709.97$; 24, $P<0.001$). At baseline, there were no significant differences between the groups (Wald $\chi^2=12.03$; 8, $P=0.150$). At 14-day after surgery, the rats demonstrated increased threshold in the paw withdrawal test compared to the baseline measure, since they are in development ($P<0.001$) and the three NP groups showed a significant increase in the nociceptive behavior (lower threshold) compared to all C and all SL groups ($P<0.001$) (Fig 3, panel A). The treated rats (NP+tDCS) showed a significant increase in the nociceptive threshold at 24 h after the end of treatment compared to NP ($P=0.012$) and NP+sham-tDCS ($P=0.002$) groups, and NP showed a similar effect of NP+sham-tDCS group ($P>0.05$), suggesting an anti-hyperalgesic effect. In addition, it was observed a decreased effect of C+tDCS ($P=0.001$) and SL+tDCS ($P=0.039$) compared to C+sham-tDCS (Wald $\chi^2=1.429.56$; 8, $P<0.001$). However, 7-day after treatment, NP+tDCS group showed significant increase compared to NP group ($P<0.001$), but this effect was similar to the sham effect (NP+sham-tDCS, $P>0.05$) (Wald $\chi^2=928.06$; 24, $P<0.001$) (Fig. 3, panel B).

3.2. BDNF analyses

For biochemical analyses, only SL and NP rats were included, as the control and sham groups did not show differences in mechanical hyperalgesia at the 7 days after tDCS treatment according to the von Frey test (a day prior rats being sacrificed). In the frontal cortex of rats in development exposed to the pain model BDNF levels did not show a statistically significant difference between the groups for pain ($F_{(1,29)}=1.635$, $P=0.211$) or tDCS ($F_{(2,29)}=1.272$, $P=0.295$), indicating that pain and tDCS treatment could not modify frontal cortex BDNF levels in the long term (Fig. 4, Panel A).

Meanwhile, in the spinal cord, an effect of pain was observed ($F_{(1,29)}=4.322$, $P=0.0466$) in BDNF levels, but no effect was detected in the post hoc test. Furthermore, there was no effect of tDCS in BDNF levels regarding

spinal cord analyses ($F_{(2,29)}=0.3370$, $P=0.7167$) or interaction pain x tDCS ($F_{(2,29)}=0.1971$, $P=0.8222$) (Fig. 4, Panel B). BDNF serum levels were not modified by the pain model ($F_{(1,29)}=1.530$, $P=0.2260$) or tDCS treatment ($F_{(2,29)}=0.1159$, $P=0.8910$) (Fig. 4, Panel C).

4. Discussion

Here we hypothesize that rats in development with neuropathic pain will develop decreased nociceptive threshold and increased BDNF levels, and that tDCS treatment will increase the nociceptive threshold mediated by a reduction in the BDNF levels in rats with chronic constriction injury, at short and long-term effect.

Regarding nociceptive behaviour, at the baseline, rats presented a similar effect, characterizing the homogeneity of the nociceptive threshold. Fourteen days after NP induction, the rats demonstrated increased in the paw withdrawal compared to the baseline measure. It is important to note that the rats were 30-day-old at the induction of CCI and 64-day-old at the end of experiments. Our results show that there is an increase of the mechanical threshold according to the development of rats, corroborating Nunes et al. (2016). Furthermore, all rats subjected to CCI surgery showed decreased mechanical hyperalgesia, as the threshold decreased significantly in rats in development.

A study conducted by Howard et al. (2005) investigated the effects of neuropathic pain in different developmental ages, using the spared nerve injury (SNI) model. The authors investigated the effects of SNI at the 3-, 10-, 21- and 33-days old rats for 28 days, observing nociceptive behavior at 7, 14 and 28 days after surgery. They found no differences in the threshold in rats of 3 days. For rats of 10 and 21 days they found a decreased threshold in the SNI rats compared to control group or contralateral paw, but the effects were not maintained for 14 and 28 days. At 33 days old they found decreased threshold at the 7, 14 and 28 days after surgery. In this same work the authors evaluated the effects of NP, using CCI model in rats aged at 10 and 60 days. The authors found no differences in the threshold of 10 days old rats at any point observed (7, 14 and 28 days after surgery). At 60 day old rats with CCI showed a significative difference was observed 7, 14 and 28 days after surgery comparing with contralateral paw. This study demonstrates the influence of age in nociceptive behavior of NP development.

Mechanical allodynia and hyperalgesia are behavioral signs of NP (Lu et al., 2009). The test of hypersensitivity to mechanical stimuli is the most common method of measuring the magnification of a neuropathological condition (Boada et al., 2015). Our results corroborate previous studies using the CCI model in *Wistar* rats aged 55–65 days (Cioato et al., 2016) and 8 weeks and 60 days (Lopes et al., 2021; Santos et al., 2020). The CCI model is the most used method in peripheral nerve injury NP experiments. It can produce significant and stable pain hypersensitivity for at least 1-month after NP induction. This model is widely used to investigate the pathophysiological mechanisms and potential therapeutic agents for the treatment of NP (Austin et al., 2012).

Interestingly, bimodal tDCS was able to promote hyper nociceptive behavior 24 h after the last session, but at 7 days after the last session, the analgesic effect was lost in rats in development, demonstrating just a short-term effect of treatment. These effects show the possible effects of manipulation and/or immobilization in the sham-tDCS groups, which characterizes a limitation of our study. In contrast, in our previous study, we demonstrate the effects of bimodal tDCS in neuropathic pain rats at 60 days old at long term-effect (7 days after the last session of tDCS), but this effect was not observed at the short-term effect (24 hours after the last session of tDCS) (Centeno Crespo et al., 2023). Then, we can suggest different responses to the tDCS treatment in different

ages. Other studies have shown that tDCS can reverse hyper nociceptive behavior at the long-term effects of tDCS in adult rats, using similar tDCS protocol and NP model (Cioato et al., 2016, Lopes et al., 2021).

Additionally, it was observed a decreased nociceptive threshold in rats of the C and SL groups that received tDCS treatment compared to rats of the C group that received sham stimulation, demonstrating an effect of tDCS treatment in rats without CCI, but these results were not maintained at long term-effect. In this study, we showed the effects of tDCS in rats in development with NP. Additionally, age can significantly influence the development of NP after CCI induction (Austin et al., 2012). According to studies with 40 healthy adult humans (median, 68 years) and young adults (median, 23 years), older adults exhibited a delayed response to anodal tDCS compared with young adults (Fujiyama et al., 2014). Several studies have shown that tDCS applied to the primary motor cortex or frontal cortex significantly reduces pain (Da Silva et al., 2011). tDCS has been shown to modify cortical excitability because it provides sufficient electrical current to the cortical and subcortical areas (Roche et al., 2011; Schestatsky et al., 2013). Furthermore, the induced after-effects of tDCS depend on the polarity, duration, and stimulation intensity (Csifcsak et al., 2009). Studies have shown that anodal tDCS increases the corticospinal excitability of local stimulation and distant areas of the stimulation site, attributed to interconnections between these sites (Vaseghi et al., 2015). The full mechanism of action of tDCS is not well understood; however, evidence suggests that tDCS can act through direct and indirect pathways (Coull et al., 2005). Our study used bimodal stimulation, and BDNF levels in rats in development in the frontal cortex, spinal cord, and serum were assessed.

At 30 days with neuropathic pain, BDNF levels in the frontal cortex of the NP group were not modified. This may be because the young rats demonstrated that the tDCS effects increased the threshold of NP rats (NP+tDCS group) compared with the NP and NP+sham-tDCS groups in the short term (24-h after the end of tDCS), but not in the long term (7-day after treatment).

The rats were sacrificed 8-day after the end of treatment; thus, tDCS effects were not observed in these rats. For the same reason, serum BDNF levels were not altered. However, BDNF is widely distributed in the human brain, plays an important role in supporting neuronal structure and function (Soltész et al., 2014), and plays various roles in development (Cheeran et al., 2008). Studies by Filho et al. (2016) in *Wistar* rats aged 55–65-day-old found a short-term (48-h after the end of tDCS) and a long-term (7-day after the end of tDCS) decrease in the brain stem BDNF levels, a short-term increase in spinal cord BDNF levels and a long-term decrease in serum BDNF levels in rats with NP. Corroborating, in our study, it was found a pain effect in the spinal cord BDNF levels, and comparing these analyses evaluated by Filho et al. (2016) in old rats with increased nociceptive threshold by tDCS treatment with short- and long-term effects, we suggest that differences in BDNF levels in these structures should be related to age.

tDCS can induce and modulate neuroplasticity (Kuo et al., 2014; Pirulli et al., 2013). Boudes and Menigoz (2009) showed that BDNF mediates changes in excitatory synaptic transmission in the dorsal horn of rats with sciatic nerve injury and other studies have demonstrated the influence of this neurotrophin in NP and tDCS treatment.

Lopes et al. (2020) investigated the effects of tDCS plus exercise over BDNF levels in neuropathic pain rats (280 g, approximately). The researchers evaluated the nociceptive behavior, and they observed that rats exposed to CCI procedure increased the mechanical hyperalgesia 7 and 14 days after surgery. Thereafter, the authors evaluated the effects of treatment immediately, 24 hours and 7 days after the end of tDCS. The rats with neuropathic pain exposed to tDCS, exercise and tDCS plus exercise had increased nociceptive threshold

immediately, 24 hours and 7 days after the end of treatment, and tDCS plus exercise increased the nociceptive threshold compared to tDCS isolated, 7 days after the end of treatment. The authors observed that cortical cerebral BDNF levels were increased in rats with NP treated with tDCS, 48 h after treatment and tDCS plus exercise increased BDNF levels 7 days after the end of treatment. In the brainstem, the authors found decreased levels of BDNF in NP groups 48 hours after the end of treatment with tDCS. In the spinal cord, the authors found increased BDNF levels in NP group that did not receive any treatment, and 48 hours after the end of treatment, decreased BDNF levels were observed in NP group that received sham-stimulation plus exercise compared with the group with sham of NP that received sham-stimulation plus exercise.

In a similar study, Lopes et al. (2021) verified the effects of tDCS associated with exercise in the BDNF levels in rats (8 weeks old) with neuropathic pain. The authors observed increased hippocampal BDNF levels occasioned by tDCS plus exercise in NP groups, at the short-term. At long-term they found that tDCS and exercise prevented a reduction in BDNF levels in the hippocampus. In the sciatic nerve, at the short term, it was observed increased BDNF levels in NP groups by the effects of tDCS and exercise.

We just find an effect of pain in the spinal cord BDNF levels in rats in development, for cortical and serum analyzes no effects were found in this study at the long-term, however, the effects of tDCS were well described in other studies with adult rats, showing its influence in NP and its modulation by tDCS treatment.

Our findings add new information since tDCS effectively reduces hyper nociceptive behavior in rats in development with CCI injury, showing that tDCS can reduce hyperalgesia at this phase of development in the short-term effect. Biochemical analyses of BDNF levels in rats in development were insufficient to elucidate the effects of tDCS on neuroplasticity because it was evaluated only in the long term, and more studies are warranted to evaluate short-term BDNF levels in rats in development. We believe that these levels will be modified by tDCS treatment at this time point.

It is relevant to know the effects of tDCS and intermediates of NP in the phase of development since age can influence the levels of these intermediates (biomarkers and immunity cells), and consequently the response to the treatment in young people. Although NP occurs less frequently at the early age, it could happen and need of another kind of intervention them the used in old patients.

This study contributes to understand the effects of tDCS in the nociceptive behavior and BDNF levels of neuropathic pain rats in development. furthermore, the NP and tDCS effects in the nociceptive behaviour and in BDNF levels of rats in development was discussed using previous published studies conducted with adult/older rats with NP treated with tDCS and that evaluate the influence of BDNF levels and other biomarkers in NP and tDCS treatment. Despite that, further studies are necessary to elucidate the effects of BDNF and tDCS on NP at the early age.

Finally, our study had some limitations, including that it was used just male rats; it used the whole spinal cord for analyses, but different regions of the spinal cord could reflect in different levels of intermediates of NP; BDNF levels were evaluated only at long-term, but important modifications could occur at the short-term effect, since a tDCS effect was observed in the nociceptive threshold just at this time point; it was observed a sham-effect occasioned by manipulation and/or immobilization of rats, as it was previously mentioned in this discussion., so a different form of immobilization of rats should be considered for future studies.

5. Conclusion

Analyzing these data made it possible to conclude that NP was induced 14-day after treatment, and tDCS promoted relief of hyperalgesic behavior in the short term in 30-day-old rats. Additionally, it was observed an effect of pain in the spinal cord BDNF levels, however, this effect was not confirmed in the post hoc test. Frontal cortex and serum BDNF levels were not altered by pain or long-term tDCS. In conclusion, these results bring the novelty of behavioral and biochemical responses to the tDCS effects in neuropathic pain rats in development, however, more studies are necessary to elucidate the effects of tDCS in the BDNF levels in rats in development with NP at the short-term.

6. Future directions

For future research, we recommend using another kind of immobilization of rats for tDCS application, since immobilization used in this experiment showed to influence some parameters analyzed. Furthermore, new studies about the effects of tDCS in neuropathic pain rats in development are necessary to evaluate other intermediates/biomarkers associated with the early age nociceptive responses.

Compliance with Ethical Standard

Ethics approval

The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

This study was performed in accordance with Brazilian law 11,794. Approval was granted by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEAA 10480-2014) of the Federal University of Pelotas by the Veterinary Medicine Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix on July 20, 2015.

Statements and Declarations

Funding

This study was financed in part by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education, CAPES-MD Finance Code 001 (P.C. Crespo), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) - MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 (Izabel Cristina Custodio de Souza).

Competing interests:

The authors declare no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.

Financial interests: none.

Data Availability

Not applicable.

Author Contributions

PCC, ICCS, and GDG contributed to the study conception and design; PCC, OTV, and CCR, were responsible for the development of animal experiments; PCC, VLS, AS, and LFM were responsible for the biochemical analyzes; PCC, LFM, LAMM were responsible for the statistical analyses and layouts; VLS, LFM, and PCC description the

results; PCC wright the manuscript; LFM, LAMM, GDG, and ICCS were responsible for edit and revision the manuscript; RNG, SPS, MRO, and ILST contributed intellectually, PCC, LFM, LAMM, GDG, and ICCS were responsible to response the editorials.

Subtitles

Fig. 1 Groups of research

Fig. 2 Timeline of experiments

Fig. 3 Effect of tDCS on the mechanical hyperalgesia response by the von Frey electronics test of rats in development. Control (C); Control + sham tDCS (C + sham-tDCS); Control + tDCS (C + tDCS); Sham Lesion (SL); Sham lesion + sham-tDCS (SL + sham tDCS); Sham lesion + tDCS (SL + tDCS); Neuropathic pain (NP); Neuropathic pain + sham-tDCS (NP + sham-tDCS); Neuropathic pain + tDCS (NP + tDCS). Data are presented as the mean $\pm$ SD, (n=7-11). Different letter subscripts (a through j) indicate a statistically significant difference between the groups. **Panel A:** Threshold at baseline and 14 days after surgery C (n=30), SL (n=25), NP (n=30). **Panel B:** Effects of tDCS 24h and 7 days after the end of treatment (GEE/Bonferroni Interaction time x group (Wald $\chi^2=1,709.97$; 24, $P<0.001$, n=7-11; C (n=10), C+sham-tDCS (n=10), C+tDCS (n=10), SL (n=7), SL+sham-tDCS (n=9), SL+tDCS (n=9), NP (n=9), NP+sham-tDCS (n=10), NP+tDCS (n=11))

Fig. 4 BDNF levels of rats in development at the long-term effect. Sham Lesion (SL); Sham lesion + sham-tDCS (SL + sham tDCS); Sham lesion + tDCS (SL + tDCS); Neuropathic pain (NP); Neuropathic pain + sham-tDCS (NP + sham-tDCS); Neuropathic pain + tDCS (NP + tDCS). Data are presented as the mean $\pm$ SD, (n=5-6). **Panel A: Frontal cortex BDNF levels:** There were no effects of pain ($F_{(1,29)}=1.635$, $P=0.211$) or tDCS ($F_{(2,29)}=1.272$, $P=0.295$) (Two-way ANOVA/Tukey, n=5-6). **Panel B: Spinal cord BDNF levels:** There was an effect of pain ($F_{(1,29)}=4.322$ $P=0.0466$), but this effect was not confirmed by the post hoc test. tDCS effect was not statistically significant different between groups ($F_{(2,29)}=0.3370$, $P=0.7167$) and no interaction pain x tDCS was found ($F_{(2,29)}=0.1971$, $P=0.8222$) (Two-way ANOVA/Tukey, n=5-6). **Panel C: Serum BDNF levels:** there were no differences between groups for pain ($F_{(1,29)}=1.530$, $P=0.2260$) or tDCS ($F_{(2,29)}=0.1159$, $P=0.8910$) (Two-way ANOVA/Tukey, n=5-6)

References:

1. Antal A, Terney D, Kühnl S, Paulus W (2010) Anodal Transcranial Direct Current Stimulation of the Motor Cortex Ameliorates Chronic Pain and Reduces Short Intracortical Inhibition. *J Pain Symptom Manage* 39:890–903. [https://doi: 10.1016/j.jpainsymman.2009.09.023](https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2009.09.023)
2. Austin PJ, Wu A, Moalem-Taylor G (2012) Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. *J Vis Exp* 1–6. [https://doi: 10.3791/3393](https://doi.org/10.3791/3393)
3. Ayache SS, Palm U, Chalah MA, et al (2016) Prefrontal tDCS decreases pain in patients with multiple sclerosis. *Front Neurosci* 10:1–12. [https://doi:10.3389/fnins.2016.00147](https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00147)
4. Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result. *Pain* 33:87–107. [https://doi: 10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6)
5. Boada MD, Gutierrez S, Aschenbrenner CA, et al (2015) Nerve injury induces a new profile of tactile and mechanical nociceptor input from undamaged peripheral afferents. *J Neurophysiol* 113:100–9. [https://doi: 10.1152/jn.00506.2014](https://doi.org/10.1152/jn.00506.2014)
6. Boldt I, Eriks-Hoogland I, Brinkhof MW, et al (2014) Non-pharmacological interventions for chronic pain in people with spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev*. [https://doi: 10.1002/14651858.CD009177.pub2](https://doi.org/10.1002/14651858.CD009177.pub2)
7. Boudes M, Menigoz A (2009) Non-neuronal BDNF, a key player in development of central sensitization and neuropathic pain. *J Physiol* 587:2111–2. [https://doi:10.1113/jphysiol.2009.172130](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172130)
8. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi: 10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
9. Centeno Crespo P, Anderson Meira Martins L, Camacho Dos Reis C, Fernandes Medeiros L, Leal Scarabelot V, Duzzo Gamaro G, Sandrielly Pereira Soares M, Maria Spanevello R, Moro Stefanello F, Cristina Custódio De Souza I. (2023) Transcranial direct current stimulation effects in the pain threshold and in oxidative stress parameters of neuropathic pain rats. *Neurosci Lett*. 11:137179. doi: 10.1016/j.neulet.2023.137179. Epub ahead of print.
10. Cheeran B, Talelli P, Mori F, et al (2008) A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. *J Physiol* 586:5717–5725. <https://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2008.159905>

- 1 11. Cioato SG, Medeiros LF, Marques Filho PR, et al (2016) Long-Lasting Effect of Transcranial Direct
2 Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic
3 Pain Model. *Brain Stimul.* (2):209–17. [https://doi: 10.1016/j.brs.2015.12.001](https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.12.001)
4
5
6
- 7 12. Coull J a M, Beggs S, Boudreau D, et al (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion
8 gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438:1017–1021. [https://doi:10.1038/nature04223](https://doi.org/10.1038/nature04223)
9
- 10 13. Csifcsak G, Antal A, Hillers F, et al (2009) Modulatory effects of transcranial direct current stimulation
11 on laser-evoked potentials. *Pain Med* 10:122–132. [https://doi: 10.1111/j.1526-4637.2008.00508.x](https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2008.00508.x)
12
13
14
15
- 16 14. DaSilva AF, Volz MS, Bikson M, Fregni F (2011) Electrode positioning and montage in transcranial
17 direct current stimulation. *J Vis Exp* e2744. [https://doi: 10.3791/2744](https://doi.org/10.3791/2744)
18
19
20
- 21 15. Dimov LF, Franciosi AC, Pinheiro Campos AC, et al (2016) Top-Down Effect of Direct Current
22 Stimulation on the Nociceptive Response of Rats. *PLoS One* 11:1–15. [https://doi:](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153506)
23 [10.1371/journal.pone.0153506](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153506)
24
25
26
- 27 16. Dockery CA, Liebetanz D, Birbaumer N, et al (2011) Cumulative benefits of frontal transcranial direct
28 current stimulation on visuospatial working memory training and skill learning in rats. *Neurobiol Learn*
29 *Mem* 96:452–460. [https://doi:10.1016/j.nlm.2011.06.018](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.06.018)
30
31
32
- 33 17. Filho PRM, Vercelino R, Cioato SG, et al (2016) Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts
34 behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-
35 lasting effect. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 64:44–51. [https://doi:](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016)
36 [10.1016/j.pnpbp.2015.06.016](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016)
37
38
39
- 40 18. Fujiyama H, Hyde J, Hinder MR, Kim SJ, McCormack GH, Vickers JC, Summers JJ (2014) Delayed
41 plastic responses to anodal tDCS in older adults. *Front Aging Neurosci* 6:115. [https://doi:](https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00115)
42 [10.3389/fnagi.2014.00115](https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00115)
43
44
45
- 46 19. Howard RF, Walker SM, Mota MP, Fitzgerald M. (2005) The ontogeny of neuropathic pain: postnatal
47 onset of mechanical allodynia in rat spared nerve injury (SNI) and chronic constriction injury (CCI)
48 models. *Pain*. 115(3):382-389. doi: 10.1016/j.pain.2005.03.016.
49
50
51
- 52 20. International association for the study of pain. What is neuropathic pain? *Global year against*
53 *neuropathic pain*, USA, 2014. Accessed in 09 sep 2019. *On line*. Available in: <https://www.iasp-pain.org>
54
55
56
- 57 21. Khan N, Smith MT (2015) Neurotrophins and neuropathic pain: Role in pathobiology. *Molecules*
58 20:10657–10688. [https://doi: 10.3390/molecules200610657](https://doi.org/10.3390/molecules200610657)
59
60
61
62
63
64
65

22. Knotkova H, Portenoy RK, Cruciani RA (2013) Transcranial direct current stimulation (tDCS) relieved itching in a patient with chronic neuropathic pain. *Clin J Pain* 29:621–2
23. Kuo MF, Paulus W, Nitsche MA (2014) Therapeutic effects of non-invasive brain stimulation with direct currents (tDCS) in neuropsychiatric diseases. *Neuroimage* 85:948–960. [https://doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.05.117](https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.117)
24. Liu A, Bryant A, Jefferson A, et al (2016) Exploring the efficacy of a 5-day course of transcranial direct current stimulation (TDCS) on depression and memory function in patients with well-controlled temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 55:11–20. [https://doi:10.1016/j.yebeh.2015.10.032](https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.10.032)
25. Lopes BC, Medeiros LF, Silva de Souza V, Cioato SG, Medeiros HR, Regner GG, Lino de Oliveira C, Fregni F, Caumo W, Torres ILS. (2020) Transcranial direct current stimulation combined with exercise modulates the inflammatory profile and hyperalgesic response in rats subjected to a neuropathic pain model: Long-term effects. *Brain Stimul.*13(3):774-782. doi: 10.1016/j.brs.2020.02.025.
26. Lopes BC, Medeiros LF, Stein DJ, Cioato SG, de Souza VS, Medeiros HR, Sanches PRS, Fregni F, Caumo W, Torres ILS (2021) tDCS and exercise improve anxiety-like behavior and locomotion in chronic pain rats via modulation of neurotrophins and inflammatory mediators. *Behav Brain Res* 404:113173. [https://doi: 10.1016/j.bbr.2021.113173](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113173)
27. Lu VB, Biggs JE, Stebbing MJ, et al (2009) Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. *J Physiol* 587:1013–1032. [https://doi: 10.1113/jphysiol.2008.166306](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.166306)
28. Netto CA, Siegfried B, Izquierdo I (1987) Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: Effect of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol* 48:304–309. [https://doi: 10.1016/S0163-1047\(87\)90850-8](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(87)90850-8)
29. Nunes EA, Medeiros LF, de Freitas JS, et al (2016) Morphine Exposure during Early Life Alters Thermal and Mechanical Thresholds in Rats. *Int J Dev Neurosci.* 60:78-85. [https://doi: 10.1016/j.ijdevneu.2016.12.008](https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.12.008)
30. Oh H, Lewis DA, Sibille E. (2016) The Role of BDNF in Age-Dependent Changes of Excitatory and Inhibitory Synaptic Markers in the Human Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology.* 41(13):3080-3091. doi: 10.1038/npp.2016.126.
31. Palm U, Chalah MA, Padberg F, et al (2016) Effects of transcranial random noise stimulation (tRNS) on affect, pain and attention in multiple sclerosis. *Restor Neurol Neurosci* 34:189–199. [https://doi: 10.3233/RNN-150557](https://doi.org/10.3233/RNN-150557)

32. Pirulli C, Fertonani A, Miniussi C (2013) The role of timing in the induction of neuromodulation in perceptual learning by transcranial electric stimulation. *Brain Stimul* 6:683–689. [https://doi: 10.1016/j.brs.2012.12.005a](https://doi.org/10.1016/j.brs.2012.12.005a)
33. Rjosk V, Kaminski E, Hoff M, et al (2016) Transcranial Alternating Current Stimulation at Beta Frequency: Lack of Immediate Effects on Excitation and Interhemispheric Inhibition of the Human Motor Cortex. *Front Hum Neurosci* 10:560. [https://doi: 10.3389/fnhum.2016.00560](https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00560)
34. Roche N, Lackmy A, Achache V, et al (2011) Effects of anodal transcranial direct current stimulation over the leg motor area on lumbar spinal network excitability in healthy subjects. *J Physiol* 589:2813–2826. [https://doi: 10.1113/jphysiol.2011.20516](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.20516)
35. Santos DS, Lopes BC, Medeiros LF, Assumpção JAF, de Souza A, Salvi AA, da Silva LS, Fregni F, Caumo W, Torres ILS (2020) Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Induces Analgesia in Rats with Neuropathic Pain and Alcohol Abstinence. *Neurochem Res.* 45(11):2653-2663. [https://doi: 10.1007/s11064-020-03116-w](https://doi.org/10.1007/s11064-020-03116-w)
36. Schestatsky P, Morales-Quezada L, Fregni F (2013) Simultaneous EEG monitoring during transcranial direct current stimulation. *J Vis Exp* 1–11. [https://doi: 10.3791/50426](https://doi.org/10.3791/50426)
37. Silva SP, Martins OG, Medeiros LF, Crespo PC, do Couto CAT, de Freitas JS, de Souza A, Morastico A, Cruz LAX, Sanches PRS, Caumo W, Gamaro GD, Torres ILDS, de Souza ICC. (2022) Evidence of Anti-Inflammatory Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in a CFA-Induced Chronic Inflammatory Pain Model in Wistar Rats. *Neuroimmunomodulation*. 29(4):500-514. doi: 10.1159/000520581.
38. Soltész F, Suckling J, Lawrence P, et al (2014) Identification of BDNF sensitive electrophysiological markers of synaptic activity and their structural correlates in healthy subjects using a genetic approach utilizing the functional BDNF Val66Met polymorphism. *PLoS One*. [https://doi: 10.1371/journal.pone.0095558](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095558)
39. Spezia Adachi LN, Caumo W, Laste G, Fernandes Medeiros L, Ripoll Rozisky J, de Souza A, Fregni F, Torres IL (2012) Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res* 1489:17-26. [https://doi: 10.1016/j.brainres.2012.10.009](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.10.009)
40. Vaseghi B, Zoghi M, Jaberzadeh S (2015) The effects of anodal-tDCS on corticospinal excitability enhancement and its after-effects: conventional vs. unihemispheric concurrent dual-site stimulation. *Front Hum Neurosci* 9:1–13. [https://doi: 10.3389/fnhum.2015.00533](https://doi.org/10.3389/fnhum.2015.00533)
41. Vega-Avelaira D, Géranton SM, Fitzgerald M (2009) Differential regulation of immune responses and macrophage/neuron interactions in the dorsal root ganglion in young and adult rats following nerve injury. *Mol Pain* 5:70. [https://doi: 10.1186/1744-8069-5-70](https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-70)

- 1
2
3 42. Vivancos GG, Verri WA, Cunha TM, et al (2004) An electronic pressure-meter nociception paw test for
4 rats. Brazilian J Med Biol Res 37:39139–9. [https://doi: 10.1590/s0100-879x2004000300017](https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000300017).
5
6
7 43. Volz MS, Farmer A, Siegmund B (2016) Reduction of chronic abdominal pain in patients with
8 inflammatory bowel disease through transcranial direct current stimulation: a randomized controlled.
9 Pain. 2016 Feb;157(2):429-437. [https://doi: 10.1097/j.pain.0000000000000386](https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000386)
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Short-term Effectiveness of Transcranial Direct Current Stimulation in the nociceptive behavior of neuropathic pain *Wistar* rats in development

Experimental Brain Research

Priscila Centeno Crespo^{1,2}, Leo Anderson Meira Martins³, Otávio Garcia Martins², Clara Camacho Dos Reis², Ricardo Netto Goulart², Andressa de Souza⁵, Liciane Fernandes Medeiros^{4,5}, Vanessa Leal Scarabelot^{4,6}, Giovana Duzzo Gamaro¹, Sabrina Pereira Silva¹, Marcos Roberto de Oliveira⁷, Iraci Lucena da Silva Torres^{3,4}, Izabel Cristina Custódio de Souza^{*1,2}

¹Postgraduate Program in Bioprospecting and Biochemistry, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, 96010-900, Brazil.

²Laboratory of Cell Neuromodulation: Basic Researches, Biology Institute, Department of Morphology, UFPel, Pelotas, RS, 96030-000, Brazil.

* Corresponding author:

e-mail: izabel.souza@ufpel.edu.br

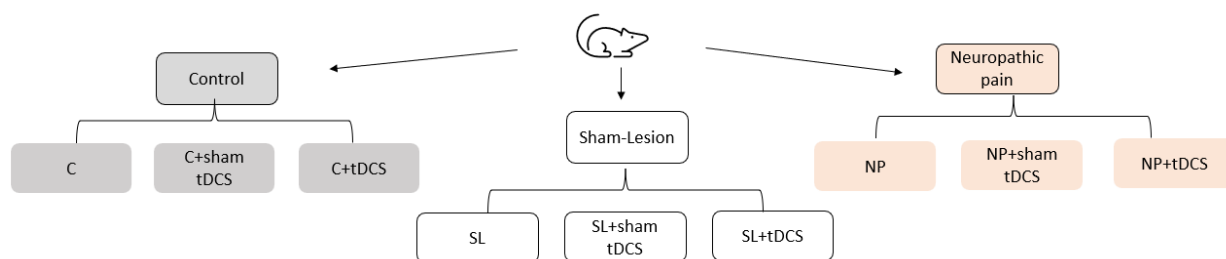
Fig. 1

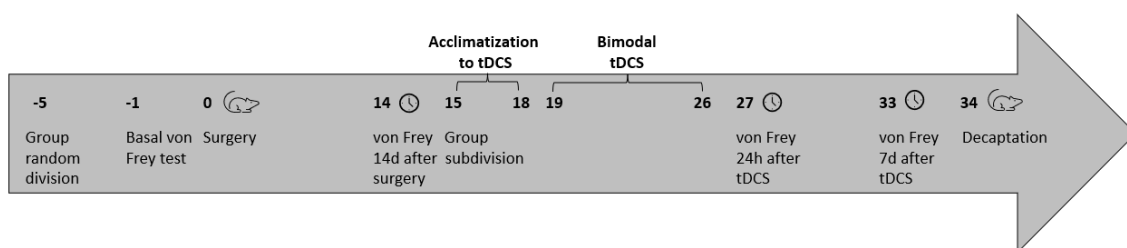
Fig. 2

Fig. 3

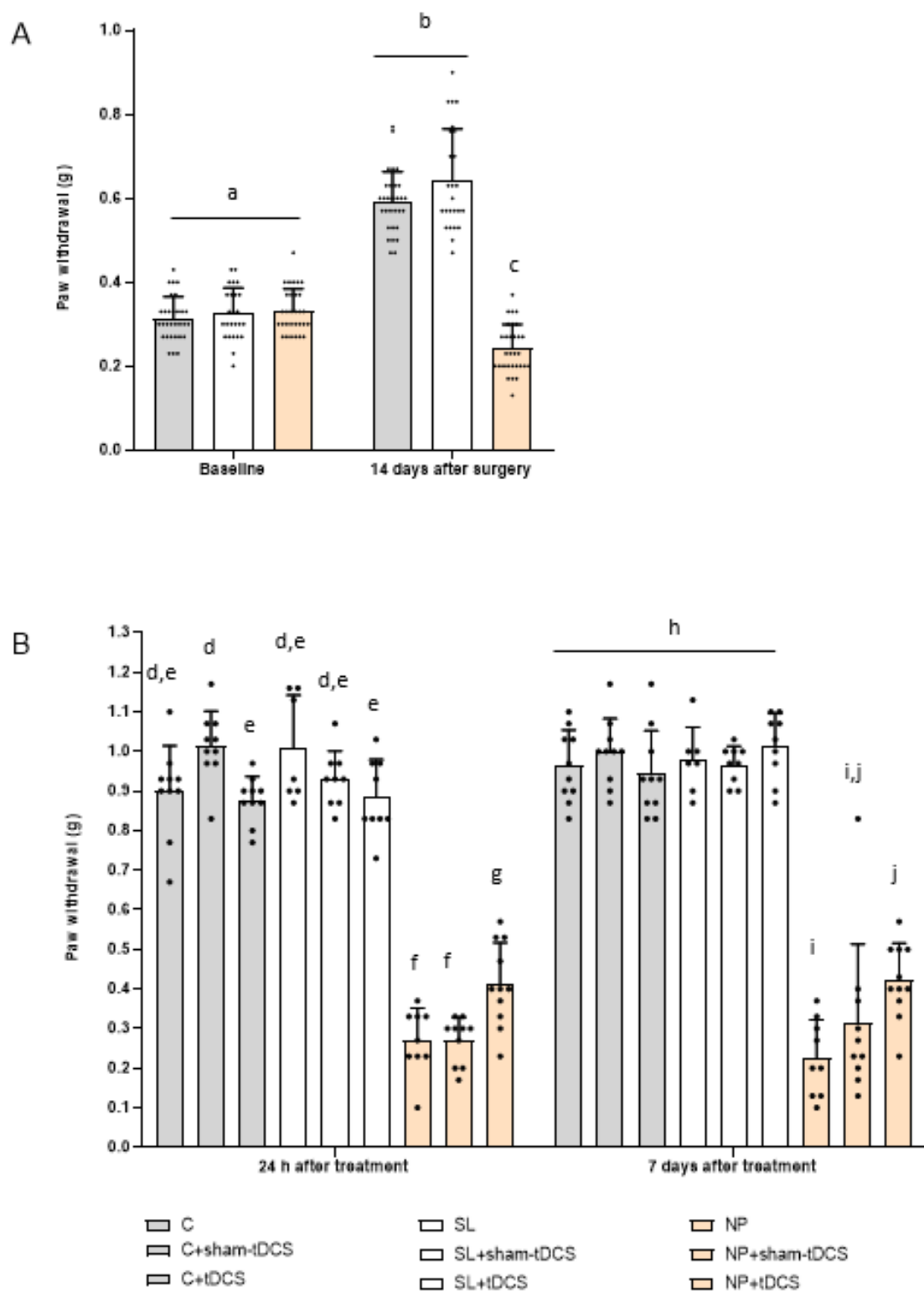
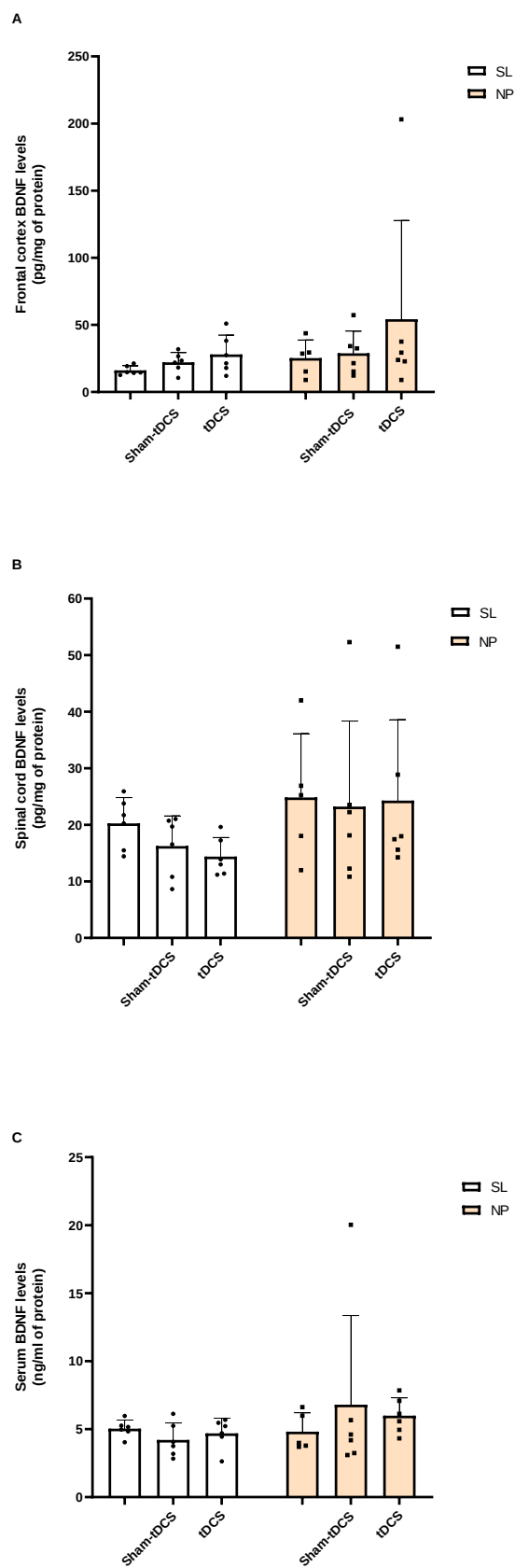


Fig. 4

Short-term effectiveness of transcranial direct current stimulation in the nociceptive behavior of neuropathic pain *Wistar* rats in development

Experimental Brain Research

Priscila Centeno Crespo^{1,2}, Leo Anderson Meira Martins³, Otávio Garcia Martins², Clara Camacho Dos Reis², Ricardo Netto Goulart², Andressa de Souza⁵, Liciane Fernandes Medeiros^{4,5}, Vanessa Leal Scarabelot^{4,6}, Giovana Duzzo Gamaro¹, Sabrina Pereira Silva¹, Marcos Roberto de Oliveira⁷, Iraci Lucena da Silva Torres^{3,4}, Izabel Cristina Custódio de Souza^{*1,2}

¹Postgraduate Program in Bioprospecting and Biochemistry, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, 96010-900, Brazil.

²Laboratory of Cell Neuromodulation: Basic Researches, Biology Institute, Department of Morphology, UFPel, Pelotas, RS, 96030-000, Brazil.

³Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, UFRGS, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

⁴Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Preclinical Researches, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

⁵Postgraduate Program in Health and Human Development, Unilasalle, Canoas, RS, 92010-000, Brazil.

⁶Postgraduate Program in Medicine Medical Sciences, Medicine School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

⁷Department of Chemistry, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, 78060-900, Brazil

Acknowledgments

The authors thank the Committee Development of Higher Education Personnel (CAPES) for supporting this study. We thank the veterinary, Anelize Campelo Félix, and employees of Central Vivarium of UFPel for helping us, and Paulo Sanches for the development of the tDCS device used in this work, Foundation of Amparo of the Research of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the HCPA Animal Experimentation Laboratory.

* Corresponding author:

Izabel Cristina Custodio de Souza, PhD

Professor - Federal University of Pelotas

Biology Institute / Department of Morphology

250 Duque de Caxias Av. Pelotas, RS 96030000

Phone: +55 53 3221-1044

e-mail: izabel.souza@ufpel.edu.br

CAPÍTULO 2

O manuscrito “***Transcranial direct current stimulation effects in the pain threshold and in oxidative stress parameters of neuropathic pain rats***” foi submetido à revista científica Neuroscience Letters e encontra-se aceito para publicação.

----- Mensagem original -----

Assunto:NSL-23229: Final Decision

Data:2023-03-08 15:12

De:"Neuroscience Letters"

Para:Izabel Cristina Custódio de Souza

Responder para:"Neuroscience Letters"

Ms. No.: NSL-23229

Title: Transcranial direct current stimulation effects in the pain threshold and in oxidative stress parameters of neuropathic pain rats
Neuroscience Letters

Dear Dr Custódio de Souza,

We are pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for publication in Neuroscience Letters.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

Many thanks for submitting your fine paper to Neuroscience Letters. We look forward to receiving additional papers from you in the future.

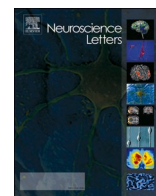
With kind regards,

Pamela E. Knapp, PhD
Editor-in-Chief
Neuroscience Letters



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Transcranial direct current stimulation effects in the pain threshold and in oxidative stress parameters of neuropathic pain rats

Priscila Centeno Crespo^{a,b}, Leo Anderson Meira Martins^c, Clara Camacho Dos Reis^b,
Liciane Fernandes Medeiros^{d,e}, Vanessa Leal Scarabelot^{d,f}, Giovana Duzzo Gamaro^b,
Mayara Sandrielly Pereira Soares^{a,g}, Roselia Maria Spanevello^a, Francieli Moro Stefanello^{a,f},
Izabel Cristina Custódio De Souza^{a,b,*}

^a Postgraduate Program in Bioprospecting and Biochemistry, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS 96010-900, Brazil

^b Laboratory of Cell Neuromodulation: Basic Research, Biology Institute, Department of Morphology, UFPEL, Pelotas, RS 96030-000, Brazil

^c Department of Physiology, ICBS, UFRGS, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

^d Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Preclinical Researches, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

^e Postgraduate Program in Health and Human Development, Unilasalle, Canoas, RS 92010-000, Brazil

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

^g Laboratory of Biomarkers, Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, UFPEL, Campus Universitário Capão do Leão s/n, Pelotas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Neuropathic pain
Oxidative stress
Brain stimulation
tDCS
Neuromodulation

ABSTRACT

Transcranial direct current stimulation (tDCS) can modulate cortical excitability and relieve neuropathic pain (NP), but the role of several biomarkers in this process is not well understood. This study aimed to analyze the effects of tDCS on biochemical parameters in rats with neuropathic pain (NP) induced by chronic constriction injury (CCI) of the right sciatic nerve. Eighty-eight male 60-day-old *Wistar* rats were divided into nine groups: control (C), control-electrode off (CEoff), control-tDCS (C-tDCS), sham-lesion (SL), sham-lesion electrode off (SLEoff), sham-lesion (SL-tDCS), lesion (L), lesion electrode off (LEoff), and lesion-tDCS (L-tDCS). After NP establishment, 20-minute bimodal tDCS for 8 consecutive days was applied to the rats. Fourteen days after the induction of NP, rats developed mechanical hyperalgesia with a decreased threshold, and at the end of treatment, an increase in the pain threshold was observed in NP rats. In addition, NP rats had increased levels of reactive species (RS) in the prefrontal cortex, while superoxide dismutase (SOD) activity was decreased in NP rats. In the spinal cord, nitrite levels and glutathione-S-transferase (GST) activity decreased in the L-tDCS group, and it was observed that increased levels in total sulfhydryl content for neuropathic pain rats were reversed by tDCS. In serum analyses, the neuropathic pain model increased the levels of RS and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and decreased the activity of butyrylcholinesterase (BuChE). In conclusion, bimodal tDCS increased total sulfhydryl content in the spinal cord of rats with neuropathic pain, positively modulating this parameter.

1. Introduction

Neuropathic pain (NP) is characterized by altered nociceptive behavior triggered by somatosensory nervous system injury [1]. Chronic pain progression is attributed to the activation of glial cells located near the site of the injured neurons, which promotes amplification of the immune response by attracting many inflammatory intermediates, such as cytokines and chemokines, thus leading to central sensitization [2,3].

The immune response can also be altered by adenosine modulation,

which produces inflammatory or anti-inflammatory effects depending on its condition and concentration [4]. Souza *et al.* [5] demonstrated total reversion of hypernociceptive behavior after administration of specific and nonspecific adenosine receptor antagonists in rats subjected to partial ligation of the sciatic nerve. In addition, acetylcholine (ACh) could be involved in the inflammatory response. In this context, alterations in the activity of serum butyrylcholinesterase (BuChE), the major ACh hydrolyzing enzyme present in blood, may indirectly signal an imbalance between pro- and anti-inflammatory systemic responses

* Corresponding author at: Postgraduate Program in Bioprospecting and Biochemistry, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS 96010-900, Brazil.
E-mail address: izabel.souza@ufpel.edu.br (I. Cristina Custódio De Souza).

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137179>

Received 23 February 2023; Accepted 8 March 2023

Available online 11 March 2023

0304-3940/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

mediated by non-neuronal cholinergic activity [6]. Indeed, increased ACh levels can lead to antinociception through cholinergic receptor activation [7].

Oxidative stress plays an important role in the development and maintenance of NP [8,9]. Previous studies have revealed that oxidative stress is elevated in the brain stem and sciatic nerve, and this increase is related to allodynia (pain without stimulus), hyperalgesia (increased pain in response to normal stimulus), and inflammatory response due to the induction of chronic constriction of the sciatic nerve [9]. Researchers have demonstrated that hyperalgesia is reduced by treatments that block the increase in reactive oxygen species (RS) and enhance the expression of antioxidant enzymes in neuropathic pain models [10].

There are pharmacological drugs available that are widely administered to patients for treating NP; however, their therapeutic management is restricted because they produce relevant side effects [11]. Electrostimulation techniques are promising tools, and it is an alternative for treating pain. Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a noninvasive technique that modulates brain function [12]. Anodal tDCS can induce long-lasting modification of cortical excitability that modulates synaptic plasticity, oxidative stress levels, neuroinflammation, and autophagy [13,14], thus promoting pain relief [15].

Previous studies have shown the tDCS effects in several biomarkers in neuropathic pain, and over oxidative stress parameters in other neuropathological diseases, however, despite our knowledge, this is the first research that relates the effects of tDCS over oxidative stress parameters in neuropathic pain.

Furthermore, the physiological mechanisms involved in the effects of tDCS during NP treatment remain unclear. Thus, we aimed to analyze the effects of tDCS in rats subjected to NP induced by chronic constriction injury (CCI model) of the right sciatic nerve. Thus, oxidative stress parameters, as well as adenosine deaminase (ADA) and BuChE activities, were evaluated using the CCI model.

2. Methods

2.1. Animals

Eighty-eight male *Wistar* rats at 60 days of age (adult rats) weighing 200–250 g were provided by the Central Vivarium of the Federal University of Pelotas (UFPe) for the experiment, according to the established sample calculation to produce reliable scientific data. Before starting the experiments, the rats were acclimated to the maintenance room for four days and then randomized by weight into three major groups: control, sham-lesion, and lesion groups. Three to four rats were placed in cages measuring 65 × 25 × 15 cm, and the floor of each cage was covered with wood shavings. The rats were maintained with water and food *ad libitum* in a controlled environment at room temperature (22 ± 2 °C) and a light–dark cycle of 12 h. All the procedures were performed to minimize pain and discomfort. This research was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEA 10480–2014), and all experiments and procedures were performed according to the Guide for the Care and Use for Laboratory Animals and Brazilian law 11,794, which establishes procedures for the scientific use of animals.

2.2. Mechanical hyperalgesia measuring through electronic von Frey test

An automatic von Frey aesthesiometer (Insight, São Paulo, Brazil) was used to measure mechanical hyperalgesia. To avoid novelty to the apparatus, the rats were habituated for 20 min one day before the test [16]. They were placed in polypropylene cages measuring 12 cm × 20 cm × 17 cm, and pain was measured through a paw withdrawal test, which consists of measuring the rats' pain threshold in grams (g). Pressure intensity was recorded automatically after paw withdrawal [17]. The force applied to the right paw of the animals was checked, and the threshold at which the animal withdrew the paw upon application of force was determined. The average of three readings of the von Frey test

was used as the behavioral response.

2.3. Neuropathic pain model

Before establishing the neuropathic pain (NP) model, all rats were subjected to the von Frey test to measure mechanical hyperalgesia (baseline). To induce NP, chronic constriction injury (CCI) of rats' sciatic nerves was reproduced according to the model described by Bennett and Xie [18]. Briefly, the rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Then, an incision was made, the sciatic nerve was exposed, and three ligatures were tied (Chromic Catgut 4.0) around it at 1 mm intervals, without impeding the epineural blood flow. The same researcher executed all ligatures to guarantee a similar constriction in all rats. The sciatic nerve of sham rats was exposed through surgery, but no ligatures were performed. All animals subjected to the surgical procedure received postoperative analgesia with tramadol 10 mg/kg [19] through subcutaneous injection. Control rats were not subjected to any surgical procedures.

Fourteen days after surgery, the animals were resubmitted to the von Frey test and NP was confirmed in rats with sciatic nerve ligature. The first three major groups (control group, sham-lesion group, and lesion group) were then divided into the following sub-groups: control (C), control-electrode off (CEoff), control-tDCS (C-tDCS), sham-lesion (SL), sham-lesion electrode off (SLEoff), sham-lesion-tDCS (SL-tDCS), lesion (L), lesion electrode off (LEoff), and lesion-tDCS (L-tDCS) (Fig. 1).

2.4. Experimental design and Transcranial direct current stimulation (tDCS)

Experimental procedures, from establishing the NP model to submitting rats to tDCS sessions and further decapitation for sample collection, are summarized in Fig. 2. Control rats (C, SL, and L groups) did not receive any treatment. Electrode-off rats (CEoff, SLEoff, and LEoff groups) were exposed to the tDCS device; however, the electrodes were not connected to the battery. T-DCS-treated rats (C-tDCS, SL-tDCS, and L-tDCS) were exposed daily to bimodal electrical stimulation sessions for 20 min for eight consecutive days, as described by Lopes *et al.* [20] and Santos *et al.* [21], with minor modifications.

Briefly, a constant direct current of 0.5 mA was emitted using a battery-powered stimulator coupled to the electrodes. For both the electrode-off and tDCS rats, the cathodal electrode was placed at the supraorbital area, while the anodal electrode was placed at the midline between the two hemispheres of the parietal cortex. It is worthwhile to mention that before treatment, stimulated and sham-stimulated rats were habituated to immobilization for four days and the area where the electrodes were positioned was shaved for guaranteeing a better adherence. This procedure was necessary to prevent the rats from removing the electrodes from their heads. After 24 h (short-term effect) and 7 days (long-term effect) after the last tDCS session, rats were again subjected to the von Frey test. Eight days after the end of tDCS treatment, the rats were killed by decapitation. The central nervous system structures (prefrontal cortex and spinal cord) and serum of 45 rats (five rats per group) were collected and kept frozen at – 80 °C until

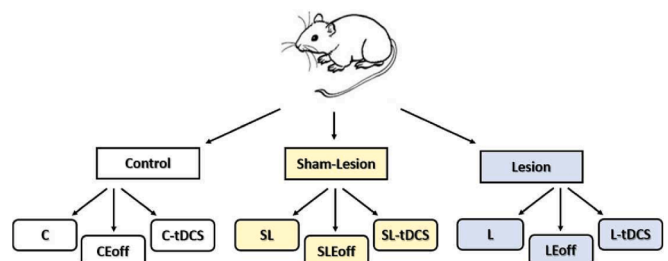


Fig. 1. Experimental groups of research.

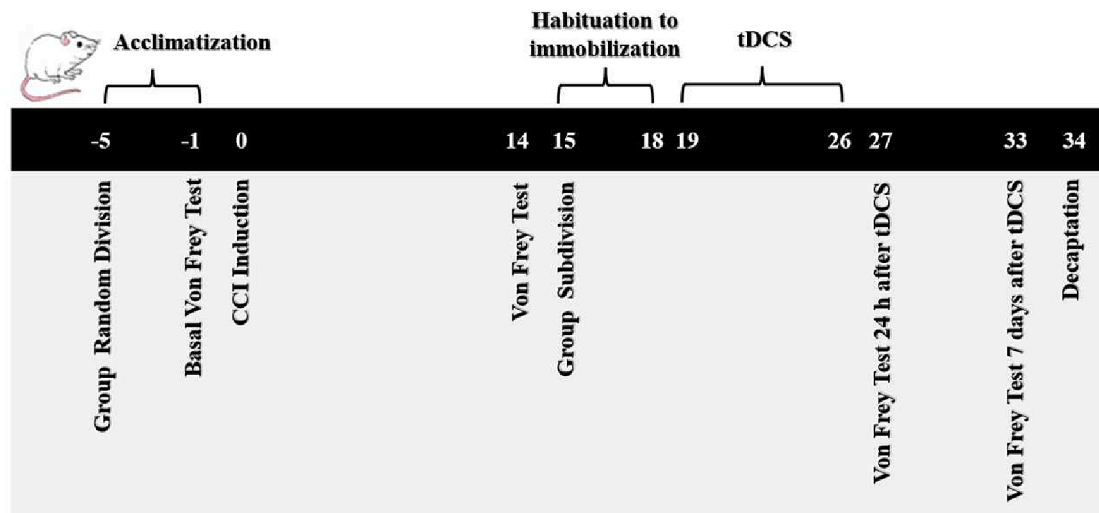


Fig. 2. Timeline of the experiment.

processing.

2.5. Tissue preparation and protein determination

The prefrontal cortex and spinal cord were removed and homogenized in buffered (pH 7.4) 10 mM Tris-HCl solution. The homogenates were then centrifuged at 3500 rpm at 4 °C for 10 min and the supernatant was separated. Lowry's method [22] was used to determine the protein content using bovine serum albumin as a reference in a standard curve.

2.6. Oxidative stress parameters

2.6.1. Reactive oxygen species (RS) measurement

The intracellular RS content was measured as described by Ali *et al.* [23], with minor alterations. In this methodology, DCFH-DA oxidation to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) was measured as a parameter for detecting RS production. Briefly, DCFH-DA was added to the medium containing the samples, and after 30 min, the fluorescence emission at a wavelength of 525 nm was recorded after exciting DCF at a wavelength of 488 nm in a spectrophotometer (SpectraMAX190, Molecular Devices, CA, USA). RS were expressed as μmol DCF per mg of protein.

2.6.2. Nitrite levels determination

The method described by Stuehr and Nathan [24] was used to measure nitrite levels. Briefly, the samples were incubated with 1% sulfanilamide and 0.3 % N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride. Sodium nitrite was used as a reference for the standard curve. The absorbance was measured at 550 nm using a spectrophotometer (SpectraMAX190) and the results were expressed as μM nitrite/mg protein.

2.6.3. Total sulfhydryl content quantification

This assay was performed according to the method described by Aksenov and Markesbery [25]. Serum was added to phosphate buffered saline (pH 7.4) containing EDTA. The reaction was initiated by adding 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The reduction of DTNB by thiols generates the (2-nitro-5-thiobenzoic acid-TNB) molecule, which ionizes to the yellow derivative TNB^{2-} dianion. The absorbance was measured at 412 nm using a spectrophotometer (SpectraMAX190) and the results were reported as nmol TNB/mg protein.

2.6.4. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) quantification

To determine lipid peroxidation, the TBARS method was performed, as described by Esterbauer and Cheeseman [26]. Homogenates were mixed with 15% trichloroacetic acid (TCA) and 0.67% thiobarbituric acid, followed by heating at 100 °C for 30 min. Absorbance was measured at 532 nm using a spectrophotometer (SpectraMAX190) and results were expressed as nmol TBARS/milligram (mg) of protein.

2.6.5. Superoxide dismutase (SOD) activity assay

The SOD activity was evaluated according to the method described by Misra and Fridovich [27]. This assay is based on measuring the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation of adeno-chrome. Absorbance was determined at 412 nm using a spectrophotometer (SpectraMAX190). The results of the analyses were expressed as units(U)/mg protein.

2.6.6. Catalase (CAT) activity assay

The CAT activity was determined as described by Aebi [28]. This test is based on measuring exogenous hydrogen peroxide (H_2O_2) decomposition. For this assay, reaction medium containing 10 mM potassium phosphate buffer (PBS, pH 7.0) and H_2O_2 was added to each sample. The absorbance was measured at 240 nm in a spectrophotometer (SpectraMAX190) and the results were referenced as U/mg of protein.

2.6.7. Glutathione S-transferase (GST) activity assay

GST activity was measured using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as the substrate according to the method described by Habig *et al.* [29]. The assay mixture contains 1 mM CDNB (in ethanol), 10 mM glutathione, 20 mM PBS (pH 6.5), and 20 μL serum. The absorbance was measured at 340 nm in a spectrophotometer (SpectraMAX190) and the activity of GST was reported as μmol GS-DNB min/mg protein.

2.7. Serum adenosine deaminase (ADA) activity assay

ADA activity was analyzed following the method described by Giusti and Galanti [30]. In this assay, ammonia reacts with hypochlorite and phenol to generate an intense blue indophenol. The concentration of ammonia is directly proportional to the absorption of indophenol at 620 nm. The reaction catalyzed by ADA was interrupted at the end of the incubation period (60 min at 37 °C) by adding nitroprusside phenol solution. ADA activity was defined as the quantity of enzyme necessary to release 1 mmol of ammonia of adenosine for a minute under standard assay conditions. The results are expressed in U/L. A unit (1 U) of ADA.

2.8. Serum butyrylcholinesterase (BuChE) activity assay

Butyrylcholinesterase activity was evaluated using the method described by Ellman *et al.* [31] with minor modifications. This assay is based on measuring the formation of 5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid. The reaction was initiated by addition of butyrylthiocholine iodide (BuSCh). The absorbance was measured using a spectrophotometer (SpectraMax90) at 412 nm. BuChE activity was expressed as $\mu\text{mol BuSCh/h/mg protein}$.

2.9. Statistical analyses

Pain measured at different times (from baseline to experimental procedures) and tDCS effects were considered independent variables. Thus, to evaluate the results of the behavioral tests, the generalized estimating equation (GEE) followed by the Bonferroni test was performed. To test the normality of the distribution of the biochemical samples, the Kolmogorov-Smirnov test was used. Since the data presented a normal distribution a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used to compare biochemical data between the groups, considering pain threshold and tDCS effects as independent variables. Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of the mean (S.D.), using an alpha of 5%, and considered significant at $P \leq 0.05$. SPSS (version 20.0) for Windows was used to process results from behavioral tests, and GraphPad Prism 8.4.3 was used to process results from biochemical parameter measurements.

3. Results

3.1. Mechanical hyperalgesia

To establish the NP model, two variables were evaluated: time/period after surgery (from baseline), and tDCS application. Regarding the mechanical hyperalgesia, the generalized estimation equation indicated an interaction between these two independent variables contributing to these results. There was a time effect (Wald $\chi^2 = 167,0.952$; 8, $P < 0.001$) comparing all measures (basal, fourteen days after surgery and twenty four hours and seven days after treatment, except comparing twenty four hours with 7 seven days after treatment between each other). It was observed a group effect (Wald $\chi^2 = 1549,468$; 8, $P < 0.001$), since the L group presented statistically different from all C and SL groups ($p < 0.001$) and from L-tDCS group ($P = 0.008$), and an interaction time $\times$ group (Wald $\chi^2 = 857.72$; 24, $P < 0.001$). At baseline, there were no statistically significant differences among the groups (Wald $\chi^2 = 3.27$; 8, $P = 0.916$). Fourteen days after surgery, all groups exposed to the CCI model showed a reduction in the pain threshold compared to the C and SL groups (Wald $\chi^2 = 1447.18$; 8, $P < 0.001$). There was an effect of treatment twenty four hours after the end of tDCS (Wald $\chi^2 = 797.53$; 8, $P < 0.001$), however, tDCS increased the pain threshold only seven days after the end of tDCS treatment (Wald $\chi^2 = 854.80$; 8, $P < 0.001$), characterized by an increase in L-tDCS group compared to L group ($p < 0.001$) and to LEoff ($p = 0.036$) and by a similar effect of L group compared to LEoff ($P < 0.0001$) (Fig. 3).

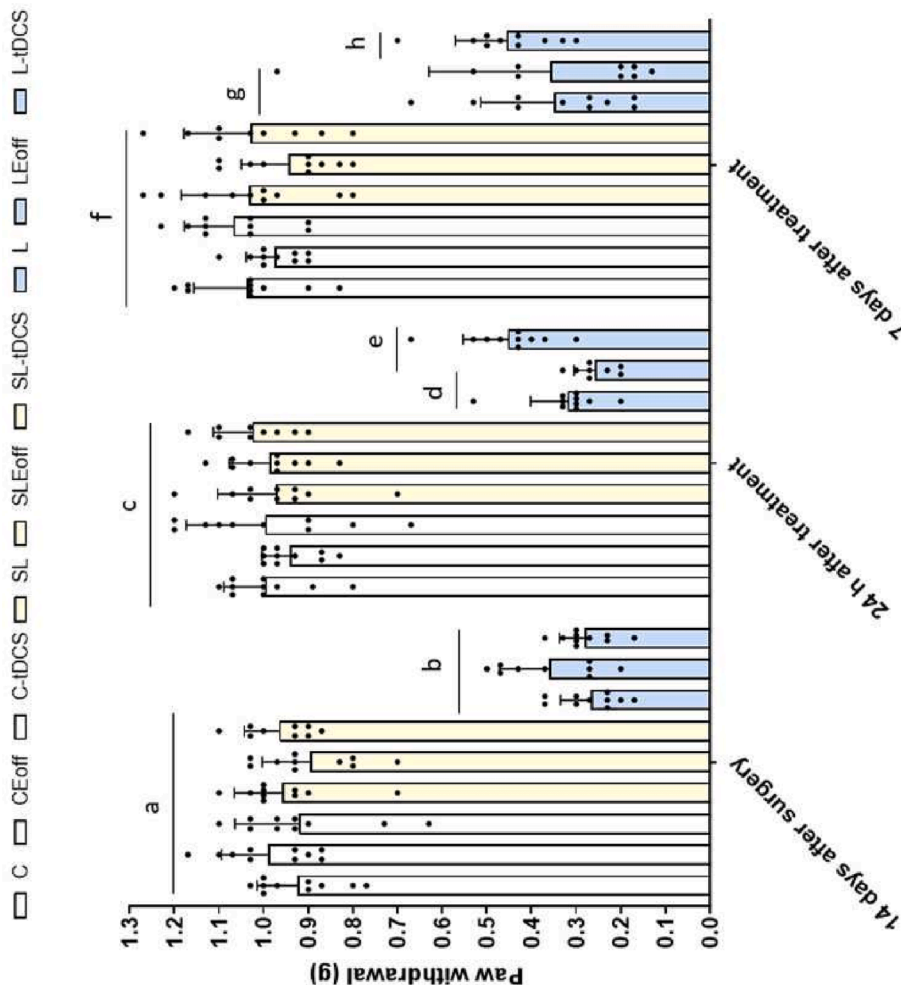


Fig. 3. Effect of tDCS on the mechanical hyperalgesia response through the Von Frey electronics test. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation of the mean (SD). Control (C); Control Electrode off (CEoff); Control-tDCS (C-tDCS); Sham Lesion (SL); Sham lesion Electrode off (SLEoff); Sham Lesion-tDCS (SL-tDCS); Lesion (L); Lesion Electrode off (LEoff); Lesion-tDCS (L-tDCS). Different letter subscripts (a through h) indicate a statistically significant difference between the groups (GEE/Bonferroni interaction time $\times$ group (Wald $\chi^2 = 857.72$; 24, $P < 0.001$; $n = 9-10$).

3.2. Oxidative stress parameters in the prefrontal cortex of rats

RS levels presented an effect of pain ($F_{(2,26)} = 11.16$, $P = 0.0003$) demonstrated by an increased in the prefrontal cortex of the L group compared to those in the C (adjusted $P = 0.0051$), C-tDCS (adjusted $P = 0.0133$), SL (adjusted $P = 0.0066$), and SL-tDCS (adjusted $P = 0.0196$) groups (Fig. 4, panel A). There were no effects of tDCS ($F_{(2,26)} = 1.104$, $P = 0.3465$) or interaction pain $\times$ tDCS ($F_{(4,26)} = 1.877$, $P = 0.1445$). Nitrite levels were not statistically different among the groups for pain ($F_{(2,29)} = 1.038$, $P = 0.3671$) or tDCS ($F_{(2,29)} = 0.3204$, $P = 0.7284$; Fig. 4, panel B).

In the total sulfhydryl content an effect in the SLEoff group compared to the SL (adjusted $P = 0.0400$) and L (adjusted $P = 0.0390$) groups was observed, probably due to the manipulation and/or immobilization of rats; (pain effect, $F_{(2,32)} = 0.9715$, $P = 0.3894$; tDCS effect, $F_{(2,32)} = 3.665$, $P = 0.0369$ and interaction, $F_{(4,32)} = 3.148$, $P = 0.0273$) (Fig. 4, panel C). Although TBARS levels showed a pain effect ($F_{(2,31)} = 4.069$, $P = 0.0270$), no effect of tDCS or interaction between they were found ($F_{(2,31)} = 0.00876$, $P = 0.9913$ and $F_{(4,31)} = 1.160$, $P = 0.3473$, respectively), and they were not statistically significantly different among groups (Fig. 4, panel D).

SOD activity was decreased in the SL group compared to the C (adjusted $P = 0.0182$), CEoff (adjusted $P = 0.0408$), and C-tDCS (adjusted $P = 0.0159$) groups; in the SLEoff group compared to the C (adjusted $P = 0.0244$) and C-tDCS (adjusted $P = 0.0214$) groups; and in the L group compared to the C (adjusted $P = 0.0201$), CEoff (adjusted $P = 0.0430$), and C-tDCS (adjusted $P = 0.0177$) groups (pain effect ($F_{(2,30)} = 14.46$, $P < 0.0001$), tDCS effect ($F_{(2,30)} = 4.488$, $P = 0.0197$) and interaction ($F_{(4,30)} = 0.9669$, $P = 0.4400$); Fig. 4, panel E). CAT activity and GST levels were not statistically different among the groups (pain effect ($F_{(2,30)} = 2.571$, $P = 0.0932$) and tDCS effect ($F_{(2,30)} = 0.7784$, $P = 0.4682$) for CAT activity, pain effect ($F_{(2,35)} = 2.755$, $P = 0.0774$) and tDCS effect ($F_{(2,35)} = 0.6202$, $P = 0.5436$) for GST levels, respectively; Fig. 4, panels F and G, respectively).

3.3. Oxidative stress parameters in the spinal cord of rats

The RS levels were not different among the groups (pain effect, $F_{(2,24)} = 2.828$, $P = 0.0790$) and (tDCS effect, $F_{(2,24)} = 2.937$, $P = 0.0723$; Fig. 5, panel A). Although, L group did not present a statistically significant difference to the C group (adjusted $P = 0.0622$), a decrease in the nitrite levels was detected in the L-tDCS group compared to the L group (adjusted $P = 0.0237$). There were no differences between the L-tDCS and LEoff groups (adjusted $P = 0.9900$), and neither between the LEoff and L groups (adjusted $P = 0.1967$). Pain effect ($F_{(2,30)} = 0.2947$, $P = 0.7469$), tDCS effect ($F_{(2,30)} = 0.9868$, $P = 0.3846$) and interaction pain $\times$ tDCS ($F_{(4,30)} = 4.070$, $P = 0.0094$; Fig. 5, panel B).

A decrease was observed in the total sulfhydryl content in the L group compared to the C (adjusted $P = 0.0064$), CEoff (adjusted $P = 0.0417$), C-tDCS (adjusted $P < 0.0001$), SL (adjusted $P = 0.0009$), SLEoff (adjusted $P < 0.0001$), and SL-tDCS (adjusted $P = 0.0216$) groups. The LEoff group had decreased levels of sulfhydryl content compared to the C-tDCS (adjusted $P = 0.0147$) and SLEoff (adjusted $P = 0.0120$) groups, while the L-tDCS group had increased levels compared to the C (adjusted $P < 0.0001$), CEoff (adjusted $P < 0.0001$), C-tDCS (adjusted $P = 0.0015$), SL (adjusted $P < 0.0001$), SLEoff (adjusted $P = 0.0019$), SL-tDCS (adjusted $P < 0.0001$), L (adjusted $P < 0.0001$), and LEoff (adjusted $P < 0.0001$) groups. The C-tDCS group showed increased levels of sulfhydryl compared to the CEoff group (adjusted $P = 0.0438$), while the SLEoff group presented increased levels compared to the CEoff group (adjusted $P = 0.0363$). Pain effect ($F_{(2,27)} = 0.2561$, $P = 0.7759$), tDCS effect ($F_{(2,27)} = 29.60$, $P < 0.0001$) and interaction pain $\times$ tDCS ($F_{(4,27)} = 27.72$, $P < 0.0001$; Fig. 5, panel C). There were no differences in TBARS levels among the groups for pain ($F_{(2,28)} = 2.108$, $P = 0.6626$) or tDCS ($F_{(2,28)} = 0.3707$, $P = 0.6936$; Fig. 5, panel D).

SOD and CAT activities were not significantly different between

groups. Pain effect, $F_{(2,29)} = 1.113$, $P = 0.3421$) and tDCS effect ($F_{(2,29)} = 0.8575$, $P = 0.4347$) for SOD. Pain effect ($F_{(2,26)} = 0.4286$, $P = 0.6559$) and tDCS effect for CAT ($F_{(2,26)} = 0.5569$, $P = 0.5796$), although there were no significative effects for pain or tDCS, an interaction pain $\times$ tDCS was found for CAT activity ($F_{(4,26)} = 4.045$, $P = 0.0111$, respectively; Fig. 5, panels E and F, respectively). For GST levels a pain effect ($F_{(2,29)} = 5.983$; $P = 0.0067$), a tDCS effect ($F_{(2,29)} = 4.120$; $P = 0.0266$) and an interaction pain $\times$ tDCS ($F_{(4,29)} = 5.979$; $P = 0.0012$) were found. The L group had increased levels of GST compared to the C (adjusted $P = 0.0021$), CEoff (adjusted $P = 0.0116$), SL (adjusted $P = 0.0010$), SLEoff (adjusted $P = 0.0013$), and SL-tDCS (adjusted $P = 0.0004$) groups. tDCS treatment decreased GST levels comparing L to those in the L-tDCS group (adjusted $P = 0.0002$). There were no differences between the L-tDCS and LEoff groups (adjusted $P = 0.38251$) and between the LEoff and L groups (adjusted $P = 0.0595$; Fig. 5, panel G).

3.4. Oxidative stress parameters in the serum of rats

RS levels increased in the L group compared to those in the C (adjusted $P < 0.0001$), CEoff (adjusted $P < 0.0001$), C-tDCS (adjusted $P < 0.0001$), SL (adjusted $P < 0.0001$), SLEoff (adjusted $P < 0.0001$), and SL-tDCS (adjusted $P < 0.0001$) groups. On the other hand, RS levels were lower in the LEoff (adjusted $P < 0.0001$) and L-tDCS (adjusted $P < 0.0001$) groups than in the L group (pain effect ($F_{(2,27)} = 4.940$, $P = 0.0149$), tDCS effect ($F_{(2,27)} = 25.43$, $P < 0.0001$) and interaction pain $\times$ tDCS ($F_{(4,27)} = 21.91$, $P < 0.0001$); Fig. 6, panel A). Nitrite levels and sulfhydryl content were not significantly different among the groups for pain ($F_{(2,35)} = 2.244$, $P = 0.1211$) or tDCS ($F_{(2,35)} = 0.1423$, $P = 0.8678$) for nitrite levels and for pain ($F_{(2,32)} = 2.253$, $P = 0.1215$) or tDCS ($F_{(2,32)} = 0.02125$, $P = 0.9790$) for sulfhydryl content, respectively; Fig. 6, panel B and C).

In TBARS levels, there was an effect of tDCS ($F_{(2,32)} = 3.837$; $P = 0.0321$) and an interaction pain $\times$ tDCS ($F_{(4,32)} = 7.673$; $P = 0.0002$). The L group showed increased levels of TBARS compared with the C (adjusted $P = 0.0030$), C-tDCS (adjusted $P = 0.0034$), SL (adjusted $P = 0.0020$), SLEoff (adjusted $P = 0.00280$) and SL-tDCS (adjusted $P = 0.0087$) groups. tDCS decreased TBARS levels in the L-tDCS group compared to the L group (adjusted $P = 0.0003$); however, the LEoff group showed decreased TBARS levels compared to the L group (adjusted $P = 0.0004$, Fig. 6, panel D). There was not effect of pain in TBARS levels ($F_{(2,32)} = 1.083$; $P = 0.3508$).

SOD activity and CAT activity were not significantly different among the groups (pain effect, $F_{(2,28)} = 1.707$, $P = 0.1997$ and tDCS effect, $F_{(2,28)} = 0.1141$, $P = 0.8926$) and (pain effect, $F_{(2,29)} = 0.9050$, $P = 0.4157$ and tDCS effect, $F_{(2,29)} = 0.2379$; $P = 0.7898$, respectively; Fig. 6, panels E and F, respectively).

3.5. Serum ADA and BuChE activities

ADA activity was not statistically significantly different between groups (pain effect, $F_{(2,29)} = 1.065$, $P = 0.3579$ and tDCS effect, $F_{(2,29)} = 3.281$, $P = 0.0519$; Fig. 7, panel A). BuChE activity was lower in the L group than in the C (adjusted $P = 0.0201$), CEoff (adjusted $P = 0.0036$), and SL-tDCS (adjusted $P = 0.0159$) groups (pain effect, $F_{(2,28)} = 5.352$, $P = 0.0108$, tDCS effect $F_{(2,28)} = 2.098$, $P = 0.1453$) and interaction pain $\times$ tDCS ($F_{(4,28)} = 3.192$, $P = 0.0280$; Fig. 7, panel B).

4. Discussion

In this study, we observed that all groups exposed to the CCI model developed a reduction in the pain threshold compared to the C and SL groups 14 days after surgery. Twenty-four hours after the end of treatment, tDCS showed no effect on pain reduction, but it was able to increase the pain threshold seven days after treatment. Previous studies using the CCI model in *Wistar* rats aged 55–65 days old (Cioato *et al.* [32]

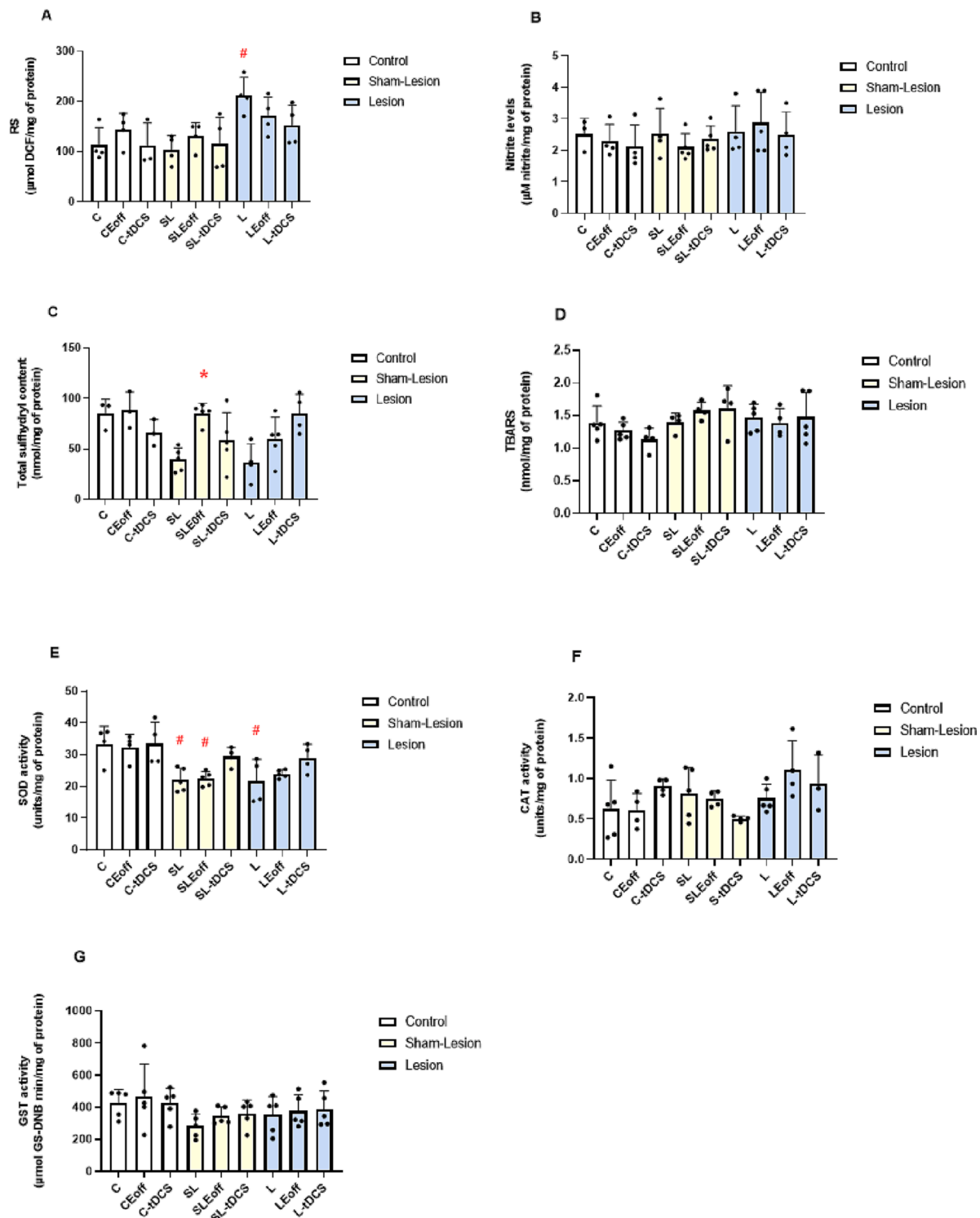
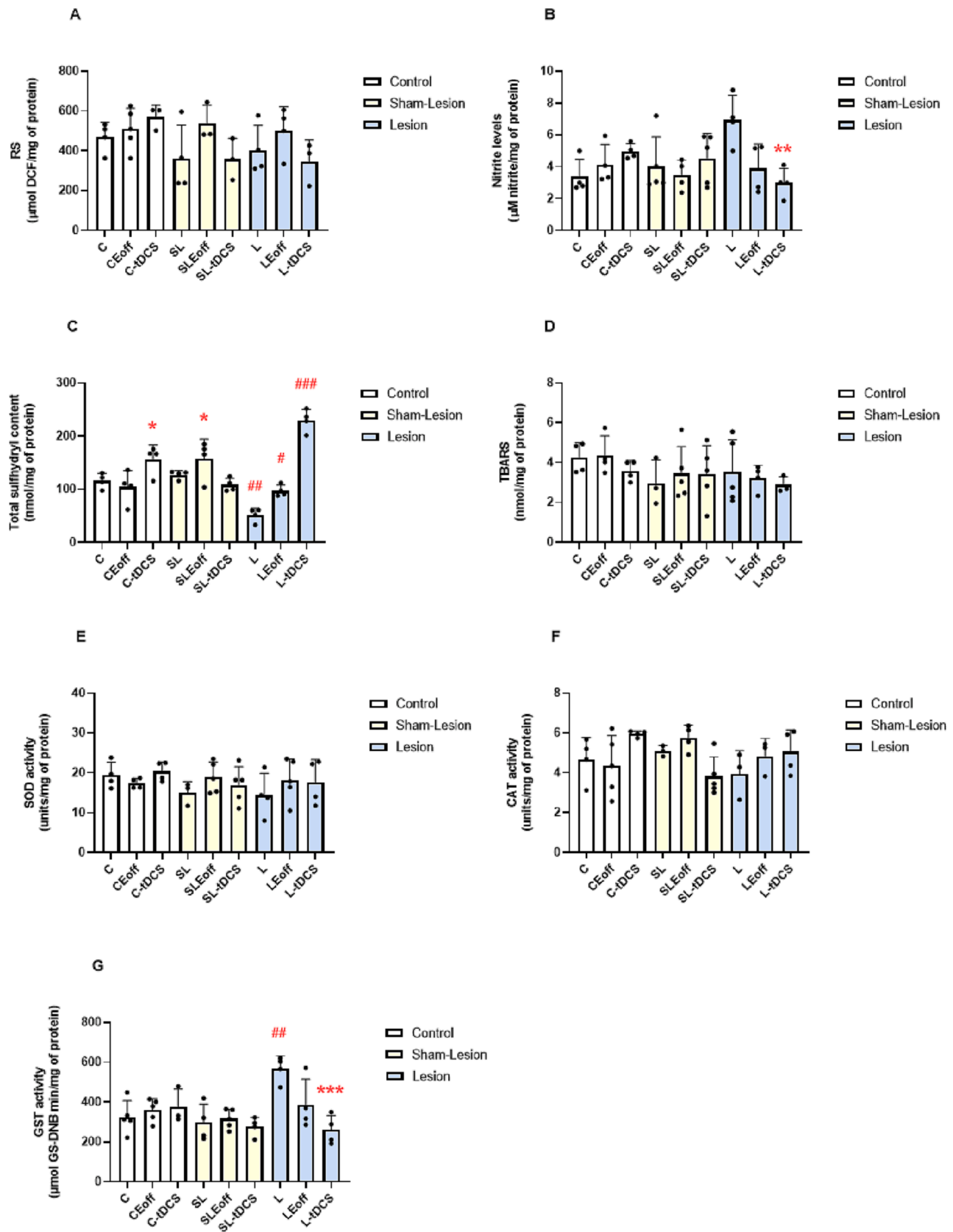


Fig. 4. Effect of tDCS on prefrontal cortex oxidative stress parameters of rats subjected to neuropathic pain model. Panel A: RS levels ($\mu\text{mol DCF/mg}$ of protein); Panel B: Nitrite levels ($\mu\text{M nitrite/mg}$ of protein); Panel C: Total sulfhydryl content (nmol/mg of protein); Panel D: TBARS levels (nmol/mg of protein); Panel E: SOD activity (units/mg of protein); Panel F: CAT activity (units/mg of protein); Panel G: GST activity ($\mu\text{mol GS-DNB/mg}$ of protein). Data are presented as the mean $\pm$ SD. Panel A: # - difference for L group compared to C, C-tDCS, SL and SL-tDCS groups (pain effect $P = 0.0003$, tDCS effect $P = 0.3465$, $n = 3-5$); Panel B: there was no statistical difference between groups (pain effect $P = 0.3671$, tDCS effect $P = 0.7284$, $n = 3-5$); Panel C: * - significant difference for SL-Off group compared to SL and L groups (pain effect $P = 0.3894$, tDCS effect $P = 0.0369$ and interaction pain $\times$ tDCS $P = 0.0273$, $n = 3-5$); Panel D: there was no statistical difference between groups (pain effect $P = 0.0270$, tDCS effect $P = 0.9913$, $n = 4-5$); Panel E: # - significant difference of SL compared to C, C-Off and C-tDCS groups, for L compared to C, C-Off and C-tDCS groups, and for SL-Off compared with C and C-tDCS groups (pain effect $P < 0.0001$, tDCS effect $P = 0.0197$, $n = 4-5$); Panel F and G: there was no statistical difference between groups (pain effect $P = 0.0932$, tDCS effect, $P = 0.4682$, $n = 3-5$) and (pain effect $P = 0.0774$, tDCS effect $P = 0.5436$, $n = 5$); respectively. Two-way ANOVA/Tukey.



(caption on next page)

Fig. 5. Effect of tDCS on spinal cord oxidative stress parameters of rats subjected to neuropathic pain model. Panel A: RS levels ($\mu\text{mol DCF}/\text{mg}$ of protein); Panel B: Nitrite levels (μM nitrite/ mg of protein); Panel C: Total sulfhydryl content (nmol/mg of protein); Panel D: TBARS levels (nmol/mg of protein); Panel E: SOD activity (units/mg of protein); Panel F: CAT activity (units/mg of protein); Panel G: GST activity ($\mu\text{mol GS-DNB}/\text{mg}$ of protein). Data are presented as the mean $\pm$ SD. Panel A: there was no difference between groups (pain effect $P = 0.0790$, tDCS effect $P = 0.0723$, $n = 3-5$); Panel B: ** - significant difference for L-tDCS compared to L group (pain effect $P = 0.7469$, tDCS effect $P = 0.3846$, interaction $P = 0.0094$, $n = 4-5$); Panel C: ## - significant difference for L compared to C, CEoff, C-tDCS, SL, SLEoff and SL-tDCS groups, # - significant difference for LEoff compared to C-tDCS and SLEof groups, and ### - significant difference for L-tDCS compared to C, CEoff, C-tDCS, SL, SLEoff, SL-tDCS, and LEoff groups, and significant difference for C-tDCS compared to CEoff and SLEoff compared to CEoff (pain effect $P = 0.7759$, tDCS effect $P < 0.0001$, interaction pain $\times$ tDCS $P < 0.0001$, $n = 4-5$); Panel D, E and F: there was no difference between groups (pain effect $P = 0.6626$, tDCS effect $P = 0.6936$, $n = 3-5$; pain effect, $P = 0.3421$, tDCS effect $P = 0.4347$, $n = 3-5$; pain effect $P = 0.6559$, tDCS effect $P = 0.5796$, $n = 3-5$, respectively); Panel G: ## - significant difference for L group compared to C, CEoff, SL, SLEoff and SL-tDCS groups, *** - significant difference for L-tDCS compared with L group (pain effect $P = 0.0067$, tDCS effect $P = 0.0266$, interaction pain $\times$ tDCS $P = 0.0012$, $n = 3-5$). Two-way ANOVA/Tukey.

and *Wistar* rats aged 8 weeks = 60 days (Lopes *et al.* [20]; Santos *et al.* [21], showed similar effects. Neuropathic pain (NP) is characterized by mechanical allodynia and hyperalgesia [33]. Medeiros *et al.* [34] systematically reviewed the neurobiological effects of tDCS and reported that tDCS modulates physiological changes that result in plastic modifications in local and distant locations of tDCS application. This review summarizes that tDCS aftereffects are associated with synaptic modulation, which is influenced by the enhancement of synaptic glutamatergic receptors and GABAergic neurotransmission via interneurons. The excitatory/inhibitory pathways are involved in the mechanism of pain relief mediated by tDCS.

The application of weak electrical currents to the cortex modifies the cellular excitability [35] and modulates several biomarkers, as demonstrated by increased brain derived neurotrophic factor levels in the brainstem, spinal cord and serum of neuropathic pain rats treated with tDCS [36] and by the increased pro inflammatory cytokines in the cortex and anti-inflammatory cytokines in the brainstem of rats with neuropathic pain which received tDCS treatment [21]. Here, we observed increased RS levels in the prefrontal cortex of rats with neuropathic pain in response to peripheral lesions, but tDCS did not reverse this effect. In addition, SOD activity decreased in animals subjected to surgery and sham surgery, suggesting that these modifications were caused by the surgical procedures. Additionally, the modulated activity of SOD may be related to elevated RS levels, although RS levels did not modify TBARS levels.

An increased effect of total sulfhydryl content was observed in the SLEoff group compared to the SL and L groups, probably due to the manipulation and/or immobilization of rats. Moreover, the neuropathic pain model and treatment did not modify nitrite levels, CAT, and GST activities at the supraspinal level.

In the spinal cord, we observed a reduction in total sulfhydryl content in rats with NP compared to the rats that were not subjected to CCI or had a sciatic nerve just exposed (sham-lesion) during the surgical procedure. Similar to our results, the study by Forouzanfar *et al.* [37], using a model of CCI with adult male *Wistar* rats subjected to four ligatures of the sciatic nerve, showed a decreased thiol content in the L4-L6 segment of the spinal cord just 14 days after CCI induction. It is noteworthy that we used three ligatures of the sciatic nerve; however, thiol content was analyzed 34 days after CCI, thus suggesting that this effect is maintained for a long period.

NP rats showed increased activity of GST compared to control rats (C group) and rats that had the sciatic nerve just exposed during the surgery (SL group). In the spinal cord, RS and TBARS levels and SOD and CAT activities remained unaltered. In contrast, Zhang *et al.* [38] reported decreased SOD and CAT activities and increased MDA levels in the L4-L5 segment of the lumbar spinal cord in a mouse CCI model 14 days after surgery. SOD converts the superoxide radical to hydrogen peroxide for CAT to convert hydrogen peroxide into water [39]. The superoxide anion seems to be produced in the dorsal horn of the spinal cord and sensitizes these neurons, thus contributing to persistent pain [40]. However, our findings showed no altered mechanism at the spinal level but at the supraspinal level this effect was observed since it was found a decreased SOD activity and an increased RS level in the prefrontal cortex. In addition, increased systemic levels of RS and TBARS could be

due to two factors: (a) increased RS levels in the prefrontal cortex, and (b) modifications at the site of peripheral injury.

Regarding the tDCS effects in the spinal cord, nitrite levels were decreased in rats treated with tDCS (L-tDCS group) compared to rats that were not treated (L group), however, L group do not show significantly statistically different to C group, but evaluating the P value, a tendency of increased nitrite levels of the L group compared to the C group, could be suggested and explain this result. Additionally, tDCS increased the total sulfhydryl content in rats with neuropathic pain (L-tDCS group) compared to non-treated rats (L group) or rats that received sham-stimulation (LEoff group). The C-tDCS group showed increased levels of total sulfhydryl content compared with the CEoff group, thus demonstrating a possible effect of treatment in healthy rats. Furthermore, tDCS decreased GST activity in the L-tDCS group compared to that in the L group; however, the LEoff group showed a similar effect to that of the L-tDCS group. It is important to emphasize that the LEoff and L groups demonstrated no significant differences between them. GSTs plays an important role in the detoxification of xenobiotic compounds and protection against oxidative stress [41]. The increased activity of GST in the spinal cord could be related to the increased levels of nitrite in the spinal cord, accompanied by a reduction in total sulfhydryl content. Along with the restoration of nitrite levels, there was a reduction in GST activity and an increase in the total sulfhydryl content. Neuropathic pain is amplified by an increased expression of protein intermediates that regulates the exacerbate neuronal sensitive response [2] and the uncontrolled production of reactive species is implicated in the initiation and propagation of several pathological conditions [42]. Total sulfhydryl content increases in the L-tDCS group compared with L and LEoff group; these modifications could be related with the degradation of some intermediates that are important to maintain hyperexcitability and hyperalgesia caused by the lesion.

In the serum, RS and TBARS levels increased in NP rats (L group), and tDCS decreased these levels in the L-tDCS group. However, the LEoff group showed the same effect of decreasing serum RS and TBARS levels. Total sulfhydryl content, SOD and CAT activities and nitrite levels were not altered by pain or tDCS in the serum. However, the impairment of RS seems to enhance TBARS levels in the serum, suggesting the existence of lipid peroxidation and/or reaction with products of proteins and acid nucleic oxidations and carbohydrates compounds [42] at the systemic level. The effect of the sham-stimulated group probably occurred due to the manipulation and/or immobilization of rats, which is a limitation of our study. Immobilization could be a factor that stimulates the stress response. Since activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis induces cortisol/corticosterone release [43], serum RS and TBARS levels could be related to the release of corticosterone in immobilized rats.

In our study, for ADA activity, there was no long-term influence of pain or tDCS treatment, and this result may indicate that there were no altered parameters of adenosine metabolism in this study. Moreover, BuChE activity was lower in the L-tDCS group than in the CEoff and SL-tDCS groups. BuChE is a nonspecific enzyme that hydrolyzes ACh and acts as an anti-inflammatory molecule [6]. Thus, when BuChE activity is diminished, ACh hydrolysis is decreased, indicating a major anti-inflammatory action for preventing or controlling the increase in pain-mediated inflammatory intermediates.

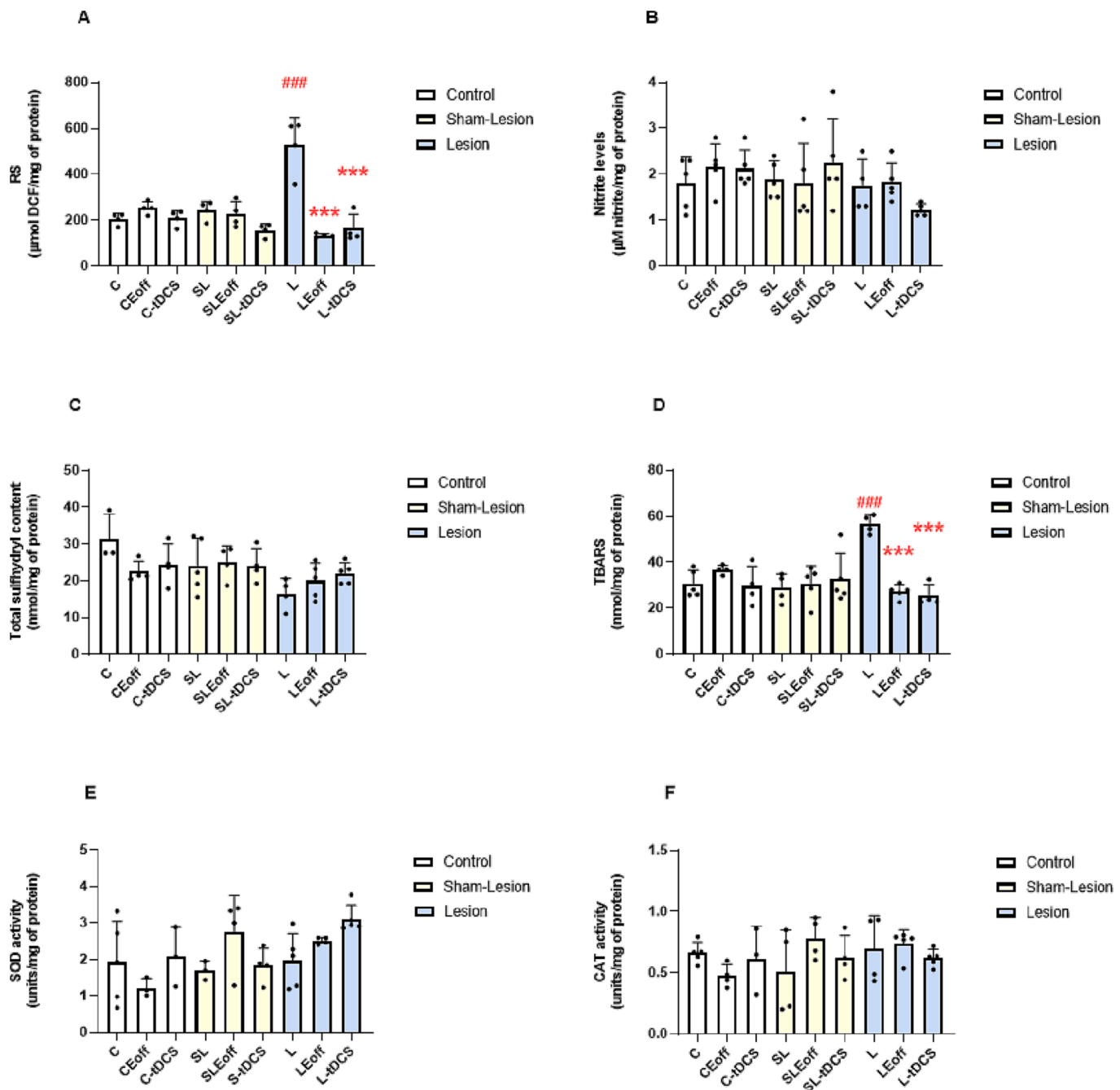


Fig. 6. Effect of tDCS on oxidative stress parameters in serum of rats subjected to neuropathic pain model. Panel A: RS levels (μmol DCF/mg of protein); Panel B: Nitrite levels (μM nitrite/mg of protein); Panel C: Total sulfhydryl content (nmol/mg of protein); Panel D: TBARS levels (nmol/mg of protein); Panel E: SOD activity (units/mg of protein); Panel F: CAT activity (units/mg of protein). Data are presented as the mean ± SD. Panel A: ### - significant difference for L group compared to C, CEoff, C-tDCS, SL, SLEoff and SL-tDCS groups, *** - significant difference for L-off (adjusted $P < 0.0001$) and L-tDCS (adjusted $P < 0.0001$) groups compared to L group (pain effect $P = 0.0149$, tDCS effect $P < 0.0001$, interaction pain X tDCS $P < 0.0001$, $n = 3-5$); Panel B and C: there were no differences among groups (pain effect $P = 0.1211$, tDCS effect $P = 0.8678$, $n = 4-5$ and pain effect $P = 0.1215$, tDCS effect $P = 0.9790$, $n = 3-5$, respectively); Panel D: ### - significant difference for L compared to C, C-tDCS, SL, SLEoff and SL-tDCS groups, *** - significant difference for L-tDCS compared to L group and for L-off group compared to L group; Panel E and Panel F: there were no differences among groups ((pain effect $P = 0.1997$, tDCS effect $P = 0.8926$, $n = 3-5$ and pain effect $P = 0.4157$, tDCS effect $P = 0.7898$, $n = 4-5$, respectively). Two-way ANOVA/Tukey.

A previous study by Leffa *et al.* [12] evaluated oxidative stress parameters in response to tDCS using spontaneously hypertensive rats (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and Wistar Kyoto rats (WKY) as controls. In this study, it was found that tDCS increased RS levels in the hippocampus and glutathione (GSH) levels in control and SHR rats 48 h after eight consecutive days of tDCS exposure. Guo *et al.* [44] investigated the effects of tDCS on

oxidative stress parameters in a vascular dementia model. Anodal tDCS was applied in two sessions for five consecutive days, with a pause of two days between sessions. The authors demonstrated that tDCS decreased the levels of RS and malondialdehyde (MDA) and increased the levels of GSH and SOD activity in the hippocampus of male *Sprague-Dawley* rats with vascular dementia. Lu *et al.* [14] evaluated anodal tDCS treatment in male mice with Parkinson's disease. In the total cortex,

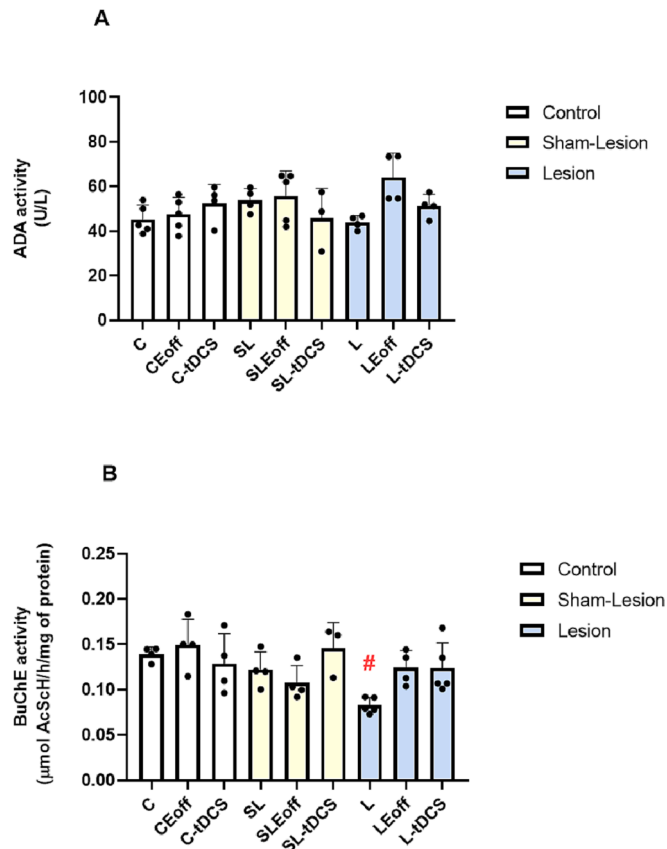


Fig. 7. Effect of tDCS on serum activity of ADA and BuChE in rats subjected to neuropathic pain model. Panel A: ADA activity (units/L); Panel B: BuChE activity ($\mu\text{mol AcSH/h/mg}$ of protein). Data are presented as the mean $\pm$ SD. Panel A: There was not differences between groups (pain effect $P = 0.3579$, tDCS effect $P = 0.0519$, $n = 3-5$); Panel B: # - significant difference for the L group compared to C, CEoff and SL-tDCS groups (pain effect $P = 0.0108$, tDCS effect $P = 0.1453$, and interaction pain $\times$ tDCS $P = 0.0280$, $n = 3-5$). Two-way ANOVA/Tukey.

tDCS decreased MDA levels and increased SOD and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities. These studies demonstrate that oxidative stress parameters are important intermediates of different conditions and that tDCS modulates these parameters in the mentioned disorders.

Our results showed that the CCI model decreased the threshold of rats 14 days after surgery and tDCS treatment increased the threshold 7 days after the end of treatment. Neuropathic pain increases RS levels, while decreasing SOD activity at the supraspinal level. At the spinal level, the CCI model, decreased total sulphydryl content, and increased GST activity. Peripheral lesions induce the release of biological intermediates that lead to sensitization of the spinal cord and perception at the supraspinal level [2]. tDCS increased the total sulphydryl content at the spinal level, thus reducing the long-term pain effect in the neuropathic pain model. This fact agreed with the increased threshold detected by mechanical hyperalgesia, which was promoted by the long-term effect of tDCS treatment. The CCI model increased RS and TBARS levels and decreased the BuChE activity in the serum (Fig. 8). Our findings add new information to the literature because we performed a biochemical analysis 34 days after surgery, thus providing insights into the long-term effects of tDCS treatment in the NP. For further perspectives, it will be interesting to compare these analyses with the short-term effects of tDCS on oxidative stress.

Oxidative stress parameters were previously demonstrated to be influenced by tDCS effects in different kinds of illness. In addition, other studies have shown the modifications occurred in oxidative stress mediators in the NP. However, the most important finding of our study is

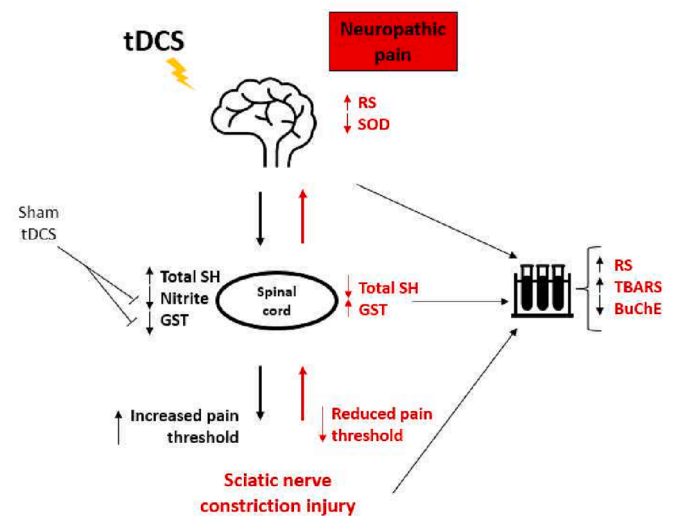


Fig. 8. Modulatory effects of neuropathic pain and tDCS on prefrontal cortex, spinal cord, and serum. Total sulphydryl content (total SH).

that we provide a view of the effects of tDCS in the oxidative stress mediators and in the antioxidant defense, specifically in the NP.

Considering tDCS is an alternative to treat pain, our study brings a important finding since the modifications in the oxidative stress parameters can influence the progress of the lesion once the restored balance of levels of reactive species and antioxidant defense could minimize the exacerbate response to the damage in the neuronal cells reducing hyperexcitability and the activation of pain mediators.

Lastly, our study have some limitations: we used just male rats; as we mentioned before, it was observed a sham-effect occasioned by manipulation and/or immobilization of rats; we used the whole spinal cord for analyses, not determining a specific zone, but we know that different regions of the spinal cord could reflect in different levels of intermediates of NP; we evaluate our analyses only at long term, maybe there are modifications that could be interesting to be observed at the short term effect.

5. Conclusion

Our results contribute to a better understanding of the effects of tDCS on oxidative stress parameters and ADA and BuChE activities during neuropathic pain. Here, we reinforce that a peripheral lesion modifies the pain threshold and biomarkers evaluated at the spinal, supraspinal, and systemic levels for a long term. In addition, bimodal tDCS was able to increase the pain threshold and total sulphydryl content in the spinal cord improving modulatory effects on pain and oxidative stress. Although bimodal tDCS decreased nitrite levels and GST activity in the spinal cord of rats with CCI, similar effects of sham stimulation were observed and should be considered.

6. Future directions

Our future studies will analyze the effects of tDCS using another alternative for immobilization in rats since immobilization used has been demonstrated to influence some biochemical parameters measured in this study.

7. Ethics approval

This study was performed in accordance with Brazilian law 11,794. Approval was granted by the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEA 10480-2014) of the Federal University of Pelotas by the Veterinary Medicine Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix on July 20,

2015.

Funding

This study was financed in part by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education, CAPES-MD Finance Code 001 (P.C. Crespo), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) - MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 (Izabel Cristina Custodio de Souza).

Author contributions

PCC, ICCS, and GDG contributed to the study conception and design; PCC and CCR were responsible for the development of animal experiments; PCC, VLS, LFM, MSPS, and RMS were responsible for the biochemical analyses; PCC, VLS, LFM, LAMM, MSPS, and FMS were responsible for the statistical analyses and layouts; VLS, LFM, and PCC describe the results; PCC wrote the manuscript; LFM, LAMM, GDG, RMS, FMS, and ICCS were responsible for editing and revising the manuscript; PCC, LFM, LAMM, GDG, RMS, FMS, and ICCS were responsible for responding to editorials.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We thank the Committee Development of Higher Education Personnel (CAPES) for supporting this research. We thank the veterinary, Anelize Campelo Félix, and employees of Central Vivarium of Federal University of Pelotas (UFPEL) for helping us, Paulo Sanches for development of the device of transcranial direct current stimulation (tDCS) used in this work, the Foundation of Amparo for the Research of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- [1] Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy, Pain Suppl 3 (1986) S1–226.
- [2] M. Costigan, J. Scholz, C.J. Woolf, Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage, *Annu. Rev. Neurosci.* 32 (2009) 1–32, <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135531>.
- [3] R. Vallejo, D.C. Platt, J.A. Rink, M.A. Jones, C.A. Kelley, A. Gupta, C.L. Cass, K. Eichenberg, A. Vallejo, W.J. Smith, R. Benyamin, D.L. Cedeño, Electrical Stimulation of C6 Glia-Precursor Cells In Vitro Differentially Modulates Gene Expression Related to Chronic Pain Pathways, *Brain Sci.* 9 (11) (2019) 303, <https://doi.org/10.3390/brainsci9110303>.
- [4] R. Akkari, J.C. Burbel, J. Hockmeyer, C.E. Müller, Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs, *Curr. Top. Med. Chem.* 6 (13) (2006) 1375–1399, <https://doi.org/10.2174/15680266106061375>.
- [5] A. Souza, D.F. Martins, L.F. Medeiros, C. Nucci-Martins, T.C. Martins, A. Siteneski, W. Caumo, A.R.S. Dos Santos, I.L.S. Torres, Neurobiological mechanisms of antiallodynic effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a mice model of neuropathic pain, *Brain Res.* 1682 (2018) 14–23, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.005>.
- [6] A.R. Zivkovic, J. Bender, T. Brenner, S. Hofer, K. Schmidt, Reduced butyrylcholinesterase activity is an early indicator of trauma-induced acute systemic inflammatory response, *J. Inflamm. Res.* 9 (2016) 221–230, <https://doi.org/10.2147/JIR.S117590>. Erratum. In: *J. Inflamm. Res.* 16;10:17.
- [7] C.I.B. Walker, S.M. Oliveira, R. Tonello, M.F. Rossato, B.E. da Silva, J. Ferreira, G. Trevisan, Anti-nociceptive effect of stigmasterol in mouse models of acute and chronic pain, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 390 (11) (2017) 1163–1172, <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1416-x>.
- [8] A. Khan, A. Khan, S. Khalid, B. Shal, E. Kang, H. Lee, G. Laumet, E.K. Seo, S. Khan, 7β-(3-Ethyl-*cis*-crotonoyloxy)-1α-(2-methylbutyryloxy)-3,14-dehydro-2 Notonipetranone Attenuates Neuropathic Pain by Suppressing Oxidative Stress, *Inflammatory and Pro-Apoptotic Protein Expressions*, *Molecules* 26 (1) (2021) 181, <https://doi.org/10.3390/molecules26010181>.
- [9] S. Rezaq, A.E. Alsemeh, L. D'Elia, A.M. El-Shazly, D.M. Monti, M. Sobeh, M. Mahmoud, Thymus algeriensis and Thymus fontanesii exert neuroprotective effect against chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020) 20559, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77424-0>.
- [10] A. Kroth, M.D.C.Q. Santos, T.C. Borella da Silva, E.M. Santos Silveira, W.A. Partata, Aqueous leaf extract from *Luehea divaricata* Mart. Modulates oxidative stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain, *J. Ethnopharmacol.* 268 (2021), 113674, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113674>.
- [11] J. Li, J. Ma, M.J. Lacagnina, S. Lorca, M.A. Odem, E.T. Walters, A. Kavelaars, P. M. Grace, Oral Dimethyl Fumarate Reduces Peripheral Neuropathic Pain in Rodents via NFE2L2 Antioxidant Signaling, *Anesthesiology* 132 (2) (2020) 343–356, <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000003077>.
- [12] D.T. Leffa, B. Bellaver, A.A. Salvi, C. de Oliveira, W. Caumo, E.H. Grevet, F. Fregni, A. Quincozes-Santos, L.A. Rohde, I.L.S. Torres, Transcranial direct current stimulation improves long-term memory deficits in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder and modulates oxidative and inflammatory parameters, *Brain Stimul.* 11 (4) (2018) 743–751, <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.04.001>.
- [13] G. Laste, W. Caumo, L.N.S. Adachi, J.R. Rozisky, I.C. de Macedo, P.R.M. Filho, W. A. Partata, F. Fregni, I.L.S. Torres, After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation, *Exp. Brain Res.* 221 (1) (2012) 75–83.
- [14] Lu C, Wei Y, Hu R, Wang Y, Li K, Li X (2015) Transcranial Direct Current Stimulation Ameliorates Behavioral Deficits and Reduces Oxidative Stress in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neuromodulation* 18(6):442-6; discussion 447. doi: 10.1111/ner.12302.
- [15] A.P. Brietzke, M. Zortea, F. Carvalho, P.R.S. Sanches, D.P.J. Silva, I.L.D.S. Torres, F. Fregni, W. Caumo, Large Treatment Effect With Extended Home-Based Transcranial Direct Current Stimulation Over Dorsolateral Prefrontal Cortex in Fibromyalgia: A Proof of Concept Sham-Randomized Clinical Study, *J. Pain* 21 (1–2) (2020) 212–224, <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.06.013>.
- [16] A.C. Netto, B. Siegfried, I. Izquierdo, Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation, *Behav. Neural Biol.* 48 (2) (1987) 304–309, [https://doi.org/10.1016/s0163-1047\(87\)90850-8](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(87)90850-8).
- [17] G.G. Vivancos, W.A. Verri Jr, T.M. Cunha, I.R. Schivo, C.A. Parada, F.Q. Cunha, S. H. Ferreira, An electronic pressure-meter nociception paw test for rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37 (3) (2004) 391–399, <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000300017>.
- [18] G.J. Bennett, Y.K. Xie, A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man, *Pain* 33 (1) (1988) 87–107, [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6).
- [19] T.M. Austin, E. Delpire, Inhibition of KCC2 in mouse spinal cord neurons leads to hypersensitivity to thermal stimulation, *Anesth. Analg.* 113 (6) (2011) 1509–1515, <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e31822e0a5d>.
- [20] B.C. Lopes, L.F. Medeiros, D.J. Stein, S.G. Cioato, V.S. de Souza, H.R. Medeiros, P. R.S. Sanches, F. Fregni, W. Caumo, I.L.S. Torres, tDCS and exercise improve anxiety-like behavior and locomotion in chronic pain rats via modulation of neurotrophins and inflammatory mediators, *Behav. Brain Res.* 404 (2021), 113173, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113173>.
- [21] D.S. Santos, B.C. Lopes, L.F. Medeiros, J.A.F. Assumpção, A. de Souza, A.A. Salvi, L. S. da Silva, F. Fregni, W. Caumo, I.L.S. Torres, Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Induces Analgesia in Rats with Neuropathic Pain and Alcohol Abstinence, *Neurochem. Res.* 45 (11) (2020) 2653–2663, <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03116-w>.
- [22] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1) (1951) 265–275.
- [23] S.F. Ali, C.P. LeBel, S.C. Bondy, Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity, *Neurotoxicology* 13 (3) (1992) 637–648.
- [24] D.J. Stuehr, C.F. Nathan, Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells, *J. Exp. Med.* 169 (5) (1989) 1543–1555, <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1543>.
- [25] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 302 (2–3) (2001) 141–145, [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01636-6).
- [26] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-h).
- [27] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (10) (1972) 3170–3175.
- [28] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126, [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3).
- [29] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249 (22) (1974) 7130–7139.
- [30] G. Giusti, B. Galanti, Colorimetric method, in: *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., Verlag Chemie, Weinheim, 1984, pp. 315–323.
- [31] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr, R.M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

- [32] S.G. Cioato, L.F. Medeiros, P.R. Marques Filho, R. Vercelino, A. de Souza, V. L. Scarabelot, C. de Oliveira, L.N. Adachi, F. Fregni, W. Caumo, I.L. Torres, Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model, *Brain Stimul.* 9 (2) (2016) 209–217, <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.12.001>.
- [33] V.B. Lu, J.E. Biggs, M.J. Stebbing, S. Balasubramanyan, K.G. Todd, A.Y. Lai, W. F. Colmers, D. Dawbarn, K. Ballanyi, P.A. Smith, Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury, *J. Physiol.* 587 (Pt 5) (2009) 1013–1032, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.166306>.
- [34] L.F. Medeiros, I.C. de Souza, L.P. Vidor, A. de Souza, A. Deitos, M.S. Volz, F. Fregni, W. Caumo, I.L. Torres, Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: a review, *Front. Psych.* 3 (2012) 110, <https://doi.org/10.3389/fpsy.2012.00110>.
- [35] M.A. Nitsche, L.G. Cohen, E.M. Wassermann, A. Priori, N. Lang, A. Antal, W. Paulus, F. Hummel, P.S. Boggio, F. Fregni, A. Pascual-Leone, Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008, *Brain Stimul.* 1 (3) (2008) 206–223, <https://doi.org/10.1016/j.brs.2008.06.004>.
- [36] P.R. Filho, R. Vercelino, S.G. Cioato, L.F. Medeiros, C. de Oliveira, V.L. Scarabelot, A. Souza, J.R. Rozisky, S. Quevedo Ada, L.N. Adachi, P.R. Sanches, F. Fregni, W. Caumo, I.L. Torres, Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 4 (64) (2016) 44–51, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016>.
- [37] F. Forouzanfar, H. Hosseinzadeh, M.B. Khorrami, S. Asgharzade, H. Rakhshandeh, Attenuating Effect of Portulaca oleracea Extract on Chronic Constriction Injury Induced Neuropathic Pain in Rats: An Evidence of Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 18 (4) (2019) 342–349, <https://doi.org/10.2174/1871527318666190314110528>.
- [38] G. Zhang, N. Liu, C. Zhu, L. Ma, J. Yang, J. Du, W. Zhang, T. Sun, J. Niu, J. Yu, Antinociceptive effect of isoorientin against neuropathic pain induced by the chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice, *Int. Immunopharmacol.* 75 (2019), 105753, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105753>.
- [39] C.S. Goecks, A. Horst, M.S. Moraes, T. Scheid, C. Kolberg, A. Belló-Klein, W. A. Partata, Assessment of oxidative parameters in rat spinal cord after chronic constriction of the sciatic nerve, *Neurochem. Res.* 37 (9) (2012) 1952–1958, <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0815-0>.
- [40] H.Y. Kim, J. Wang, Y. Lu, J.M. Chung, K. Chung, Superoxide signaling in pain is independent of nitric oxide signaling, *Neuroreport* 20 (16) (2009) 1424–1428, <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e328330f68b>.
- [41] P.C. Babbitt, Reengineering the glutathione S-transferase scaffold: a rational design strategy pays off, *PNAS* 97 (19) (2000) 10298–10300, <https://doi.org/10.1073/pnas.97.19.10298>.
- [42] H.J. Forman, O. Augusto, R. Brigelius-Flohe, P.A. Dennery, B. Kalyanaraman, H. Ischiropoulos, G.E. Mann, R. Radi, L.J. Roberts 2nd, J. Vina, K.J. Davies, Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology, *Free Radic. Biol. Med.* 78 (2015) 233–235, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504>.
- [43] N.C. Nicolaides, E. Kyratzi, A. Lamprokostopoulou, G.P. Chrousos, E. Charmandari, Stress, the stress system and the role of glucocorticoids, *Neuroimmunomodulation* 22 (1–2) (2014) 6–19, <https://doi.org/10.1159/000362736>.
- [44] T. Guo, J. Fang, Z.Y. Tong, S. He, Y. Luo, Transcranial Direct Current Stimulation Ameliorates Cognitive Impairment via Modulating Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy in a Rat Model of Vascular Dementia, *Front. Neurosci.* 14 (2020) 28, <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00028>.

5 Discussão

Nosso estudo contemplou a avaliação dos efeitos da ETCC sobre ratos com dor neuropática, em fase de desenvolvimento (30 dias) e adultos (60 dias). Avaliando os resultados encontrados neste trabalho é possível afirmar que os animais submetidos à constrição do nervo ciático desenvolveram dor, catorze dias após a indução da lesão, que pôde ser verificada pela redução do limiar de dor constatada pela aplicação do teste de retirada da pata. Além disso, os animais submetidos à lesão, tratados com ETCC, apresentaram redução da hiperalgesia produzida pelo modelo de dor aplicado, demonstrando a eficácia do tratamento com ETCC. Estes resultados corroboram com estudos realizados previamente por Cioato et al. (2016) e Filho et al. (2016).

Neste contexto, salienta-se um ponto interessante observado em nossa pesquisa, os ratos com idade de 30 dias apresentaram aumento do limiar de dor conforme deu-se o desenvolvimento desses ratos até a idade adulta. Além disso, os ratos com idade de 30 dias apresentaram redução do limiar de dor, promovido pelo modelo de dor neuropática, a curto prazo (24 horas após o término do tratamento), no entanto, esse efeito não foi observado em longo prazo (7 dias após o final do tratamento). Para os ratos de 60 dias, o oposto foi demonstrado. A curto prazo, não foi possível observar efeito do tratamento, em contrapartida, esse efeito foi observado em longo prazo. Essa diferença observada na resposta ao tratamento pode estar relacionada à idade dos ratos utilizados em nosso estudo. Corroborando, em outros trabalhos um retardo da resolução do quadro de dor após indução de lesão no nervo e resposta neuro-imunológica exacerbada foram observados em ratos, camundongos e primatas saudáveis senescentes (GALBAVY et al., 2015).

Tratando-se ainda dos resultados encontrados na avaliação dos testes de hiperalgesia mecânica dos ratos de 30 dias, observou-se uma redução do limiar de dor de ratos do grupo controle e do grupo sham da lesão, ambos tratados com ETCC quando comparados com ratos do

grupo controle submetidos à estimulação sham, o que supõe um efeito do tratamento em ratos sem constrição do nervo ciático.

Por conseguinte, oito dias após a última sessão de ETCC, os ratos foram eutanasiados e o córtex pré-frontal, a medula espinal e o soro coletados para verificação de marcadores biológicos. Os ratos de 30 dias foram analisados em relação aos efeitos da estimulação sobre a plasticidade neuronal, pela quantificação do BDNF. Enquanto os ratos de 60 dias foram avaliados em relação aos efeitos da ETCC sobre os parâmetros de estresse oxidativo, adenosina deaminase e BuChE.

Nos ratos de 30 dias, os níveis de BDNF permaneceram inalterados no córtex frontal e no soro de ratos com dor neuropática induzida, comparados aos ratos que tiveram o nervo ciático apenas exposto (sem gerar constrição), além disso, não foi observado efeito modulatório da ETCC sobre os ratos tratados. Na medula espinal, foi observado efeito da dor sobre os níveis de BDNF, no entanto, esse resultado não foi confirmado pelo teste de post hoc.

Uma vez que os ratos com idade de 30 dias apresentaram efeito do tratamento pela redução da hiperalgesia mecânica dos ratos com dor neuropática apenas 24 horas após o final do tratamento e os níveis de BDNF foram avaliados apenas 8 dias após o final do tratamento, talvez a interferência dessa neurotrofina não tenha sido detectada em função dessa diferença de tempo entre o efeito do tratamento e a avaliação bioquímica realizada. É possível que em uma avaliação dos níveis de BDNF, 24 horas após o final do tratamento, ocorresse alguma alteração importante entre os grupos.

Ademais, ainda que não tenha sido observada diferença significativa entre os grupos em estudo, os dados estatísticos mostraram um efeito da dor sobre os níveis de BDNF em nível espinal, em longo prazo, nos ratos em desenvolvimento. Estudos prévios realizados em ratos machos *Wistar* adultos (com idade de 55 a 65 dias), utilizando protocolos similares de indução da lesão e de tratamento com ETCC, identificaram redução dos níveis de BDNF na medula espinal de ratos com dor neuropática. Interessantemente,

esses níveis aumentaram, a longo prazo (7 dias após o final do tratamento), pelo efeito da ETCC, após o final de 8 sessões consecutivas de ETCC, com intensidade de 0.5 mA e duração de 20 minutos cada sessão (FILHO et al., 2016).

Adicionalmente, alguns estudos que avaliaram os efeitos da ETCC (protocolo de 8 sessões consecutivas, com intensidade de 0.5 mA e duração de 20 minutos cada sessão) e do exercício físico sobre os níveis de BDNF em ratos com dor neuropática encontraram resultados interessantes. Lopes et al. (2020) identificaram um aumento dos níveis de BDNF corticais e uma redução dos níveis de BDNF no tronco cerebral, promovidos pelo tratamento com ETCC, 48 horas após o final do tratamento, bem como um aumento dos níveis de BDNF em ratos adultos (200 - 250 g) com dor neuropática submetidos à ETCC + exercício físico. Neste mesmo estudo, foi observado um aumento dos níveis de BDNF em ratos com dor neuropática comparados aos ratos submetidos ao sham da lesão, a curto prazo e uma redução desses níveis em ratos com dor neuropática submetidos à estimulação sham + exercício físico, a longo prazo.

Em estudo similar, utilizando o mesmo protocolo de tratamento, Lopes et al. (2021) observaram um aumento dos níveis de BDNF no hipocampo e no nervo ciático de ratos adultos (8 semanas de idade) com dor neuropática, promovidos pelo efeito da ETCC + exercício físico, a curto e a longo prazo.

Os efeitos da ETCC sobre os níveis de BDNF em ratos adultos com dor neuropática estão descritos na literatura. No entanto, nosso estudo avaliou apenas os efeitos a curto prazo da ETCC sobre essa neurotrofina, nos ratos em fase de desenvolvimento. Mais estudos são necessários para elucidar o envolvimento do BDNF em estudos que avaliem o efeito da ETCC em ratos jovens com dor neuropática.

Sobre os ratos de 60 dias, foram avaliados os níveis de ROS, nitritos, conteúdo total de tióis, TBARS, SOD, CAT e GST no córtex pré-frontal e na medula espinal. Os marcadores ROS, nitritos, tióis, TBARS, SOD, CAT ADA e a BuChE foram mensurados em soro.

Em nível supraespinal, foi observado um aumento dos níveis de ROS e uma diminuição da atividade da SOD em ratos com dor neuropática. Uma redução na atividade da SOD em ratos que tiveram os nervos ciáticos apenas expostos também foi constatada. Considerando que uma redução na atividade da SOD também foi observada nos ratos do grupo sham, podemos sugerir que essa alteração possa ter ocorrido como efeito do procedimento cirúrgico. Além disso, esse efeito pode estar relacionado ao aumento dos níveis de RS observados nos ratos com dor neuropática, uma vez que a redução da atividade da SOD poderia resultar em aumento dos níveis de espécies reativas.

Nos ratos do grupo sham da lesão (que passaram pelo procedimento cirúrgico sem que ocorresse constrição do nervo) e que foram submetidos à simulação do tratamento com ETCC foi verificado um aumento do conteúdo total de tióis, provavelmente ocasionado pela manipulação e/ou imobilização dos ratos deste grupo. Ademais, não foram detectadas outras alterações significativas, em longo prazo, nos níveis dos demais marcadores avaliados no córtex pré-frontal.

Em nível espinal, foi observada uma redução dos níveis de nitritos em ratos com dor neuropática, tratados com ETCC, comparados com os ratos com dor neuropática que não receberam tratamento. Embora não tenha sido detectado um aumento estatisticamente significativo dos níveis de nitritos em ratos com dor neuropática, é possível observar uma tendência de aumento desses níveis quando comparados aos ratos do grupo controle, o que poderia explicar estes resultados.

Uma redução no conteúdo total de tióis foi observada nos ratos com dor neuropática, a qual foi efetivamente revertida pela ETCC. Além disso, a ETCC foi capaz de promover um aumento do conteúdo total de tióis em ratos do grupo controle. Um aumento do conteúdo total de tióis também foi observado em ratos do grupo sham da lesão que receberam simulação do tratamento, possivelmente ocasionado pela imobilização dos ratos. A dor neuropática é amplificada pelo aumento da expressão de proteínas que regulam a resposta neuronal

exacerbada e aumentam a hipersensibilidade neuronal (COSTIGAN et al., 2009), o que poderia justificar o aumento observado para o conteúdo total de tióis nos ratos com dor neuropática. A redução desses níveis nos ratos com dor neuropática tratados com ETCC poderia estar relacionada ao controle da liberação desses mediadores, gerando também uma redução da hiperalgesia mecânica.

Adicionalmente, ocorreu aumento dos níveis de GST nos ratos com dor neuropática. A GST possui ação detoxificante sendo importante na proteção contra estresse oxidativo (BABITT, 2000). Provavelmente esse aumento está relacionado à resposta aumentada a marcadores de estresse oxidativo nos processos de dor. Embora tenha sido observado uma redução da atividade da GST em ratos com dor neuropática, tratados com ETCC, e o efeito do tratamento tenha sido significativo comparando com animais não tratados, não houve diferença estatística em comparação com animais que receberam simulação da ETCC.

A redução do conteúdo total de tióis e o aumento da atividade da GST indicam aumento da atividade celular com incremento da atividade antioxidante, provavelmente ocasionada pela alteração detectada nos níveis de nitritos. Ademais, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para os demais parâmetros avaliados na medula espinal.

Em nível sérico, um aumento dos níveis de ROS e de TBARS foram observados em ratos com dor neuropática induzida, além disso, o tratamento reduziu esses níveis para ambos os marcadores, no entanto, ratos com dor neuropática submetidos à simulação do tratamento também apresentaram redução dos níveis séricos de ROS e TBARS. O incremento desses biomarcadores em nível sérico pode refletir o aumento ocasionado em nível central, uma vez que a redução da atividade da SOD, acompanhada pelo aumento nos níveis de ROS em nível supraespinal, pode estar relacionado ao aumento dos níveis de ROS e TBARS em nível sistêmico. Também é possível que os níveis de ROS e TBARS detectados no soro possam estar relacionados com alterações em nível periférico.

Além disso, a imobilização dos ratos também poderia elevar o nível de estresse mediado pela liberação de cortisol, pela ativação do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal, promovendo aumento de espécies reativas e o dano às estruturas celulares (NICOLAIDES et al., 2014).

Ainda em nível sérico, foi observada uma redução da atividade da BuChE nos ratos com dor neuropática comparados aos ratos do grupo controle. A atividade aumentada de BuChE está relacionada com inflamação crônica (YANG et al., 2022; ZIVKOVIC et al., 2016). Uma redução na atividade da BuChE acarreta maior disponibilidade de ACh, a qual possui ação anti-inflamatória e potencializa as sinapses excitatórias no sistema nervoso.

Para a atividade da adenosina, não foram observadas alterações significativas entre os grupos. Embora a desaminação da adenosina a inosina pela enzima adenosina deaminase possua papel importante, este não é o principal mecanismo de degradação da adenosina (revisado por AKKARI et al., 2006; MULLER e SCIOR, 1993). Dessa forma, podemos inferir que a adenosina não foi modificada pelo modelo de dor ou pelo tratamento em nosso estudo, pelo mecanismo citado.

Retomando as avaliações dos efeitos da ETCC, estudos prévios verificaram importantes alterações em parâmetros de estresse oxidativo em modelos animais de diferentes doenças.

Em estudo realizado por Lu et al. (2015), os efeitos da ETCC foram avaliados em ratos submetidos a um modelo animal de doença de Parkinson (DP), utilizando camundongos C57BL. Os camundongos foram tratados com tDCS anodal, com uma frequência de 0.2 mA, por 21 dias com duração de 10 minutos cada sessão. A ETCC promoveu redução dos níveis de malondialdeído (MDA) e aumentou as atividades da SOD e da glutathione peroxidase no córtex total de camundongos com DP comparados a camundongos com DP que receberam simulação da estimulação.

Leffa et al. (2018) avaliaram os efeitos da ETCC em ratos de 90 dias de idade submetidos a um modelo animal de transtorno do déficit de atenção/hiperatividade (TDAH). A ETCC foi aplicada por 8 dias consecutivos, com duração de 20 minutos cada sessão, utilizando uma

frequência de 0.5 mA. Quarenta e oito hora após o final do tratamento, os autores verificaram um aumento da produção de ROS no hipocampo de ratos com TDAH e um aumento dos níveis de glutathione no hipocampo de ratos controle e com TDAH.

Guo et al. (2020) investigaram os efeitos da ETCC sobre parâmetros de estresse oxidativo, em um modelo de demência vascular, utilizando ratos machos Sprague Dawley. A ETCC anodal foi aplicada, com uma frequência de 0.2 mA, em 2 sessões de 5 dias consecutivos, com um intervalo de 2 dias entre as sessões. Os autores encontraram que a ETCC reduziu os níveis de RS e MDA e aumentou os níveis de glutathione e a atividade da SOD no hipocampo de ratos submetidos a um modelo de demência vascular.

Enfim, diferentes estudos demonstraram que a ETCC modula uma gama de marcadores de estresse oxidativo em variados tipos de doenças. Ressalta-se que diferentes protocolos de tratamento, com diferentes frequências de estimulação, tempo de tratamento e duração de cada sessão podem interferir os efeitos ocasionados pela estimulação. Nosso estudo é relevante, pois avaliou os efeitos da ETCC sobre os parâmetros de estresse oxidativo, especificamente na dor neuropática, utilizando um protocolo bem estabelecido.

Considerando os resultados encontrados para os ratos de 30 e 60 dias, podemos considerar que a dor e a ETCC promoveram efeitos importantes sobre os diferentes marcadores avaliados: marcador de plasticidade nos ratos de 30 dias e marcadores de estresse oxidativo e dano tecidual em ratos de 60 dias. A modulação das vias inibitórias pode estar relacionada com a modulação desses marcadores, uma vez que a estimulação é aplicada em nível cortical. O mecanismo espinal é de extrema importância para o processo de ativação e manutenção da dor e a ETCC demonstrou eficácia na modulação de marcadores em nível espinal. O controle de mediadores biológicos em nível espinal parece ser essencial para promoção do alívio da dor neuropática.

Além disso, estes resultados podem contribuir para um diferente foco sobre o tratamento da dor neuropática em pacientes jovens, uma vez que foi observada redução da hiperalgesia mecânica a curto prazo

para os ratos em desenvolvimento e redução da hiperalgesia mecânica a longo prazo para os ratos adultos. Ademais, o melhor entendimento dos mecanismos pelo qual a ETCC modula marcadores reduzindo a hiperalgesia mecânica, pode influenciar também a pesquisa por novos alvos terapêuticos para o tratamento da dor.

Por fim, nosso estudo apresentou algumas limitações, dentre as quais, podemos citar o efeito da manipulação e/ou imobilização sobre os ratos do grupo sham, sendo necessária uma forma diferente de imobilização para estudos futuros. Foram utilizados apenas ratos machos. Foi coletada a medula espinal inteira para a realização das análises bioquímicas, no entanto, pode haver diferenças nos níveis de marcadores analisados em diferentes regiões da medula espinal. As análises bioquímicas foram realizadas em longo prazo, entretanto, pode haver efeitos importantes sobre os marcadores avaliados em curto prazo.

6 Considerações finais

Com base na revisão de literatura realizada e nos resultados obtidos foi possível concluir que a dor neuropática é uma situação clínica complexa em relação aos mecanismos envolvidos na ativação e na manutenção do processo de dor. Embora existam tratamentos farmacológicos, as opções disponíveis ocasionam efeitos colaterais consideráveis. A ETCC é uma técnica de estimulação não invasiva que vem demonstrando resultados promissores em estudos pré-clínicos e clínicos para o tratamento de dores crônicas, incluindo a dor neuropática. Ainda assim, estudos necessitam ser realizados para elucidar os mediadores envolvidos nos processos de ativação e manutenção da dor e a forma como a ETCC interage modulando esses mediadores. Nosso estudo demonstrou a eficácia da ETCC em ratos em desenvolvimento (30 dias) em curto prazo e ratificou a eficácia da ETCC para tratar a dor em ratos adultos (60 dias) em longo prazo.

Demonstramos ainda, que ocorreu um efeito da dor sobre os níveis de BDNF na medula espinal de ratos em desenvolvimento, que o modelo de dor foi capaz de modificar parâmetros de estresse oxidativo e que a ETCC produziu efeito positivo modulando a hiperalgesia mecânica e o conteúdo total de tióis em ratos de 60 dias. Ressalta-se que embora os efeitos da ETCC sobre o BDNF na dor neuropática, já tenham sido descritos em ratos adultos, nosso trabalho demonstrou os efeitos da ETCC sobre essa neurotrofina em ratos com constrição do nervo ciático, em fase de desenvolvimento, disponibilizando resultados importantes e que contribuem com a literatura científica. Da mesma forma, estudos prévios demonstraram a eficácia da ETCC sobre parâmetros de estresse oxidativo em diferentes modelos animais de variadas doenças, mas este trabalho é inovador em avaliar, especificamente, os efeitos da ETCC sobre parâmetros de estresse oxidativo em ratos com dor neuropática, em nível espinal, supraespinal e sistêmico.

Por fim, o conhecimento disponível atualmente é relevante, no entanto, ainda são necessários estudos que avaliem as relações entre dor neuropática, mediadores biológicos e ETCC.

Perspectivas

Nesta tese foram descritos os resultados comportamentais e bioquímicos, por meio da avaliação do limiar nociceptivo em ratos de 30 e 60 dias, de marcadores de plasticidade neuronal, BDNF em córtex pré-frontal, medula espinal e soro de ratos de 30 dias e de parâmetros de estresse oxidativo em córtex pré-frontal, medula espinal e soro de ratos de 60 dias, das enzimas ADA e BuChE em soro de ratos de 60 dias. A partir dos resultados apresentados, foram relacionados os efeitos da aplicação da eletroestimulação transcraniana, a plasticidade cerebral de ratos com dor neuropática induzida e a neurogênese. Para avaliações futuras, com o intuito de melhor compreender os mecanismos de ação da ETCC, ressalta-se as seguintes perspectivas deste trabalho:

- ✓ Avaliar marcadores de plasticidade (BDNF e mTOR) pelo método de imuno-histoquímica do cérebro total dos animais de 30 e 60 dias;
- ✓ Avaliar histologicamente quanto às alterações na morfologia dos nervos ciáticos dos ratos de 30 e 60 dias;
- ✓ Analisar o RNAm das proteínas BDNF e mTOR, em estruturas do SNC (córtex pré-frontal, medula espinal, hipocampo e estriado) dos animais de ambas as idades.

Produções

CENTENO CRESPO, P.; ANDERSON MEIRA MARTINS, L.; CAMACHO DOS REIS, C.; FERNANDES MEDEIROS, L.; LEAL SCARABELOT, V.; DUZZO GAMARO, G.; SANDRIELLY PEREIRA SOARES, M.; MARIA SPANEVELLO, R.; MORO STEFANELLO, F.; CRISTINA CUSTÓDIO DE SOUZA, I. Transcranial direct current stimulation effects in the pain threshold and in oxidative stress parameters of neuropathic pain rats. **Neuroscience Letters**, 2023 Apr 23;803:137179. doi: 10.1016/j.neulet.2023.137179.

SILVA, S.P.; MARTINS, O.T.; MEDEIROS, L.F.; CRESPO, P.C.; DO COUTO, C.A.T.; DE FREITAS, J.S.; DE SOUZA, A.; MORÁSTICO, A.; CRUZ, L.A.X.; SANCHES, P.R.S.; CAUMO, W.; GAMARO, G.D.; TORRES, I.L.S.; DE SOUZA, I.C.C.S. Evidence of Anti-Inflammatory Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in a CFA-induced Chronic Inflammatory Pain Model in *Wistar* Rats. **Neuroimmunomodulation**, 2022 Feb 2:1-15. doi: 10.1159/000520581.

Suporte financeiro:

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 (Priscila Centeno Crespo) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 (Izabel Cristina Custódio de Souza)”.

Referências

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AKKARI, R.; BURBIEL, J.C.; HOCKEMEYER, J.; MÜLLER, C.E. Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. **Current Topics Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 1375-1399, 2006.

AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p.141-145, 2001.

ALI, S.F.; LEBEL, C.P.; BONDY, S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, p. 637-648, 1992.

ALM, P. A.; DREIMANIS, K. Neuropathic pain: transcranial electric motor cortex stimulation using high frequency random noise. Case report of a novel treatment. **Journal of Pain Research**, v.6, p. 479–486, 2013.

ANTAL, A.; TERNEY, D.; KÜHNEL, S.; PAULUS, W. Anodal Transcranial Direct Current Stimulation of the Motor Cortex Ameliorates Chronic Pain and Reduces Short Intracortical Inhibition. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 39, p. 890–903, 2010.

ARUL-ANANDAM, A. P.; LOO, C.; SACHDEV, P. Transcranial direct current stimulation - what is the evidence for its efficacy and safety? **Medicine Reports**, v.1, p.1-4, 2009.

ASANTE, C.O.; WALLACE, V.C.; DICKENSON, A.H. Mammalian target of rapamycin signaling in the spinal cord is required for neuronal plasticity and behavioral hypersensitivity associated with neuropathy in the rat. **Journal of Pain**, v. 11, p. 1356-1367, 2010.

AUSTIN, T.M.; DELPIRE, E. Inhibition of KCC2 in mouse spinal cord neurons leads to hypersensitivity to thermal stimulation. **Anesthesia e Analgesia**, v. 113, p. 1509-1515, 2011.

AUSTIN, P.J.; WU, A.; MOALEM-TAYLOR, G. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. **Journal of Visualized Experiments**, v. 61, p. 1–6, 2012.

AYACHE, S. S.; PALM, U.; CHALAH, M.A.; AL-ANI, T.; BRIGNOL, A.; ABDELLAOUI, M.; DIMITRI, D.; SOREL, M.; CRÉANGE, A.;

LEFAUCHEUR, J.P. Prefrontal tDCS decreases pain in patients with multiple sclerosis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p.1–12, 2016.

BABBITT, P. C. Reengineering the glutathione-S-transferase scaffold: a rational design strategy pays off. **Proceeding National Academy Sciences**, v. 97, p. 10293-10300, 2000.

BAE, C.; WANG, J.; SHIM, H. S.; TANG, S. J.; CHUNG, J. M.; LA, J-H. Mitochondrial superoxide increases excitatory synaptic strength in spinal dorsal horn neurons of neuropathic mice. **Molecular Pain**, v. 14, p. 1-9, 2018.

BARBIERI, R.; CONTESTABILE, A.; CIARDO, M.G.; FORTE, N.; MARTE, A.; BALDELLI, P.; BENFENATI, F.; ONOFRI, F. Synapsin I and synapsin II regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice, **Oncogetarget**, v.9, n. 27, p. 18760-18774, 2018.

BEAR, Mark; CONNORS, Barry; PARADISO, Michael. **Neuroscience: exploring the brain**. 3.ed. United States of America: Lippincott Williams & Willkins, 2006. 857p.

BEGGS, S.; SALTER, M. W. The known knowns of microglia-neuronal signaling in neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, v. 557, p. 37-42, 2013.

BENNETT, G.J., XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87–107, 1988.

BOADA, M.D.; GUTIERREZ, S.; ASCHENBRENNER, C.A.; HOULE, T.T.; HAYASHIDA, K.; RIRIE, D.G.; EISENACH, J.C. Nerve injury induces a new profile of tactile and mechanical nociceptor input from undamaged peripheral afferents. **Journal of Neurophysiology**, v.113, p. 100-109, 2015.

BOLDT, I.; ERIKS-HOOGLAND, I.; BRINKHOF, M.W.; DE BIE, R.; JOGGI, D.; VON ELM, E. Non-pharmacological interventions for chronic pain in people with spinal cord injury. **Cochrane Database of Systematic Review**, v. 11, p. 1-73, 2014.

BOUDES M, MENIGOZ A. Non-neuronal BDNF, a key player in development of central sensitization and neuropathic pain. **The Journal of Physiology**, v. 587, 2111-2112, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND, M.D.; ORR, AL.; PEREVOSHCHIKOVA, I.V.; QUINLAN, C.L. The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. **British Journal of Dermatology**, v. 169, 1-8, 2013.

BRASIL NETO, J. P. Motor Cortex Stimulation for Pain Relief: Do Corollary Discharges Play a Role? **Frontiers in human neuroscience**, v. 10, p. 1-6, 2016.

BRIETZKE, A.P.; ZORTEA, M.; CARVALHO, F.; SANCHES, P.R.S.; SILVA, D.P.J.; TORRES, I.L.D.S.; FREGNI, F.; CAUMO, W. Large Treatment Effect With Extended Home-Based Transcranial Direct Current Stimulation Over Dorsolateral Prefrontal Cortex in Fibromyalgia: A Proof of Concept Sham-Randomized Clinical Study. **The Journal of Pain**, v. 21, p. 212-224, 2020.

BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLMANN, B. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. São Paulo: Artmed, 2012. 2112p.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta cirúrgica brasileira**, v. 17, p. 417-423, 2022.

CHEERAN, B.; TALELLI, P.; MORI, F.; KOCH, G.; SUPPA, A.; EDWARDS, M.; HOULDEN, H.; BHATIA, K.; GREENWOOD, R.; ROTHWELL, J. A common polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the responses to rTMS. **Journal of physiology**, v.23, p. 5717-5725, 2008.

CHEN, J. T. et al. Presynaptic GABAergic inhibition regulated by BDNF contributes to neuropathic pain induction. **Nature Communications**, v. 5, p. 1-14, 2014.

CIOATO, S.G.; MEDEIROS, L.F.; MARQUES FILHO, P.R.; et al. Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model. **Brain Stimulation**, n. 9, p. 209-217, 2016.

CIOATO, S. G.; MEDEIROS, L.F.; LOPES, B. G.; DE SOUZA, A.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Transcranial direct current stimulation did not revert the increased central and peripheral NGF levels induced by neuropathic pain in rats. **Brazilian Journal of Pain**, v. 4, p. 99-103, 2021.

CLEETER M.W.; COOPER, J.M.; DARLEY-USMAR, V.M.; MONCADA, S.; SCHAPIRA, A.H. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. **FEBS Letters**, v. 345, p. 50-54, 1994.

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

COULL, J.A.; BEGGS, S.; BOUDREAU, D.; BOIVIN, D.; TSUDA, M.; INOUE, K.; GRAVEL, C.; SALTER, M.W.; DE KONINCK, Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. **Nature**, v. 438, p. 1017–1021, 2005.

CRESPO, P.C.; MARTINS, L.A.M.; DOS REIS, C.C; MEDEIROS, L.F.; SCARABELO, V.L.; GAMARO, G.D.; SOARES, M.S.P.; SPANEVELLO, R.M. STEFANELLO, F.M.; DE SOUZA, I.C.C. Transcranial direct current stimulation effects in the pain threshold and in oxidative stress parameters of neuropathic pain rats. **Neuroscience Letters**, v. 803, p. 1-12, 2023.

CSIFCSAK, G.; ANTAL, A.; HILLERS, F.; LEVOLD, M.; BACHMANN, C.G.; HAPPE, S.; NITSCHKE, M.; ELLRICH, J.; PAULUS, W. Modulatory effects of transcranial direct current stimulation on laser-evoked potentials. **Pain Medicine**, v. 10, p. 122–132, 2009.

DA SILVA, A.F.; VOLZ, M.S.; BIKSON, M.; FREGNI, F. Electrode positioning and montage in transcranial direct current stimulation. **Journal of Visualized Experiments**, v. 51, p.1-11, 2011.

DIMOV, L.F.; FRANCIOSI, A.C.; CAMPOS, A.C.; BRUNONI, A.R.; PAGANO, R.L. Top-Down Effect of Direct Current Stimulation on the Nociceptive Response of Rats. **Plos One**, v. 11, p. 1–15, 2006.

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

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V. JR.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95. 1961.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, 407-421, 1990.

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

FILHO, P.R.; VERCELINO, R.; CIOATO, S.G.; MEDEIROS, L.F.; DE OLIVEIRA, C.; SCARABELO, V.L.; SOUZA, A.; ROZISKY, JR.;

QUEVEDO, A. S., ADACHI, L.N.; SANCHES, P.R.; FREGNI, F.; CAUMO, W.; TORRES, I.L. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect. **Prog NeuroPsychopharmacology Biol Psychiatry**, v. 64, p.44–51, 2016.

FLEMING, A., RUBINSZTEIN, D.C. Autophagy in neuronal development and plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 43, p. 767-779, 2020.

FORMAN HJ, AUGUSTO O, BRIGELIUS-FLOHE R, DENNERY PA, KALYANARAMAN B, ISCHIROPOULOS H, MANN GE, RADI R, ROBERTS LJ 2ND, VINA J, DAVIES KJ. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 78, p. 233-235, 2015.

FOROUZANFAR, F.; HOSSEINZADEH, H.; KHORRAMI, M.B.; ASGHARZADE, S.; RAKHSHANDEH, H. Attenuating Effect of *Portulaca oleracea* Extract on Chronic Constriction Injury Induced Neuropathic Pain in Rats: An Evidence of Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 18, p. 342-349, 2019.

FRITSCH, B.; REIS, J.; MARTINOWICH, K.; SCHAMBRA, H.M.; JI, Y.; COHEN, L.G.; LU, B. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: Potential implications for motor learning. **Journal Neuron**, v.2, p. 198–204, 2010.

FUJIYAMA, H.; HYDE, J.; HINDER, M.R.; KIM, S.J.; MCCORMACK, G.H.; VICKERS, J.C.; SUMMERS, J.J. Delayed plastic responses to anodal tDCS in older adults. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, p. 1-9, 2014.

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

GAN, Z.; LI, H.; NASER, P. V.; OSWALD, M.J.; KUNER, R. Suppression of neuropathic pain and comorbidities by recurrent cycles of repetitive transcranial direct current motor cortex stimulation in rats. **Scientific reports**, v.11, p. 1-17, 2021.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Colorimetric method. Adenosine deaminase. **Methods of enzymatic analysis**, 3ed., p. 315–323, 1984.

GOEKS, C. S. B.; HORST, A.; MORAES, M. S.; SCHEID, T.; KOLBERG, C.; BELLÓ-KLEIN, A.; PARTATA, W. A. Assessment of oxidative parameters in rat spinal cord after chronic constriction of the sciatic nerve. **Neurochemical Research**, v. 37, p. 1952-1958, 2012.

GONÇALVES-RIBEIRO, J.; PINA, C.C.; SEBASTIÃO, A.M.; VAZ, S.H. Glutamate Transporters in Hippocampal LTD/LTP: Not Just Prevention of Excitotoxicity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.13, p.1-7, 2019.

GUO, T.; FANG, J, TONG ZY, HE S, LUO Y. Transcranial Direct Current Stimulation Ameliorates Cognitive Impairment via Modulating Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy in a Rat Model of Vascular Dementia. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 1-11, 2020.

HABIG WH, PABST MJ, JAKOBY WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HOWARD, R.F.; WALKER, S.M.; MOTA, M.P.; FITZGERALD, M. The ontogeny of neuropathic pain: postnatal onset of mechanical allodynia in rat spared nerve injury (SNI) and chronic constriction injury (CCI) models. **Pain**, v. 115, p. 382-389, 2005.

HSIAO, M-Y.; LIN, P-C.; LIAO, W-H.; CHEN, W-S.; HSU, C-H.; HE, C-K.; WU, Y-W.; GEFEN, A.; IAFISCO, M.; LIU, L.; LIN, F-H. The effect of the repression of oxidative stress on tenocyte differentiation: a preliminary study of a rat cell model using a novel differential tensile strain bioreactor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p.1-12, 2019.

ILARI, S.; GIANCOTTI, L.A.; LAURO F, GLIOZZI, M.; MALAFOGLIA, V.; PALMA, E.; TAFANI, M.; RUSSO, M.A.; TOMINO, C.; FINI, M.; SALVEMINI, D.; MOLLACE, V.; MUSCOLI, C. Natural Antioxidant Control of Neuropathic Pain-Exploring the Role of Mitochondrial SIRT3 Pathway. **Antioxidants (basel)**, v.9, p.1-20, 2020.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Subcommittee on Taxonomy. **Pain Supplements**, v.3: S1-226, 1986.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. What is neuropathic pain? Global year against neuropathic pain, USA, 2014. *On line*. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org> Acesso em: 09 set 2019.

ISLAM, M.T. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction-Linked Neurodegenerative Disorders. **Neurological Research**, v. 39, p.73–82, 2017.

JAGGI, S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental and clinical pharmacology**, v. 25, p.1-28, 2011.

KALLENBORN-GERHARDT, W.; SCHRÖDER, K.; GEISSLINGER, G.; SCHMIDTKO, A. Noxious signaling in pain processing. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 137, p. 309-317, 2013.

KHALIL, Z.; KHODR, B. A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. **Elsevier**, v.31, p. 430-439, 2001.

KHAMSING, D.; LEBRUN, S.; FANGET, I.; LAROCLETTE, N.; TOURAIN, C.; DE SARS, V.; BRUNSTEIN, M.; OHEIM, M.; CARREL, D.; DARCHEN, F.; DESNOS, C. A role for BDNF- and NMDAR-induced lysosomal recruitment of mTORC1 in the regulation of neuronal mTORC1 activity. **Molecular Brain**; v. 14, p.1-20, 2021.

KHAN, A.; KHAN, A.; KHALID, S.; SHAL, B.; KANG, E.; LEE, H.; LAUMET, G.; SEO, E. K.; KHAN, S. 7β -(3-Ethyl-*cis*-crotonoyloxy)- 1α -(2-methylbutyryloxy)-3,14-dehydro-Z Notonipetranone Attenuates Neuropathic Pain by Suppressing Oxidative Stress, Inflammatory and Pro-Apoptotic Protein Expressions. **Molecules**, v. 26, p. 1-35, 2021.

KHAN, N.; SMITH, M. Neurotrophins and neuropathic pain: role in pathobiology. **Molecules**, v. 20, p. 10657-10688, 2015.

KHANGURA, R. K.; SHARMA, J.; BALI, A.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. An integrated review on new targets in the treatment of neuropathic pain. **Korean journal of physiology and pharmacology**, v.23, p.1-20, 2019.

KIM, H.Y.; WANG, J.; LU, Y.; CHUNG, J.M.; CHUNG, K. Superoxide signaling in pain is independent of nitric oxide signaling. **Neuroreport**, v. 20, p. 1424-1428, 2009.

KNOTKOVA, H.; PORTENOY, R.K.; CRUCIANI, R.A. Transcranial direct current stimulation (tDCS) relieved itching in a patient with chronic neuropathic pain. **The Clinical Journal of Pain**, v. 29, p. 621-622, 2013.

KROTH, A.; SANTOS, M.D.C.Q.; BORELLA DA SILVA, T.C.; SANTOS SILVEIRA, E.M.; PARTATA, W.A. Aqueous leaf extract from *Luehea divaricata* Mart. Modulates oxidative stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, p. 1-12, 2021.

KUO M.F.; PAULUS, W.; NITSCHKE, M.A. Therapeutic effects of non-invasive brain stimulation with direct currents (tDCS) in neuropsychiatric diseases. **Neuroimage**, v. 85, p. 948–960, 2014.

LASTE G, CAUMO W, ADACHI LN, ROZISKY JR, DE MACEDO IC, FILHO PR, PARTATA WA, FREGNI F, TORRES IL. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in

a rat model of chronic inflammation. **Experimental Brain Research**, v. 221, p. 75–83, 2012.

LEFFA, D.T.; BELLAVER, B.; SALVIA, A.; DE OLIVEIRA, C.; CAUMO, W.; GREVET, E.H.; FREGNI, F.; QUINCOZES-SANTOS, A.; ROHDE, L.A.; TORRES, I.L.S. Transcranial direct current stimulation improves long-term memory deficits in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder and modulates oxidative and inflammatory parameters. **Brain Stimulation**, v. 11, p. 743-751, 2018.

LI, J.; MA, J.; LACAGNINA, M.J.; LORCA, S.; ODEM, M.A.; WALTERS, E.T.; KAVELAARS, A.; GRACE, P.M. Oral Dimethyl Fumarate Reduces Peripheral Neuropathic Pain in Rodents via NFE2L2 Antioxidant Signaling. **Anesthesiology**, v. 132, p. 343-356, 2020.

LIM, T. K. Y.; RONE, M. B.; LEE, S.; ANTEL, J. P.; ZHANG, J. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in trauma-induced painful peripheral neuropathy. **Molecular pain**, v. 11, p. 1-9, 2015.

LIU, A.; BRYANT, A.; JEFFERSON, A.; FRIEDMAN, D.; MINHAS, P.; BARNARD, S.; BARR, W.; THESEN, T.; O'CONNOR, M.; SHAFI, M.; HERMAN, S.; DEVINSKY, O.; PASCUAL-LEONE, A.; SCHACHTER, S. Exploring the efficacy of a 5-day course of transcranial direct current stimulation (TDCS) on depression and memory function in patients with well-controlled temporal lobe epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 55, p. 11–20, 2016.

LIU, G.Y.; SABATINI, D.M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, p. 183–203, 2020.

LOPES, B.C.; MEDEIROS, L.F.; SILVA DE SOUZA, V.; CIOATO, S.G.; MEDEIROS, H.R.; REGNER, G.G.; LINO DE OLIVEIRA, C.; FREGNI, F.; CAUMO, W.; TORRES, I.L.S. Transcranial direct current stimulation combined with exercise modulates the inflammatory profile and hyperalgesic response in rats subjected to a neuropathic pain model: Long-term effects. **Brain Stimulation**, v. 13, p. 774-782, 2020.

LOPES, B. C.; MEDEIROS, L. F.; STEIN, D. J.; CIOATO, S. G.; DE SOUZA, V. S.; MEDEIROS, H.R.; SANCHES, P. R. S.; FREGNI, F.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. tDCS and exercise improve anxiety-like behavior and locomotion in chronic pain rats via modulation of neurotrophins and inflammatory mediators. **Behavioral Brain Research**, 2021.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, 265-75, 1951.

LU, C.; WEI, Y.; HU, R.; WANG, Y.; LI, K.; LI, X. Transcranial Direct Current Stimulation Ameliorates Behavioral Deficits and Reduces Oxidative Stress in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. **Neuromodulation**, v. 18, p. 442-446, 2015.

LU, V.B.; BIGGS, J.E.; STEBBING, M.J.; BALASUBRAMANYAN, S.; TODD, K.G.; LAI, A.Y.; COLMERS, W.F.; DAWBARN, D.; BALLANYI, K.; SMITH, P.A. Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. **The Journal of Physiology**, v. 587, p. 1013-1032, 2009.

MEDEIROS, L.F.; DE SOUZA, I.C.; VIDOR, L.P.; DE SOUZA, A.; DEITOS, A.; VOLZ, M.S.; FREGNI, F.; CAUMO, W.; TORRES, I.L. Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: a review. **Frontiers in Psychiatry**, v.3, p. 1-11, 2012.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170-3175, 1972.

MÜLLER, C.E.; SCIOR, T. Adenosine receptors and their modulators. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 68, p. 77-111, 1993.

MUNOZ, F. M.; GAO, R.; TIAN, Y.; HENSTENBURG, B. A.; BARRETT, J. E.; HU, H. Neuronal P2X7 receptor-induced reactive oxygen species production contributes to nociceptive behavior in mice. **Scientific reports**, v. 7, p. 1-9, 2017.

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

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

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

NELSON, David; COX, Michael. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5.ed. São Paulo: Artmed, 2010. 1304p.

NETTO, C.A.; SIEGFRIED, B.; IZQUIERDO, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: Effect of concurrent and post-training stressful stimulation. **Behavioral and Neural Biology**, v. 48, p. 304–309, 1987.

NGERNYAM, N.; JENSEN, M.; AUVICHAYAPAT, N.; PUNJARUK, W.; AUVICHAYAPAT, P. Transcranial direct current stimulation in neuropathic pain. **Journal of pain relief**, v.1, p. 1-13, 2013.

NICOLAIDES, N.C.; KYRATZI, E.; LAMPROKOSTOPOULOU, A.; CHROUSOS, G.P.; CHARMANDARI, E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, p. 6–19, 2014.

NITSCHKE, M.A.; COHEN, L.G.; WASSERMANN, E.M.; PRIORI, A.; LANG, N.; ANTAL, A.; PAULUS, W.; HUMMEL, F.; BOGGIO, P.S.; FREGNI, F.; PASCUAL-LEONE, A. Transcranial direct current stimulation: State of the art. **Brain Stimulation**, v. 1, p. 206-223, 2008.

NUNES, E.A. MEDEIROS, L.F.; DE FREITAS, J.S.; MACEDO, I.C.; KUO, J.; DE SOUZA, A.; ROZISKY, J.R.; CAUMO, W.; TORRES, I.L.S. Morphine Exposure during Early Life Alters Thermal and Mechanical Thresholds in Rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 60, p. 78-85, 2016.

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

OH, H.; LEWIS, DA.; SIBILLE, E. The Role of BDNF in Age-Dependent Changes of Excitatory and Inhibitory Synaptic Markers in the Human Prefrontal Cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, p. 3080-3091, 2016.

PALM, U.; CHALAH, M.A.; PADBERG, F.; AL-ANI, T.; ABDELLAOUI, M.; SOREL, M.; DIMITRI, D.; CRÉANGE, A.; LEFAUCHEUR, J.P.; AYACHE, S.S. Effects of transcranial random noise stimulation (tRNS) on affect, pain and attention in multiple sclerosis. **Restorative Neurology Neuroscience**, v. 34, p. 189–199, 2016.

PARK J, KIM SH, KIM YJ, KIM H, OH Y, CHOI KY, KIM BC, LEE KH, SONG WK. Elevation of phospholipase C- β 1 expression by amyloid- β facilitates calcium overload in neuronal cells. **Brain Research**, v. 1788, p. 1-10, 2022.

PIRULLI, C.; FERTONANI, A.; MINIUSI, C. The role of timing in the induction of neuromodulation in perceptual learning by transcranial electric stimulation. **Brain Stimulation**, v. 6, p. 683–689, 2013.

RANIERI, F.; PODDA, M.V.; RICCARDI, E.; FRISULLO, G.; DILEONE, M.; PROFICE, P.; PILATO, F.; DI LAZZARO, V.; GRASSI, C. Modulation of LTP at rat hippocampal CA3-CA1 synapses by direct current stimulation. **Journal of Neurophysiology**, v. 107, p. 1868-1880, 2012.

REZQ, S.; ALSEMEH, A.E.; D'ELIA, L.; EL-SHAZLY, A.M.; MONTI, D.M.; SOBEH, M.; MAHMOUD, M.F. Thymus algeriensis and Thymus fontanesii exert neuroprotective effect against chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-15, 2020.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift Fur Rheumatologie**, v. 60, p. 404-415, 2001.

RJOSK, V.; KAMINSKI, E.; HOFF, M.; GUNDLACH, C.; VILLRINGER, A.; SEHM, B.; RAGERT, P. Transcranial Alternating Current Stimulation at Beta Frequency: Lack of Immediate Effects on Excitation and Interhemispheric Inhibition of the Human Motor Cortex. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 10, p. 1-9, 2016.

SANTOS, D.S.; LOPES, B. C.; MEDEIROS, L. F.; ASSUMPÇÃO, J. A. F.; DE SOUZA, A.; SALVI, A.A.; DA SILVA, L. S.; FREGNI, F.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Transcranial direct current stimulation (tDCS) induces analgesia in rats with neuropathic pain and alcohol abstinence. **Neurochemical Research**, v.45, p. 2653-2663, 2020.

SCHESTATSKY, P.; MORALES-QUEZADA, L.; FREGNI, F. Simultaneous EEG monitoring during transcranial direct current stimulation. **Journal of Visualized Experiments**, v. 76, p. 1–11, 2013.

SINISCALCO, D.; FUCCIO, C.; GIORDANO, C.; FERRARACCIO, F.; PALAZZO, E.; LUONGO, L.; ROSSI, F.; ROTH, K. A.; MAIONE, S.; NOVELLIS, V. Role of reactive oxygen species and spinal cord apoptotic genes in the development of neuropathic pain. **Pharmacological research**, v. 55, p. 158-166, 2007.

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

SILVA, S.P.; MARTINS, O.G.; MEDEIROS, L.F.; CRESPO, P.C.; DO COUTO, C.A.T.; DE FREITAS, J.S.; DE SOUZA, A.; MORASTICO, A.; CRUZ, L.A.X.; SANCHES, P.R.S.; CAUMO, W.; GAMARO, G.D.; TORRES, I.L.D.S.; DE SOUZA, ICC. Evidence of Anti-Inflammatory Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in a CFA-Induced Chronic Inflammatory Pain Model in Wistar Rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 29, p. 500-514, 2022.

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

SOLTÉSZ, F.; SUCKLING, J.; LAWRENCE, P.; TAIT, R.; OOI, C.; BENTLEY, G.; DODDS, C.M.; MILLER, S.R.; WILLE, D.R.; BYRNE, M.; MCHUGH, S.M.; BELL GROVE, M.A.; CROFT, R.J.; LU, B.; BULLMORE, E.T.; NATHAN, P.J. Identification of BDNF sensitive electrophysiological markers of synaptic activity and their structural correlates in healthy subjects using a genetic approach utilizing the functional BDNF Val66Met polymorphism. **PLoS One**, v.9, p. 1-16, 2014.

SOMMER, C.; LEINDERS, M.; ÜÇEYLER N. Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain. **Pain**, v. 159, p. 595-602, 2018.

SOUZA, A.; MARTINS, D.F.; MEDEIROS, L.F.; NUCCI-MARTINS, C.; MARTINS, T.C.; SITENESKI, A.; CAUMO, W.; DOS SANTOS, A.R.S.; TORRES, I.L.S. Neurobiological mechanisms of antiallodynic effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a mice model of neuropathic pain. **Brain Research**, v. 1682, p. 14-23, 2018.

SPEZIA ADACHI, L.N.; CAUMO, W.; LASTE, G.; FERNANDES MEDEIROS, L.; RIPOLL ROZISKY J.; DE SOUZA, A.; FREGNI, F.; TORRES, I.L. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. **Brain Research**, v. 1489 p. 17-26, 2012.

STOELTING, Robert; FLOOD, Pamela; RATHMELL, James; SHAFER, Steven. **Manual de Farmacologia e Fisiologia na Prática Anestésica**. 3.ed. São Paulo: Artmed, 2016. 824p.

STUEHR, D.J.; NATHAN, C.F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, 1543-1555, 1989.

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

TOTSCH, S.K.; SORGE, R.E. Immune System Involvement in Specific Pain Conditions. **Molecular Pain**, v. 13, p. 2017 744806917724559.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F.F.; PEREIRA, J. A. M. Extração, purificação e avaliação da atividade da glutatona-S-transferase de fígado bovino. **Ciências agrotécnicas**, v. 30, p. 302-307, 2006.

ULLAH, H.; DI MINNO, A.; SANTARCANGELO, C.; KHAN, H.; DAGLIA, M. Improvement of Oxidative Stress and Mitochondrial

Dysfunction by β -Caryophyllene: A Focus on the Nervous System. **Antioxidants (basel)**, v. 10, p. 1-22, 2021.

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

VALLEJO, R.; PLATT, D.C.; RINK, J.A.; JONES, M.A.; KELLEY, C.A.; GUPT, A. A.; CASS, C.L.; EICHENBERG, K.; VALLEJO, A.; SMITH, W.J.; BENYAMIN, R.; CEDEÑO, D.L. Electrical Stimulation of C6 Glia-Precursor Cells In Vitro Differentially Modulates Gene Expression Related to Chronic Pain Pathways. **Brain Sciences**, v. 9, p.1-13, 2019.

VASEGHI, B.; ZOGHI, M.; JABERZADEH, S. The effects of anodal-tDCS on corticospinal excitability enhancement and its after-effects: conventional vs. unihemispheric concurrent dual-site stimulation. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 9, p. 1–13, 2015.

VEGA-AVELAIRA, D.; GÉRANTON, S.M.; FITZGERALD, M.; Differential regulation of immune responses and macrophage/neuron interactions in the dorsal root ganglion in young and adult rats following nerve injury. **Molecular Pain**, v. 5, p.1-17, 2009.

VILLAR, M.; MIRA, H. Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: expected and unexpected roles, **Frontiers in neuroscience**, v.10, p. 1-9, 2016.

VIVANCOS, G.G.; VERRI WA, JR.; CUNHA, T.M.; SCHIVO, I.R.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 391-399, 2004.

VOLZ, M.S.; FARMER, A.; SIEGMUND, B. Reduction of chronic abdominal pain in patients with inflammatory bowel disease through transcranial direct current stimulation: a randomized controlled. **Pain**, v. 157, 429-437, 2016.

WALKER, C.I.B.; OLIVEIRA, S.M.; TONELLO, R.; ROSSATO, M.F.; DA SILVA BRUM, E.; FERREIRA, J.; TREVISAN, G. Anti-nociceptive effect of stigmasterol in mouse models of acute and chronic pain. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, p. 1163-1172, 2017.

WILLARD, S.S.; KOOCHKEPOUR, S. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. **International Journal of Biological Sciences**, v.9, p. 948-959, 2013.

WOOLF, C.J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**, v.55, p. 353-364, 2007.

WU, J.; RENN, C.L.; FADEN, A.I.; DORSEY, S.G. TrkB.T1 contributes to neuropathic pain after spinal cord injury through regulation of cell cycle pathways. **Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 12447-12463, 2013.

YANG, J.; ZHOU, Y.; BAN, Y.; MI, J.; HE, Y.; LI, X.; LIU, Z.; WANG, K.; ZHU, G.; LIU, W.; TAN, Z.; SANG, Z. Development of naringenin-O-alkylamine derivatives as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 792-816, 2022.

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

YIN, F.; SANCHETI, H.; CADENAS, E. Mitochondrial thiols in the regulation of cell death pathways. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 17, p. 1714-1727, 2012.

ZHANG, G.; LIU, N.; ZHU, C.; MA, L.; YANG, J.; DU, J.; ZHANG, W.; SUN, T.; NIU, J.; YU, J. Antinociceptive effect of isoorientin against neuropathic pain induced by the chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice. **International Immunopharmacology**, v. 75, p. 2019.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, Localization and Functional Roles of Ecto-Nucleotidases in the Nervous System. **Progress in Neurobiology**, v. 49, p. 589-618, 1996.

ZIVKOVIC, A.R.; BENDER, J.; BRENNER, T.; HOFER, S.; SCHMIDT, K. Reduced butyrylcholinesterase activity is an early indicator of trauma-induced acute systemic inflammatory response. **Journal of Inflammation Research**, v. 9, p. 221-230, 2016.

Anexos

Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) – UFPEL



Pelotas, 13 de julho de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Profa. Dra. Izabel Cristina Custódio de Souza
Departamento de Morfologia – Instituto de Biologia

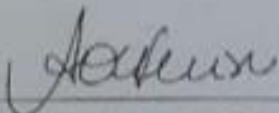
Senhora Professora:

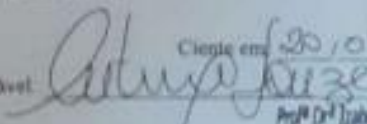
A CEEA analisou o projeto intitulado: “Avaliação dos efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua na neurogênese e na dor neuropática de ratos wistar”, processo nº23110.010480/2014-89 que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem),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

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

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

Vigência do Projeto: 01/08/2015 a 01/09/2016
 Espécie/Linhagem: *Rattus norvegicus*/Wistar
 Nº de animais: 198
 Idade: 10, 30 e 60 dias (66 animais de cada idade)
 Sexo: Machos
 Origem: Biotério Central/UFPEL


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em 20/07/2015

 Profa. Dra. Izabel Cristina C. de Souza
 Depto. Morfologia
 SIAPE: 1348701
 IM - UFPEL

Assinatura do Professor Responsável