

A estimulação elétrica do córtex insular posterior induz antinociceção opioide e canabinoide dependente e regula células da glia na medula espinal

Electrical stimulation of the posterior insular cortex induces opioid and cannabinoid-dependent antinociception and regulates glial cells in the spinal cord

Elizamara Santos Gonçalves¹, Heloísa Alonso Matielo¹, Manoel Jacobsen Teixeira², Daniel Ciampi de Andrade², Clement Hamani³, Camila Squarzoni Dale^{1,2}

DOI 10.5935/2595-0118.20220049-pt

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Metade dos pacientes com dor neuropática são refratários aos tratamentos. A estimulação elétrica do córtex insular (EECI) posterior modula circuitos sensoriais e nociceptivos. Assim, este estudo avaliou os efeitos de uma faixa de frequências de EECI como tratamento em modelo animal de dor neuropática.

MÉTODOS: Ratos machos, Sprague Dawley, 280-340 g, submetidos a cirurgia para indução de constrição crônica (ICC) do nervo isquiático direito, foram avaliados em relação à sensibilidade mecânica com a utilização do teste de pressão de pata e de filamentos de von Frey, e sensibilidade térmica usando o teste de placa quente. Os ratos foram submetidos a EECI de 10, 60 ou 100 Hz (uma, cinco ou sete EECI, 15 min, 210 μ s, 1V), aplicada ao córtex insular posterior esquerdo, e avaliados nos testes antes e após EECI, ou em *follow up* de 48, 72 e 168 horas. Por meio do teste de campo aberto, avaliou-se a atividade geral após a EECI5. O envolvimento de receptores opioides e cana-

binoides foi avaliado por meio da administração de naloxona e SR141716A - antagonista e agonista/antagonista inverso dos receptores, respectivamente - após a EECI 5, enquanto a ativação de astrócitos - marcada por proteína ácida fibrilar glial (GFAP), e de micróglia - marcada por IBA-1 - na medula espinal foi avaliada por imuno-histoquímica.

RESULTADOS: Os dados mostraram que EECI em 10, 60 e 100 Hz modulam

a sensibilidade mecânica e térmica dos animais. A EECI 5 aumentou a imunorreatividade de GFAP na medula espinhal, sem alterar IBA-1 (marcador glial). Naloxona e SR141716A revertiram a antinociceção produzida por EECI 5 de 60 Hz. EECI 7 de 60 Hz induziu antinociceção por até 72 horas.

CONCLUSÃO: A EECI 60 Hz produz antinociceção dependente de opioides e canabinoides e regula a glia.

Descritores: Dor crônica, Estimulação elétrica, Neuroglia.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Half of neuropathic pain patients still end up failing clinical treatments. Electrical stimulation of the posterior insular cortex (ESI) modulates sensory and nociceptive circuits. The study evaluated the effects of a range of frequencies of ESI proposed to improve neuropathic pain.

METHODS: Male Sprague Dawley rats, 280-340 g, submitted to the chronic constriction of the right sciatic nerve were tested for mechanical sensitivity using the paw pressure and von Frey filaments tests, and for thermal sensitivity using the hot plate test. The rats were submitted to ESI 10, 60 or 100 Hz (one, five or seven ESI, 15 min, 210 μ s, 1V), applied to the posterior insular cortex, and were evaluated in the tests before and after ESI, or in follow-up of 48, 72 and 168h. The open field evaluated general activity after ESI 5. The involvement of opioid and cannabinoid testes were evaluated through treatment with naloxone and SR1416A - antagonist and inverse agonist/antagonist of the receptors, respectively, after ESI 5, while activation of astrocytes, marked by glial fibrillary acid protein (GFAP), and of microglia, marked by IBA-1 (glial marker), in the spinal cord evaluated by immunohistochemistry.

RESULTS: Data demonstrate that 10, 60, and 100 Hz ESIs modulate mechanical and thermal sensitivity. ESI 5 increased

Elizamara Santos Gonçalves – <https://orcid.org/0000-0003-1722-7108>;
Heloísa Alonso Matielo – <https://orcid.org/0000-0002-3616-4192>;
Manoel Jacobsen Teixeira – <https://orcid.org/0000-0002-7974-6045>;
Daniel Ciampi de Andrade – <https://orcid.org/0000-0003-3411-632X>;
Clement Hamani – <https://orcid.org/0000-0002-7586-2487>;
Camila Squarzoni Dale – <https://orcid.org/0000-0002-3421-7799>.

1. Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Anatomia, São Paulo, SP, Brasil.
2. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Clínica Cirúrgica, São Paulo, SP, Brasil.
3. Universidade de Toronto, Centro Harquail para Neuromodulação, Toronto, ON, Canadá.

Apresentado em 14 de julho de 2022.

Aceito para publicação em 13 de setembro de 2022.

Conflito de interesses: não há – Fontes de fomento: Os autores receberam os seguintes financiamentos: ESG [Financiamento 2017/07411-7], HAM [Financiamento 2017/25399-4] e CSD [Financiamento 2015/17136-8], da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

DESTAQUES

- A EECI de 60 Hz foi o melhor protocolo analgésico para nossa estimulação insular.
- Os dados mostram um efeito analgésico prolongado de até 72h após repetidas EECI.
- A EECI regula a ativação da glia no sistema modulatório da dor.

Correspondência para:

Camila Squarzoni Dale

E-mail: camila.dale@usp.br

immunoreactivity of GFAP in the spinal cord, without altering IBA-1 (glial marker). Naloxone and SR141716A reversed the antinociception of 60 Hz ESI 5. 60 Hz ESI 7 induced antinociception up to 72h.

CONCLUSION: 60 Hz ESI induces opioid and cannabinoid-dependent antinociception and regulates glia.

Keywords: Chronic pain, Electric stimulation, Neuroglia.

INTRODUÇÃO

O córtex insular é um centro de matriz da dor¹ composto de subdivisões anteriores e posteriores que modulam tanto os aspectos sensoriais quanto emocionais da dor². Embora eficazes, os tratamentos farmacológicos muitas vezes não aliviam completamente os sintomas de dor em condições neuropáticas crônicas. Além disso, alguns desses tratamentos levam a eventos adversos e descontinuação do tratamento^{3,4}. Diferentes modalidades de estimulação elétrica invasiva e não invasiva visando a ínsula foram propostas, exercendo efeitos analgésicos ao influenciar funcionalmente tanto o córtex insular quanto as vias associadas^{5,6}. Estudos anteriores^{7,8} descreveram protocolos usando estimulação elétrica simples ou repetida de 60 Hz no córtex insular (EECI) para induzir antinociceção em ratos de laboratório com dor neuropática.

Projeções desde o córtex insular até as regiões ventrolateral e dorso-lateral da substância cinzenta periaquedutal (PAG) e as lâminas da medula espinhal relacionadas à dor^{9,10} foram propostas para modular a entrada nociceptiva. No corno dorsal, a sinalização opioidérgica e canabinoidérgica promove a antinociceção¹¹. Mudanças neuroplásticas nesta região têm sido relatadas em estados de dor crônica, nos quais processos gliais de astrócitos e icróglia contribuem para o desenvolvimento e a cronificação de eventos patológicos de dor^{12,13}. A ativação glial de astrócitos (ou seja, astrogliose reativa) e as respostas microgliais na via descendente da dor são consideradas um mecanismo precoce associado com a manutenção da dor neuropática crônica¹⁴⁻¹⁷.

A partir das referências citadas, a presente pesquisa levantou a hipótese de que diversos protocolos de EECI baseados em uma gama de frequências de estimulação – desde baixa frequência, 10 Hz; até alta frequência, 60 Hz e 100 Hz – resultam em diferentes eficiências no controle dos sintomas da dor neuropática, bem como são capazes de influenciar aspectos de suprema importância da sinalização modulatória da dor endógena e da ativação glial, que podem constituir poderosos alvos regulatórios para melhorar a eficácia da neuroestimulação e do tratamento da dor crônica do paciente. Isso é de importância substancial devido ao grande número de pacientes com dor crônica neuropática, enquanto nenhum tratamento atualmente disponível atinge 100% de eficácia total na produção de analgesia. O estudo utilizou a constrição crônica do nervo ciático (CCI), um modelo padrão na literatura para induzir dor neuropática, para avaliar os efeitos antinociceptivos mecânicos e térmicos de diferentes frequências de EECI repetidas e sua duração a longo prazo. Também foi investigado o envolvimento de receptores opioides e canabinoides tipo 1, além de seus efeitos sobre astrócitos e na ativação de icróglia na medula espinhal de ratos com dor neuropática.

MÉTODOS

Foram utilizados ratos Sprague Dawley machos (280-340 g) obtidos no Centro de Produção de Ratos (Instituto de Ciências Biomédicas - Rede de Biotérios da Universidade de São Paulo). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de São Paulo (CEUA N° 5874130618; N° 3447131117) e seguiu as diretrizes do Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais. Todos os protocolos foram conduzidos às cegas pelo mesmo pesquisador, com animais distribuídos aleatoriamente em grupos. Neste estudo, os ratos machos foram escolhidos como modelo animal principal devido ao uso frequente na literatura de neuromodulação, permitindo a reprodutibilidade de protocolos que suportaram a hipótese. Além disso, o uso de ratos machos pretendeu padronizar o melhor protocolo de tratamento de EECI baseado em frequências que resultaram em analgesia, excluindo diferenças nas respostas de dor que poderiam ser observadas de acordo com o ciclo estral do rato fêmea¹⁸. Este trabalho foi elaborado de acordo com as diretrizes ARRIVE¹⁹.

Projeto do experimento

Os animais foram habituados aos aparelhos (exceto para o campo aberto) um dia antes dos experimentos, para reduzir o estresse²⁰. As medições de base foram avaliadas antes de qualquer manipulação de animais. A sensibilidade mecânica foi medida usando os testes de pressão da pata e filamentos von Frey, e a sensibilidade térmica foi medida usando o teste de placa quente. Os animais foram submetidos à CCI na pata traseira direita. Sete dias depois, um eletrodo foi implantado na ínsula, como está melhor descrito na seção “Implantação de eletrodo e estimulação elétrica do córtex insular (EECI)” abaixo⁸.

Catorze dias após a CCI, os animais foram submetidos a uma única estimulação elétrica do córtex insular (EECI 1) ou a EECI repetida 5 vezes (EECI 5), realizadas com 10, 60 ou 100 Hz. Grupos de animais: (A) EECI 10 Hz (n = 8), (B) EECI 60 Hz (n = 8), (C) EECI 100 Hz (n = 5); e *Sham* (n = 4 a 5). O EECI 60 Hz (n=7) também foi dado por 7 dias (EECI 7). Foram realizadas avaliações comportamentais antes de qualquer manipulação (linha de base), antes (Pré) e depois (Pós) da EECI.

Naloxona ou SR141716A (grupos de animais: EECI+Sal n= 6; EECI+NLX n= 5; EECI+DMSO n= 4; EECI+ SR141716 n= 4) foram administrados antes da EECI 5 e os animais foram reavaliados no teste de pressão da pata 30 e 40 minutos depois, respectivamente. Para estudar a antinociceção de longa duração, os animais foram avaliados 48, 72 e 168 horas após a EECI 7 (Figura 1). Amostras fixas da medula espinhal foram coletadas após a EECI 5 para analisar a ativação de astrócitos marcada pela proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e a ativação microglial marcada pela IBA-1, usando ensaios de imuno-histoquímica. Os pesquisadores que realizaram todos os experimentos e cirurgias não tinham acesso ao valor da frequência de estimulação.

A figura 1 ilustra, em dias e em horas, após a EECI 7, a avaliação do comportamento, cirurgia CCI, implante de eletrodos, dias de estimulação com EECI e acompanhamento do comportamento de dor a partir do protocolo aplicado neste trabalho. Setas pretas: Estimulação com EECI; setas cinza escuro: avaliação do comportamento da

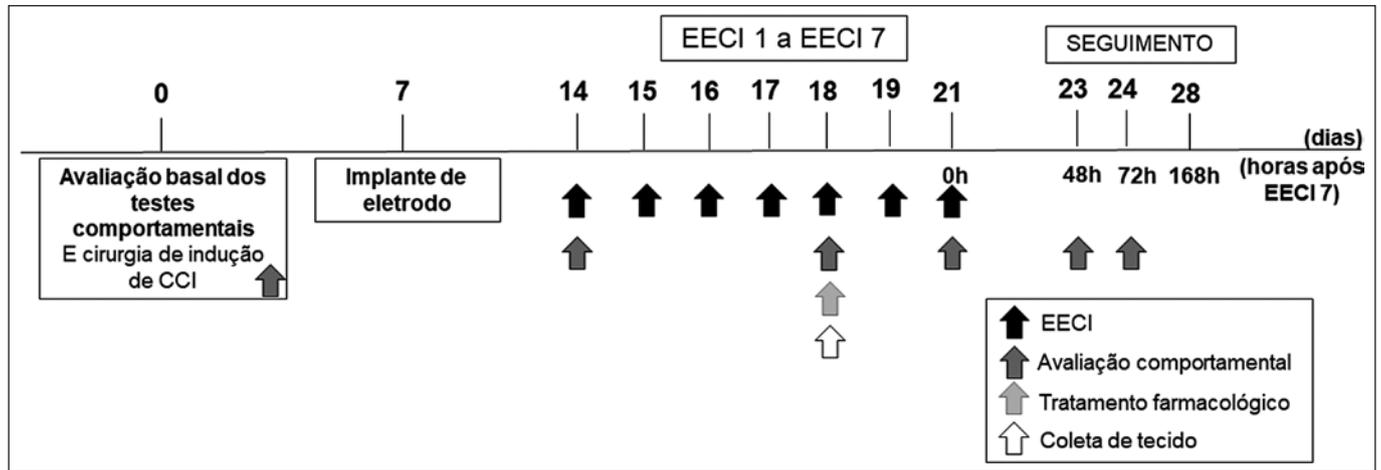


Figura 1. Projeto do experimento para EECI única e repetida

sensibilidade térmica e/ou mecânica e/ou atividade geral; setas cinza claro: tratamento farmacológico com naloxona ou SR141716; setas brancas: coleta de amostras fixas.

Lesão por constrição crônica (CCI)

As operações CCI foram realizadas de acordo com os autores²¹. Com aplicação de 2,5% de isoflurano (IsoforineTM, Cristália, São Paulo, SP, Brasil), quatro ligaduras foram amarradas frouxamente ao redor do nervo ciático direito com catgut cromado 5,0 (EthiconTM, Raritan, New Jersey, EUA). A incisão foi suturada com fio de seda 4.0 e os animais foram monitorados durante a recuperação pós-cirúrgica.

Implantação de eletrodos e estimulação elétrica do córtex insular (EECI)

Um eletrodo concêntrico (D039035408 Spes MedicaTM, Genova, GE, Itália) foi implantado na ínsula agranular posterior esquerda, como descrito anteriormente⁸. Os ratos receberam pré-anestesia com acepromazina (2,75 mg/kg, AcepramTM, Vetnil, Louveira, SP, Brasil) por via intraperitoneal, e anestesia com cloridrato de cetamina (82 mg/kg, DopalenTM, Paulínia, SP, Brasil, Sespo) via intraperitoneal, cloridrato de xilazina (7,5 mg/kg, AnasedanTM, Paulínia, SP, Brasil, Sespo) via intraperitoneal e anestesia local (3% cloridrato de mepivacaína, 100 µL/animal MEPISVTM, DFL, Taquara, RJ, Brasil).

O eletrodo foi colocado com -1,0 AP; +5,8 ML; -7,1 DV. As coordenadas de posicionamento do eletrodo foram as mesmas descritas anteriormente pelos autores⁷. Os ratos Sprague-Dawley foram baseados nas coordenadas do Atlas Cérebro de Ratos²². Como foi assumido que podem existir algumas variações mínimas entre as cirurgias, a colocação do eletrodo foi continuamente verificada através da seleção aleatória de animais implantados para analisar as partes com colocação do eletrodo.

O posicionamento no córtex insular foi observado em seções histológicas e verificado com uma lupa de microscópio estereoscópico (DI 724, DIGILAB) e as coordenadas foram comparadas, quanto ao posicionamento do bregma, com as coordenadas do Atlas Cerebral de Ratos²², com base em dados já publicados⁷. O grupo desta pesquisa utilizou, ainda, seções histológicas do córtex insular posterior esquerdo submetidas à coloração Nissl para

confirmar o posicionamento do eletrodo em comparação com as coordenadas do Atlas.

Os animais receberam trihidrato de amoxicilina (100 mg/kg subcutâneo, Agemoxi L.A., Agener UniãoTM, São Paulo, SP, Brasil) e foram monitorados por 7 dias. A EECI foi realizada em animais acordados, em movimento livre, com o Estimulador de Teste MedtronicTM Modelo 3625 (Dublim, Irlanda), através de cabos de conexão adaptados (10000NNHF3 Spes MedicaTM, Genova, GE, Itália)^{7,8}, de acordo com os seguintes parâmetros: uma, cinco ou sete sessões de EECI, 15 minutos por sessão, com 10, 60 ou 100 Hz, 210 µs, 1V. Os animais do grupo Sham tiveram eletrodos implantados mas não foram estimulados. Avaliações comportamentais foram realizadas logo após o término dos 15 minutos e com os animais ainda sob estimulação (Figura 1).

Avaliações comportamentais

Teste de pressão da pata

O teste foi realizado como descrito por Randall e Selitto (1957). Uma força com magnitude crescente (16 g/s) foi aplicada à pata traseira direita com um aparelho de pressão (InsightTM, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). A sensibilidade mecânica foi avaliada como a força necessária para induzir uma resposta de retirada.

Filamentos von Frey

Os animais foram colocados individualmente em pequenas caixas de acrílico com piso de malha e habituados ao teste no dia anterior à análise. A hipersensibilidade mecânica das punções foi avaliada pelos monofilamentos von Frey (Touch-TestTM Sensory Evaluators, North Coast Medical, Morgan Hill, CA, EUA), de acordo com o método descrito pelo autor^{23,24}. Nove monofilamentos de flexão com diferentes calibres (3,22, 3,61, 3,84, 4,08, 4,31, 4,56, 4,93, 5,18, 5,46) foram aplicados perpendicularmente à superfície plantar média da pata posterior direita. A retirada da pata, lambendo ou tremendo, foi considerada uma resposta positiva. O limite de 50% foi calculado usando a fórmula: $50\% (g) = 10 [xf + K.\delta]$, na qual xf é o calibre do filamento testado, K é o valor padrão para a sequência de seis respostas comportamentais, e δ é a medida das diferenças (em log) dos filamentos utilizados (0,28 para a sequência utilizada)²³.

Teste de placa quente

Para avaliar a sensibilidade térmica, foi utilizada uma placa metálica aquecida a uma temperatura constante (51,5 °C). A latência em segundos foi observada para uma resposta positiva, incluindo a retirada da pata, pulando, sacudindo ou lambendo a pata traseira. Foi usado um limite de exposição de 15 segundos para evitar lesões no tecido pela alta temperatura²⁴.

Teste de campo aberto

Para avaliar e confirmar ausência de efeito da EECI sobre a atividade geral após sessões de estimulação, os ratos foram colocados por três minutos em uma arena circular (95 cm de diâmetro x 45 cm de altura, com o piso dividido em quadrantes) e avaliados para locomoção (número total de entradas de quadrantes) e elevação (número total de posições bípedes). O teste foi realizado uma vez após a EECI 5.

Tratamentos farmacológicos

Naloxona (naloxone hydrochloride, cod:0599 Tocris Bioscience™, Bristol, Inglaterra, 2 mg/kg i.p. em solução fisiológica a 0,9%), um antagonista dos receptores opioides não específico, foi administrado 30 minutos antes do teste de pressão da pata. SR141716A (cloridrato de rimonabant/SR141716A, cod:0923 Tocris Bioscience™, Bristol, Inglaterra, 1 mg/kg i.p. em DMSO 80%), um agonista inverso/antagonista seletivo de receptores canabinoides tipo 1 foi administrado 40 minutos antes do teste 7. Os animais foram submetidos ao tratamento farmacológico e avaliação de comportamento após a EECI 5. A administração de fármacos foi realizada às cegas pelo pesquisador principal, que realizou os testes de comportamento, e os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos.

Ensaio imuno-histoquímico para GFAP e Iba-1 na medula espinhal

As amostras fixas da medula espinhal foram coletadas após perfusão transcardíaca (0,9% por 0,1 M PB mais formaldeído 4%) e cortadas em um micrótomo de congelamento (30 µm). As seções foram processadas como imuno-histoquímica livre flutuante: a) 3 lavagens de 10 minutos em 0,1 M PB; b) incubação noturna a 4° C sob agitação com GFAP (1:500; clone GA5 MAB360; Millipore™, Burlington, Massachusetts, EUA) ou Anti-Iba1/AIF-1 (1:500 MABN92, Millipore™, Burlington, Massachusetts, EUA); c) 3 lavagens de 10 minutos em 0,1M PB; d) incubado durante 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo biotilado cabra anti IgG de rato (1:200 Jackson Immuno Research Laboratories, INC.™, Bar Harbor, Maine, EUA.); e) incubação por 2 horas à temperatura ambiente com kit avidina-biotina (1:100) e 0,05% diaminobenzidina-0,01% peróxido de hidrogênio (Jackson Immuno Research Laboratories, INC.™, Bar Harbor, Maine, EUA), montagem em lâminas de vidro gelatinizado utilizando um meio de montagem à base de glicerol, desidratação com soluções de etanol e xileno graduados, e tampa deslizante com solução Permount (Fisher Scientific™, Hampton, Nova Hampshire, EUA). Três fatias da medula espinhal de cada animal de cada grupo (n por grupo= 4-5) foram coletadas com um microscópio óptico (Aristoplan, Leitz™, Stuttgart, Alemanha) com ampliação final de 200x. Imagens da medula espinhal foram comparadas com figuras da

medula espinhal do Cérebro de Rato em Coordenadas Estereotáxicas²³ para delinear a área do corno dorsal dos segmentos lombares L4-L6, onde o nervo ciático está inserido na medula espinhal. A quantificação da imunorreatividade GFAP foi realizada utilizando uma quantificação baseada em limiares no software Image J, na qual o software identifica, dentro de uma área escolhida, pixels com um determinado valor limiar definido de acordo com sua coloração. Este valor é aplicado em todas as imagens e a densidade óptica é obtida para cada medida.

Análise estatística

Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). O intervalo de confiança foi de 95% (IC 95%). O software GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software Inc.™, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para análises estatísticas. A normalidade foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos obtidos de medidas comportamentais, incluindo a pressão da pata, testes de placa quente e filamentos de von Frey, foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias repetida, enquanto o acompanhamento dos testes de pressão da pata e de campo aberto foi analisado por ANOVA de uma via, e a ANOVA comum de duas vias foi usada para análises de imuno-histoquímica, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. O valor de p<0,05 foi considerado significativo. A menos que especificado de outra forma, os valores de F no texto estão relacionados a interações tratamento x tempo.

RESULTADOS

EECI repetidas com diferentes frequências interferem na sensibilidade mecânica

Os animais desenvolveram hipersensibilidade mecânica (ou seja, diminuição do limiar mecânico ou 50% do limiar, respectivamente) avaliada pelos testes de pressão da pata (Figura 2) e filamentos von Frey (Figura 2) 14 dias após a CCI. As EECI 1 e EECI 5 induziram a antinocicepção (ou seja, aumento no limiar mecânico) somente quando estimulados pelo uso de 60 e 100 Hz (Figura 2, B e C) em comparação ao grupo de controle, que manteve um limiar mecânico baixo (EECI 60 Hz e Sham, n=5 a 7, F (4,40) = 60. 51, p<0,0001; Sham após EECI 5, 24,2±1,46; EECI: 92,1±2,88; 95% IC= -78,56 a -57,32); (EECI 100 Hz e Sham, n=4 a 5, F (4,16) = 284,4, p<0,0001; Sham após EECI 5, 30,75±2,13; EECI: 74,6±2,56; 95% IC = -53,27 a -34,43).

A estimulação de 10 Hz induziu antinocicepção após a EECI 5 quando comparada ao tratamento Sham, (Figura 2, A) (EECI 10 Hz e Sham, n=5 a 8, F (4,44) = 1,41, p=0,246; Sham após a EECI 5, 24,2± 14,6; EECI: 37,37± 2,07; 95% IC = -23,73 a -2,621). Resultados similares foram observados para hipersensibilidade de punção, como foi revelado pelos testes de filamentos de von Frey (Figura 2, D-F) (EECI 10 Hz e Sham, n=4 a 5, F (4,28) = 17,81, p<0,0001; Sham após a EECI 5, 2,19±0,24; EECI: 10,74±1,08; 95% IC = -12,02 a -5,095); (EECI 60 Hz e Sham n=4 a 5, F (4,28) = 28,83, p<0,0001; Sham após a EECI 5, 2,13± 0,23; EECI: 13,28±0,94; 95% IC = -5,443 a -1. 750); (EECI 100 Hz e Sham, n=4, F (4,24) = 17,76, p<0,0001; Sham após a EECI 5, 2,19± 0,24; EECI: 12,94± 1,16; 95% IC= -3,879 a 0,6244).

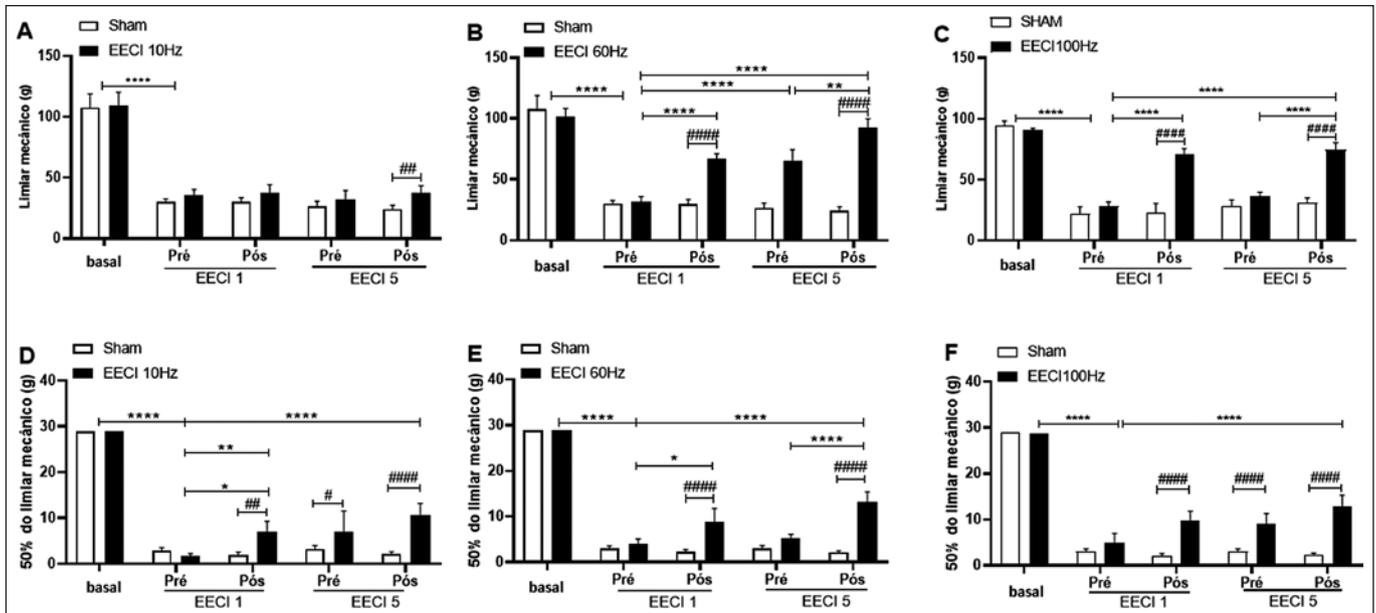


Figura 2. Efeito da EECI repetida com 10, 60 e 100 Hz na sensibilidade mecânica.

Ratos CCI com eletrodos implantados no córtex insular posterior esquerdo foram submetidos a EECI repetidas com 10, 60 e 100 Hz e avaliados no teste de pressão da pata (A a C) e usando filamentos von Frey (D a F) em relação ao Valor Basal, antes (pré) e depois (pós) de uma ou cinco sessões de EECI. Os grupos foram separados em (A) EECI 10 Hz (n = 8), (B) EECI 60 Hz (n = 8), (C) EECI 100 Hz (n = 5); e SHAM (n = 4 a 5). Os dados foram apresentados como média ± E.P.M. A ANOVA bidirecional foi realizada após o teste de Bonferroni. (A) Valor Basal vs Pré EECI 1, ****p < 0,0001. (B) Valor Basal vs Pré EECI 1; Pré EECI 1 vs Pós EECI 1; Pré EECI 1 vs Pós EECI 5; Pré EECI 1 vs Pós EECI 5, ****p < 0,0001. Pré EECI 5 vs Pós EECI 5, **p = 0,0048; Grupos SHAM vs EECI, Pós EECI 1 e Pós EECI 5 ####p < 0,0001. (C) Valor Basal vs Pré EECI 1, ****p < 0,0001; Pré EECI 1 vs Pós EECI 1 e Pós EECI 5, ****p < 0,0001; Pré EECI 5 vs Pós EECI 5; ****p < 0,0001; Grupos SHAM vs EECI, Pós EECI 1 e Pós EECI 5 ####p < 0,0001. (D) Valor Basal vs Pré EECI 1, ****p < 0,0001; Pré EECI 1 vs Pós EECI 1, *p = 0,0211; Pré EECI 1 vs Pós EECI 5, **p = 0,0015; Pré EECI 1 vs Pós EECI 5, ****p < 0,0001. Grupos SHAM vs EECI, Pós EECI 1, Pré EECI 5; Pós EECI 5 ##p = 0,0013; #p = 0,0227; ####p < 0,0001, respectivamente. (E) Valor Basal vs Pré EECI 1, ****p < 0,0001; Pré EECI 1 vs Pós EECI 1, **p = 0,0244; Pré EECI 1 vs Pós EECI 5, ****p < 0,0001. Grupos SHAM vs EECI, Pós EECI 1, Pós EECI 5 ####p < 0,0001. (F) Valor Basal vs Pré EECI 1; ****p < 0,0001; Pré EECI 1 vs Pós EECI 1, ****p < 0,0001; Grupos SHAM vs EECI, Pós EECI 1, Pré EECI 5, Pós EECI 5 ####p < 0,0001.

A EECI de 60 Hz, mas não as de 10 e 100 Hz, aumenta a sensibilidade térmica dos ratos induzidos pela CCI sem mudanças na atividade geral dos animais

Os resultados obtidos demonstram que a EECI 60 Hz induziu o aumento da latência térmica, tanto após uma EECI quanto após cinco EECI, em ratos CCI (EECI 60 Hz e Sham, n=4, F (4,12) = 17,08, p<0,0001; Sham após EECI 5, 2,15± 0,05; EECI: 5,65± 0,218; 95% IC= -4,641 a -2,359), enquanto 10 Hz (EECI 10 Hz e Sham, n=4 e 5, F (4,35) = 0,971, p=0,435; EECI: 3,24± 0,294; 95% IC= -2,275 a 0,09453) e EECI 100 Hz (EECI 100 Hz e Sham, n=4, F (4,12) = 2,47, p=0,1; Pós EECI 5, EECI: 3,25± 0,338; 95% IC= -2,368 a 0,1683) não afetaram a hipersensibilidade térmica no teste de placas quentes (Figura 3, A-C), em comparação com os animais do grupo Sham, que mantiveram a hipersensibilidade térmica (ou seja, baixa latência de resposta) observada após a CCI. A locomoção e a elevação avaliadas pelo teste de campo aberto não mudou após EEICs de 10, 60 e 100 Hz (Figura 3, D-E) (Elevação: EECI 60 Hz e Sham, n=4, F (3,12) = 1,297, p=0,3294; 95% IC= -7,456 a 3,456); (Locomoção: EECI 60 Hz e Sham, n=4, F (3,8) = 5,405, p=0,025; 95% IC= -37,95 a 5,285).

O aumento do limiar mecânico induzido por EECI repetida de 60 Hz é revertido por antagonistas opioidérgicos e canabinoérgicos
O Naloxone inverteu o aumento do limiar mecânico após a EECI 5 (EECI 60 Hz: n=7; F [4,44]=4,853, p=0,0025; Pré EECI 5:

42,571± 4,628; Pós EECI 5: 28,142± 3,595; EECI 60 Hz+Sal: n=6; Pré EECI 5= 44,5± 3,584; Pós EECI 5: 53,833± 7,773; Figura 4, A; 95% IC= -42,17 a -9,214). Similarmente, o SR141716 reverteu os efeitos do EECI 5 (EECI 60 Hz: n=4; F [4,24] = 7,292, p=0,0003; Pré EECI 5: 52,5± 3,883; Pós EECI 5: 35,75± 3,172; EECI 60 Hz+DMSO: n=4; Pré EECI 5: 58,5± 7,643; Pós EECI 5: 74±7,047; Figura 4, B; 95% IC= -56,62 a -19,88).

A EECI de 60 Hz repetida aumentou a imunorreatividade da GFAP, mas não da IBA-1, na medula espinal

A análise qualitativa das imagens imuno-histoquímicas sugere um aumento do GFAP-IR no corno dorsal após EECI de 60 Hz (DHSC: EECI; Figura 5, E e F vs SHAM; Figura 5, C e D), e nenhuma alteração no IBA-1 IR (DHSC: EECI; Figura 5, J e K vs SHAM; Figura 5, H e I). A análise quantitativa revelou um aumento no GFAP-IR no corno dorsal direito de animais estimulados (EECI 60 Hz; n=5, F (1,14)= 9,184, p=0,009; Direita 1,250x1010 ± 3,916x1009; vs SHAM n=4; Direita 3,346x1009 ± 7,466x1008; Figura 5, G; 95% IC= -17945884820 a -365735414), mas sem mudanças no IBA-1-IR (EECI 60 Hz; n=5, F (1,16)= 0,0768, p=0,7852; Figura 5, L; 95% IC= -4782549390 a 2757797535).

A EECI de 60 Hz repetida induziu um aumento do limiar mecânico sustentado por até 72 horas

Os resultados demonstram que os ratos CCI tiveram um aumento no limiar mecânico mantido por 72 horas após a EECI 7

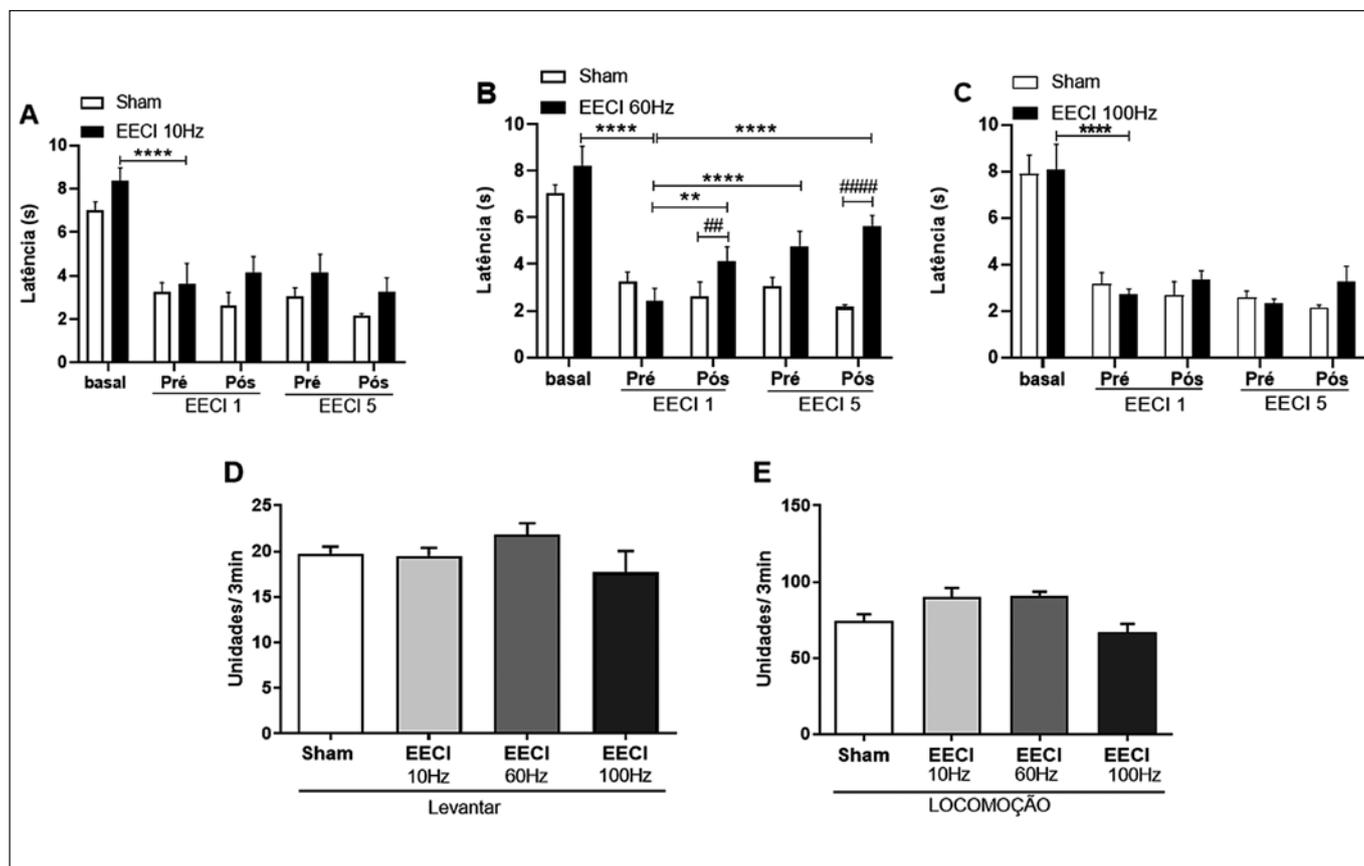


Figura 3. Efeito da EEIC repetida com 10, 60 e 100 Hz sobre a hipersensibilidade térmica e a atividade geral.

Ratos CCI com eletrodos implantados no córtex insular posterior esquerdo foram submetidos a EEIC repetidas com 10, 60, 80 e 100 Hz e avaliados no teste de placas quentes para hipersensibilidade térmica em relação ao Valor Basal, antes (pré) e depois (pós) de uma ou cinco sessões de EEIC. Para análises de sensibilidade térmica, os grupos foram separados em (A) EEIC 10 Hz (n = 5), (B) EEIC 60 Hz (n = 4), (C) EEIC 100 Hz (n = 4); e SHAM (n = 4). A atividade geral foi medida no teste de campo aberto uma vez, após cinco EEIC. A elevação (D) e a locomoção (E) foram avaliadas em EEIC 10 Hz (n=3), 60 Hz (n=3), 100 Hz (n=3) e grupo SHAM (n=3) durante três minutos. Dados apresentados como média ± E.P.M. em (A-C), ANOVA bidirecional seguida do teste post-hoc de Bonferroni. Sendo (A) Valor Basal vs Pré EEIC 1, ****p< 0,0001. (B) Pré EEIC 1 vs Pós EEIC 1, **p=0,0066; Valor Basal vs Pré EEIC 1, Pré EEIC 1 vs Pré EEIC 5 e Pré EEIC 1 vs Pós EEIC 5, ****p< 0,0001. Grupos SHAM vs EEIC, Pós EEIC 1, ##p=0,0076; Pós EEIC 5, ###p<0,0001. (C) Valor Basal vs Pré EEIC 1; ****p< 0,0001. (D-E), ANOVA unidirecional seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni.

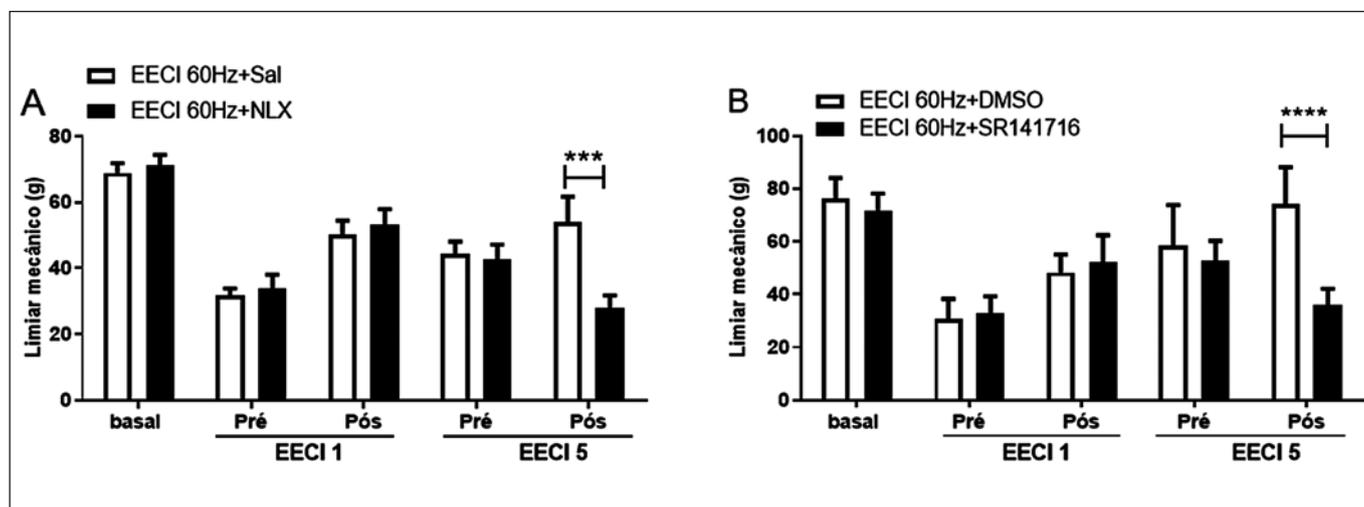


Figura 4. Avaliação farmacológica dos mecanismos opioides e canabinoides do EEIC 60 Hz.

Ratos CCI implantados com eletrodos no córtex insular posterior esquerdo submetidos a EEIC repetida de 60 Hz foram injetados com (A) naloxona (2 mg/kg; i.p.) (EEIC+Sal n= 6; EEIC+NLX n=5) ou (B) SR141716 (1 mg/kg; i.p.) (EEIC+DMSO n= 4; EEIC+ SR141716 n=4), 30 e 40 minutos antes da avaliação mecânica nociceptiva, respectivamente. Os animais foram avaliados no teste de pressão das patas em relação ao Valor Basal, antes (pré) e depois (pós) de uma ou de cinco sessões de EEIC 60 Hz. Os dados foram apresentados como média ± E.P.M. A ANOVA bidirecional foi realizada após o teste post-hoc de Bonferroni. (A) EEIC 60 HZ+Sal vs EEIC 60 HZ+NLX ***p=0,0006 (B) EEIC 60 HZ+DMSO vs EEIC 60 HZ +SR141716 ****p<0,0001. Abreviações: Sulfóxido de dimetilo (DMSO).

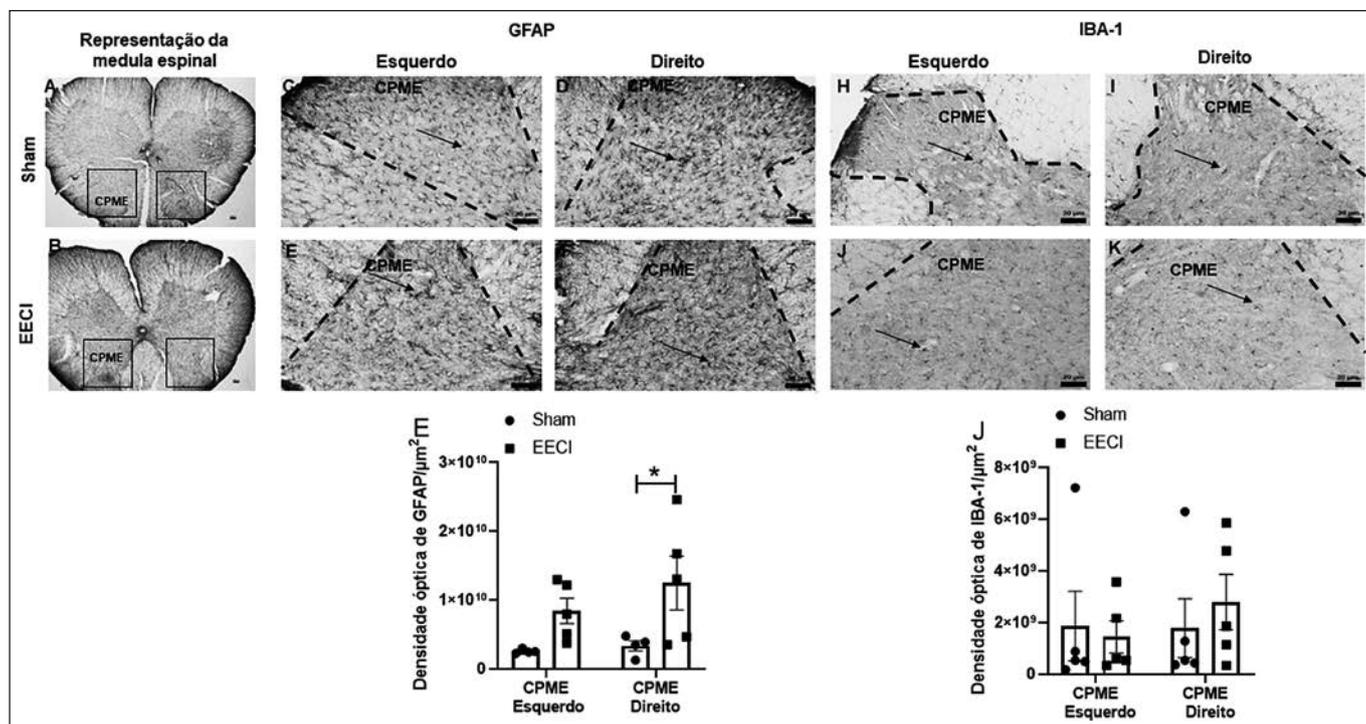


Figura 5. Efeito da EEIC 60 Hz sobre a imunoreatividade de astrócitos e microglia na medula espinal.

Foram preparadas fatias da medula espinal de ratos CCI dos grupos EEIC 60 Hz ($n = 5$) ou SHAM ($n = 4-5$) para análise imuno-histoquímica de GFAP (C-F) ou IBA-1 (H-K). Imagens representativas do DHSC foram obtidas usando um microscópio óptico, e a imunoreatividade da densidade óptica foi analisada por uma contagem baseada em limiares no software Image J. Em A e B, barra horizontal = 100 μm ; nas outras imagens, barra horizontal = 20 μm . O GFAP-IR foi marcado por pontos negros escuros nas imagens e apontado por setas pretas. Em (H) e (L), os dados são apresentados como média \pm E.P.M. e foram analisados pela ANOVA bidirecional seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. Em (E) temos densidade óptica GFAP SHAM vs grupo EEIC no DHSC direito, * $p = 0,0024$.

(72 horas, Figura 6) e esse efeito foi parcialmente revertido 168 horas após a última EEIC (168 horas, Figura 6) (EEIC 60 Hz, $n=7$, $F(1,861, 11,16) = 16,89$, $p=0,0005$; Pós EEIC 7 = $66,00 \pm 4,440$; 72h = $52,00 \pm 3,170$; Tempo 168h = $37,43 \pm 1,888$; 95% IC = 11,58 a 45,57).

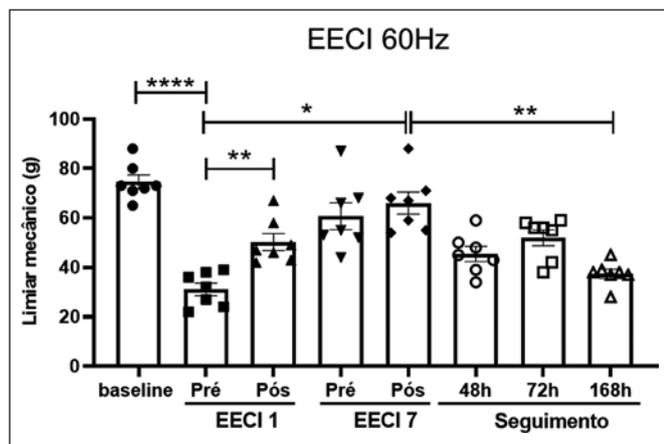


Figura 6. Efeito antinociceptivo a longo prazo da EEIC 7 de 60 Hz.

Os ratos CCI com eletrodos implantados na ínsula posterior esquerda foram submetidos a sete EEIC de 60 Hz repetidas e diárias ($n=7$) e avaliados no teste de pressão da pata em relação ao Valor Basal, antes (pré) e depois (pós) de uma única EEIC (EEIC 1), de sete sessões de EEIC (EEIC 7) e após diferentes períodos de acompanhamento (48, 72 e 168 horas). Os dados foram apresentados como média \pm E.P.M. A ANOVA foi realizada após o teste de Bonferroni. Valor Basal vs Pré EEIC 1, **** $p < 0,0001$; Pré EEIC 1 vs Pós EEIC 1, ** $p = 0,0015$; Pré EEIC 1 vs Pós EEIC 7, * $p = 0,0465$; Pós EEIC 7 vs 168 horas, ** $p = 0,0030$.

DISCUSSÃO

As técnicas de neuroestimulação se mostraram promissoras terapias não-farmacológicas tanto em estudos experimentais quanto clínicos, com vários ensaios mostrando sua eficácia no tratamento de pacientes com dor neuropática que não responderam aos tratamentos analgésicos convencionais²⁷. O córtex insular é uma área cortical complexa com conexões recíprocas intra e extra-insulares, projetando-se para áreas corticais essenciais límbicas, sensoriais e associativas para criar percepção da dor, além de uma área somatossensorial posterior delimitada que regula as entradas sensoriais, intimamente envolvida em mecanismos de nociceção e dor^{2,25,28}. Como consequência, a neuroestimulação insular tem sido proposta recentemente em muitos estudos clínicos⁶.

A eficácia da estimulação pode variar muito de acordo com os parâmetros de estimulação²⁹. Isto indica e reafirma que, de acordo com a frequência e mesmo com outros ajustes de parâmetros, as respostas antinociceptivas podem variar e com isso surge a necessidade de serem ajustadas de acordo com os mecanismos terapêuticos desejados. Enquanto as baixas frequências ativam os elementos neurais, o DBS de alta frequência reduz o disparo de células e aciona projeções axonais nas proximidades dos eletrodos^{30,31}. A dor evocada pode ser observada após estimulação insular, usando 1 a 50 Hz em curto prazo (5 segundos), e modulada, após intervenções nas vias cerebrais associadas à dor³²⁻³⁵. Assim, 60 e 100 Hz foram frequências consideradas como potencialmente mais eficazes no presente estudo. Os resultados deste estudo são semelhantes aos encontrados com a estimulação

do córtex motor de 60 Hz, o que também induziu a antinocicepção em ratos CCI³⁶ nos mesmos paradigmas de comportamento aplicados no presente estudo.

Foi previamente demonstrado que a EECI afeta a nocicepção em animais com dor neuropática^{7,8}. Neste trabalho, essas descobertas foram corroboradas e foi fornecida uma avaliação mais detalhada sobre protocolos e mecanismos de estimulação através dos quais a EECI modula a dor neuropática. Foi descoberto que, enquanto o Grupo Sham manteve a hipersensibilidade, uma gama de frequências de EECI foi capaz de induzir a antinocicepção mecânica em ambos os testes após a EECI 5, através, potencialmente, da modulação dos circuitos relacionados à dor⁸.

Em contraste com a nocicepção mecânica, apenas a EECI de 60 Hz inverteu a hipersensibilidade térmica. Isto está de acordo com o fato de que a ínsula modula os limiares nociceptivos de calor após estimulação inibitória de alta frequência em indivíduos epiléticos selecionados³⁵. Não obstante, ainda faltam estudos padronizando um teste de dor térmica na neuroestimulação insular experimental. O presente estudo forneceu evidências adicionais que sugerem que a ínsula pode reduzir a nocicepção de calor quando estimulada em determinadas condições, o que pode ajudar no projeto de futuros estudos translacionais.

O teste de campo aberto foi usado para confirmar a ausência de efeitos da EECI sobre a eficiência da atividade geral do animal, confirmada pela medição de dois parâmetros, locomoção e levantamento, sendo que nenhuma alteração em ambos os parâmetros foi observada, como já havia sido publicado anteriormente^{7,8}. A CCI é um modelo de lesão nervosa para estudar a dor neuropática que, embora possa causar comportamentos de ansiedade, não afetou os comportamentos gerais de locomoção em ratos previamente avaliados pelo modelo de EECI deste estudo. Isto está de acordo com outros comportamentos similares à dor^{7,8,37}. Além disso⁷, ratos não habituados não demonstraram alterações nos parâmetros do teste de campo aberto após uma única EECI, confirmando novamente a sua segurança para os animais.

É viável fazer a implementação de sistemas endógenos opioides e canabinoides após a CCI, conforme apontado pela literatura³⁸. Nessa perspectiva, observou-se que os opioides e canabinoides antagonistas dos receptores tipo 1, naloxona e SR141716 agem bloqueando a antinocicepção da EECI. Resultados similares foram obtidos após estimulação epidural do córtex insular posterior em ratos com dor neuropática que dependia do sistema opioidérgico³⁹. Dada a administração de fármacos IP no presente estudo, verificou-se que sua ação afeta diferentes estruturas do circuito da dor, incluindo alvos centrais e periféricos como PAG, bulbo rostral ventromedial (RVM) e medula espinhal, por exemplo. Um estudo⁸ mostrou uma baixa ativação neuronal Fos na PAG, uma área conhecida por sua analgesia dependente de opioides, e nenhuma associação de sinalização inibitória GAD65 na RVM após EECI. Isto sugere que estas podem não ser as principais áreas de analgesia opioide e canabinoide na estimulação insular.

Uma possibilidade é que o sistema opioide induza analgesia através da modulação pós-sináptica da medula espinhal. Em contraste, um mecanismo chave da analgesia induzida por canabinoides envolve a inibição pós-sináptica de neurônios periféricos e processos inflamatórios¹¹. Isto pode ser importante para a implementação da terapia proposta por esta pesquisa e para a seleção de modalidades comple-

mentares. Por outro lado, neste estudo não foi avaliada a ativação ou expressão do receptor, o que de fato pode ocasionar diferenças após lesão nervosa e EECI.

As células gliais são cruciais para o desenvolvimento e a manutenção da dor neuropática^{17,40}. A glia ativada sustenta as funções neuronais, regula as sinapses e facilita a neurotransmissão nociceptiva, enquanto participa da sensibilização dos neurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal^{17,40}. A ativação de astrócitos no corno dorsal foi descrita após a CCI^{15,41} e foi sugerido que desempenha um papel na gênese da alodinia⁴². Esta pesquisa postula que o aumento da imunorreatividade da GFAP no corno dorsal de animais que receberam a estimulação de 60 Hz está potencialmente relacionado à modulação seletiva de circuitos inibitórios locais por células gliais. A literatura demonstra os efeitos de estimulação GABAérgica nas células gliais⁴³. No presente estudo foi observado um aumento significativo na atividade glial na antinocicepção induzida pela EECI, sugerindo que a EECI modula a atividade glial através da sinalização GABAérgica inibitória⁸. Isto reforça a ideia de uma via inibitória agindo para estabelecer analgesia após a EECI. Não obstante, os astrócitos são conhecidos por sua capacidade de resposta aos sinais relacionados à dor e neuroplasticidade, influenciando esses circuitos inibitórios⁴⁴.

A presente pesquisa também caracterizou o efeito antinociceptivo de longa duração da EECI repetida de 60 Hz em animais CCI. A antinocicepção mecânica foi observada desde a primeira até a sétima EECI. Foi constatado que ela foi mantida por 72 horas, com um efeito antinociceptivo parcial ainda observado 168 horas mais tarde. Foi demonstrado anteriormente que a atividade neuronal insular foi aumentada após a EECI 8 de 60 Hz e quando o córtex insular foi submetido a LTP e plasticidade sináptica após um processo neuropático⁴⁵. O presente estudo propôs que a neuroplasticidade glial após o EECI pode contribuir para as mudanças funcionais e estruturais prolongadas que ocorrem junto com a melhoria de comportamento observada a longo prazo⁴⁶.

Finalmente, as limitações deste estudo podem ser apontadas na medida em que alguns resultados comportamentais foram obtidos com poucas amostras, como no teste de campo aberto mostrado na figura 5, com n=3, devido à necessidade de excluir dados de animais cujo implante foi perdido e por isso não completaram os testes ou os protocolos de estimulação. No entanto, os resultados foram submetidos a análises estatísticas robustas e permitiram conclusões consistentes.

CONCLUSÃO

Esta pesquisa mostrou que diferentes frequências de EECI são capazes de induzir antinocicepção em animais com dor neuropática induzida pelo modelo CCI sem afetar a atividade locomotora geral, sugerindo a EECI de 60 Hz como a opção mais provável de se obter os melhores benefícios, uma vez que também foi demonstrado que a mesma sustenta o efeito antinociceptivo por até 72 horas, consolidando a ínsula como alvo de protocolos de estimulação cerebral e como uma forma de alcançar o alívio da dor na medicina clínica. A sinalização de opioides e canabinoides e a ativação de astrócitos na medula espinhal indicaram os efeitos da EECI, o que corrobora a sua capacidade de modulação dos componentes das vias de dor. Futuros estudos poderão ser capazes de investigar uma nova percepção sobre a estimulação insular.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Luiz Roberto Giorgetti de Britto e Adilson Silva Alves, do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de São Paulo (ICB/USP), pelo grande apoio para o desenvolvimento deste trabalho, aos Professores Roberto de Pasquale e José Francis de Oliveira pelo apoio técnico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento: ESG [Financiamento 2017/07411-7], HAM [Financiamento 2017/25399-4] e CSD [Financiamento 2015/17136-8].

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Elizamara Santos Gonçalves

Coleta de Dados, Investigação, Metodologia

Heloísa Alonso Matielo

Análise estatística, Coleta de Dados, Conceitualização, Investigação, Metodologia, Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição, Validação

Manoel Jacobsen Teixeira

Supervisão

Daniel Ciampi de Andrade

Supervisão

Clement Hamani

Redação - Preparação do original, Supervisão

Camila Squarzoni Dale

Aquisição de financiamento, Conceitualização, Gerenciamento do Projeto, Redação - Preparação do original, Supervisão

REFERÊNCIAS

- García-Larrea L, Peyron R. Pain matrices and neuropathic pain matrices: A review. *Pain*. 2013;154(Suppl 1):S29-S43.
- Lu C, Yang T, Zhao H, Zhang M, Meng F, Fu H, Xie Y, Xu H. Insular cortex is critical for the perception, modulation, and chronification of pain. *Neurosci Bull*. 2016;32(2):191-201.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain*. 2006;10(4):287-333.
- Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ*. 2014;348:f7656.
- Ciampi de Andrade D, Galhardoni R, Pinto LF, Lancelotti R, Rosi J Jr, Marcolin MA, Teixeira MJ. Into the island: a new technique of non-invasive cortical stimulation of the insula. *Neurophysiol Clin*. 2012;42(6):363-8.
- Galhardoni R, Aparecida da Silva V, García-Larrea L, Dale C, Baptista AF, Barbosa LM, Menezes LMB, de Siqueira SRDT, Valério F, Rosi J Jr, de Lima Rodrigues AL, Reis Mendes Fernandes DT, Lorenzini Selingardi PM, Marcolin MA, Duran FLS, Ono CR, Lucato LT, Fernandes AMBL, da Silva FEF, Yeng LT, Brunoni AR, Buchpiguel CA, Teixeira MJ, Ciampi de Andrade D. Insular and anterior cingulate cortex deep stimulation for central neuropathic pain: disassembling the percept of pain. *Neurology*. 2019;92(18):e2165-e2175.
- Dimov LF, Toniolo EF, Alonso-Matielo H, de Andrade DC, Garcia-Larrea L, Ballester G, Teixeira MJ, Dale CS. Electrical stimulation of the insular cortex as a novel target for the relief of refractory pain: An experimental approach in rodents. *Behav Brain Res*. 2018;346:86-95.
- Alonso-Matielo H, Gonçalves ES, Campos M, Oliveira VRS, Toniolo EF, Alves AS, Lebrun I, de Andrade DC, Teixeira MJ, Brito LRG, Hamani C, Dale CS. Electrical stimulation of the posterior insula induces mechanical analgesia in a rodent model of neuropathic pain by modulating GABAergic signaling and activity in the pain circuitry. *Brain Res*. 2021;1754:147237.
- Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. *Behav Brain Res*. 2003;138(1):17-28.
- Linnman C, Moulton EA, Barmettler G, Becerra L, Borsook D. Neuroimaging of the periaqueductal gray: state of the field. *Neuroimage*. 2012;60(1):505-22.
- Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 2002;66(6):355-474.
- Ni HD, Yao M, Huang B, Xu LS, Zheng Y, Chu YX, Wang HQ, Liu MJ, Xu SJ, Li HB. Glial activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation of neuropathic pain through the p38 MAPK signaling pathway. *J Neurosci Res*. 2016;94(1):50-61.
- Tsuda M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. *J Diabetes Investig*.

- 2016;7(1):17-26.
- Eto K, Ishibashi H, Yoshimura T, Watanabe M, Miyamoto A, Ikenaka K, Moorhouse AJ, Nabekura J. Enhanced GABAergic activity in the mouse primary somatosensory cortex is insufficient to alleviate chronic pain behavior with reduced expression of neuronal potassium-chloride cotransporter. *J Neurosci*. 2012;32(47):16552-9.
- Ren K. Emerging role of astroglia in pain hypersensitivity. *Jpn Dent Sci Rev*. 2010;46(1):86-92.
- Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Glial activation and pathological pain. *Neurochem Int*. 2004;45(2-3):389-95.
- Gosselin RD, Suter MR, Ji RR, Decosterd I. Glial cells and chronic pain. *Neuroscientist*. 2010;16(5):519-31.
- Greenspan JD, Craft RM, LeResche L, Arendt-Nielsen L, Berkley KJ, Fillingim RB, Gold MS, Holdcroft A, Lautenbacher S, Mayer EA, Mogil JS, Murphy AZ, Traub RJ; Consensus Working Group of the Sex, Gender, and Pain SIG of the IASP. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. *Pain*. 2007;132(Suppl 1):S26-S45.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000412.
- Tatem KS, Quinn JL, Phadke A, Yu Q, Gordish-Dressman H, Nagaraju K. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *J Vis Exp*. 2014;29(91):51785.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87-107.
- Austin PJ, Wu A, Moalem-Taylor G. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. *J Vis Exp*. 2012;13(61):3393.
- Paxinos GW. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. 2005.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;53(1):55-63.
- Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:284.
- Rachidi I, Minotti L, Martin G, Hoffmann D, Bastin J, David O, Kahane P. The insula: a stimulating Island of the brain. *Brain Sci*. 2021;11(1):1533.
- Klooster DC, de Louw AJ, Aldenkamp AP, Besseling RM, Mestrom RM, Carrette S, Zinger S, Bergmans JW, Mess WH, Vonck K, Carrette E, Breuer LE, Bernas A, Tjihuis AG, Boon P. Technical aspects of neurostimulation: Focus on equipment, electric field modeling, and stimulation protocols. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;65:113-41.
- Moisset X, Lefaucheur JP. Non pharmacological treatment for neuropathic pain: Invasive and non-invasive cortical stimulation. *Rev Neurol (Paris)*. 2019;175(1-2):51-8.
- Tan LL, Kuner R. Neocortical circuits in pain and pain relief. *Nat Rev Neurosci*. 2021;22(8):458-471.
- Zhou H, Zhang Q, Martinez E, Dale J, Robinson E, Huang D, Wang J. A novel neuromodulation strategy to enhance the prefrontal control to treat pain. *Mol Pain*. 2019;15:1744806919845739.
- Hamani C, Nóbrega JN. Deep brain stimulation in clinical trials and animal models of depression. *Eur J Neurosci*. 2010;32(7):1109-17.
- Hamani C, Nóbrega JN. Preclinical studies modeling deep brain stimulation for depression. *Biol Psychiatry*. 2012;72(11):916-23.
- Ostrowsky K, Magnin M, Ryvlin P, Isnard J, Guenot M, Mauguière F. Representation of pain and somatic sensation in the human insula: a study of responses to direct electrical cortical stimulation. *Cereb Cortex*. 2002;12(4):376-85.
- Aff A, Hoffmann D, Minotti L, Benabid AL, Kahane P. Middle short gyrus of the insula implicated in pain processing. *Pain*. 2008 Sep 15;138(3):546-55.
- Mazzola L, Isnard J, Peyron R, Guenot M, Mauguière F. Somatotopic organization of pain responses to direct electrical stimulation of the human insular cortex. *Pain*. 2009;146(1-2):99-104.
- Denis DJ, Marouf R, Rainville P, Bouthillier A, Nguyen DK. Effects of insular stimulation on thermal nociception. *Eur J Pain*. 2016;20(5):800-10.
- Pagano RL, Assis DV, Clara JA, Alves AS, Dale CS, Teixeira MJ, Fonoff ET, Britto LR. Transdural motor cortex stimulation reverses neuropathic pain in rats: a profile of neuronal activation. *Eur J Pain*. 2011;15(3):268.e1-14.
- Challa SR. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *Int J Neurosci*. 2015;125(3):170-4.
- Pol O, Murtra P, Caracul L, Valverde O, Puig MM, Maldonado R. Expression of opioid receptors and c-fos in CB1 knockout mice exposed to neuropathic pain. *Neuropharmacology*. 2006;50(1):123-32.
- Komboz F, Mehsein Z, Kobäiter-Maarrawi S, Chehade HD, Maarrawi J. Epidural posterior insular stimulation alleviates neuropathic pain manifestations in rats with spared nerve injury through endogenous opioid system. *Neuromodulation*. 2022;23:51094-7159(22)00022-8.
- Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(3):185-93.
- Garrison CJ, Dougherty PM, Carlton SM. GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. *Exp Neurol*. 1994;129(2):237-43.
- Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Inada H, Roh SE, Kim SJ, Lee G, Bae H, Moorhouse AJ, Mikoshiba K, Fukazawa Y, Koizumi S, Nabekura J. Cortical astrocytes wire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. *J Clin Invest*. 2016;126(5):1983-97.
- Tanaka Y, Tozuka Y, Takata T, Shimazu N, Matsumura N, Ohta A, Hisatsune T. Excitatory GABAergic activation of cortical dividing glial cells. *Cereb Cortex*. 2009;19(9):2181-95.
- Yoon BE, Woo J, Lee CJ. Astrocytes as GABA-ergic and GABA-ceptive cells. *Neurochem Res*. 2012;37(11):2474-9.
- Zhuo M. Contribution of synaptic plasticity in the insular cortex to chronic pain. *Neuroscience*. 2016;338:220-9.

