

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Lisandra Eda Fusinato Zin

**ALTERAÇÕES ASTROGLIAIS EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À
ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA**

Porto Alegre

2023

Lisandra Eda Fusinato Zin

**ALTERAÇÕES ASTROGLIAIS EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À
ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Silva de Quevedo

Porto Alegre

2023

“Nascer sabendo é uma limitação porque obriga apenas repetir e, nunca, a criar, inovar, refazer, modificar. Quanto mais se nasce pronto, mais refém do que já se sabe e, portanto, do passado; aprender sempre é o que mais impede que nos tornemos prisioneiros de situações que, por serem inéditas, não saberíamos enfrentar”.

MARIO SERGIO CORTELLA

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças e não permitir que eu perdesse o ânimo ao longo de toda a jornada. A Ele que colocou em minha vida pessoas que se tornaram imprescindíveis na realização desse trabalho e que me fizeram crescer diante de cada dificuldade.

Ao orientador, Professor Doutor Carlos Alberto Saraiva Gonçalves, por sua generosidade em apostar em mim mesmo sem ter nenhuma garantia, me aceitando em seu grupo de pesquisa e me orientando ao longo do doutorado com muita dedicação e paciência.

Ao co-orientador, Professor Doutor Alexandre Quevedo, por abrir as portas da pesquisa na UFRGS, orientações e ensinamentos.

A Doutora Adriana Vizuete, por realizar com primor as análises bioquímicas e abdicar do seu tempo, para estar no laboratório. Também, pela paciência e ensinamentos.

Aos meus familiares, meu pai, Pasqualino minha mãe, Iracy, por não terem medido esforços para investir na minha educação. Meu irmão Everson e minha irmã Lisiane que me apoiaram nos momentos em que precisei estudar e fizeram o necessário para que eu pudesse atingir meu objetivo. Aos meus cunhados (Graciela e Ricardo) e a minha sobrinha (Letícia) pelo apoio.

Ao meu marido, Fábio, por ser um companheiro para todas as horas, enfrentando as minhas batalhas como se fossem suas. Por me apoiar, financiar, tolerar, torcer por mim e por mudar o curso de sua vida para seguir a minha. Sou eternamente grata por existir em minha vida. Gostaria pedir desculpa pelas diversas vezes que me ausentei, por estar estudando.

Enfim, posso afirmar: Cursar o Mestrado e o Doutorado na UFRGS promoveu um processo disruptivo positivo em minha vida. Obrigada pelo conhecimento adquirido e pelas experiências vividas. Valeu a pena!

ÍNDICE

RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1 INTRODUÇÃO	6
1.1 NEUROMODULAÇÃO: ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA	6
1.2 DEFINIÇÃO E CONSIDERAÇÕES SOBRE DOR	7
1.2.1 Mecanismos centrais da dor	8
1.2.2 Sensibilização periférica e central	9
1.2.3 Dano neural	10
1.3 ASTRÓCTIOS	11
1.3.1 Ação e classificação dos astrócitos	11
1.4 MARCADORES GLIAIS – S100B (PROTEÍNA LIGANTE DE CÁLCIO B, DA FAMÍLIA S100) E GFAP (PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL)	12
1.4.1 Proteína S100B	12
1.4.2 Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)	15
1.5 PAPEL DOS ASTRÓCITOS NO METABOLISMO DO GLUTAMATO E NA TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA	16
1.6 DEFESA ANTIOXIDANTE	19
1.7 MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DANO NEURAL	20
1.7.1 Fator de Necrose Tumoral- α	21
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVOS GERAIS	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
CAPÍTULO 1	23
CAPÍTULO 2	32
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXO	87

RESUMO

A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) consiste na aplicação de corrente elétrica sobre o córtex cerebral, sendo atribuída para diversas patologias, incluindo a dor, inflamação, epilepsia e depressão. É uma técnica de neuromodulação central, de baixo custo, não invasivo e indolor; compreende a aplicação de uma corrente elétrica 0,5 – 2 mA, contínua fraca, aplicada através de pequenos eletrodos (cátodo e ânodo) durante 15-20 minutos, sobre o córtex motor primário (M1) posicionados no escalpo íntegro em modelos animais. A corrente anodal despolariza a membrana celular, enquanto a catodal a hiperpolariza. ETCC é considerada um tratamento adjuvante e muitas vezes podendo substituir como por exemplo, fármacos antidepressivos, anticonvulsivos e opioides, por se tratar de uma terapia não farmacológica de fácil execução, baixo custo e sem efeitos adversos de grandes proporções. Seus mecanismos de ação não estão totalmente elucidados, o que limita o seu potencial terapêutico em diversas áreas da saúde, bem como, a base celular e molecular de mecanismo de ação de ETCC ainda foi pouco esclarecida. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo geral demonstrar que uma única sessão de ETCC bimodal (20 min, 0,5 mA), aumentaria o limiar de dor induzida por estímulos mecânicos e térmicos, avaliados pelos testes de von Frey e placa quente, respectivamente. O trabalho foi executado em duas etapas: (1) Avaliação do efeito temporal da ETCC sobre parâmetros inflamatórios e gliais no córtex cerebral (resultados já publicados, capítulo 1) e (2) Avaliação das mudanças astrogliais – celulares e funcionais no hipocampo induzidas pela ETCC (manuscrito em preparação, capítulo 2). Assim, foi testada a hipótese que o tratamento com ETCC bimodal provocaria alterações de curto prazo em astrócitos no córtex cerebral e hipocampus nos ratos após trinta minutos da estimulação elétrica. Avaliando, os marcadores astrogliais no córtex cerebral total, apresentou diminuição da proteína ligante de cálcio (S100B) e em relação a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) não ocorreu diferença significativa em animais submetidos à eletroestimulação. O mesmo, ocorreu no hipocampo, sendo analisado também, a captação de glutamato, glutamina sintetase (GS), que sofreu aumento e conteúdo de glutathione (GSH) onde ocorreu diminuição em animais eletroestimulados. O líquido cerebrospinal (LCR) também foi coletado, e apresentou alteração na proteína S100B em animais estimulados eletricamente com a ETCC. Estes dados poderão dar suporte a eficácia para aplicação da ETCC em ratos, para diversas situações como dor inflamatória e neuropática e posterior aplicação em seres humanos.

ABSTRACT

Transcranial direct current stimulation (tDCS) consists of the application of electrical current on the cerebral cortex, being attributed to several pathologies, including pain, inflammation, epilepsy and depression. It is a low cost, non-invasive and painless central neuromodulation technique; comprises the application of a weak continuous 0.5 - 2 mA electric current, applied through small electrodes (cathode and anode) for 15-20 minutes, on the primary motor cortex (M1) positioned on the intact scalp in animal models. Anodal current depolarizes the cell membrane, while cathodal current hyperpolarizes it. tDCS is considered an adjuvant treatment and can often replace, for example, antidepressant drugs, anticonvulsants and opioids, as it is a non-pharmacological therapy that is easy to perform, low cost and without major adverse effects. Its mechanisms of action are not fully elucidated, which limits its therapeutic potential in several areas of health, as well as the cellular and molecular basis of the tDCS mechanism of action is still unclear. Thus, the present work had the general objective of demonstrating that a single session of bimodal tDCS (20 min, 0.5 mA) would increase the pain threshold induced by mechanical and thermal stimuli, assessed by von Frey and hot plate tests, respectively. The work was carried out in two stages: (1) Evaluation of the temporal effect of tDCS on inflammatory and glial parameters in the cerebral cortex (results already published, chapter 1) and (2) Evaluation of astroglial – cellular and functional changes in the hippocampus induced by tDCS (manuscript in preparation, chapter 2). Thus, the hypothesis was tested that treatment with bimodal tDCS would cause short-term changes in astrocytes in the cerebral cortex and hippocampus in rats after thirty minutes of electrical stimulation. Evaluating the astroglial markers in the total cerebral cortex, there was a decrease in calcium binding protein (S100B) and in relation to glial fibrillary acidic protein (GFAP) there was no significant difference in animals submitted to electrostimulation. The same occurred in the hippocampus, also being analyzed, the uptake of glutamate, glutamine synthetase (GS), which suffered an increase and glutathione content (GSH) where there was a decrease in electrostimulated animals. Cerebrospinal fluid (CSF) was also collected, and showed changes in the S100B protein in animals electrically stimulated with tDCS. These data may support the efficacy of tDCS application in rats, for various situations such as inflammatory and neuropathic pain and subsequent application in humans.

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT/PKB	proteína cinase B
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metiloxazole-4-propiónico
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
AVE	acidente vascular encefálico
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
DPS	densidade pós-sináptica
EAAT	transportador de aminoácidos excitatórios
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ETCC	Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GLAST	transportador de glutamato e aspartato
GLT-1	transportador de glutamato 1
GS	glutamina sintetase
GSH	glutationa
GTP	guanosina trifosfato
GUO	guanosina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIC	hipertensão intracraniana
IASP	Associação Internacional de Estudos da Dor
IL10	interleucina 10
LCR	líquido cerebrospinal

MAPK	proteína cinase ativada por mitógenos
mGluRs	receptores metabotrópicos de glutamato
M1	córtex motor primário
NGF	fator de crescimento neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
NSE	enolase neurônio específica
SBED	Sociedade Brasileira para Estudo da Dor
S100B	proteína ligante de cálcio B, da família S100
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
SUS	sistema único de saúde
TCE	traumatismo crânio encefálico
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
UAMP	Unidade de Análise Molecular e de Proteínas
UEA	Unidade de Experimentação Animal

1 INTRODUÇÃO

1.1 NEUROMODULAÇÃO: ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA

A ETCC envolve a aplicação de corrente direta constante de baixa intensidade (1 – 2 mA) no escalpo através de eletrodos (20-35 cm²) para modular a excitabilidade de áreas corticais. O tratamento com ETCC para dor tem como foco o córtex motor, região que representa área adjacente à área da dor (FREGNI et al., 2006a). A aplicação da ETCC em pacientes com dor neuropática reduz a intensidade da sintomatologia por semanas (SPEZIA ADACHI et al., 2012a). Embora a aplicação de ETCC seja de corrente fraca, ela altera a excitabilidade neuronal de forma espontânea em regiões corticais (MACHADO et al., 2013). Evidências sugerem que o alívio da dor pela ETCC depende da projeção das fibras do córtex motor para outras estruturas envolvidas no processamento da dor, como o tálamo e núcleos do tronco cerebral (LEFAUCHEUR; BOËRIO; CRÉANGE, 2006). O princípio da ETCC baseia-se na utilização de uma corrente elétrica fraca aplicada no couro cabeludo do cátodo para o ânodo. A estimulação anódica tipicamente despolariza (aumenta a excitação) e a estimulação catódica hiperpolariza (diminui a excitação) os neurônios corticais (LANG et al., 2005; VOS et al., 2010). Além disso, esta técnica apresenta baixo risco e pouco desconforto, e a utilização em sessões repetidas o efeito pode ser duradouro (LANG et al., 2005). O efeito da ETCC em um curto prazo (efeito imediato) é, respectivamente, devido a uma diminuição (anódica) ou a um aumento (catódica) do limiar de repouso neuronal (RUSCHEWEYH et al., 2011). No entanto, os efeitos a longo prazo envolvem a participação do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e de receptores glutamatérgicos, como o ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) em mecanismos de plasticidade sináptica (FERTONANI et al., 2010).

A ETCC é uma modalidade de estimulação cerebral não-invasiva, indolor, que é bem tolerada e não apresenta nenhuma sensação desagradável (LANG et al., 2005). Além disso, trata-se de método seguro em seres humanos e pode ser combinada com outras intervenções. Com isso, a ETCC poderá ser um método adicional no tratamento da dor pós-operatória e

neuropática, porém estudos com ênfase nas mudanças neuroquímicas e moleculares devem ser realizados para confirmar essas hipóteses. A ETCC induz mudanças em vários níveis do sistema nervoso, resultando em polarização tecidual e, conseqüentemente, a modulação da atividade neuronal (LANG et al., 2005). Os efeitos da ETCC baseiam-se em interações cortico-corticais, com alguns componentes subcorticais, incluindo o córtex cingulado anterior (JACKSON et al., 2017). Em estudos com ratos, observa-se efeitos duradouros do tratamento de ETCC na inflamação crônica (BIKSON et al., 2016) e hiperalgesia induzida por estresse crônico por restrição (NITSCHKE et al., 2003a).

1.2 DEFINIÇÃO E CONSIDERAÇÕES SOBRE DOR

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) definiu a dor como uma sensação subjetiva relacionada com uma lesão tissular, há evidências que essa associação possa não ocorrer. A cefaleia e a dor pélvica crônica, por exemplo, parecem existir sem lesão tissular detectável pelos métodos diagnósticos disponíveis na prática clínica atual, favorecendo a hipótese de que pode haver alterações neurofuncionais restritas ao âmbito biomolecular, cuja interação é pouco conhecida entre neuromediadores, neurotransmissores e transdutores de sinais, em uma rede de bilhões de sinapses, o que dificulta a compreensão da etiologia da dor (AGULHON; FIACCO; MCCARTHY, 2010).

A dor tem sido definida por vários grupos ao longo dos anos, muitas vezes categorizados de acordo com os termos agudo e crônico (KYRANOU; PUNTILLO, 2012). Uma definição comum de dor aguda é “a fisiologia normal prevista perante resposta a um estímulo químico, térmico ou mecânico adverso associado a cirurgia, traumatismo, e doença aguda” (KYRANOU; PUNTILLO, 2012). Tradicionalmente, a dor crônica tem sido definida pela Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP) como “dor sem valor biológico aparente que persiste para além do tempo de cicatrização normal do tecido (geralmente cerca de três meses)”. É amplamente aceito que, ao contrário da dor aguda, a dor crônica não tem função protetora (WILLIAMS; CRAIG, 2016).

Outra definição de dor: “A dor é uma experiência angustiante associada a dano tecidual real ou a potencial componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais ” (TREEDE et al., 2015). A dor é um dos motivos mais comuns para um indivíduo consultar a atenção primária, estima-se que um em cada cinco adultos na Europa seja afetado pela dor

crônica (BREIVIK et al., 2006). No entanto, um dos desafios de manejar a dor no cenário da atenção primária é que ela é mal avaliada e relatada (JOHNSON; COLLETT; CASTRO-LOPES, 2013). A dor crônica tem um impacto negativo importante na qualidade de vida, participação da força de trabalho e produtividade, e gastos em saúde (PHILLIPS et al., 2008). De fato, as estatísticas dos EUA estimam que os custos anuais totais associados a dores crônicas são de US \$ 560 a US \$ 635 bilhões enquanto na Europa, os dados indicam que de 3 a 10% do produto interno bruto é gasto em cuidados de saúde nacionais e os custos socioeconômicos associados a dor crônica (RAFTERY et al., 2012).

Segundo a SBED (Sociedade Brasileira para Estudo da Dor), a prevalência de dor crônica em unidades do SUS (Sistema Único de Saúde) ocorre entre 30 a 50%. Outros estudos, mostraram que a dor de dente no Brasil, possui uma taxa de 12%, tanto em crianças, adolescentes e adultos, sendo nas crianças abaixo de 5 anos, uma taxa maior ainda, de 17%. E o tratamento da dor atinge apenas 10% da totalidade dos casos.

Uma revisão sistemática realizada no Brasil em 2021, relatou que a maior prevalência de dor crônica ocorre na região lombar, com 41,96% de prevalência geral, seguido por membros inferiores, cabeça, articulações e membros superiores (AGUIAR et al., 2021).

1.2.1 Mecanismos centrais da dor

A transmissão dos estímulos nocivos através da medula espinal não é um processo passivo. Os circuitos intramedulares têm a capacidade de alterar o estímulo e a consequente resposta dolorosa. A interação entre esses circuitos medulares determinará as mensagens que atingirão o córtex cerebral (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009a). Estudos clínicos e experimentais demonstraram que estímulos nocivos provocam alterações no sistema nervoso central (SNC) e modificam os mecanismos desencadeados pelos estímulos aferentes. A estimulação persistente de nociceptores provoca dor espontânea, redução do limiar de sensibilidade e hiperalgesia. Esta pode ser classificada como hiperalgesia primária e secundária. A hiperalgesia primária é conceituada como sendo o aumento da resposta ao estímulo doloroso no local da lesão, enquanto a hiperalgesia secundária é aquela que se estende para áreas adjacentes. A presença de todos esses elementos sugere que a sensibilização periférica não é o único fenômeno responsável por todas essas mudanças e que deve haver envolvimento do SNC neste processo (FILHO et al., 2016). A sensibilização

central implica alterações dos impulsos periféricos, com adaptações positivas ou negativas. Ocorre redução do limiar ou aumento da resposta aos impulsos aferentes, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios do corno dorsal. Impulsos repetidos em fibras C amplificam sinais sensoriais em neurônios espinais, enviando mensagens para o encéfalo (THELIN et al., 2017).

Lesões periféricas induzem plasticidade em estruturas supra-espinais por meio de mecanismos que envolvem tipos específicos de receptores para o glutamato. Após a agressão tecidual há liberação de neurotransmissores, como substância P, somatostatina, peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina, neurocinina-A, glutamato e aspartato. Essas substâncias estão relacionadas com a ativação de potenciais pós-sinápticos excitatórios e dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e não-NMDA. Estímulos frequentes dos neurônios aferentes geram a somação dos potenciais de ação e consequente despolarização pós-sinápticas cumulativa. Depois da ativação de receptores NMDA pelo glutamato há remoção do íon magnésio do interior do receptor e o influxo de cálcio para a célula, do que resulta a amplificação e o prolongamento da resposta ao impulso doloroso (DIERING, 2017). O aumento do cálcio tem como consequência a ativação da enzima óxido nítrico-sintetase e a estimulação da transcrição de proto-oncogenes. Estes são genes localizados no SNC e demais tecidos e estão envolvidos na formação de dinorfinas e encefalinas. As encefalinas têm ação anti-nociceptiva e estão envolvidas no processo de redução da neuroplasticidade e hiperalgesia. Entretanto, as dinorfinas têm um efeito complexo, já que possuem ação algôgena e anti-nociceptiva (CHAPLAN et al., 1994).

1.2.2 Sensibilização periférica e central

Os nociceptores (receptores para estímulos nocivos) são capazes de fazer a transdução de estímulos agressivos de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico (potenciais de ação) (ADACHI et al., 2007) que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor. A transmissão destes estímulos é feita por fibras do tipo A δ e C. As primeiras, em função da presença da bainha de mielina, transmitem o estímulo doloroso de forma rápida, enquanto as fibras C são responsáveis pela transmissão lenta da dor (TYNAN et al., 2013). Após a ocorrência da lesão periférica, múltiplas substâncias químicas são liberadas na região como interleucinas pró-inflamatórias

(ex. IL-6), anti-inflamatórias (ex. IL-4 e IL-10) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (CRESPO et al., 2007; GREGHI, 2011). A persistência da agressão causa modificações no sistema nervoso periférico (SNP) com consequente aumento da resposta a estímulos supraliminares (hiperalgesia) e diminuição do limiar de ativação dos nociceptores (alodínia) (COLLOCA et al., 2013).

A sensibilização central é considerada o principal mecanismo fisiopatológico em condições de dores crônicas, onde há recrutamento de fibras A δ e C e também das fibras A β (ROWBOTHAM; FIELDS, 1996). Este fenômeno ocorre como consequência da liberação de neurotrofinas como o fator de crescimento neural (NGF) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no corno dorsal da medula espinal (SCHOLZ; WOOLF, 2007), tronco encefálico e córtex cerebral (SPEZIA ADACHI et al., 2012a) que podem ser responsáveis pela facilitação do processo nociceptivo. Clinicamente este fenômeno pode ser responsável pela hiperalgesia, alodínia, dor irradiada ou dor persistente descrita como desagradável, latejante, em queimação ou dormência (CHIANG et al., 2011).

1.2.3 Dano neural

O dano neural pode ser estudado através das alterações nos astrócitos e células da glia no SNC, utilizando marcadores como a S100B, GFAP e a enolase neurônio específica (NSE) (OLIVEIRA; IKUTA; REGNER, 2008).

A proteína S100B é encontrada nos astrócito e células de *Schwann*, e algumas populações de neurônios (PORTELA et al., 2002). A S100B está presente no soro e no líquido espinal, exercendo um efeito pró-sobrevivência nos neurônios com estimulação nos neuritos em baixas concentrações, e um efeito tóxico em altas concentrações causando morte neuronal por apoptose (DONATO, 2003). A S100B extracelular também desempenha uma função na neuroinflamação, ativando microglia, células consideradas os macrófagos residentes do tecido nervoso, ainda que em altas concentrações (ADAMI et al., 2001). Tem sido demonstrado que a quantificação dos níveis dessa proteína no LCR e sangue correlacionam-se com a intensidade e a extensão dos danos ao sistema nervoso central, o que permite sua utilização em estudos como marcador bioquímico de dano ou disfunção cerebral (GONÇALVES; CONCLI LEITE; NARDIN, 2008; LITCHER-KELLY et al., 2007; PORTELA et al., 2002). A enolase neurônio específica (NSE) não é secretada, sendo

que o aumento de seus níveis no soro e no LCR pode sinalizar danos estruturais para as células neuronais, como tem sido relatado em pessoas com trauma no cérebro, sendo considerada uma proteína marcadora de morte neuronal (MORLION et al., 2018; PORTELA et al., 2002). A NSE é o único marcador que avalia diretamente dano em neurônios. Ela é liberada passivamente por destruição celular e suas concentrações aumentadas, após dano neural, podem ser mensuradas em sangue periférico ou LCR (PELLERIN, 2005).

1.3 ASTRÓCITOS

1.3.1 Ação e classificação dos astrócitos

A constituição do SNC está baseada em dois tipos celulares, células neuronais e células gliais. As células gliais são subdivididas em microglia, células fagocíticas envolvidas na resposta inflamatória, e macroglia – composta por oligodendrócitos, formadores da mielina; células ependimais, que revestem os ventrículos cerebrais e astrócitos (JESSEN, 2004).

Os astrócitos podem ser classificados em dois subtipos principais: astrócitos protoplasmáticos, encontrados em maior concentração na substância cinzenta, e astrócitos fibrosos, localizados principalmente na substância branca cerebral, que correspondem, respectivamente, ao tipo 1 e tipo 2, em cultura (JI et al., 2003). Existem ainda astrócitos especializados, encontrados em 11 estruturas específicas, como a glia de Bergmann no cerebelo, as células de Müller na retina e os pituícitos na neurohipófise (ENG, 1985). Apesar de serem as células mais abundantes do SNC, somente nas últimas décadas os astrócitos deixaram de ser considerados apenas suporte estrutural para os neurônios e passaram a ser reconhecidos por sua capacidade dinâmica e diversidade funcional (SHAO; MCCARTHY, 1994), permitindo a proteção dos neurônios contra a neurotoxicidade pelo excesso de glutamato e amônio (NH^{4+}) (ALOTAIBI; RAHMAN, 2019).

Hoje se sabe que os astrócitos não somente estabelecem a arquitetura estrutural do cérebro, mas também organizam e participam de suas vias de comunicação e plasticidade (BLASKO et al., 2004). Além de modular a intensidade e atividade sináptica, os astrócitos também podem regular a neurogênese e gliogênese, assim como estabelecer interações recíprocas com outros tipos celulares do SNC, como neurônios, células endoteliais,

oligodendrócitos, microglia e células ependimais (TSUBOI et al., 2011). Dentre as inúmeras funções exercidas pelos astrócitos podemos citar também tamponamento de níveis extracelulares dos íons (KIM et al., 2017); produção de fatores tróficos (ERIKSEN; DRUSE, 2001) metabolismo de neurotransmissores (JI et al., 2003) e suporte energético para os neurônios (PELLERIN, 2005). Além disso, os astrócitos, juntamente com a microglia, são as principais células efetoras de resposta imune inata no SNC, exibindo um fenótipo ativado em doenças neurodegenerativas, produzindo diversos mediadores inflamatórios e exercendo atividade fagocítica (HAUWEL et al., 2005).

1.4 MARCADORES GLIAIS – S100B (PROTEÍNA LIGANTE DE CÁLCIO B, DA FAMÍLIA S100) E GFAP (PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL)

1.4.1 Proteína S100B

A família S100 foi, originalmente, caracterizada como um grupo de pequenas proteínas citosólicas diméricas do tipo ligante de cálcio. Esta família de proteínas tem peso aproximado de 10 kDa, existe em várias formas, dependendo de sua estrutura de cadeias α e β , e estão em abundância em tecido nervoso (OLIVEIRA; IKUTA; REGNER, 2008). Cada membro desta família tem um padrão único de expressão e, aproximadamente 50% delas, possuem a mesma sequência de aminoácidos. As propriedades físicas e estruturais da família S100 sugerem que sejam ativadoras, ao contrário de outras ligantes de cálcio (Ca^{2+}) que atuam como tampões. A afinidade pelo cálcio é, entretanto, um importante parâmetro, no qual pode ser influenciado através da ligação com o zinco (Zn^{2+}), aumentando a afinidade, ou o potássio (K^+), diminuindo-a. Entre elas estão a S100A6, S100B e a calgranulin C, nas quais mais se observou tal atividade (JOHNSON; COLLETT; CASTRO-LOPES, 2013).

A forma dimérica β é chamada de S100B (de 21 kDa) e é encontrada principalmente nos astrócitos do SNC em condições fisiológicas ou patológicas (TSOPORIS; MOHAMMADZADEH; PARKER, 2010). S100B é produzida e secretada principalmente pelos astrócitos e exerce efeitos autócrinos e parácrinos sobre a glia, neurônios (ADAMI et al., 2001). A S100B extracelular, é usada como parâmetro de ativação glial e / ou morte em diversas situações de lesão cerebral (ROTHERMUNDT et al., 2003).

Esta proteína S100B é abundantemente expressa pelos astrócitos, e liberada constitutivamente por essas células da glia (SPEZIA ADACHI et al., 2015), e sua secreção é estimulada por agonistas do receptor 5-HT1A, glutamato, adenosina e ácido lisofosfatídico (CICCARELLI et al., 2007; GUO et al., 2018).

A S100B é encontrada em vertebrados e tem atividade de regulação tanto como uma proteína intracelular quanto extracelular (THULIN; KESVATERA; LINSE, 2011). No meio intracelular, a S100B está envolvida na transdução de sinal, pois inibe a fosforilação de proteínas, regula a atividade das enzimas e está envolvida na homeostase do Ca^{2+} (THULIN; KESVATERA; LINSE, 2011). A S100B está localizada principalmente no citoplasma onde participa do metabolismo energético; da dinâmica dos constituintes do citoesqueleto, e da regulação da proliferação e da diferenciação celular (DONATO, 2003), no entanto, há poucas informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos (ADAMI et al., 2001). Uma expressão elevada da S100B é encontrada nas células de melanoma e está relacionada com a progressão do tumor, uma vez que a S100B interage com o supressor de tumor p53, bloqueando sua fosforilação, mas também regulando sua expressão (THULIN; KESVATERA; LINSE, 2011).

A lesão cerebral é um termo amplo que descreve uma variedade de insultos que ocorrem no cérebro. Causas comuns de lesão cerebral incluem trauma, acidente vascular cerebral, tumores cerebrais, infecções, envenenamento, hipóxia, isquemia e abuso de drogas (GUREJE et al., 2001). Em pessoas híidas os níveis da proteína S100B no soro são muito baixos. A S100B é um marcador altamente sensível e específico para a disfunção do SNC, e concentrações elevadas de S100B no soro têm sido relatadas após traumatismo crânio-encefálico e AVE (Acidente Vascular Encefálico) (ETTINGER; MULLIGAN, 1999). Seu mecanismo de liberação é incerto, mas é provavelmente devido à liberação pelas células danificadas e/ou pela secreção devido à ativação de células gliais (THULIN; KESVATERA; LINSE, 2011). De acordo com Einav & colaboradores (2008), altas concentrações séricas de S100B têm sido relacionadas com evidência clínica de danos no SNC nos três modelos aceitos de lesão cerebral em humanos: trauma, isquemia e hipóxia. Concentrações significativamente mais elevadas de S100B têm sido demonstradas em morte encefálica e, em não sobreviventes de parada cardiorespiratória, quando comparados aos sobreviventes. Níveis elevados de S100B têm sido relatados após trauma crânio-encefálico, acidente vascular encefálico, hemorragia subaracnóide e no pós-operatório de cirurgia cardíaca,

quando evolui com complicações neurológicas. A S100B também se mostrou elevada em pacientes com choque hemorrágico, estando relacionada com a gravidade do choque e hipoperfusão. Os mecanismos básicos que levam ao aumento sérico da S100B no trauma crânio-encefálico permanecem desconhecidos. Não está claro se a liberação da proteína depende de dano celular irreversível ou se pode ocorrer após lesão menos severa (OLIVEIRA; IKUTA; REGNER, 2008). Embora o papel fisiológico da proteína S100B ainda não seja totalmente conhecido, está bem descrito que seus níveis no sangue e no LCR estão aumentados em vários distúrbios agudos e crônicos envolvendo o SNC (AVIVI-ARBER et al., 2011). Tem sido demonstrado que a quantificação dos níveis da proteína S100B em LCR e sangue se correlaciona com a intensidade e a extensão das injúrias ao SNC, o que permite sua utilização em estudos como marcador bioquímico de dano ou disfunção cerebral. Os níveis periféricos no LCR e no sangue podem refletir a reatividade glial à injúria cerebral, bem como alterações na barreira hematoencefálica (PORTELA et al., 2002). As alterações séricas nos níveis da proteína estão mais comumente relacionadas com diversos fatores que afetem sua síntese, distribuição, e metabolismo no SNC, incluindo dano astrocítico agudo e gliose reativa, bem como podem refletir alterações na barreira hematoencefálica (COSTA; SILVA; COERTJENS, 2013). Sabe-se que há uma relação diretamente proporcional entre os níveis de S100B em LCR e sangue e a intensidade e extensão da injúria cerebral, permitindo, então, utilizar esta proteína como marcador bioquímico de dano, ou disfunção, cerebral (VALENTIM, 2002).

O pico máximo de concentração da proteína ocorre 20 minutos após o dano cerebral, sendo ela metabolizada no rim e excretada na urina (meia-vida aproximada entre 30 e 113 minutos). A proteína pode ser medida em sangue arterial ou venoso, não é afetada por hemólise, e se mantém estável por horas, sem necessidade de centrifugação e congelamento imediatos da amostra. Níveis elevados de S100B após traumatismo crânio-encefálico também podem ser medidos no LCR (OLIVEIRA; IKUTA; REGNER, 2008). A proteína S100B não é específica para lesão cerebral. Um aumento de suas concentrações séricas é encontrado em pacientes com melanoma, lesões renal e hepática, inflamação e infecção (VALENTIM, 2002).

A proteína S100B também pode ser um marcador para a doença de Alzheimer, síndrome de Down, demência, epilepsia e tumor cerebral. Níveis elevados de S100B têm sido descritos após operações cardíacas complexas, complicadas ou não, por uma lesão

neurológica (ETTINGER; MULLIGAN, 1999). Há evidências experimentais de que a secreção de S100B pelos astrócitos possa ser um processo ativo. Como a S100B tem meia-vida de aproximadamente 2 horas, seus valores aumentados devido ao dano cerebral primário devem retornar aos níveis basais dentro de 12 a 24 horas. Portanto, o acompanhamento diário da dosagem de S100B tem grande relevância clínica, pois níveis de S100B em elevação ou persistentemente altos sinalizam dano cerebral secundário (OLIVEIRA; IKUTA; REGNER, 2008). Devido à meia-vida curta de S100B no soro, o conhecimento do tempo da lesão é importante para a interpretação precisa do resultado (S100B PROTEIN, 2009). Entretanto, cabe salientar que a S100B sérica pode se originar de fontes extracerebrais, principalmente do tecido adiposo (GONALVES; LEITE; GUERRA, 2010) e isso exige cautela na interpretação dos resultados.

Além do soro, é importante determinar os níveis de S100B no LCR, como realizamos em nosso trabalho, podendo refletir a reatividade glial à injúria cerebral, bem como alterações na barreira hematoencefálica (INGEBRIGTSEN et al., 1999).

1.4.2 Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)

A GFAP é uma proteína filamentar intermediária monomérica, com massa molecular aproximada de 50 kDa (GUO et al., 2018; HINKLE et al., 1997). Representa o principal componente dos filamentos intermediários do citoesqueleto astrogial, sendo, altamente específica para tecido cerebral (GUO et al., 2018). Estudos demonstram a utilidade de mensurar a GFAP no LCR como um indicador específico de anormalidade patológica do SNC (HINRICHS-ROCKER et al., 2009; MENDONCA et al., 2011). A GFAP é liberada na corrente sanguínea logo após o traumatismo crânio encefálico (TCE). Ela relaciona-se com o grau de gravidade do TCE, com a classificação de Marshall e a presença de Hipertensão Intracraniana (HIC). A GFAP é mais elevada em pacientes com desfecho primário fatal e com pior desfecho neurológico, avaliado pelo GOS. A GFAP não é liberada no politrauma sem Traumatismo Crânio Encefálico (TCE) (GUO et al., 2018).

1.5 PAPEL DOS ASTRÓCITOS NO METABOLISMO DO GLUTAMATO E NA TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, está envolvido em diversas funções fisiológicas do cérebro tais como aprendizado e memória (IZQUIERDO; MEDINA, 1997), desenvolvimento e envelhecimento (AIDA et al., 1999), como proliferação, migração celular, diferenciação e morte (MCDONALD; JOHNSTON, 1990). O glutamato, como neurotransmissor, é originado metabolicamente dos esqueletos de carbono da glicose e da glutamina que atravessam a barreira hematoencefálica, sendo assim, requerem um permanente suprimento glial (ALBARRACÍN, 2022)

A concentração aproximada de glutamato no cérebro é da ordem de 5 a 10 mM (GONEN et al., 2020) e a da glutamina é de 7 mM, embora possa ser maior nos somas ou pericarions dos mesmos neurônios em que a concentração é da ordem de 38 mM, de acordo com estudos neuroquímicos e quantitativos ultraestruturais (TANG; BAIR; DESCALZI, 2021).

O glutamato pode ser sintetizado a partir da glutamina ou do α -cetoglutarato por transaminação (SCHOLZ; WOOLF, 2007). O destino do glutamato nas células depende da condição metabólica, podendo seguir para o metabolismo oxidativo através do ciclo do ácido cítrico (TCA) e gerar ATP, ou ser transformado em glutamina e glutathione (GSH). A glutamina está envolvida na síntese de ácidos nucleicos, nucleotídeos, proteínas entre outros. Quando catalisada pela enzima glutaminase, a glutamina dissocia-se em íon amônio e glutamato. Por meio do glutamato, pode ocorrer a síntese de outros aminoácidos e de antioxidantes como a GSH, principal antioxidante celular não enzimático (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009). O ciclo glutamato-glutamina entre astrócitos e neurônios tem sido proposto como a maior via de reciclagem do glutamato, que ao ser captado é primeiramente convertido à glutamina, pela ação da glutamina sintetase (GS), a qual é posteriormente transportada ao neurônio e convertida a glutamato pela ação da glutaminase (ZHOU; DANBOLT, 2014). A concentração de glutamato varia de acordo com a sua localização intra e extracelular (MINET et al., 1997).

Uma deficiência de (GS) em humanos pode levar, de uma forma geral, a níveis baixos de GSH resultando em danos metabólicos de consequências comprometedoras, uma vez que ao ocorrer uma acumulação em γ - glutamilcisteína, esta pode ser convertida a 5-oxoprolina (ALOTAIBI; RAHMAN, 2019). Este último pode causar acidose metabólica grave, anemia hemolítica e danos no sistema nervoso central (KRUGER; LIGHT, 2010). A GS apesar de não ter um papel determinante na biossíntese de GSH, a sua acumulação está associada a

situações de stresse. Por exemplo, no trauma cirúrgico, os níveis de GSH e a atividade da enzima GS no músculo esquelético declinam. Como tal, é pertinente considerar a GS na regulação da síntese de GSH, como também em situações de estresse oxidativo (RAO; LARIOSAWILLINGHAM; YU, 2003).

O glutamato, como mediador de sinapses excitatórias, tem um papel importante em funções fisiológicas do SNC; entretanto, uma ativação excessiva do sistema glutamatérgico pode provocar dano, ou até mesmo morte neuronal (PRIESTNALL et al., 2020; SUN et al., 2016; WILHELMSSON et al., 2006). Essa situação, denominada excitotoxicidade, tem sido relacionada a diversas doenças agudas e crônicas do SNC, tais como isquemia, hipoglicemia, hipóxia e trauma (CHO et al., 2018; SUN et al., 2016), Huntington, Alzheimer e *status epilepticus*, respectivamente (ZHOU; DANBOLT, 2014).

Os receptores de glutamato medeiam a maioria da neurotransmissão excitatória no SNC de mamíferos. Esses receptores são classificados em dois grandes grupos, ionotrópicos e metabotrópicos, de acordo com suas características farmacológicas e moleculares, os quais geralmente coexistem em uma única sinapse (OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998). O NMDA e AMPA encontram-se espalhados nos dendritos dos neurônios pós-sinápticos, gerando a densidade pós-sináptica (DPS), enquanto que os mGluRs estão localizados na periferia da DPS (OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998).

A captação do glutamato ocorre quando um transportador de aminoácidos excitatórios (EAAT) capta uma molécula de glutamato e três de Na^+ , trocando-as por uma molécula de K^+ , sendo este mecanismo dependente da atividade de Na^+/K^+ ATPase, que mantém o gradiente de concentração de Na^+ . A retirada do glutamato da sinapse por seus transportadores é fundamental para que ocorra o mecanismo da neurotransmissão excitatória normal, bem como a prevenção contra a toxicidade do glutamato (KRNJEVIC, 1970).

Além da importância dos receptores, vale ressaltar, que as concentrações extracelulares de glutamato são mantidas em níveis fisiológicos exclusivamente por transportadores de alta afinidade Na^+ - dependentes (EAATs). Os EAATs, localizados tanto em células gliais quanto neuronais, são os responsáveis pela captação do glutamato extracelular, permitindo a transmissão excitatória normal, assim como protegendo da excitotoxicidade do glutamato (ZHOU; DANBOLT, 2014). São os transportadores: GLAST/EAAT1 (STORCK et al., 1992), GLT-1/EAAT2 (ZHOU; DANBOLT, 2014), EAAC1/EAAT3 (ZHOU; DANBOLT, 2014), EAAT4 (FAIRMAN et al., 1995) e EAAT5

(FAIRMAN et al., 1995). Estes cinco transportadores de glutamato fazem parte de uma única família de proteínas e apresentam entre 50 e 60% de homologia na sequência de aminoácidos entre si (BEART; O'SHEA, 2007).

O glutamato ativa vários receptores de membrana, entre eles o receptor ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA), que tem papel crucial na sensibilização dos neurônios nociceptivos e na ativação dos astrócitos por meio do influxo do íon cálcio (Ca^{2+}) (VALLEJO et al., 2010). O aumento do cálcio intracelular para além de um certo limiar parece ser o desencadeador principal para iniciar a sensibilização central atividade-dependente. O seu influxo tem a capacidade de fortalecer as conexões sinápticas entre os nociceptores e neurônios do corno dorsal, exacerbando as respostas a estímulos dolorosos, e gerando hiperalgesia (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009b). A indução e manutenção de sensibilização central atividade-dependente está relacionada com os recetores NMDA, o que demonstra um papel crucial do glutamato e dos seus recetores. Os recetores NMDA medeiam diversas funções biológicas, como dor crônica, memória e fenômenos de *wind up* (a estimulação repetida dos neurônios de largo espectro dinâmico induz um aumento da sua resposta evocada e descarga subsequente, após cada estimulação) em diferentes áreas do SNC. Em condições normais encontram-se bloqueados por íons magnésio (Mg^{2+}) (BAHR-HOSSEINI; BIKSON, 2021)

A ativação da microglia e dos astrócitos após uma lesão nervosa periférica envolve a liberação, pelos neurônios, de neurotransmissores como a proteína relacionada geneticamente à calcitonina (CGRP), a substância P, o glutamato o ácido gama-aminobutírico (GABA), a serotonina e o trifosfato de adenosina (ATP) (GUO et al., 2018). Essa ativação ocorre através dos mediadores químicos como a substância P, o CGRP, o óxido nítrico, o ATP e o glutamato liberados no momento da lesão nervosa poderiam ser transportados através ou entre os neurônios aferentes, não somente afetando a transmissão sináptica, mas também ativando as células da glia (GUO et al., 2018; VALLEJO et al., 2010).

Também, pode ocorrer outra ativação da microglia e dos astrócitos após uma lesão nervosa periférica, através de astrócitos supra-espinais que podem potencializar a dor neuropática pela ativação das células da glia por vias descendentes. A migração de macrófagos periféricos, permitida pelo aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica após uma lesão neuronal, poderia estar associada à proliferação dessas

células e posterior diferenciação em células gliais ativadas no encéfalo (ROMERO-SANDOVAL et al., 2008)

Para tanto, as células da microglia como os astrócitos também contribuem para o processo de sensibilização central. As células da microglia, macrófagos residentes do SNC, estão distribuídas ao longo da substância cinzenta da medula espinal (RUGGIERO et al., 2011). Ao contrário da microglia, a ativação dos astrócitos é tardia e persiste por um período mais longo, estando mais relacionados com a manutenção da sensibilização central e dor persistente (PAUKERT et al., 2014). Outras evidências científicas, descrevem que as células da glia, ao secretarem citocinas pró-inflamatórias atuam sobre receptores glutamatérgicos excitatórios, induzindo potenciação sináptica e ativação de vias descendentes facilitadoras da dor (ABBADIE et al., 2009).

Em síntese, a sensibilização central é uma expressão do aumento do ganho sináptico de glutamato nos neurônios da transmissão nociceptiva central e, desse modo, contribui de forma importante para a hiperalgesia. A compreensão dos papéis da microglia e astroglia pode levar a novas estratégias para o diagnóstico e tratamento da dor neuropática (SCHOLZ; WOOLF, 2007).

1.6 DEFESA ANTIOXIDANTE

A glutathiona (GSH) no SNC é sintetizada e armazenada principalmente nos astrócitos. A sua síntese irá variar de acordo com a biodisponibilidade dos aminoácidos, mais concretamente da cisteína, uma vez que este aminoácido é essencial. Para além desta limitação na sua biodisponibilidade, este aminoácido apresenta na sua estrutura um componente que o caracteriza bioquimicamente, o enxofre, designado de grupo tiol. Este grupo vai conferir à glutathiona a capacidade de desempenhar as funções que lhe são características e de importância vital no organismo (WEI; INAN, 2013). Nas células, a glutathiona pode encontrar-se sob a forma de glutathiona reduzida (também denominada de monomérica), na forma oxidada (também designada de dimérica (GSSG)) (PETROFF, 2002). Nos tecidos saudáveis cerca de 90% da glutathiona existente encontra-se na forma reduzida (PERRY; GODIN; HANSEN, 1982). A glutathiona é o principal antioxidante produzido pela célula, sendo esta a sua função principal – poder antioxidante – protegendo-a de radicais livres (ALLEN et al., 2000).

Após a síntese, parte da GSH sintetizada é encaminhada para compartimentos intracelulares específicos, incluindo mitocôndrias e retículo endoplasmático, mas muita da GSH é enviada para espaços extracelulares, inclusive o plasma sanguíneo, secreções exócrinas, fluido de revestimento do pulmão e LCR (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009). A GSH é uma molécula que intervêm em diversos processos, como antioxidante e destoxicante, no transporte de aminoácidos, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, manutenção da forma activa de certas enzimas, protecção do organismo contra a exposição a radiações solares e, estudos recentes apontam para uma participação importante da GSH na regulação da morte celular programada (DRINGEN; GUTTERER; HIRRLINGER, 2000).

1.7 MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DANO NEURAL

Um marcador tecidual é descrito como uma característica objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, patológicos, ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (BRUGUEROLLE; LABRECQUE, 2007). De acordo com Treede et al., 2015 do ponto de vista bioquímico, biomarcadores são moléculas sistêmicas, que podem ser proteínas, enzimas ou produtos metabólicos, que podem ser determinados em laboratório para avaliar determinados processos biológicos ou determinada patologia.

Nos últimos anos, o dano neural tem sido estudado examinando-se alterações nos astrócitos e células da glia no SNC. Os biomarcadores cerebrais utilizados são: lactato, adenilato quinase, creatina quinase, S100B, GFAP e Enolase Neurônio Específica (NSE). Estas duas últimas proteínas são consideradas os mais importantes marcadores de danos às células gliais e neuronais, respectivamente (BUCHHOLD et al., 2007).

A resposta inflamatória sistêmica intensa afeta tanto o tecido cerebral traumatizado quanto o sadio, e é frequente no TCE. A resposta de estresse inflamatório inclui ativação do sistema complemento e baixa regulação de moléculas de adesão do endotélio de vasos cerebrais associada com acúmulo de neutrófilos e produção de citocinas (FILHO et al., 2016). O papel dos mediadores inflamatórios no desenvolvimento da lesão secundária tem sido investigado. Entre as citocinas, o interesse está particularmente focado no fator de necrose tumoral α (TNF- α).

1.7.1 Fator de Necrose Tumoral- α

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, sintetizada como uma proteína transmembrana com massa molecular de 26 KDa. Ela passa por uma clivagem antes de ser liberada para a circulação como uma molécula solúvel (ARSLAN; ERDUR; AYDIN, 2010).

Os astrócitos e a microglia, logo após o trauma, liberam IL-1 β e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), levando a uma liberação adicional de citocinas e à produção de mediadores do sistema imune periférico (CRESPO et al., 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar o efeito de uma única sessão de ETCC bimodal, sobre o limiar de dor induzida por estímulos mecânicos e térmicos, bem como sobre parâmetros inflamatórios e astrogliais em córtex cerebral e hipocampo de ratos Wistar machos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da ETCC bimodal em diferentes tempos (30, 60, 120 minutos e 24 horas) sobre o limiar de dor aos estímulos térmico e mecânico e sobre as proteínas gliais GFAP e S100B no córtex cerebral total e LCR;

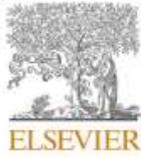
- Investigar os efeitos da ETCC bimodal sobre parâmetros inflamatórios e marcadores gliais (GFAP e S100B) no hipocampo;

- Avaliar os efeitos da ETCC bimodal sobre atividades astrogliais relacionadas ao metabolismo do glutamato (captação de glutamato, síntese de glutamina e glutatona) no hipocampo.

CAPÍTULO 1

Evaluation of the immediate effects of a single transcranial direct current stimulation session on astrocyte activation, inflammatory response, and pain threshold in naive rats.

Behav Brain Res. 2022 Jun 25;428:113880.



Research report

Evaluation of the immediate effects of a single transcranial direct current stimulation session on astrocyte activation, inflammatory response, and pain threshold in naïve rats



Etiane Micheli Meyer Callai^{a,1}, Lisandra Eda Fusinato Zin^{c,1}, Luciana Santa Catarina^a, Deise Ponzoni^a, Carlos Alberto Saraiva Gonçalves^c, Adriana Fernanda Kuckartz Vizuete^c, Milton Cristian Cougo^a, Jamile Boff^a, Edela Puricelli^a, Elissa Kerli Fernandes^b, Iraci Lucena da Silva Torres^d, Alexandre Silva Quevedo^{a,b,d,*}

^a Postgraduate Program in Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Neuroscience Graduate Program, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Department of Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Pharmacology Graduate Program, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Pain
Rats
Transcranial Direct Current Stimulation
Astrocytes
Interleukins
Inflammation

ABSTRACT

Transcranial direct current stimulation (tDCS) has demonstrated clinical benefits such as analgesia, anti-inflammatory, and neuroprotective effects. However, the mechanisms of action of a single tDCS session are poorly characterized. The present study aimed to evaluate the effects of a single tDCS session on pain sensitivity, inflammatory parameters, and astrocyte activity in naïve rats. In the first experiment, sixty-day-old male Wistar rats ($n = 95$) were tested for mechanical pain threshold (von Frey test). Afterward, animals were submitted to a single bimodal tDCS (0.5 mA, 20 min) or sham-tDCS session. According to the group, animals were re-tested at different time intervals (30, 60, 120 min, or 24 h) after the intervention, euthanized, and the cerebral cortex collected for biochemical analysis. A second experiment ($n = 16$) was performed using a similar protocol to test the hypotheses that S100B levels in the cerebrospinal fluid (CSF) are altered by tDCS. Elisa assay quantified the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL10), S100 calcium-binding protein B (S100B), and Glial fibrillary acidic protein (GFAP). Data were analyzed using ANOVA and independent t-test ($P < 0.05$). Results showed that tDCS decreased pain sensitivity (30 and 60 min), cerebral TNF- α and S100B levels (30 min). CSF S100B levels increased 30 min after intervention. There were no differences in IL10 and GFAP levels. TCDS showed analgesic, anti-inflammatory, and neuroprotective effects in naïve animals. Therefore, this non-invasive and inexpensive therapy may potentially be a preemptive alternative to reduce pain, inflammation, and neurodegeneration in situations where patients will undergo medical procedures (e.g., surgery).

1. Introduction

Non-invasive neuromodulation techniques such as Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) are becoming a potential therapeutic tool to treat different neurological disorders [1–4]. Moreover, tDCS has shown encouraging results in several pain conditions such as migraine [5], inflammatory diseases [6], and neuropathic pain [7]. However, there is little information available on the tDCS effects in healthy

individuals. These possible clinical benefits may be important to prevent pathologies, such as chronic pain.

Biochemical alterations induced by tDCS involving different mechanisms such as the inflammatory process. For example, studies indicate tDCS reduces TNF- α levels (i.e., proinflammatory) and increases anti-inflammatory interleukins (e.g., IL-10) [8]. Furthermore, studies have evaluated the importance of astrocytes in the effects of tDCS [9], [10]. Astrocytes are the primary glial cells with a crucial role in neural

* Correspondence to: Department of Surgery and Orthopedic, School of Dentistry, UFRGS, R. Ramiro Barcelos, 2492 - Santa Cecilia, Porto Alegre, RS 90035-004, Brazil.

E-mail addresses: alexandre.quevedo@ufrgs.br, quevedoalexandre@hotmail.com (A.S. Quevedo).

¹ Authors have contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.113880>

Received 28 April 2021; Received in revised form 15 February 2022; Accepted 1 April 2022

Available online 4 April 2022

0166-4328/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

activity, maintaining the extracellular environment of neurons and supplying energy to neural cells [11]. Moreover, they actively participate in synaptic transmission, neuronal plasticity, and neuroprotection [12].

There is evidence that tDCS increases astrocyte calcium signaling [13]. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100 calcium-binding protein B (S100B) have been used to mark astrocyte gliosis and activation, respectively [14], [15]. GFAP is the major intermediate filament protein in astrocytes [15], [16] and seems to be involved in chaperone-mediated autophagy, synaptic plasticity, and injury protection [15]. S100B is predominantly expressed and secreted by astrocytes [14], [17], [18]. This protein has several intra- and extracellular targets [14], [18], [19] and regulates cell proliferation, cytoskeleton states, and apoptosis [18]. Furthermore, astrocyte activity has been related to the pathogenesis of pain syndromes [20]. Therefore, the evaluation of S100B levels may be a valuable tool to estimate the effects of tDCS on astrocytes [18] at the cerebral cortical level and its secretion into the cerebrospinal fluid (CSF).

Studies have proposed that tDCS may have different clinical applications [5], [21]. The possible benefits may become more viable if the effects of tDCS can be found with a reduced number of sessions. Therefore, tDCS can be an inexpensive alternative to prevent painful complications resulting from clinical procedures (e.g., surgery), providing patient well-being and reduced treatment costs. Although the underlying neural mechanisms of tDCS need to be explored, the time required for the onset of the tDCS effects is also essential to clinical applications.

Therefore, the present study tested the hypothesis that a single tDCS session is able to increase the mechanical pain threshold, modulate S100B synthesis (cerebral cortex) and secretion (cerebrospinal fluid), and alter the inflammatory response. The rationale of the study was to support tDCS application to prevent rather than treat diseases. For example, a single preoperative tDCS session might be used as a preemptive treatment that may increase patient well-being by activating different mechanisms (e.g., decreasing pain, astrocytic signaling, and inflammatory factors). Accordingly, the present study aimed to systematically test the effect of a single tDCS session on astrocyte activity and cerebral inflammatory responses in the central nervous system, such as the mechanical pain threshold in naive rats.

2. Methods

2.1. Animals

Sixty-day-old male Wistar rats weighing 180–230 g were used ($n = 8$ –10/group for the behavioral test; $n = 6$ /group for biochemical assays). All animals were maintained in a standard 12:12 light-dark cycle (lights on at 07:00 a.m. and lights off at 07:00 p.m.) in a controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and air humidity (40–60%) environment. The Institutional Committee for Animal Care and Use approved all experiments and procedures (CEUA-HCPA protocol 16-0408). The experimental protocol complied with the ethical and methodological standards of the ARRIVE guidelines [22].

2.2. Experimental design

Animals were habituated to the maintenance room for two weeks before the study began. After this period, they were randomly divided into different groups, and the mechanical threshold was assessed (see 2.3) on “day one” (baseline).

The present study was divided into two experiments with complementary aims. The experiment one systematically evaluated (30, 60, 120 min, and 24 h) the immediate effects of tDCS on the mechanical pain threshold and the neurochemical changes in the cerebral cortex (TNF- α , IL-10, and S100B). This timeline for post tDCS evaluations was chosen to associate behavioral (nociceptive responses) and biochemical (protein

synthesis) changes. The experiment two used the optimal time-response (based on experiment 1) to investigate tDCS effects on S100B content in the CSF.

2.2.1. Experiment 1

To test the hypothesis that a single session of tDCS can induce analgesic effects and neurochemical changes in the cerebral cortex, behavioral and biochemical tests were performed in naive rats treated with a single intervention (tDCS/sham). Firstly, behavioral data were collected during baseline (day 1) to assess mechanical pain threshold (Fig. 1). One week later (day 8), a 20-minute real-tDCS session (T), or sham-tDCS procedure (S), was performed. Afterward, a post-intervention test was conducted at different time points: 30 min (T30 or S30 groups), 60 min (T60 or S60 groups), 120 min (T120 or S120 groups), or 24 h (T24 or S24 groups). Subsequently, animals were euthanized, and neural tissues (cerebral cortex) were collected for biochemical analysis.

Two controls groups (without tDCS treatment) were included: (1) Behavioral control group (CT): mechanical pain was assessed twice, during the baseline period and a week later (day 8); (2) Biochemical control (BC): mechanical pain was assessed only in the baseline period. Animals from both control groups did not receive tDCS or sham-tDCS and were euthanized on day 8. The cerebral cortex tissues were collected for neurochemical analysis.

2.2.2. Experiment 2

In order to investigate if the effects of tDCS were specifically in cortical areas, BDNF levels in the CSF were evaluated 30 min after tDCS application. Animals ($n = 16$) were divided into 3 groups: Control, Sham tDCS, and tDCS. Therefore, 30 min after a tDCS (or sham-tDCS) session, animals were anesthetized, CSF was collected (see Section 2.5), and they were euthanized. The procedures of experiment 2 followed the same protocol as experiment 1 (see above).

2.3. Von Frey test

Mechanical sensitivity was assessed using an automatic von Frey aesthesiometer (Insight, São Paulo, Brazil). Tests were performed by the

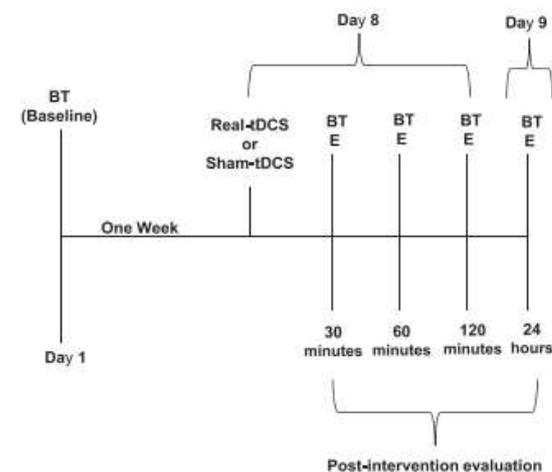


Fig. 1. Experimental design. On day 1, the baseline behavioral test was performed (von Frey test). One week later (Day 8), animals were submitted to transcranial direct current stimulation (real-tDCS) or false stimulation (Sham-tDCS). After the intervention, the behavioral test was repeated at 30 min, 60 min, 120 min, and 24 h and animals euthanized (E) according to the groups. BT = behavioral test; E = Euthanasia.

same researcher who was blinded to the animal's experimental groups during the study. Rats were acclimatized, for 10 min, 24 h before the test to avoid novelty. During testing, a polypropylene tip was placed perpendicularly underneath the mesh floor and applied to one of the five distal footpads with a gradual increase in pressure. The test consisted of poking the hind paw to provoke a flexion reflex followed by a flinch response after paw withdrawal. The intensity of the stimulus was automatically recorded when the paw was withdrawn. The average values of grams expressed three successive readings of von Frey measurements. The paw withdrawal threshold was expressed in grams (g). Pain sensitivity was tested in two different moments: baseline and specific time after the tDCS session according to the experimental group (30, 60, 120 min, or 24 h).

2.4. Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS)

The animals of T30, T60, T120, and T24 groups were subjected to a single session of bimodal tDCS [6], [23]. The present bimodal model has been used to investigate the behavioral and biochemical changes induced by tDCS in rats [24]. During the intervention (real-tDCS or sham-tDCS), animals remained gently wrapped in a towel, maintaining the upper and lower limbs' movements restricted [25], [26] for 20 min. The direct current was delivered from a battery-powered stimulator using electrocardiogram electrodes with conductive adhesive hydrogel (self-adhesive) (Meditrace®). Rats' heads were shaved for better adherence. The electrodes used were uniformly cut with a final area of 1.5 cm². They were attached to the scalp of the animal over a region of the primary cortex and fixed with adhesive tape (Micropore™), and covered with protective bandages to prevent removal (Fig. 2) [27]. If animals made small movements that could displace the electrodes, the researcher helped to keep the electrodes in position.

The anodal electrode was placed on the head using landmarks of the neck and shoulder lines as guides (the anterior and posterior regions in the midline between the two hemispheres of the parietal cortex, as previously described [28] (Fig. 2B)). The cathodal electrode was positioned at the midpoint between the lateral angles of both eyes [29]. This protocol mirrors human tDCS application [1], [3], [30], [31]. A constant current intensity of 0.5 mA was applied for 20 min [6]. This current intensity allowed to be delivered a current density of 3.3 A/m², which has been found to be safe for use in animal models [32].

Earlier studies had shown that higher current intensities (e.g., 1 mA) might cause skin lesions as current density is comparatively higher than those using large pads (i.e., tDCS in humans) [33]. For sham tDCS stimulation, the electrodes (off position) were placed in the same

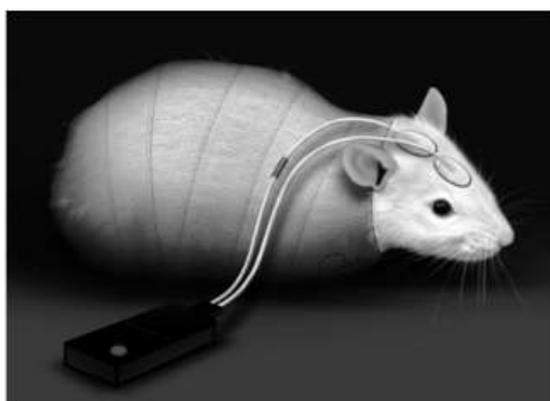


Fig. 2. The tDCS protocol. Animals were gently wrapped in a towel during tDCS session. The electrodes were positioned on the animal's head. The electric current is generated in a battery connected to the electrodes.

positions as the real stimulation [34].

2.5. Tissue and CSF collection

Animals were euthanized immediately after the second behavioral test depending on the group. In experiment 1, to avoid biochemical changes induced by general anesthetics, rats were decapitated, and the tissues were collected. In experiment 2, animals were anesthetized using ketamine (75 mg/Kg) and xylazine (10 mg/kg) to collect the CSF. Afterward, rats were positioned in the stereotaxic apparatus for ventricular access, and CSF was collected by puncturing the cisterna magna with an insulin syringe. A maximum volume of 30 μ l was collected over a 3-min period to minimize brainstem damage. After CSF collection, animals were euthanized by overdose of ketamine and xylazine. All biological samples were frozen at -80°C immediately after the collection.

2.6. S100B measurement

Tissue slices were homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) containing in mM: 50 NaCl, 18 Na₂HPO₄, 83 NaH₂PO₄, H₂O, pH 7.4, with 1 mM EGTA and 1 mM PMSF. The S100B content in the CSF, and cerebral cortex was measured by ELISA, as described previously [35]. Briefly, 50 μ l of sample plus 50 μ l of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate that was previously coated with monoclonal anti-S100B SH-B1 (Sigma- Aldrich, San Luis, Missouri, EUA). Polyclonal anti-S100 (Dako, Carpinteria, CA, USA) was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA) was added for a further 30 min. The color reaction with OPD (Sigma- Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.02 to 10 ng/mL. Data were calculated as ng/mL and were expressed as percentages of the control.

2.7. GFAP measurement

GFAP content from cortex tissue homogenate was measured by ELISA, as described previously [36]. The ELISA for GFAP was carried out by coating 100 μ l samples containing 70 μ g of protein overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. Incubation with an antibody polyclonal anti-GFAP (Dako) from rabbit for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature. The color reaction with OPD (Sigma- Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) was measured at 492 nm. The standard GFAP (Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.) curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL. Data were calculated as ng/mL and were expressed as percentages of the control.

2.8. IL-10 measurement

Seventy cerebral cortex samples from male Wistar rats previously homogenized in PBS containing 1 mM EGTA and 1 mM PMSF, followed by centrifugation at 1000 X g for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. This cytokine was measured in supernatants according to the manufacturer's instructions for ELISA kit (Boster Biological Technology). Data were calculated as ng/mL and were expressed as percentages of the control.

2.9. TNF- α measurement

Cerebral cortex tissue was homogenized in PBS, with 1 mM EGTA and 1 mM PMSF, followed by centrifugation at 1000 X g for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. Cytokine was measured in supernatants according to the manufacturer's instruction (eBioscience, Ref. 88-7340, San Diego, EUA). Data were calculated as ng/mL and were expressed as percentages of the control.

2.10. Statistical Analyses

Normality of data distribution was tested with Kolmogorov Smirnov.

To test the analgesic effect of tDCS, repeated-measures ANOVA followed by Fisher LSD post hoc test was used (basal vs. post-treatment for all groups).

The cerebral cortical levels of S100B, GFAP, TNF- α , and IL-10 were normalized by the control group. To assess the effect of tDCS at each time period (30, 60, 120 min, and 24 h), the comparison between the treated and sham groups was performed using an independent t-test. Results were considered statistically significant if $p < 0.05$. Data were expressed as mean \pm standard deviation of the mean (SDM). The SPSS 20.0 program was used for all statistical analysis.

3. Results

3.1. Experiment 1

3.1.1. Decrease of mechanical pain sensitivity by a single tDCS session

A single tDCS session was able to increase the mechanical threshold at 30 (T30) and 60 (T60) minutes after the intervention (baseline vs. post-tDCS; $p = 0.026$ and $p = 0.011$, respectively) (Fig. 3). Animals that were evaluated 120 min or 24 h after the tDCS session did not show differences between baseline and post-tDCS evaluation ($p = 0.327$ and $p = 0.174$, respectively).

The sham-tDCS procedure (S) did not alter the mechanical pain threshold at 30 ($p = 0.405$), 60 min ($p = 0.488$), 120 min ($p = 0.139$), and 24 h ($p = 0.179$) (baseline vs. post-tDCS) (Fig. 3).

Control group (CT) animals did not show differences at the mechanical pain threshold between the baseline and the retest session (a week later) ($p = 0.452$). Therefore, differences between pain thresholds found before and after treatments (i.e., tDCS or sham-tDCS) cannot be attributed to habituation, sensitization, or memory.

3.1.2. Modulation of inflammatory mediators by tDCS

Thirty minutes after the tDCS application, TNF- α levels in the cerebral cortex were lower in animals that received real-tDCS compared to the sham-tDCS group (30 min; T vs. S; $p < 0.043$) (Fig. 4). There were no differences at 60 min ($p = 0.303$), 120 min ($p = 0.351$), and 24 h ($p = 0.298$).

There were no differences in IL10 levels at 30 min ($p = 0.401$), 60 min ($p = 0.07$), 120 min ($p = 0.951$), and 24 h ($p = 0.613$) (Fig. 5).

3.1.3. tDCS effects on astrocyte activity in the cerebral cortex

After 30 min of intervention, there was an increase in S100B levels in the cerebral cortex of animals that received sham-tDCS (30 min; T vs. S)

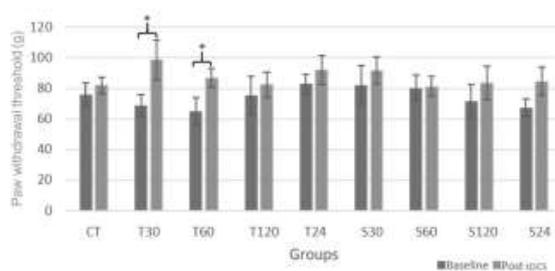


Fig. 3. Mechanical nociceptive behavior. The von Frey test showed that tDCS was able to increase mechanical pain threshold at 30 (T30) and 60 (T60) minutes after the intervention (baseline vs. post-tDCS). Data are presented as mean \pm standard deviation of the mean. Asterisk (*) indicates a statistically significant difference of $P < 0.05$ between baseline and post-treatment session. CT = Control Group, T30 = animals tested 30 min after real-tDCS session; T60 = animals tested 60 min after real-tDCS session; T120 = animals tested 120 min after real-tDCS session; T24 = animals tested 24 h after real-tDCS session; S30 = animals tested 30 min after sham-tDCS session; S60 = animals tested 60 min after sham-tDCS session; S120 = animals tested 120 min after sham-tDCS session; S24 = animals tested 24 h after sham-tDCS session.

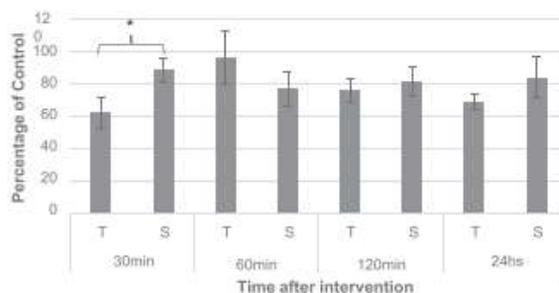


Fig. 4. Effect of tDCS on TNF- α levels in the cerebral cortex. Measurement of TNF- α levels in the cerebral cortex detected a significantly lower concentration in animals that received real-tDCS compared to Sham-tDCS 30 min after the intervention. The data are presented as mean \pm standard deviation of the mean. Asterisk (*) indicates a statistically significant difference of $P < 0.05$. T = Real-tDCS groups; S = Sham-tDCS groups.

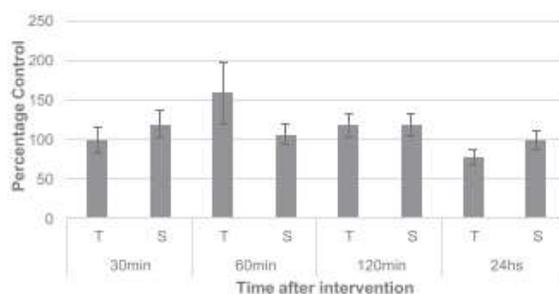


Fig. 5. Effect of tDCS on IL-10 levels in the cerebral cortex. Although treated animals had a tendency to increase IL-10 levels at 60 min ($P = 0.07$), there was no difference in the levels of IL-10 between real-tDCS and sham-tDCS groups in the cerebral cortex ($P > 0.05$). The data are presented as mean \pm standard deviation of the mean. T = Real-tDCS groups; S = Sham-tDCS groups.

($p = 0.019$) (Fig. 6). The increased levels of S100B could be explained by the immobilization required during the intervention (tDCS or sham-tDCS) that is known to induce stress in rodents. Moreover, real-tDCS was able to decrease S100B levels, indicating that tDCS may regulate the astrocyte activity or that S100B was released from rat cortical regions. There were no differences between groups at 60 min ($p = 0.468$), 120 min ($p = 0.469$), and 24 h ($p = 0.487$).

There were no differences between groups related to GFAP levels at

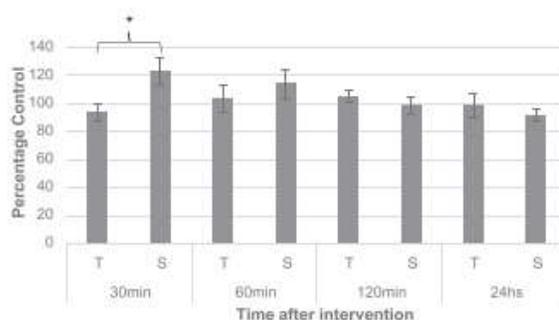


Fig. 6. Effect of tDCS on S100B levels in the cerebral cortex. Animals that received real-tDCS showed lower levels of S100B at 30 min after the intervention (T30 vs. S30). Data are presented as mean \pm standard deviation of the mean. Asterisk (*) indicates a statistically significant difference of $P < 0.05$. T = Real-tDCS groups; S = Sham-tDCS groups.

30 min ($p = 0.415$), 60 min ($p = 0.187$), 120 min ($p = 0.470$), and 24 h ($p = 0.701$) (Fig. 7).

3.2. Experiment 2

3.2.1. S100 in cerebrospinal fluid

In order to investigate the changes of S100B levels in CSF after a single session of tDCS, thirty minutes after the treatment, animals were anesthetized, and CFS collected. There was an increase of S100B in the CFS after the real-tDCS session (tDCS vs. Sham-tDCS; $p = 0.040$) (Fig. 8).

4. Discussion

The present data demonstrate that a single session of tDCS can alter behavioral and neurochemical parameters related to pain, inflammation, and astrocytic activation in naïve rats. Most of scientific research has focused on the effects of tDCS on pathological conditions (e.g., pain) [27]. Although some clinical investigations had been used in healthy subjects [37], [38], in vivo studies evaluating tDCS effects on naïve animals are uncommon. Furthermore, the few experiments that assessed tDCS effects on naïve rats used invasive procedures (e.g., implantation of epicranial electrodes) [39]. The investigation of the effects of tDCS in naïve rats is a broad field that can be explored using different methods and approaches. This is an opportunity to understand the tDCS mechanisms, animal safety [40], and applications in different research and clinical scenarios, such as preemptive analgesia.

During the application of tDCS, when both electrodes are placed on the head, electrical current may project superficially between the electrodes. Different methods, such as a chronically implanted electrode [41] or chest electrode [42], allow the electric field to be delivered into the brain. The present study used a protocol that has been shown to be effective in inducing alterations in pain sensitivity [43] and changes in biochemical parameters such as interleukins [44], neurotrophins [43], and neurotransmitters [45]. These data indicate that the electrical current, at least part of it, was able to be delivered to the brain using the present animal model.

Furthermore, since this tDCS model is bimodal, it is essential to note that the present results can be attributed not only to the active electrode (cathode) but also to the influence (i.e., position and distance) of the reference electrode (anode) [46]. Therefore, the behavioral and biochemical changes found may be due to activation or even inhibition of cortical regions under both electrodes.

Pain management is a challenge, especially when it is a chronic condition [47]. Acting to prevent the onset of nociceptive processing is the most profitable strategy for pain management [48–50]. The present results indicate a decrease in mechanical pain sensitivity up to 60 min after the tDCS session (Fig. 3), and this finding is in line with previous

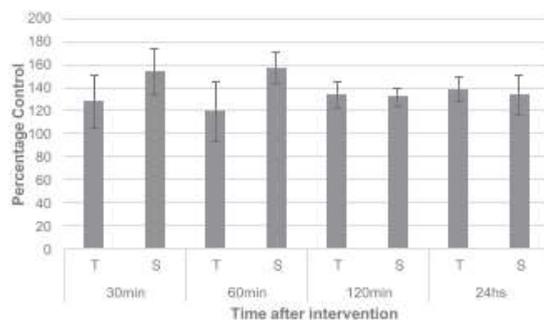


Fig. 7. Effect of tDCS on GFAP levels in the cerebral cortex. GFAP levels showed no difference between real-tDCS and sham-tDCS groups ($P > 0.05$). Data are presented as mean \pm standard deviation of the mean. T = Real-tDCS groups; S = Sham-tDCS groups.

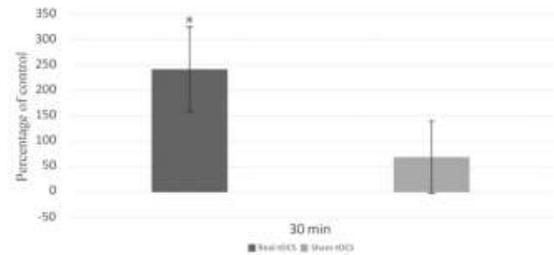


Fig. 8. Effect of tDCS on S100B levels in the cerebrospinal fluid. The concentration of S100B was higher at the T30 group compared to the S30 group. Data are presented as mean \pm standard deviation of mean. Asterisk (*) indicates a statistically significant difference of $P < 0.05$ between real-tDCS and sham-tDCS groups.

works [38], [51]. Studies reported increased pain threshold in healthy individuals after cathodic tDCS over the primary motor cortex (M1) [5]. Moreover, there was an increase in sensory thresholds for 30 min after anodal tDCS application over different cortical areas such as M1, the primary somatosensory cortex (S1), and the dorsolateral prefrontal cortex (DLPF) [38], [51]. Another study showed that sensory perception of experimental pain can alter sensory testing measurements in older adults with knee osteoarthritis [52]. One possible explanation is that tDCS changes the level of neurochemical factors involved in pain processing.

Therefore, the current study indicates that the concentration of TNF- α in the cerebral cortex of naïve rats may vary after tDCS application (Fig. 4). Thirty minutes after intervention, TNF- α levels in the real-tDCS group were significantly lower than in the sham-tDCS group. The reduction of TNF- α levels may be directly or indirectly related to reducing pain sensitivity [53], [54]. Some drugs block the action of cytokines as a strategy to treat painful inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis [55]. TNF- α is an early and potent pro-inflammatory cytokine released by macrophages in the periphery and microglia and astrocytes in the CNS [56], [57].

Furthermore, the half-life of TNF- α can vary from a few minutes [58] to 14–18 min [59], which can justify the analgesia found 30 min after the tDCS intervention in the present study. Thus, tDCS might be effective in controlling different inflammatory mechanisms. For example, in addition to decreasing the amount of pro-inflammatory cytokines in the cerebral cortex (i.e., TNF- α), a tDCS session tended to increase levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, 60 min after the intervention (Fig. 5). In summary, the present findings indicate the presence of mechanisms involving the neuroinflammation pathways underlying tDCS effects.

In addition to immune modulation, tDCS alters intra- and extracellular signaling in different cell types [51], [60], [61]. For example, the present results showed that 30 min after the intervention, tDCS-treated animals had lower cerebral cortical levels of S100B when compared to the sham-tDCS group (Fig. 6). S100B and GFAP levels have been used to assess astrocyte reactivity [11], [18]. GFAP is expressed exclusively by astrocytes and is considered a biomarker for CNS injury [62], [63]. In the present study, although there were changes in cerebral levels of S100B, there was no variation in GFAP levels (Fig. 7). These data may indicate that, rather than morphological changes, alterations in S100B levels are due to the increase in astrocyte activity.

The increase in S100B levels 30 min after the sham-tDCS session should be further discussed, considering the limitation of the present tDCS rat model. For example, animals were immobilized during tDCS application (sham and real tDCS), similar to the immobilization stress model [34]. Studies have been shown that stress can alter S100B levels at different regions of the CNS [17], [18].

Therefore, the immobilization necessary for the tDCS rat model may

induce stress [34], increasing S100B levels in the cerebral cortex 30 min after the intervention. Furthermore, the stress-induced augmentation of S100B was found only in the sham-tDCS group. S100B levels in biological fluids have been shown to increase stressful activities, suggesting that S100B levels may be physiologically regulated and raised during stress conditions [64]. The lack of increase in S100B levels when animals received real-tDCS may indicate that this treatment prevents or reverses the effect of stress-induced by immobilization. One possible explanation would be that the intracellularly increased S100b in the tDCS group was released with the passage of electrical current by activating the voltage-regulated calcium channels of astrocytes or by glutamate released in response to tDCS [65]. However, a limitation of this work is that S100b mRNA levels in the cerebral cortex were not evaluated.

An alternative explanation for the lack of increase in S100B levels in the cerebral cortex by tDCS would be its movement to another region of the CNS. For example, the high levels of S100B are released from the cerebral cortex (neuronal and non-neuronal cells) to cerebral interstitial fluid that is drained into CSF [66], [67]. Therefore, the assessment of biochemical parameters in the CSF can be used to evaluate the secretion of specific molecules [68], [69]. Thus, the measurement of S100b in CSF provides essential information on what may have occurred.

Experiment one showed that S100B increased 30 min after the immobilization procedure (sham-tDCS group), and real-tDCS was able to reverse or prevent this effect. To investigate whether the levels of S100B in the CSF followed the same pattern as in the cerebral cortex, experiment two was performed. Data demonstrate that real-tDCS was able to increase the levels of S100B in the CSF (real-tDCS vs. sham-tDCS) 30 min after the intervention. (Fig. 8). These results can indicate that tDCS is able to cause cerebral S100B release into CSF. These data are in line with that proposed by Monai [10], indicating that tDCS induces a transient increase of calcium in mouse cortical astrocytes. Consequently, tDCS would be able to release gliotransmitters and several other transmitters [10].

However, S100B may have opposite roles depending on the circumstances, making the interpretation of the results a challenging task. For example, the impact of S100B can diverge according to its concentration [70]. Accordingly, high concentrations of S100B are harmful to neurons, while low concentrations are protective to neurons and astrocytes [71–76]. On the other hand, S100B may be able to attenuate neuronal damage and promote tissue repair after traumatic brain injury [77]. Furthermore, S100B increases the amplitude of gamma oscillations in vivo, which is critical to cognitive functions [78]. Therefore, this protein has been addressed as a "good" or "bad" molecule [79].

According to previous molecular studies [79], the concentration of S100B in the CSF observed in the present study was insufficient to cause neurotoxicity. Furthermore, the increase of CSF S100B levels may have neurotrophic effects involving different mechanisms, such as the receptor for advanced glycation end products (RAGE) [74], cell differentiation and survival [76], and neuroprotective effect [77]. Future studies will be needed to address these issues directly.

In summary, the present results indicate that tDCS would reduce pain, prevent inflammation, and has neuroprotective effects. Furthermore, the tDCS may be an alternative to induce immediate clinical pain relief [80], and a preemptive treatment in patients submitted to surgical procedures. Accordingly, protocols using tDCS may reduce local anesthetics and analgesic drugs needed in the trans and postoperative periods [81], [82]. Moreover, the effectiveness of pain control decreases the risk of drug addiction and provides a reduction in postoperative costs. Future investigations should address tDCS effects on pain conditions and neurodegenerative diseases.

CRedit authorship contribution statement

Etiane Micheli Meyer Callai: Conceptualization, Data curation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Lisandra Eda Fusinato Zin:** Data curation, Visualization,

Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Luciana Santa Catarina:** Conceptualization, Data curation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Deise Ponzoni:** Project administration, Writing – review & editing, Visualization. **Carlos Alberto Saraiva Gonçalves:** Methodology, Writing – review & editing, Resources. **Adriana Fernanda Kuckartz Vizuete:** Data curation, Methodology, Resources. **Milton Cristian Cougo:** Data curation. **Jamile Boff:** Data curation, Visualization. **Edela Puricelli:** Writing – original draft, Writing – review & editing. **Elissa Kerli Fernandes:** Data curation, Writing – original draft. **Iraci Lucena da Silva Torres:** Conceptualization, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Alexandre Silva Quevedo:** Conceptualization, Methodology, Project administration, Writing – original draft, Writing – review & editing, Resources. A therapeutic approach to neuroprotection.

Research funding

This research was supported by the following Brazilian funding agencies: Graduate Group (GPPG) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and Research Incentive Fund of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE) (grant number 2016–0408).

Declaration of interest

none.

Acknowledgments

We thank the Engineering Unit of the HCPA, headed for Engineer Paulo Roberto Stefani Sanches, Ph.D., for developing the tDCS stimulator. Finally, we thank the staff of the Animal Experimentation Unit (UEA), headed by Marta Justina Giotti Cioato, DNP for the professionalism and credibility in the service provided, ensuring the quality of research.

References

- [1] A. Antal, M.A. Nitsche, W. Paulus, Transcranial direct current stimulation and the visual cortex, *Brain Res. Bull.* 68 (6) (2006) 459–463, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.10.006>. Feb.
- [2] F. Cogiamanian, M. Vergari, F. Pulecchi, S. Marceglia, A. Priori, Effect of spinal transcutaneous direct current stimulation on somatosensory evoked potentials in humans, *Clin. Neurophysiol.* vol. 119 (11) (2008) 2636–2640, <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2008.07.249> (Nov.).
- [3] M.A. Nitsche, et al., Transcranial Direct Current Stimulation: State of the Art 2008, in: *Brain Stimulation*, vol. 1, Elsevier Inc., 2008, pp. 206–223, <https://doi.org/10.1016/j.bsc.2008.06.004> (no.).
- [4] M.A. Nitsche, W. Paulus, Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation, *J. Physiol.* vol. 527 (3) (2000) 633–639, <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00633.x>.
- [5] M.F. DosSantos, et al., Immediate effects of tDCS on the μ -opioid system of a chronic pain patient, *Front. Psychiatry* vol. 3 (2012), <https://doi.org/10.3389/fpsy.2012.00093>.
- [6] G. Laste, et al., After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation, *Exp. Brain Res.* vol. 221 (1) (2012) 75–83, <https://doi.org/10.1007/s00221-012-3149-x> (Aug.).
- [7] V. Scarabelot, et al., Transcranial direct-current stimulation reduces nociceptive behaviour in an orofacial pain model, *J. Oral. Rehabil.* vol. 46 (1) (2018) 40–50, <https://doi.org/10.1111/joor.12726>.
- [8] H. Zhou, I. Rigoutsos, The emerging roles of GPRC5A in diseases, *Oncoscience* vol. 1 (12) (2014) 765–776, <https://doi.org/10.18632/oncoscience.104>.
- [9] H. Monai, H. Hirase, Astrocytes as a target of transcranial direct current stimulation (tDCS) to treat depression, in: *Neuroscience Research*, Elsevier Ireland Ltd, 2018, pp. 15–21, <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.08.012>. Jan. 01.
- [10] H. Monai, et al., Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain, *Nat. Commun.* vol. 7 (1) (2016) 1–10, <https://doi.org/10.1038/ncomms11109>.
- [11] M. Pekny, U. Wilhelmsson, M. Pekna, The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis, in: *Neuroscience Letters*, Elsevier Ireland Ltd, 2014, pp. 30–38, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.071> (vol.).
- [12] A. Becerra-Calixto, G.P. Cardona-Gómez, The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: Potential in cell therapy, in: *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, Frontiers Media S.A., 2017, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00088>.

- [13] H. Monai, H. Hirase, Astrocytic calcium activation in a mouse model of tDCS-Extended discussion, *Neurogenesis* vol. 3 (1) (2016), <https://doi.org/10.1080/23262133.2016.1240055>.
- [14] R. Donato, A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2001) 637–668, [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00046-2).
- [15] J. Middelkorp, E.M. Hol, GFAP in health and disease, *Prog. Neurobiol.* 93 (3) (2011) 421–443, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>.
- [16] L.F. Eng, Glial fibrillary acidic protein (GFAP): The major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes, *J. Neuroimmunol.* 81 (1985) 203–214, [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(85\)80063-1](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(85)80063-1).
- [17] R. Donato, et al., S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal, *Biochim. Et. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* vol. 1793 (6) (2009) 1008–1022, <https://doi.org/10.1016/j.bbancer.2008.11.009>.
- [18] C.A. Gonçalves, M. Conclí Leite, P. Nardin, Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury, *Clin. Biochem.* 41 (10–11) (2008) 755–763, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.04.003>.
- [19] R. Donato, Intracellular and extracellular roles of S100 proteins, *Microsc. Res. Tech.* vol. 60 (6) (2003) 540–551, <https://doi.org/10.1002/jemt.10296> (Apr.).
- [20] Y.V. Simkhes, S.M. Karpov, V.A. Baturin, A. Vyslova, Role Of S100 protein in the pathogenesis of pain syndromes, *Neurol. Neuropsychiatry Psychosom.* vol. 8 (4) (2016) 62–64, <https://doi.org/10.14412/2074-2711-2016-4-62-64> (Dec.).
- [21] H. Ribeiro, et al., Preoperative transcranial direct current stimulation: Exploration of a novel strategy to enhance neuroplasticity before surgery to control postoperative pain. A randomized sham-controlled study, *PLoS One* vol. 12 (11) (2017), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187013>.
- [22] C. Kilkenny, W.J. Browne, I.C. Cuthill, M. Emerson, D.G. Altman, Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research, *PLoS Biol.* vol. 8 (6) (2010), e1000412, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.
- [23] B.C. Lopes, et al., 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.* vol. 13 (3) (2020) 774–782, <https://doi.org/10.1016/j.brs.2020.02.025>.
- [24] D.S. Santos, et al., Bimodal transcranial direct current stimulation reduces alcohol consumption and induces long-term neurochemical changes in rats with neuropathic pain, *Neurosci. Lett.* vol. 759 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136014>.
- [25] I. Castagliuolo, et al., A neurotensin antagonist, SR 48692, inhibits colonic responses to immobilization stress in rats, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 93 (22) (1996) 12611–12615, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12611> (Oct.).
- [26] M.A. Hebert, L.I. Serova, E.L. Sabban, Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus, *J. Neurochem.* vol. 95 (2) (2005) 484–498, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03386.x>.
- [27] L.N. Spezia Adachi, et al., Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: Conceptualized model for electrical brain stimulation, *Exp. Brain Res.* vol. 233 (5) (2015), <https://doi.org/10.1007/s00221-015-4212-1>.
- [28] Y. Takano, T. Yokawa, A. Masuda, J. Niimi, S. Tanaka, N. Hironaka, A rat model for measuring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI, *Neurosci. Lett.* vol. 491 (1) (2011) 40–43, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.01.004>.
- [29] G. Laste, et al., After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation, *Exp. Brain Res.* vol. 221 (1) (2012) 75–83, <https://doi.org/10.1007/s00221-012-3149-x> (Aug.).
- [30] F. Fregni, et al., A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia, *Arthritis Rheum.* 54 (12) (2006) 3988–3998, <https://doi.org/10.1002/art.22195>.
- [31] A.C. Rosen, M. Ramkumar, T. Nguyen, F. Hoefl, Noninvasive transcranial brain stimulation and pain, *Curr. Pain. Headache Rep.* vol. 13 (1) (2009) 12, <https://doi.org/10.1007/s11916-009-0004-2>.
- [32] M. Bikson, et al., Safety of transcranial direct current stimulation: Evidence based update 2016, *Brain Stimul.* vol. 9 (5) (2016) 641–661, <https://doi.org/10.1016/j.brs.2016.06.004> (Sep.).
- [33] P.C. Miranda, P. Faria, M. Hallett, What does the ratio of injected current to electrode area tell us about current density in the brain during tDCS? *Clin. Neurophysiol.* (2009) <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2009.03.023>.
- [34] L.N. Spezia Adachi, et al., Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model, *Brain Res.* vol. 1489 (2012) 17–26, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.10.009> (Dec.).
- [35] M.C. Leite, et al., A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein, *J. Neurosci. Methods* vol. 169 (1) (2008) 93–99, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.11.021>.
- [36] F. Tramontina, et al., Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: Antigen recognition is affected by its phosphorylation state, *J. Neurosci. Methods* vol. 162 (1–2) (2007) 282–286, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.01.001> (May).
- [37] T. Dissanayaka, M. Zoghi, M. Farrell, G.F. Egan, S. Jaberzadeh, Does transcranial electrical stimulation enhance corticospinal excitability of the motor cortex in healthy individuals? A systematic review and meta-analysis, *Eur. J. Neurosci.* vol. 46 (4) (2017) 1968–1990, <https://doi.org/10.1111/ejn.13640> (Aug.).
- [38] B. Vaseghi, M. Zoghi, S. Jaberzadeh, A meta-analysis of site-specific effects of cathodal transcranial direct current stimulation on sensory perception and pain, *PLoS One* vol. 10 (5) (2015), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123873> (May).
- [39] L.F. Dimov, A.C. Franciosi, A.C.P. Campos, A.R.R. Brunoni, L. Pagano, Top-down effect of direct current stimulation on the nociceptive response of rats, *PLoS One* vol. 11 (4) (2016), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153506> (Apr.).
- [40] M. Bikson, et al., Safety of Transcranial Direct Current Stimulation: Evidence Based Update 2016, in: *Brain Stimulation*, Elsevier Inc, 2016, pp. 641–661, <https://doi.org/10.1016/j.brs.2016.06.004> (Sep. 01).
- [41] E. de Souza Nicolau, et al., Transcranial direct current stimulation (tDCS) in Mice, *J. Vis. Exp.* vol. 2018 (139) (2018), <https://doi.org/10.3791/58517> (Sep.).
- [42] D. Liebetanz, et al., Anticonvulsant effects of Transcranial direct-current stimulation (tDCS) in the rat cortical ramp model of focal epilepsy, *Epilepsia* vol. 47 (7) (2006) 1216–1224, <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00539.x> (Jul.).
- [43] P.R.M. Filho, et al., Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* vol. 64 (2016), <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016>.
- [44] G.G. Regner, et al., Transcranial direct current stimulation (tDCS) affects neuroinflammation parameters and behavioral seizure activity in pentylenetetrazole-induced kindling in rats, *Neurosci. Lett.* vol. 735 (2020), 135162, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135162> (Sep.).
- [45] L. Gabis, B. Shklar, D. Geva, "Immediate influence of transcranial electrostimulation on pain and β -endorphin blood levels: An active placebo-controlled study, *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* (2003), <https://doi.org/10.1097/00002060-200302000-00001>.
- [46] M. Bikson, A. Datta, A. Rahman, J. Scaturro, Electrode montages for tDCS and weak transcranial electrical stimulation: Role of 'return' electrode's position and size, *Clin. Neurophysiol.* vol. 121 (12) (2010) 1976–1978, <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2010.05.020>.
- [47] R. Staud, Biology and therapy of fibromyalgia: Pain in fibromyalgia syndrome, *Arthritis Res. Ther.* vol. 8 (3) (2006), <https://doi.org/10.1186/ar1950>.
- [48] V. Mutlu, I. Ince, Preemptive intravenous ibuprofen application reduces pain and opioid consumption following thyroid surgery, *Am. J. Otolaryngol. - Head. Neck Med. Surg.* vol. 40 (1) (2019) 70–73, <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2018.10.008> (Jan.).
- [49] M.A. Isordia-Espinoza, A. Pozos-Guillen, R. Martinez-Rider, J. Perez-Urizar, Comparison of the analgesic efficacy of oral ketorolac versus intramuscular tramadol after third molar surgery: A parallel, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial, *Med. Oral. Patol. Oral. Y. Cir. Bucal* vol. 21 (5) (2016) e637–e643, <https://doi.org/10.4317/medoral.21077> (Sep.).
- [50] A.P.C. Rocha, et al., Dor: Aspectos atuais da sensibilização periférica e central, *Rev. Bras. De Anestesiologia* vol. 57 (1) (2007) 94–105, <https://doi.org/10.1590/S0034-70942007000100011>.
- [51] B. Vaseghi, M. Zoghi, S. Jaberzadeh, Does anodal transcranial direct current stimulation modulate sensory perception and pain? A meta-analysis study, *Clin. Neurophysiol.* vol. 125 (9) (2014) 1847–1858, <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2014.01.020>.
- [52] R. Suchting, S. Kapoor, K.B. Mathis, H. Ahn, Changes in experimental pain sensitivity from using home-based remotely supervised transcranial direct current stimulation in older adults with knee osteoarthritis, *Pain. Med* vol. 21 (11) (2020) 2676–2683, <https://doi.org/10.1093/pm/pnaa268> (Nov.).
- [53] A.L. Hung, M. Lim, T.L. Doshi, Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain, in: *Scandinavian Journal of Pain*, Elsevier B.V., 2017, pp. 287–293, <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2017.08.002>, Oct. 01.
- [54] C.M.B. de Oliveira, R.K. Sakata, A.M. Issy, L.R. Gerola, R. Salomão, Citocinas e Dor, *Rev. Bras. De Anestesiologia* vol. 61 (2) (2011) 255–265, [https://doi.org/10.1016/S0034-7094\(11\)70029-0](https://doi.org/10.1016/S0034-7094(11)70029-0).
- [55] J.S. Smolen, G. Steiner, Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis, *Nat. Rev. Drug Discov.* vol. 2 (6) (2003) 473–488, <https://doi.org/10.1038/nrd1109>.
- [56] C.D. Raeburn, F. Sheppard, K.A. Barsness, J. Arya, A.H. Harken, Cytokines for surgeons, *Am. J. Surg.* vol. 183 (3) (2002) 268–273, [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(02\)00781-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(02)00781-X).
- [57] S. Zhang, et al., CD200-CD200R dysfunction exacerbates microglial activation and dopaminergic neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease, *J. Neuroinflamm.* vol. 8 (2011), <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-154>.
- [58] A. Diez-Ruiz, G.P. Titz, R. Zangerle, G. Baier-Bitterlich, H. Wachter, D. Fuchs, Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis, *Eur. J. Haematol.* 54 (1) (1995) 1–8, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1995.tb01618.x>.
- [59] M.C. Guisasaola, B. Alonso, B. Bravo, J. Vaquero, F. Chana, An overview of cytokines and heat shock response in polytraumatized patients, *Cell Stress Chaperon.-.* vol. 23 (4) (2018) 483–489, <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0859-9>.
- [60] B. Fritsch, et al., Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: Potential implications for motor learning, *Neuron* vol. 66 (2) (2010) 198–204, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.035> (Apr.).
- [61] H. Monai, et al., Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain, *Nat. Commun.* (2016), <https://doi.org/10.1038/ncomms11100>.
- [62] L. Lorente, Biomarkers associated with the outcome of traumatic brain injury patients, *Brain Sci.* vol. 7 (11) (2017), <https://doi.org/10.3390/brainsci7110142>, MDPI AG, Nov. 01.
- [63] Z. Yang, K.K.W. Wang, Glial fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker, in: *Trends in Neurosciences*, vol. 38, Elsevier Ltd., 2015, pp. 364–374, <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>.

- [64] F. Michetti, et al., The S100B protein in biological fluids: More than a lifelong biomarker of brain distress, *J. Neurochem.* vol. 120 (5) (2012) 644–659, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07612.x>.
- [65] R.-P. M. R.-R. J. G.-S. J. A. MT, Direct monitoring of ER Ca²⁺ dynamics reveals that Ca²⁺ entry induces ER-Ca²⁺ release in astrocytes, *Pflug. Arch.* vol. 472 (4) (2020) 439–448, <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02364-7> (Apr.).
- [66] R. Spector, S. Robert Snodgrass, C.E. Johanson, A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans, in: *Experimental Neurology*, Academic Press Inc, 2015, pp. 57–68, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.027>, Aug. 01.
- [67] H.F. Cserr, D.N. Cooper, T.H. Milhorat, Flow of cerebral interstitial fluid as indicated by the removal of extracellular markers from rat caudate nucleus, *Exp. Eye Res.* vol. 25 (1977) 461–473, [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(77\)80041-9](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(77)80041-9).
- [68] C.J.M. Sindic, M.P. Chalou, C.L. Cambiasso, E.C. Laterre, P.L. Masson, Assessment of damage to the central nervous system by determination of S-100 protein in the cerebrospinal fluid, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* vol. 45 (12) (1982) 1130–1135, <https://doi.org/10.1136/jnnp.45.12.1130>.
- [69] A. Barateiro, et al., S100B as a potential biomarker and therapeutic target in multiple sclerosis, *Mol. Neurobiol.* vol. 53 (6) (2016) 3976–3991, <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9336-6> (Aug.).
- [70] G. Sorci, S100B protein in tissue development, repair and regeneration, *World J. Biol. Chem.* vol. 4 (1) (2013) 1, <https://doi.org/10.4331/wjbc.v4i1.1>.
- [71] P. Niemegeers, et al., Differential effects of inflammatory and psychosocial stress on mood, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and inflammation in remitted depression, *Neuropsychobiology* vol. 74 (3) (2016) 150–158, <https://doi.org/10.1159/000466698> (Jun.).
- [72] M. Rothermundt, M. Peters, J.H.M. Prehn, V. Arolt, S100B in brain damage and neurodegeneration, *Microsc. Res. Tech.* vol. 60 (6) (2003) 614–632, <https://doi.org/10.1002/jemt.10303>.
- [73] E.P. Thelin, et al., Serial sampling of serum protein biomarkers for monitoring human traumatic brain injury dynamics: A systematic review, *Front. Neurol.* vol. 8 (JUL) (2017), <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00300>.
- [74] H.J. Huttunen, J. Kuja-Panula, G. Sorci, A.L. Agneletti, R. Donato, H. Rauvala, Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation, *J. Biol. Chem.* vol. 275 (51) (2000) 40096–40105, <https://doi.org/10.1074/jbc.M006993200> (Dec.).
- [75] B. Ahlemeyer, H. Beier, I. Semkova, C. Schaper, J. Kriegstein, S-100β protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702, *Brain Res.* vol. 858 (1) (2000) 121–128, [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02438-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02438-5).
- [76] M. Rickmann, J.R. Wolff, D.L. Meyer, Expression of S100 protein in the vestibular nuclei during compensation of unilateral labyrinthectomy symptoms, *Brain Res.* vol. 688 (1–2) (1995) 8–14, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00495-C](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00495-C) (Aug.).
- [77] A. Kleindienst, M.R. Bullock, A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury, *J. Neurotrauma* vol. 23 (8) (2006) 1185–1200, <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.1185>.
- [78] S. Sakatani, et al., Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo, *J. Neurosci.* vol. 28 (43) (2008) 10928–10936, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3693-08.2008> (Oct.).
- [79] A. Villarreal, et al., S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: Implications for its role in the propagation of reactive gliosis, *J. Neurochem.* vol. 131 (2) (2014) 190–205, <https://doi.org/10.1111/jnc.12790>.
- [80] M.F. Villamar, et al., Focal modulation of the primary motor cortex in fibromyalgia using 4×1-ring high-definition transcranial direct current stimulation (HD-tDCS): Immediate and delayed analgesic effects of cathodal and anodal stimulation, *J. Pain* vol. 14 (4) (2013) 371–383, <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.12.007>.
- [81] B. Ji, et al., Transcranial direct current stimulation (tDCS) reduces postsurgical opioid consumption in total knee arthroplasty (TKA), *Clin. J. Pain.* vol. 29 (11) (2013) 925–928, <https://doi.org/10.1097/AJP.0b013e31827e32be> (Nov.).
- [82] J.J. Borckardt, et al., Prefrontal versus motor cortex transcranial direct current stimulation (tDCS) effects on post-surgical opioid use, *Brain Stimul.* vol. 10 (6) (2017) 1096–1101, <https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.09.006> (Nov.).

DISCUSSÃO

A ETCC difere de outras técnicas de estimulação transcraniana por não induzir potenciais de ação, ou seja, seus efeitos são exclusivamente relacionados ao aumento ou redução da polarização de membrana dos neurônios, uma forma de aumentar o tônus da atividade neuronal. Portanto, mais do que uma estratégia de neuroestimulação, é uma ferramenta de neuromodulação, hiper ou hipo-polarizando a membrana em repouso, dificultando ou facilitando, respectivamente, que os potenciais de ação possam ocorrer (FREGNI et al., 2005).

Diversos estudos mostraram que quando a ETCC é aplicada em pacientes saudáveis promove efeitos positivos no processo de neuroplasticidade, uma vez que apresentam potencial de modular a excitabilidade cortical, produzindo efeitos imediatos e a longo prazo (RUOHONEN; KARHU, 2012; SPEZIA ADACHI et al., 2012b), corroborando os nossos achados em relação à astrogliose.

Os efeitos comportamentais de uma única sessão de ETCC são relativamente curtos, durando poucos minutos, como podemos observar no Cap.1. Evidências apontam que múltiplas sessões podem prolongar por semanas os efeitos da estimulação tanto em sujeitos saudáveis como em pacientes (BIKSON et al., 2016). Outros estudos demonstraram que uma aplicação de ETCC catódica de 18 minutos (1 mA) tem seu efeito prolongado por até 90 minutos. Se uma segunda estimulação for realizada ainda dentro do período de efeito de uma primeira, o efeito se prolonga por até 120 minutos. Entretanto, se a segunda for feita após 3 ou 24 horas da primeira aplicação, ou seja, quando não há mais efeito da primeira, o efeito da ETCC seria inicialmente atenuado ou abolido, mas, em seguida, restabelecido e mantido por 120 minutos (ALONZO et al., 2012).

Em relação à citocina pró-inflamatória, TNF- α , inicia a cascata de ativação de várias citocinas e fatores de crescimento, estando diretamente envolvida no desenvolvimento de dor em muitos modelos de lesão nervosa. A diminuição da sinalização de TNF- α atenua a hiperalgesia / alodínia após uma lesão nervosa em vários modelos experimentais (JIMENEZ-TORRES et al., 2017), resultado semelhante ocorreu em nossas pesquisas, porém o nosso modelo não causava dano aos animais, mas a ETCC *per se*, diminui esta citocina pró-inflamatória. As alterações temporais nos níveis desta citocina e as manifestações físicas da persistência a dor ocorrem concomitantemente. Estes dados determinam a sinalização de

TNF- α no desenvolvimento da hiperalgesia. As mudanças no hipocampo em relação aos níveis de TNF- α , juntamente com o seu envolvimento na dor mostra que a percepção cognitiva da dor deve desempenhar um papel integral na hiperalgesia (AIDA et al., 1999). Alguns eventos intracelulares resultam na secreção de IL-1 beta, IL-6 e TNF- α pelos astrócitos, bem como na expressão da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), o que ajuda a propagar ainda mais a resposta inflamatória e prolongar o estado de dor (MIYOSHI et al., 2008).

Os astrócitos são as células mais abundantes do sistema nervoso e estão envolvidos em diversas atividades encefálicas tais como formação da barreira hematoencefálica, regulação metabólica, respostas inflamatórias e comunicação sináptica (GONÇALVES et al., 2019). Existem vários marcadores específicos de astrócitos utilizados para identificar a reatividade astrogliar em situações de lesão aguda ou crônica, principalmente GFAP e S100B (JANIGRO et al., 2022), mas também a enzima glutamina sintetase (GS) (ANLAUF; DEROUICHE, 2013).

Os resultados publicados no artigo (Cap.1), aplicando uma única sessão de ETCC e avaliados em diferentes tempos, determinou que após os 30 minutos os resultados foram mais expressivos. A estrutura neuronal analisada foi o córtex cerebral inteiro, por estar associado à dor. Sendo assim, após 30 minutos da estimulação elétrica, os animais que receberam a eletroestimulação apresentam níveis mais baixos da proteína S100B que os animais sham, sendo os níveis de S100B e GFAP utilizados para avaliar a reatividade dos astrócitos. A GFAP segundo Lorente (2017), é expressa exclusivamente por astrócitos e é considerada um marcador de lesão. Neste estudo, ocorreu alteração nos níveis cerebrais de S100B, mas não ocorreu variação nos níveis de GFAP, sugerindo aumento da atividade astrocitária. Em relação a ETCC 30, ocorreu aumento dos níveis de S100B no córtex cerebral e no líquido cerebrospinal (LCR). Sendo que estes animais foram imobilizados em uma compressa durante a estimulação elétrica, procedimento que pode ser considerado modelo de estresse. E os estudos demonstram que o estresse pode alterar os níveis de S100B em diferentes regiões do SNC (DONATO et al., 2010). E em relação ao aumento de S100B no LCR, foi de acordo com Monai et al (2016) que descreveram o aumento transitório de cálcio nos astrócitos corticais de camundongos após ETCC.

Evidências indicam que não é possível caracterizar a gravidade e / ou extensão do dano baseados apenas na mensuração da proteína S100B no soro e no LCR,. No entanto,

muitos autores propuseram que a elevação da S100B após uma situação de dano (por exemplo, acidente vascular encefálico ou traumatismo cranioencefálico), associado a outros sinais neurológicos e análise de neuroimagem, poderia ser preditivo de um desfecho desfavorável. De acordo, um estudo em pacientes com traumatismo cerebral grave, mostrou que S100B e outras citocinas pró-inflamatórias (particularmente IL-1 β e TNF- α) estão elevados em 24 horas após e diminuem gradualmente ao longo do tempo (ZIMMER et al., 1995). Além disso, podem melhorar a neurogênese e a recuperação do hipocampo pela adição exógena da proteína após lesão cerebral traumática experimental (KLEINDIENST; BULLOCK, 2006).

Em relação à GFAP, não ocorreram alterações significativas, pois sendo uma proteína presente no citoesqueleto do astrócito, este dado indicou que o astrócito não sofreu alterações na sua morfologia (ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000). Se ocorresse o aumento de GFAP no tecido indicaria astrogliose, evento neuroquímico muitas vezes associado com condições de lesão cerebral (O'CALLAGHAN; SRIRAM, 2005). No entanto, o significado de aumento da GFAP em tecido cerebral ou cultura de células ainda é discutível quando não observado com outros parâmetros de atividade, como transportador de glutamato, conteúdo de glutatona e secreção de citocina, tornando seu valor preditivo menos útil (LIBERTO et al., 2004).

No artigo (Cap. 2), também não foi observado efeito imediato no marcador astrociário, GFAP, no hipocampo, resultado semelhante do que ocorreu no córtex cerebral. Em relação à S100B também ocorreu resultado semelhante, como a diminuição da proteína no hipocampo dos animais que receberam a eletroterapia e o aumento da mesma no LCR. E um dado novo em relação a atividade astrocitária, foi observado aumento da atividade da GS nos animais submetidos à ETCC, reforçando a ideia do envolvimento dos astrócitos na neuroproteção e alívio da dor e do efeito da ETCC sobre os mesmos (AUVICHAYAPAT et al., 2019). As interações glia-neurônios são conhecidas por estarem envolvidas em mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de doenças crônicas, dor de origem inflamatória e neuropática (TSUBOI et al., 2011).

Os astrócitos estão envolvidos na manutenção normal da homeostase cerebral, incluindo diversas funções dependentes de energia necessárias para a atividade neuronal normal, por exemplo, regulação extracelular de K⁺, pH e osmolalidade; exportação de intermediários metabólicos; rápida captação de neurotransmissores (PORTELA et al., 2002);

sendo o principal responsável pela manutenção das concentrações extracelulares de glutamato abaixo de seus níveis neurotóxicos (ZHOU; DANBOLT, 2014). Os astrócitos também formam uma barreira estrutural em torno das sinapses, isolando o transbordamento de glutamato, como citado anteriormente e ao mesmo tempo fornecendo suporte metabólico (JI; DONNELLY; NEDERGAARD, 2019). De fato, os astrócitos desempenham um papel importante no controle da formação, maturação, eliminação e manutenção de sinapses e suporte da função sináptica através de uma variedade de sinais difundidos e mediados por contato (JI; DONNELLY; NEDERGAARD, 2019).

Os astrócitos regulam a função neuronal e remodelação de estruturas sinápticas e estão envolvidos em inúmeras doenças, como a dor crônica (PEREIRA; GOUDET, 2019). Estas células gliais podem regular a transmissão sináptica nociceptiva por meio de interações neuronais-gliais e células gliais-gliais, bem como o envolvimento da medula espinal e supraespinal na modulação da sinalização da dor e na manutenção da dor neuropática (JI; DONNELLY; NEDERGAARD, 2019), também os mesmos autores citados anteriormente, relataram nos seus estudos que os astrócitos podem modular respostas nociceptivas em condições onde se tem homeostase ou em condições patológicas. Várias evidências científicas, configuram o papel dos astrócitos na patogênese da dor e que há uma correlação entre a hipertrofia dos astrócitos no corno dorsal da medula espinal e hipersensibilidade à dor após lesão nervosa periférica em camundongos e ratos (CHIANG; SESSLE; DOSTROVSKY, 2012)

A microglia age como macrófagos residentes, que funcionam como sentinelas do SNC, fazendo o levantamento de possíveis danos (PEREIRA; GOUDET, 2019). Após a lesão nervosa instituída, a microglia envolve os terminais nervosos periféricos lesados, onde liberam diferentes fatores, fator derivado do cérebro (BDNF), citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e glutamato, que irão contribuir para a neuroinflamação, excitocidade e sensibilização central (PEREIRA; GOUDET, 2019). Patologias no SNC, entre elas a dor neuropática, geralmente envolvem astrogliose reativa, um processo pelo qual os astrócitos sofrem uma mudança na morfologia e função (TANG; BAIR; DESCALZI, 2021).

Além de seu papel na sinalização inflamatória, os astrócitos podem detectar a atividade neuronal através de uma variedade de membranas e receptores, induzindo a respostas intracelulares de Ca²⁺ (COVELO; ARAQUE, 2018), e posterior liberação de substâncias neuromoduladoras, conhecidas como gliotransmissores (GIOVANNONI;

QUINTANA, 2020), estes incluem glutamato, GABA e ATP, que se ligam a uma variedade de receptores neuronais pré e pós-sinápticos e influencia na transmissão sináptica (JI; DONNELLY; NEDERGAARD, 2019). A gliotransmissão na dor crônica é aumentada em astrócitos reativos e modulada por mediadores inflamatórios (INOUE; TSUDA, 2018).

Os neurotransmissores GABA e glutamato parecem estar envolvidos nos mecanismos de ação do ETCC (TYNAN et al., 2013) e, da mesma maneira, a serotonina, noradrenalina, dopamina e acetilcolina, podem resultar do efeito modulatório da ETCC no córtex (NITSCHKE et al., 2009). Sabe-se que as medicações de ação central, especialmente os anticonvulsivantes, ao modular a ação destes neurotransmissores, conseqüentemente, influenciam a excitabilidade cortical na dependência de qual estímulo está sendo oferecido ao córtex - anódico ou catódico (MCLAREN; NISSIM; WOODS, 2018).

Existem diversos trabalhos mostrando que S100B extracelular, em concentrações nanomolares, protege neurônios hipocámpais do dano excitotóxico induzido pelo glutamato (AHLEMEYER et al., 2000; KÖGEL et al., 2004). A liberação de S100B no LCR pode estar relacionada ao mecanismo de captação de glutamato, visto que os resultados mostraram uma diminuição de captação de glutamato em fatias de hipocampo dos animais submetidos a ETCC (TRAMONTINA et al., 2006). Segundo Greenspan et al., (2007), os efeitos tardios da ETCC envolvem o sistema GABAérgico, que mostrou uma redução da concentração de GABA após a estimulação elétrica. Esta redução está relacionada com o aumento da plasticidade glutamatérgica. A investigação da modulação glutamatérgica no modelo experimental de ETCC poderia potencialmente ampliar os conhecimentos em neuromodulação.

Quando medido os transportadores de glutamato, GLAST e GLT-1 não ocorreu diferença significativa, sendo contrário aos dados descritos por Fukamachi et al. (2001), que demonstraram uma relação entre o aumento de GLAST em alguns astrócitos com características apoptóticas e neurônios piramidais atrofiados.

Os resultados em relação a GSH, mostraram que o tripeptídeo foi capaz de induzir um aumento na secreção de S100B no grupo sham. A GSH tem atividade extracelular sobre alguns canais iônicos e receptores acoplados a proteína G (WANG et al., 2010). Isto poderia estar modulando diretamente ou indiretamente a secreção de S100B em animais que não foram submetidos a estimulação elétrica, ou sugerir, que a ETCC possui efeito neuroprotetor por estar evitando a secreção do peptídeo. Segundo Dringen, 1999, o cérebro é bastante

sensível à alteração da homeostasia da GSH. Disfunções do sistema nervoso estão relacionadas com erros inatos do metabolismo da GSH. Duas hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar a sensibilidade das células cerebrais às oscilações dos níveis de GSH. A primeira baseia-se no fato deste órgão consumir altas concentrações de oxigênio. A segunda baseia-se no fato da GSH poder funcionar como neuromodulador ou neurotransmissor, sendo assim essencial para a atividade do SNC.

Outros estudos relatam que a diminuição dos níveis de GSH está envolvida na regulação tanto da via extrínseca como intrínseca da sinalização apoptótica das caspases em pontos de atuação e controle distintos. A GSH modula a permeabilidade membranar e a ativação de caspases predispondo a célula para a ocorrência de apoptose (GUO et al., 2018).

O glutamato, além de ser o neurotransmissor excitatório mais abundante do SNC e influenciar as células gliais, também possui um papel significativo nos processos nociceptivos, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da dor causada por inflamação ou lesão nervosa (WOZNIAK et al., 2012; ZUNHAMMER et al., 2016). O glutamato e seus receptores desempenharam um papel importante na percepção e integração de sinais nociceptivos e em sua transmissão aos centros supra-espinais, sendo mais um motivo da realização de captação de glutamato neste trabalho (WOZNIAK et al., 2012). A ativação sistêmica de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs), possuem efeitos benéficos em vários modelos de dor (BALÁZS; BRIDGES; COTMAN, 2010), esses receptores, são amplamente expressos em neurônios, astrócitos, olidendrócitos e microglia em todas as áreas do cérebro que estão envolvidas no processamento da dor (PEREIRA; GOUDET, 2019).

O glutamato é liberado periféricamente, centralmente e na medula espinal em resposta à estimulação nociceptiva e lesão tecidual ou nervosa (KANGRGA; RANDI, 2008; SLUKA; WILLIS, 1998). Da mesma forma, inflamação articular crônica ou lesão nervosa são capazes de induzir a liberação de glutamato no LCR (KLAMT, 1998; OMOTE et al., 1998) e estimulação elétrica de fibras aferentes induzem a liberação do neurotransmissor excitatório na medula espinal, enquanto a inibição espinal da liberação de glutamato em roedores atenua a hiperalgesia após a estimulação nociva, inflamação ou lesão (KLAMT, 1998). Peek et al., 2020, reforçam que a quantificação de GABA e glutamato são importantes para contribuir no aumento de informações sobre pesquisa em biomarcadores para dor.

Todos os dados levantados durante este trabalho pretendem levar a um objetivo maior, que será a utilização da ETCC em humanos para minimizar processos com segurança

e eficácia, como mostram as pesquisas citadas abaixo.

A ETCC anódica provoca a despolarização da membrana neuronal contribuindo o disparo de potenciais de ação, enquanto a catódica tem efeito contrário, em função da hiperpolarização da membrana neuronal. Enquanto a anódica aumenta a excitabilidade cortical e a catódica diminui, e é essa mudança na excitabilidade cortical que fará com que se realize a modulação da dor (NITSCHE et al., 2003b). A ETCC influencia vários tecidos diferentes (vasos, tecido conjuntivo) e mecanismos fisiopatológicos (em inflamação, migração celular, motilidade vascular); além disso, os seus efeitos são observados em várias estruturas celulares (citoesqueleto, mitocôndria, membrana) (BRUNONI et al., 2012).

Uma revisão sistemática e metanálise sobre a eficácia da ETCC na fibromialgia, mostrou uma melhora da dor e da função geral relacionada à fibromialgia quando aplicada ETCC anodal sobre o córtex motor primário (M1) (ZHUO, 2008). Outra revisão sistemática com metanálise de 2020 corroborou com o estudo anterior, avaliando a eficácia da ETCC no tratamento da dor em fibromialgia. Quatorze ensaios clínicos foram incluídos e dez eram ensaios controlados. A metanálise de oito ensaios controlados forneceu evidências experimentais de redução da dor quando a ETCC é administrada em comparação com a simulação (FREGNI et al., 2018).

Os locais de estimulação mais utilizados para pacientes com cefaléia, são o córtex motor primário (M1) e o córtex pré-frontal dorsolateral (CPFDL), ambos resultando em benefícios físicos e comportamentais nesses pacientes (ZHOU et al., 2011). O córtex motor tem projeções para alguns núcleos talâmicos e a sua modulação tem papel crítico com a patofisiologia de dores crônicas (FREGNI et al., 2005). Estudos de imagem têm demonstrado que a estimulação do córtex motor aumenta a conectividade funcional e o fluxo cerebral tanto em regiões sob os eletrodos como em regiões cerebrais mais profundas como o tálamo ventrolateral e medial, ínsula, córtex orbitofrontal, giro cingulado e tronco cerebral superior; estruturas estas que estão envolvidas com aspectos emocionais da dor, participando da “neuromatrix da dor” (REDDI; CURRAN, 2014). Assim, a regulação do córtex motor primário pode modular a dor através de efeitos indiretos em áreas cerebrais envolvidas na percepção da dor (CHA et al., 2017).

Fregni et al., 2018, demonstraram o efeito profilático do ETCC no estabelecimento de hiperalgesia e alodinia induzida por estresse crônico, e os mesmos autores, realizaram estudos clínicos utilizando uma única sessão de ETCC sobre a área motora esquerda mostram

que esta reduz significativamente a dor neuropática associada à lesão da medula espinal.

Com o desenvolvimento e maior disponibilidade das técnicas de neuroestimulação não-invasiva, esses pacientes poderão ter mais uma oportunidade de tratamento clínico, antes da indicação de qualquer tratamento cirúrgico, utilizar técnicas não invasivas de eletroestimulação.

CONCLUSÃO

Sendo o tratamento da dor neuropática um dos maiores desafios na área da saúde, novos achados terapêuticos, como a ETCC, têm se mostrado promissores em seus estudos sobre eficácia deste tratamento anteriormente à injúrias cirúrgicas devido à neuromodulação causada pelo ETCC, o que leva à prevenção de dores neuropáticas.

Nos testes comportamentais, a alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica observamos aumento no limiar nociceptivo após a aplicação da ETCC. A alodinia e hiperalgesia dependem da ativação do receptor NMDA, um subtipo específico do receptor ionotrópico do glutamato, e os astrócitos podem regular a ativação deste receptor, através da sua liberação específica de um co-agonista do receptor NMDA (ZUNHAMMER et al., 2016).

Nos ensaios bioquímicos, ocorreu diminuição da concentração da proteína S100B no córtex cerebral total e no hipocampo e não aconteceram mudanças significativas na GFAP em ambas estruturas neuronais, concluindo que pode estar acontecendo atividade astrogial. Já no LCR, aumentou a secreção de S100B. A captação de glutamato foi aumentada, bem como a atividade da GS e a diminuição da GSH, concluindo que pode estar ocorrendo um processo de neuroproteção, mediada por astrócitos e induzida pela ETCC. Em relação aos parâmetros inflamatórios, dosou-se a interleucina TNF- α , no córtex cerebral total e no hipocampo, apresentando aumento da sua concentração em animais sham, indicando uma possível ação anti-inflamatória da ETCC.

Concluindo que, os objetivos destes trabalhos foram atingidos e permitiram ampliar o conhecimento de métodos alternativos no tratamento preventivo da dor neuropática. Os dados contribuiriam no desenvolvimento relevante de pesquisas multidisciplinares com uma temática de grande impacto social, nas áreas de fisiologia, farmacologia, dor, neuromodulação e terapêutica. Além disto, estes experimentos contribuíram para iniciarmos o conhecimento da ação da ETCC sobre os astrócitos. Associado com os resultados já obtidos e descritos na tabela 1, em anexo, a busca de marcadores relacionados aos mecanismos implicados no processo fisiopatogênico e terapêutico que envolve a dor crônica e sua terapêutica, se faz necessário ampliar o conhecimento para minizar os danos e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. E por fim, desenvolver um equipamento seguro e eficaz o mais breve possível que poderá ser utilizado em seres humanos, para prevenir ou minimizar dores de origem odontogênica e/ou de outros sistemas fisiológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBADIE, C. et al. Chemokines and pain mechanisms. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 125–134, 2009.
- ADACHI, K. et al. Motor cortex neuroplasticity associated with lingual nerve injury in rats. **Somatosensory & Motor Research**, v. 24, n. 3, p. 97–109, 2007.
- ADAMI, C. et al. S100B expression in and effects on microglia. **Glia**, v. 33, n. 2, p. 131–142, 2001.
- AGUIAR, D. P. et al. Prevalence of chronic pain in Brazil: systematic review. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 4, n. 3, p. 257–267, 2021.
- AGULHON, C.; FIACCO, T. A.; MCCARTHY, K. D. Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling. **Science**, v. 327, n. 5970, p. 1250–1254, 2010.
- AHLEMEYER, B. et al. S-100 β protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. **Brain Research**, v. 858, n. 1, p. 121–128, 2000.
- AIDA, S. et al. The Effectiveness of Preemptive Analgesia Varies According to the Type of Surgery: A Randomized, Double-Blind Study. **Anesthesia & Analgesia**, v. 89, n. 3, p. 711, set. 1999.
- ALBARRACÍN, ONIA L. Efeitos do Glutamato no Cérebro. **Umami e Glutamato: Aspectos Químicos, Biológicos e Tecnológicos**, p. 225–258, 2022.
- ALLEN, S. et al. A kinetic microassay for glutathione in cells plated on 96-well microtiter plates. **Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology**, v. 22, n. 4, p. 305–12, 2000.
- ALONZO, A. et al. Daily transcranial direct current stimulation (tDCS) leads to greater increases in cortical excitability than second daily transcranial direct current stimulation. **Brain stimulation**, v. 5, n. 3, p. 208–213, jul. 2012.
- ALOTAIBI, G.; RAHMAN, S. Effects of glial glutamate transporter activator in formalin-induced pain behaviour in mice. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 23, n. 4, p. 765–783, 2019.
- ANLAUF, E.; DEROUICHE, A. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. October, p. 1–5, 2013.
- ARSLAN, N.; ERDUR, B.; AYDIN, A. Hormones and cytokines in childhood obesity. **Indian pediatrics**, v. 47, n. 10, p. 829–39, out. 2010.
- ASEMOTA, A. O. et al. Causes and Trends in Traumatic Brain Injury for United States Adolescents. **Journal of Neurotrauma**, v. 30, n. 2, p. 67–75, 15 jan. 2013.
- AUVICHAYAPAT, P. et al. The effects of transcranial direct current stimulation on metabolite changes at the thalamus in neuropathic pain after spinal cord injury: A pilot study. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 102, n. 1, p. 71–77, 2019.
- AVIVI-ARBER, L. et al. Face sensorimotor cortex and its neuroplasticity related to orofacial sensorimotor functions. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 12, p. 1440–1465, 2011.
- BAHR-HOSSEINI, M.; BIKSON, M. Neurovascular-modulation: A review of primary vascular responses to transcranial electrical stimulation as a mechanism of action. **Brain Stimulation**, v. 14, n. 4, p. 837–847, 2021.
- BALÁZS, R.; BRIDGES, R. J.; COTMAN, C. W. **Metabotropic Glutamate Receptors**. [s.l: s.n.].
- BEART, P. M.; O'SHEA, R. D. Transporters for L-glutamate: An update on their molecular pharmacology and pathological involvement. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 1, p. 5–17, 2007.

BIKSON, M. et al. Safety of Transcranial Direct Current Stimulation: Evidence Based Update 2016. **Brain Stimulation**, v. 9, n. 5, p. 641–661, set. 2016.

BLASKO, I. et al. How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer’s disease in old age: The role of microglia and astrocytes. **Aging Cell**, v. 3, n. 4, p. 169–176, 2004.

BREIVIK, H. et al. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. **European Journal of Pain**, v. 10, n. 4, p. 287–333, 2006.

BRUGUEROLLE, B.; LABRECQUE, G. Rhythmic pattern in pain and their chronotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 9–10, p. 883–895, 31 ago. 2007.

BRUNONI, A. et al. Clinical research with tDCS: Challenges and future directions. **Brain stimulation**, v. 5, n. 3, p. 175–195, 2012.

BUCHHOLD, B. et al. Environmental enrichment improves functional and neuropathological indices following stroke in young and aged rats. **Restorative neurology and neuroscience**, v. 25, n. 5–6, p. 467–84, 2007.

CALLAI, E. M. M. et al. Evaluation of the immediate effects of a single transcranial direct current stimulation session on astrocyte activation, inflammatory response, and pain threshold in naïve rats. **Behavioural Brain Research**, v. 428, n. February, p. 113880, 2022.

CANCEL, L. M. et al. Direct current stimulation modulates gene expression in isolated astrocytes with implications for glia-mediated plasticity. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2022.

CASTAGLIUOLO, I. et al. A neurotensin antagonist, SR 48692, inhibits colonic responses to immobilization stress in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 22, p. 12611–12615, 1996.

CHA, M. et al. Repetitive motor cortex stimulation reinforces the pain modulation circuits of peripheral neuropathic pain. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7986, 2017.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, jul. 1994.

CHIANG, C. Y. et al. Role of glia in orofacial pain. **Neuroscientist**, v. 17, n. 3, p. 303–320, 2011.

CHIANG, C. Y.; SESSLE, B. J.; DOSTROVSKY, J. O. Role of astrocytes in pain. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 11, p. 2419–2431, 2012.

CHO, C. et al. Experimental Research Article. v. 2017, n. 5, p. 401–406, 2018.

CICCARELLI, R. et al. Molecular Signalling Mediating the Protective Effect of A1 Adenosine and mGlu3 Metabotropic Glutamate Receptor Activation against Apoptosis by Oxygen/Glucose Deprivation in Cultured Astrocytes. **Molecular Pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 1369–1380, 1 fev. 2007.

CIOATO, S. G. et al. Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model. **Brain Stimulation**, v. 9, n. 2, p. 209–217, 2016.

COLLOCA, L. et al. Placebo analgesia : Psychological and neurobiological mechanisms. **Pain**, v. 154, n. 4, p. 511–514, 2013.

COSTA, D. C. A.; SILVA, L. R. DOS S.; COERTJENS, M. Mecanismos e funções da proteína S100B durante a hipóxia: Uma revisão de literatura. **Revista Neurociências**, v. 21, n. 3, p. 408–419, 2013.

COVELO, A.; ARAQUE, A. Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. **eLife**, v. 7, p. 1–19, 2018.

CRESPO, A. R. T. P. et al. Increased serum sFas and TNF α following isolated severe head injury in males. **Brain Injury**, v. 21, n. 4, p. 441–447, 3 jan. 2007.

CRUZAT, V. F.; PETRY, É. R.; TIRAPEGUI, J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.

15, n. 5, p. 392–397, 2009.

DIERING, G. H. Sleep on it. **Science**, v. 358, n. 6362, p. 457.2-457, 2017.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, n. 6, p. 540–551, 2003.

DONATO, R. et al. S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, v. 2010, 2010.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain: Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 4912–4916, 2000.

ENG, L. F. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 8, n. C, p. 203–214, 1985.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochemical research**, v. 25, n. 9–10, p. 1439–51, out. 2000.

ERIKSEN, J. L.; DRUSE, M. J. Astrocyte-mediated trophic support of developing serotonin neurons: Effects of ethanol, buspirone, and S100B. **Developmental Brain Research**, v. 131, n. 1–2, p. 9–15, 2001.

ETTINGER, R. L.; MULLIGAN, R. The future of dental care for the elderly population. **Journal of the California Dental Association**, v. 27, n. 9, p. 687–92, set. 1999.

FAIRMAN, W. A. et al. **An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel** *Nature*, 1995.

FERTONANI, A. et al. Naming facilitation induced by transcranial direct current stimulation. **Behavioural brain research**, v. 208, n. 2, p. 311–8, 2 abr. 2010.

FILHO, P. R. M. et al. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 44–51, 2016.

FREGNI, F. et al. Transcranial direct current stimulation. **British Journal of Psychiatry**, v. 186, n. 05, p. 446–447, 2 maio 2005.

FREGNI, F. et al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 12, p. 3988–3998, 2006a.

FREGNI, F. et al. A controlled clinical trial of cathodal DC polarization in patients with refractory epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. 2, p. 335–342, 2006b.

FREGNI, F. et al. Transcranial direct current stimulation (tDCS) prevents chronic stress-induced hyperalgesia in rats. **Brain Stimulation**, v. 11, n. 2, p. 299–301, mar. 2018.

GIOVANNONI, F.; QUINTANA, F. J. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 9, p. 805–819, 2020.

GONALVES, C. A.; LEITE, M. C.; GUERRA, M. C. Adipocytes as an important source of serum S100B and possible roles of this protein in adipose tissue. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, v. 2010, 2010.

GONÇALVES, C.-A.; CONCLI LEITE, M.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 10–11, p. 755–763, 1 jul. 2008.

GONÇALVES, C. et al. Glycolysis-Derived Compounds From Astrocytes That Modulate Synaptic Communication. **Front Neurosci.**, v. 12, n. January, p. 1–17, 2019.

GONEN, O. M. et al. Resting-state functional connectivity and quantitation of glutamate and GABA of the PCC/precuneus by magnetic resonance spectroscopy at 7T in healthy individuals. **PLoS ONE**, v. 15, n. 12 December, p. 1–13, 2020.

GREENWALD, J. D.; SHAFRITZ, K. M. An Integrative Neuroscience Framework for the

Treatment of Chronic Pain: From Cellular Alterations to Behavior. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 12, n. May, p. 1–16, 2018.

GREGHI, S. L. A. Avaliação quantitativa das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 e do TGF- β , presentes na saliva de pacientes com periodontite, antes e após a submissão à psicoterapia: análise comparativa com pacientes controles. p. 214, 2011.

GUO, D. et al. Orientin and neuropathic pain in rats with spinal nerve ligation. **International Immunopharmacology**, v. 58, n. December 2017, p. 72–79, 2018.

GUO, T. et al. 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, n. January, 2020.

GUREJE, O. et al. Defining Disability in Psychosis: Performance of the Diagnostic Interview for Psychosis-Disability Module (DIP-DIS) in the Australian National Survey of Psychotic Disorders. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 846–851, 17 dez. 2001.

HAUWEL, M. et al. Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: The role of microglia, astrocytes, “protective” glial stem cells and stromal ependymal cells. **Brain Research Reviews**, v. 48, n. 2, p. 220–233, 2005.

HEBERT, M. A.; SEROVA, L. I.; SABBAN, E. L. Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, n. 2, p. 484–498, 2005.

HERRERA-MELENDEZ, A. L.; BAJBOUJ, M.; AUST, S. Application of Transcranial Direct Current Stimulation in Psychiatry. **Neuropsychobiology**, v. 79, n. 6, p. 372–383, 2020.

HINKLE, D. A. et al. GFAP and S100beta expression in the cortex and hippocampus in response to mild cortical contusion. **Journal of neurotrauma**, v. 14, n. 10, p. 729–738, 1997.

HINRICHS-ROCKER, A. et al. Psychosocial predictors and correlates for chronic post-surgical pain (CPSP) - A systematic review. **European Journal of Pain**, v. 13, n. 7, p. 719–730, ago. 2009.

INGEBRIGTSEN, T. et al. Traumatic brain damage in minor head injury: Relation of serum S-100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioral outcome. **Neurosurgery**, v. 45, n. 3, p. 468–476, 1999.

INOUE, K.; TSUDA, M. Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 138–152, 2018.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, n. 3, p. 285–316, 1997.

JACKSON, M. P. et al. Toward comprehensive tDCS safety standards. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 66, p. 413, nov. 2017.

JANIGRO, D. et al. GFAP and S100B: What You Always Wanted to Know and Never Dared to Ask. **Frontiers in Neurology**, v. 13, n. March, p. 6–8, 2022.

JESSEN, K. R. Glial cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 10, p. 1861–1867, 2004.

JL, R.-R. et al. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 12, p. 696–705, dez. 2003.

JL, R. R.; DONNELLY, C. R.; NEDERGAARD, M. Astrocytes in chronic pain and itch. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 667–685, 2019.

JIMENEZ-TORRES, G. J. et al. A study protocol for a single-blind, randomized controlled trial of adjunctive transcranial direct current stimulation (tDCS) for chronic pain among patients receiving specialized, inpatient multimodal pain management. 2017.

JOHNSON, M.; COLLETT, B.; CASTRO-LOPES, J. M. The challenges of pain management

in primary care: a pan-European survey On behalf of OPENMinds Primary Care. **Journal of Pain Research**, v. 6, n. 0, p. 393–401, 2013.

KANGRGA, I.; RANDI, M. horn in vitro by activation of low- and high-threshold primary afferent. v. 553, n. 1991, p. 347–352, 2008.

KIM, M. S. et al. Repeated anodal transcranial direct current stimulation induces neural plasticity-associated gene expression in the rat cortex and hippocampus. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 35, n. 2, p. 137–146, 23 mar. 2017.

KLAMT, J. G. **Effects of intrathecally administered lamotrigine, a glutamate release inhibitor, on short- and long-term models of hyperalgesia in rats** *Anesthesiology*, 1998.

KLEINDIENST, A.; BULLOCK, M. R. A Critical Analysis of the Role of the Neurotrophic Protein S100B in Acute Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 23, n. 8, p. 1185–1200, ago. 2006.

KÖGEL, D. et al. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. **Neuroscience**, v. 127, n. 4, p. 913–920, 2004.

KRNJEVIC, K. Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid in Brain. **Nature**, v. 228, p. 119–124, 1970.

KRUGER, L.; LIGHT, A. R. **Translational pain research : from mouse to man**. [s.l.] CRC Press/Taylor & Francis, 2010.

KYRANOU, M.; PUNTILLO, K. The transition from acute to chronic pain: might intensive care unit patients be at risk? **Annals of intensive care**, v. 2, 2012.

LANG, N. et al. How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? Europe PMC Funders Group. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 2, p. 495–504, 2005.

LASTE, G. et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. **Experimental Brain Research**, v. 221, n. 1, p. 75–83, 3 ago. 2012.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 9, p. 895–926, set. 2009a.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 9, p. 895–926, set. 2009b.

LEFAUCHEUR, J.-P.; BOËRIO, D.; CRÉANGE, A. [Nerve conduction blocks and peripheral neuropathies]. **Journal de la Societe de biologie**, v. 200, n. 4, p. 307–21, 2006.

LEFFA, D. T. et al. 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, n. 4, p. 743–751, 2018.

LEITE, M. C. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93–99, 2008.

LIBERTO, C. M. et al. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. **Journal of neurochemistry**, v. 89, n. 5, p. 1092–100, jun. 2004.

LITCHER-KELLY, L. et al. A Systematic Review of Measures Used to Assess Chronic Musculoskeletal Pain in Clinical and Randomized Controlled Clinical Trials. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 12, p. 906–913, dez. 2007.

LIU, M. G.; CHEN, J. Roles of the hippocampal formation in pain information processing. **Neuroscience Bulletin**, v. 25, n. 5, p. 237–266, 2009.

LUO, Y. et al. Transcranial Direct Current Stimulation Alleviates Neurovascular Unit Dysfunction in Mice With Preclinical Alzheimer’s Disease. **Frontiers in Aging**

Neuroscience, v. 14, n. April, p. 1–19, 2022.

MACHADO, A. G. et al. Cerebral Stimulation for the Affective Component of Neuropathic Pain. **Neuromodulation: Technology at the Neural Interface**, v. 16, n. 6, p. 514–518, nov. 2013.

MCDONALD, J. W.; JOHNSTON, M. V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. **Brain Research Reviews**, v. 15, n. 1, p. 41–70, 1990.

MCLAREN, M. E.; NISSIM, N. R.; WOODS, A. J. The effects of medication use in transcranial direct current stimulation: A brief review. **Brain Stimulation**, v. 11, n. 1, p. 52–58, 2018.

MEDEIROS, L. F. et al. Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: A review. **Frontiers in Psychiatry**, v. 3, n. DEC, p. 1–11, 2012.

MENDONÇA, M. E. et al. Transcranial DC Stimulation in Fibromyalgia: Optimized Cortical Target Supported by High-Resolution Computational Models. **The Journal of Pain**, v. 12, n. 5, p. 610–617, maio 2011.

MINET, R. et al. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 268, n. 1–2, p. 121–32, 1997.

MIYOSHI, K. et al. Interleukin-18-Mediated Microglia/Astrocyte Interaction in the Spinal Cord Enhances Neuropathic Pain Processing after Nerve Injury. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 48, p. 12775–12787, 26 nov. 2008.

MONAI, H. et al. Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–10, 2016.

MONAI, H.; HIRASE, H. Astrocytes as a target of transcranial direct current stimulation (tDCS) to treat depression. **Neuroscience Research**, v. 126, p. 15–21, jan. 2018.

MORLION, B. et al. Pain chronification: what should a non-pain medicine specialist know? **Current Medical Research and Opinion**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2018.

NAOMI, L. et al. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. p. 1377–1389, 2015.

NGERNYAM, N.; JENSEN, M. P. Transcranial Direct Current Stimulation in Neuropathic Pain. **Journal of Pain & Relief**, v. s3, p. 1–13, 2014.

NITSCHKE, M. A. et al. Safety criteria for transcranial direct current stimulation (tDCS) in humans. **Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, v. 114, n. 11, p. 2220–2; author reply 2222–3, nov. 2003a.

NITSCHKE, M. A. et al. Pharmacological Modulation of Cortical Excitability Shifts Induced by Transcranial Direct Current Stimulation in Humans. **The Journal of Physiology**, v. 553, n. 1, p. 293–301, nov. 2003b.

NITSCHKE, M. A. et al. **Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008** **Brain Stimulation**, 2008. Disponível em: <www.brainstimjrnl.com>. Acesso em: 25 mar. 2019

NITSCHKE, M. A. et al. Serotonin Affects Transcranial Direct Current-Induced Neuroplasticity in Humans. **Biological Psychiatry**, v. 66, n. 5, p. 503–508, 2009.

O'CALLAGHAN, J. P.; SRIRAM, K. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. **Expert opinion on drug safety**, v. 4, n. 3, p. 433–42, 10 maio 2005.

OLIVEIRA, C. O. DE; IKUTA, N.; REGNER, A. Biomarcadores prognósticos no traumatismo crânio-encefálico grave. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, n. 4, p. 411–421, 2008.

OMOTE, K. et al. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Research**, v. 787, n. 1, p. 161–164, 1998.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 581–618, 1998.

PAUKERT, M. et al. Norepinephrine Controls Astroglial Responsiveness to Local Circuit Activity. **Neuron**, v. 82, n. 6, p. 1263–1270, jun. 2014.

PELLERIN, L. Classical Neuroenergetics : **Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 1, p. 59–72, 2005.

PELLETIER, S. J.; CICCETTI, F. Cellular and molecular mechanisms of action of transcranial direct current stimulation: Evidence from in vitro and in vivo models. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 2, p. 1–13, 2015.

PEREIRA, V.; GOUDET, C. Emerging trends in pain modulation by metabotropic glutamate receptors. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. January, 2019.

PERRY, T. L.; GODIN, D. V.; HANSEN, S. Parkinson's disease: A disorder due to nigral glutathione deficiency? **Neuroscience Letters**, v. 33, n. 3, p. 305–310, 13 dez. 1982.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346–356, 1977.

PETROFF, O. A. C. Book Review: GABA and Glutamate in the Human Brain. **The Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 562–573, 2002.

PHILLIPS, C. et al. Prioritising pain in policy making: The need for a whole systems perspective. **Health Policy**, v. 88, p. 166–175, 2008.

PORTELA, L. V. C. et al. The serum S100B concentration is age dependent. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 950–952, 2002.

PRIESTNALL, S. L. et al. No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. **Endocrine**, v. 9, n. May, p. 6, 2020.

RAFTERY, M. N. et al. The Economic Cost of Chronic Noncancer Pain in Ireland: Results From the PRIME Study, Part 2. **The Journal of Pain**, v. 13, p. 139–145, 2012.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020.

RAO, T. S.; LARIOSAWILLINGHAM, K. D.; YU, N. G. lutamate-dependent glutamine, aspartate and serine release from rat cortical glial cell cultures. **Brain Research**, v. 978, p. 213–222, 2003.

REDDI, D.; CURRAN, N. Chronic pain after surgery: pathophysiology, risk factors and prevention. **Postgraduate Medical Journal**, v. 90, n. 1062, p. 222–227, abr. 2014.

REGNER, G. G. et al. Preclinical to clinical translation of studies of transcranial direct-current stimulation in the treatment of epilepsy: A systematic review. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. MAR, 2018.

ROMERO-SANDOVAL, A. et al. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. v. 9, 2008.

ROTHERMUNDT, M. et al. S100B in brain damage and neurodegeneration. **Microscopy research and technique**, v. 60, n. 6, p. 614–632, 2003.

ROWBOTHAM, M. C.; FIELDS, H. L. The relationship of pain, allodynia and thermal sensation in post-herpetic neuralgia. **Brain : a journal of neurology**, v. 119 (Pt 2), n. 2, p. 347–54, abr. 1996.

RUGGIERO, R. N. et al. Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: Aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. **Medicina**, v. 44, n. 2, p. 127–140, 2011.

RUOHONEN, J.; KARHU, J. tDCS possibly stimulates glial cells. **Clinical Neurophysiology**, v. 123, n. 10, p. 2006–2009, out. 2012.

RUSCHEWEYH, R. et al. Pain Catastrophizing and Pain-related Emotions. **The Clinical Journal of Pain**, v. 27, n. 7, p. 578–586, set. 2011.

SAIDI, M.; FIROOZABADI, S. M. Glial cells have more important role in tDCS-induced brain activities rather than neurons. **Medical Hypotheses**, v. 153, n. January, p. 110615,

2021.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: Neurons, immune cells and glia. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1361–1368, 2007.

SHAO, Y.; MCCARTHY, K. D. Plasticity of astrocytes. **Glia**, v. 11, n. 2, p. 147–155, 1994.

SLUKA, K. A.; WILLIS, W. D. Increased spinal release of excitatory amino acids following intradermal injection of capsaicin is reduced by a protein kinase G inhibitor. **Brain Research**, v. 798, n. 1–2, p. 281–286, 1998.

SPEZIA ADACHI, L. N. et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. **Brain Research**, v. 1489, p. 17–26, 2012a.

SPEZIA ADACHI, L. N. et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. **Brain Research**, v. 1489, p. 17–26, dez. 2012b.

SPEZIA ADACHI, L. N. et al. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. **Experimental brain research**, v. 233, n. 5, p. 1377–89, 11 maio 2015.

STORCK, T. et al. Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 22, p. 10955–10959, 1992.

SUN, Y. et al. Direct current stimulation induces mGluR5-dependent neocortical plasticity. **Annals of Neurology**, v. 80, n. 2, p. 233–246, ago. 2016.

TAKEDA, I. et al. Controlled activation of cortical astrocytes modulates neuropathic pain-like behaviour. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2022.

TANG, J.; BAIR, M.; DESCALZI, G. Reactive Astrocytes: Critical Players in the Development of Chronic Pain. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, n. May, p. 1–14, 2021.

THELIN, E. P. et al. Serial sampling of serum protein biomarkers for monitoring human traumatic brain injury dynamics: A systematic review. **Frontiers in Neurology**, v. 8, n. JUL, p. 1–23, 2017.

THOMAZI, A. P. et al. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: Sensitivity to guanosine. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, n. 7, p. 475–481, 2004.

THOMPSON, J. M.; NEUGEBAUER, V. Cortico-limbic pain mechanisms. **Neuroscience Letters**, v. 702, n. xxxx, p. 15–23, 2019.

THULIN, E.; KESVATERA, T.; LINSE, S. Molecular determinants of S100B oligomer formation. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e14768, 18 mar. 2011.

TRAMONTINA, F. et al. Glutamate Uptake Is Stimulated by Extracellular S100B in Hippocampal Astrocytes. v. 26, n. 1, p. 81–86, 2006.

TRAMONTINA, F. et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **J Neurosci Methods**, v. 162, n. 1–2, p. 282–286, 2007.

TREEDE, R.-D. et al. A classification of chronic pain for ICD-11. **PAIN**, p. 1, mar. 2015.

TSOPORIS, J. N.; MOHAMMADZADEH, F.; PARKER, T. G. Intracellular and Extracellular Effects of S100B in the Cardiovascular Response to Disease. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, v. 2010, p. 1–6, 2010.

TSUBOI, Y. et al. Modulation of astroglial glutamine synthetase activity affects nociceptive behaviour and central sensitization of medullary dorsal horn nociceptive neurons in a rat model of chronic pulpitis. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 2, p. 292–302, 2011.

TYNAN, R. J. et al. Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. **Acta Neuropathologica**, v. 126, n. 1, p. 75–91, 2013.

VALENTIM, L. M. Estudo Sobre O Papel Da Hsp27 Na Tolerância À Isquemia Cerebral Em

Um Modelo in Vivo E Em Culturas Organotípicas De Hipocampo De Ratos. **In Vivo**, 2002.

VALLEJO, R. et al. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain practice : the official journal of World Institute of Pain**, v. 10, n. 3, p. 167–84, 5 abr. 2010.

VOS, P. E. et al. GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: An observational cohort study. **Neurology**, v. 75, n. 20, p. 1786–1793, 2010.

WANG, Y. et al. Regulation of AMPA receptors in spinal nociception. p. 1–9, 2010.

WEI, H.; INAN, S. Dual effects of neuroprotection and neurotoxicity by general anesthetics: Role of intracellular calcium homeostasis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 47, p. 156–161, 2 dez. 2013.

WILHELMSSON, U. et al. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 46, p. 17513–17518, 2006.

WILLIAMS, A. C. DE C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **PAIN**, v. 157, n. 11, p. 2420–2423, nov. 2016.

WOZNIAK, K. M. et al. The Role of Glutamate Signaling in Pain Processes and its Regulation by GCP II Inhibition. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 1323–1334, 2012.

YU, X. et al. Intensity-dependent effects of repetitive anodal transcranial direct current stimulation on learning and memory in a rat model of Alzheimer’s disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 123, n. June, p. 168–178, 2015.

ZHOU, L. J. et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity by activation of spinal microglia in rat. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 2, p. 322–334, 2011.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 8, p. 799–817, 2014.

ZHUO, M. Cortical excitation and chronic pain. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 4, p. 199–207, 2008.

ZIMMER, D. B. et al. The S100 protein family: History, function, and expression. **Brain Research Bulletin**, v. 37, n. 4, p. 417–429, jan. 1995.

ZOREC, R. et al. Astroglial excitability and gliotransmission: An appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. **ASN Neuro**, v. 4, n. 2, p. 103–119, 2012.

ZUNHAMMER, M. et al. Combined glutamate and glutamine levels in pain-processing brain regions are associated with individual pain sensitivity. **Pain**, v. 157, n. 10, p. 2248–2256, 2016.

ANEXO 1

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos durante todos os experimentos.

Limiar de nociceção	Alteração
Mecânica	↑
Térmica	↑
Parâmetros astrogliais no córtex cerebral	
GFAP	~
S100B	↓
Parametros astrogliais no hipocampo	
GFAP	~
S100B	↓
Captação de glutamato	↑
Atividade da GS	↑
Conteúdo de GSH	↓
Parametros de dano/inflamação	
TNF- α (cortex cerebral)	↑
TNF- α (hipocampo)	↑
S100B (LCR)	↑

ANEXO 2

Carta de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37125

Título: Avaliação da modulação da Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) bimodal sobre astrogliose e neuroinflamação induzidos em modelo de dor neuropática trigeminal em ratos Wistar

Vigência: 01/06/2019 à 31/05/2023

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CARLOS ALBERTO SARAIVA GONCALVES - coordenador desde 01/06/2019
ALEXANDRE SILVA DE QUEVEDO - coordenador desde 01/06/2019
Lisandra Eda Fusinato Zin - Aluno de Doutorado desde 01/06/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 16/09/2019 - Plenarinho - Saguão Térreo do Prédio da Reitoria/ Campus Centro/ UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 233 ratos machos da colônia Wistar com 90 dias de idade provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 27 de Setembro de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética