

# Tratamento com estimulação transcraniana por corrente contínua não reverteu o aumento de NGF induzido por modelo de dor neuropática em ratos

*Transcranial direct current stimulation did not revert the increased central and peripheral NGF levels induced by neuropathic pain in rats*

Stefania Giotti Cioato<sup>1,2,3</sup>, Liciane Fernandes Medeiros<sup>1,2,4</sup>, Bettega Costa Lopes<sup>1,2</sup>, Andressa de Souza<sup>1,2,4</sup>, Wolnei Caumo<sup>5</sup>, Iraci Lucena da Silva Torres<sup>1,2,3,5</sup>

DOI 10.5935/2595-0118.20210031

## RESUMO

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:** A expressão do fator de crescimento neural (NGF) em neurônios de diâmetro largo pode representar um papel importante na plasticidade sináptica neuronal e na reorganização da função neuronal após lesão neural. A estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) é um método não invasivo de estimulação cerebral e representa uma ferramenta promissora para o manejo da dor, pois promove neuroplasticidade no sistema central, podendo ser combinada com outras intervenções. O objetivo foi investigar os efeitos da ETCC nos níveis de NGF em estruturas do sistema nervoso central e periférico de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática (DN).

**MÉTODOS:** A constrição crônica (CCI) do nervo isquiático foi utilizada para indução do modelo de DN. Na cirurgia sham, o nervo foi exposto, no entanto não houve constrição do nervo. O

grupo controle não foi submetido ao procedimento cirúrgico. Após estabelecimento da DN, os grupos tratados foram submetidos a ETCC 0,5 mA/20min/dia/8 dias. Os níveis de NGF no córtex cerebral, medula espinal e nervo isquiático foram mensurados pela técnica de ELISA 48 horas e 7 dias após o final do tratamento.

**RESULTADOS:** O modelo de dor CCI aumentou os níveis de NGF nas três estruturas analisadas, evidenciando a importância desta neurotrofina na dor neuropática. Por outro lado, não houve efeito da ETCC nos níveis de NGF central e periférico, descartando o papel desta neurotrofina no efeito analgésico da ETCC. **CONCLUSÃO:** Efeitos da ETCC sobre vias nociceptivas não estão diretamente relacionados com a sinalização do NGF neste modelo de dor crônica.

**Descritores:** Dor, Fator de crescimento neural, Estimulação transcraniana por corrente contínua, Ratos.

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** The expression of nerve growth factor (NGF) in the large-size neurons may represent a key role in the neuronal synaptic plasticity and re-organization of neuronal function after a nerve injury. Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a non-invasive method of cerebral stimulation and represents a promising tool to pain management since it promotes neuroplasticity in the central system, and it can be combined with other interventions. The aim was to investigate the effects of tDCS in the NGF levels in central and peripheral nervous system structures of rats submitted to a neuropathic pain (NP) model.

**METHODS:** The chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve was used for the induction of NP. For sham surgery, the sciatic nerve was exposed, but without any ligation. The control group did not undergo surgical procedure. After the establishment of NP, treated groups were subjected to tDCS treatment 0.5 mA/20min/day/8 days. NGF levels in cerebral cortex, spinal cord and sciatic nerve were determined by sandwich-ELISA at 48 hours and 7 days after the end of treatment.

**RESULTS:** The CCI model increased NGF levels in all three structures analyzed at long-lasting time, evidencing the importance of this neurotrophin in neuropathic pain condition. On the other hand, there was no tDCS effect in the central and peri-

Stefania Giotti Cioato – <http://orcid.org/0000-0002-1854-0713>;  
Liciane Fernandes Medeiros – <http://orcid.org/0000-0002-6842-7241>;  
Bettega Costa Lopes – <http://orcid.org/0000-0002-8090-0273>;  
Andressa de Souza – <http://orcid.org/0000-0002-6608-4695>;  
Wolnei Caumo – <http://orcid.org/0000-0002-5083-4658>;  
Iraci Lucena da Silva Torres – <http://orcid.org/0000-0002-3081-115X>.

1. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-Clínicas, Porto Alegre, RS, Brasil.
2. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, Unidade de Experimentação Animal, Porto Alegre, RS, Brasil.
3. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, RS, Brasil.
4. Universidade La Salle, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano, Canoas, RS, Brasil.
5. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, RS, Brasil.

Apresentado em 27 de agosto de 2020.

Aceito para publicação em 09 de abril de 2021.

Conflito de interesses: não há – Fontes de fomento: Este estudo foi apoiado pelas seguintes entidades brasileiras de financiamento: o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (I.L.S. Torres, L.F. Medeiros); o Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES (B.C. Lopes); o Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, GPPG (I.L.S. Torres, Grant 120512). FAPERGS/PRONEM (Dr. I.L.S. Torres, Subvenção nº 11/2050), MCT/FINEP - COENG/2013.

### Endereço para correspondência:

Departamento de Farmacologia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Sarmento Leite, 500/305  
90050-170 Porto Alegre, RS, Brasil.  
E-mail: iltorres@hcpa.edu.br

pheral NGF levels discarding the participation of this neurotrophin in the analgesic tDCS effect.

**CONCLUSION:** tDCS modulation effects of nociceptive pathways seem not to be linked to the NGF signaling in this chronic pain model.

**Keywords:** Nerve growth factor, Pain, Rats, Transcranial direct current stimulation.

## INTRODUÇÃO

Os fatores neurotróficos são definidos como substâncias endógenas que atuam no desenvolvimento, manutenção e regeneração do sistema nervoso<sup>1</sup>. Lesões do nervo periférico causam alterações na expressão dos níveis de neurotrofinas e seus receptores celulares no sistema nervoso periférico e central. Além disso, alterações na sinalização da neurotrofina parecem ser fundamentais no desenvolvimento da dor neuropática, bem como na regeneração do nervo periférico após a lesão<sup>2</sup>. O fator de crescimento neural (NGF) é uma neurotrofina produzida e secretada pelas células do tecido alvo, depois absorvida por fibras simpáticas e fibras pequenas sensoriais por meio de um receptor de tirosina-quinase A (trkA) e transportada retrogradadamente<sup>1,3</sup>.

Alguns estudos envolvendo o NGF indicam seus papéis no desenvolvimento inicial e nas propriedades nociceptivas dos nervos<sup>4</sup>. O papel principal do NGF é a sobrevivência neuronal no sistema nervoso em desenvolvimento, entretanto em adultos parece ser mais protetora por meio da modulação da dor<sup>5</sup>. O papel do NGF na dor neuropática tem sido difícil de definir; estudos têm proposto um efeito exacerbador e aliviador desta neurotrofina em modelos de roedores<sup>6-8</sup>. Além disso, a expressão do NGF nos neurônios de diâmetro largo pode apresentar um papel essencial na plasticidade sináptica neuronal e na reorganização da função neuronal após uma lesão nervosa<sup>9</sup>. Estudos recentes mostraram que em condições de dor a expressão do NGF no local da lesão tecidual aumenta e atua no trkA sobre as terminações nervosas sensoriais produzindo alterações conformacionais e aumentando a expressão dessas proteínas<sup>10</sup>. Estes eventos parecem estar relacionados à sensibilização periférica e central na medula espinhal, induzindo hiperalgesia e alodinia<sup>3</sup>.

Neste contexto, uma técnica que pode modular alterações plásticas focalizadas nas redes neurais relacionadas à dor, como a estimulação transcraniana de corrente contínua (ETCC), pode ter efeitos terapêuticos significativos<sup>11</sup>. Estudos anteriores do presente grupo de pesquisa mostraram efeitos analgésicos duradouros após repetidas sessões de ETCC anodal sobre inflamação crônica<sup>12</sup>, hiperalgesia induzida por modelos de estresse de contenção crônica<sup>13</sup> e na lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI)<sup>14</sup>. Além disso, estudos em modelos animais e celulares demonstraram que a ETCC pode modular a transmissão sináptica, a biossíntese molecular e a morfologia neuronal. Vários sistemas de neurotransmissão estão envolvidos em seus efeitos; entretanto, os principais mecanismos desta técnica não são completamente compreendidos<sup>15</sup>. Considerando a importância das terapias não invasivas para o manejo das condições de dor neuropática e a necessidade de identificar os mecanismos da ETCC, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da ETCC nos níveis de NGF nas estruturas do sistema nervoso central e no nervo isquiático de ratos submetidos a um modelo de dor CCI.

## MÉTODOS

Um total de 84 ratos Wistar machos adultos, 55-65 dias de idade; pesando 200-250g, foram utilizados. Os animais foram randomizados por peso e alojados com três animais por gaiola doméstica feita de material de polipropileno (49cmx34cmx16cm) com o piso coberto com serragem. Todos os animais foram mantidos em um ambiente controlado ( $22\pm 2^\circ\text{C}$ ), sob um ciclo padrão claro/escuro (luzes acesas às 07:00h e luzes apagadas às 19:00h), com água e comida (Nuvital, Porto Alegre/ Brasil) disponível ad libitum. O estudo foi realizado de acordo com o Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório 8ª ed.<sup>16</sup>. O protocolo experimental obedeceu aos padrões éticos e metodológicos das diretrizes *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE)<sup>17</sup>. O experimento utilizou o número de animais necessários para produzir dados científicos confiáveis.

Os ratos foram habituados à sala de manutenção durante uma semana antes do início dos experimentos, e então, divididos em sete grupos: controle (CT); dor neuropática sham (NS); dor neuropática sham mais tratamento ETCC sham (NSS); dor neuropática sham mais tratamento ETCC (NST); modelo de dor neuropática (DN); dor neuropática mais tratamento ETCC sham (DNS); dor neuropática mais tratamento ETCC (DNT). Após o estabelecimento da dor neuropática (DN), os ratos foram submetidos a uma sessão diária de ETCC durante oito dias consecutivos (Figura 1). Os investigadores foram cegos para evitar e prevenir o viés em todos os procedimentos.

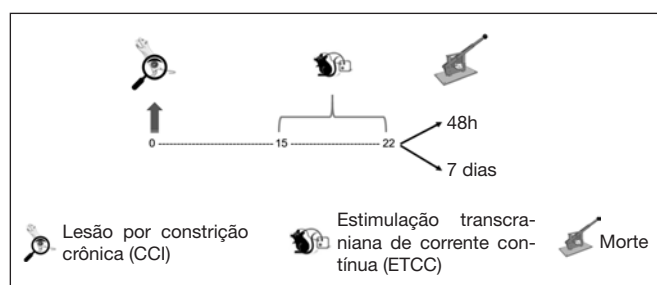


Figura 1. Desenho experimental

A CCI do nervo isquiático descrita pelo estudo<sup>18</sup> e adaptada<sup>14</sup> foi usada como modelo para a indução de dor neuropática. Os ratos foram anestesiados com isoflurano a 5% para indução, 2,5% para manutenção e colocados em decúbito lateral direito para a realização da tricotomia da coxa esquerda e antisepsia da pele com álcool iodado a 2%. Após incisão da pele do membro posterior esquerdo no terço médio da coxa para expor o músculo bíceps femoral, o nervo isquiático comum foi exposto e três ligaduras soltas foram amarradas (Vycril 4.0), separadas por um intervalo de 1 mm. Dessa maneira, o comprimento do nervo afetado foi de aproximadamente 5,0 mm. As ligaduras reduziram levemente o diâmetro do nervo, mas não interromperam a circulação epineural. Finalmente, a pele foi suturada com fio Mononylon 4.0. Para a cirurgia sham, o nervo isquiático foi exposto de forma semelhante ao modelo CCI, mas não houve constrição. Após a cirurgia e recuperação anestésica, os animais foram colocados em suas gaiolas domésticas onde permaneceram até o dia da morte. O CT não foi submetido a procedimento cirúrgico. O mesmo investigador realizou as constrições em todos os ratos para garantir um nível igual de constrição. Como descrito em um estudo

anterior realizado pelo presente grupo de pesquisadores, o modelo de dor neuropática usando a constrição crônica do nervo isquiático é estabelecido 14 dias após a constrição do nervo. Foi observada uma diminuição da latência e do limiar de retirada da pata nos ratos submetidos à constrição do nervo isquiático, confirmando o estabelecimento do modelo de dor neuropática<sup>14,19,20</sup>.

Após o estabelecimento da dor neuropática, os animais do grupo de tratamento ativo foram submetidos a uma sessão de 20 minutos de ETCC bimodal, todas as tardes, durante oito dias consecutivos, conforme descrito no estudo<sup>21</sup>. A corrente constante direta de 0,5 mA de intensidade foi fornecida por um estimulador de corrente constante acionado por bateria usando eletrodos de ECG com hidrogel adesivo condutivo. As cabeças dos ratos foram raspadas para melhor aderência e os eletrodos foram aparados a 1,5 cm<sup>2</sup>. Após a colocação, os eletrodos foram fixados na cabeça com fita adesiva (Micropore™) e cobertos com uma malha de proteção para evitar a remoção.

O eletrodo catódico foi posicionado no ponto médio entre os ângulos laterais de ambos os olhos na área supraorbital, e o eletrodo anodal foi colocado na cabeça usando pontos de referência das linhas do pescoço e ombro como guia nas regiões anterior e posterior na linha média entre os dois hemisférios do córtex parietal, como descrito pelos autores<sup>22</sup>. Esta técnica imita os protocolos da ETCC para o tratamento da dor em humanos<sup>23-26</sup> e foi aplicada pelo presente grupo de pesquisa mostrando efeitos mais duradouros no alívio da dor, assim como uma resposta anti-hiperalgésica em ratos com pata inflamada<sup>12</sup>. Para a estimulação sham, os eletrodos foram colocados e fixados nas mesmas posições da estimulação real; entretanto, o estimulador permaneceu desligado durante todo o tempo.

Os animais foram mortos por decapitação 48 horas e 7 dias após a última sessão de ETCC e as amostras de tecido do córtex cerebral, medula espinhal e nervo isquiático esquerdo da pata foram coletadas. As estruturas foram congeladas a -80°C até que os ensaios fossem realizados.

Os níveis de NGF no córtex cerebral, medula espinhal e nervo isquiático esquerdo da pata foram determinados pela técnica de ELISA usando anticorpos monoclonais específicos para NGF (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos). A proteína total foi medida pelo método de Bradford usando albumina de soro bovino como padrão. Todos os experimentos e procedimentos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais (protocolo GPP-G-HCPA no. 120512).

### Análise estatística

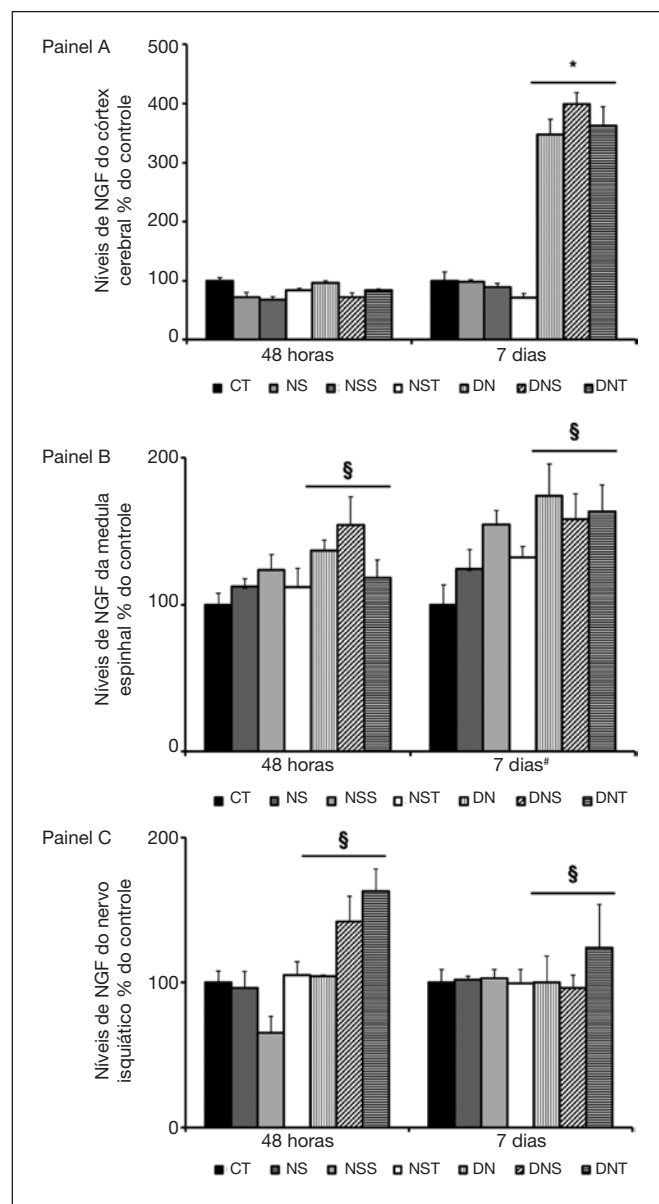
Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Uma análise de variância ANOVA de três vias seguida de um teste de Bonferroni foi realizada para comparar os grupos considerando a DN, tratamento e tempo como fatores independentes. Os valores de p menores de 0.05 foram considerados significantes. Os valores foram apresentados como porcentagem do CT. Foi utilizado o programa SPSS 19.0 para Windows.

## RESULTADOS

Quanto aos níveis de NGF do córtex, uma interação entre a DN e o tempo nos níveis de NGF (ANOVA de três vias,  $p < 0.05$ ,  $F(1,69) = 286.380$ , Figura 2, Painel A) foi observada, com um aumento sig-

nificativo nos níveis de NGF no 29º dia pós-cirurgia, quando comparado com a medida do 24º dia pós-cirurgia. Os níveis de NGF da medula espinhal apresentaram os efeitos principais da DN e do tempo (ANOVA de três vias,  $F(1,68) = 10,776$ ,  $p < 0,05$ ,  $F(1,68) = 9,258$  respectivamente, figura 2, Painel B). Todos os ratos apresentaram níveis aumentados de NGF na medula espinhal após a DN; entretanto, seus níveis foram significativamente mais altos no 29º dia pós-cirurgia. Na estrutura periférica analisada, foram observados níveis aumentados de NGF no nervo isquiático após o modelo de DN com efeitos principais de DN e tempo nesta estrutura (ANOVA de três vias,  $F(1,71) = 17,867$ ,  $p < 0,05$ ,  $F(1,71) = 7,760$ , respectivamente, figura 2, Painel C).

**Painel A.** Níveis de NGF no córtex cerebral (n=4-6 por grupo). Os dados foram expressos como porcentagem da média de controle ± E.P.M. (pg/mg de proteína). Grupos: controle (CT); dor neuropática (NS, NSS, NST, DN, DNS, DNT).



**Figura 2.** Níveis de NGF em diferentes estruturas

ca sham (NS); dor neuropática sham mais tratamento ETCC sham (NSS); dor neuropática sham mais tratamento ETCC (NST); modelo de dor neuropática (DN); dor neuropática mais tratamento ETCC sham (DNS); dor neuropática mais tratamento ETCC (DNT).

\* interação entre modelo de dor vs tempo (ANOVA de três vias/ Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

**Painel B.** Níveis de NGF na medula espinhal ( $n=4-6$  por grupo). Os dados foram expressos como porcentagem da média de controle  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína). Grupos: controle (CT); dor neuropática sham (NS); dor neuropática sham mais tratamento ETCC sham (NSS); dor neuropática sham mais tratamento ETCC (NST); modelo de dor neuropática (DN); dor neuropática mais tratamento ETCC sham (DNS); dor neuropática mais tratamento ETCC (DNT).

§ efeito significativo do modelo de dor; # efeito significativo do tempo (ANOVA de três vias/ Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

**Painel C.** Níveis de NGF no nervo isquiático ( $n=4-6$  por grupo). Os dados foram expressos como porcentagem da média de controle  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína). Grupos: controle (CT); dor neuropática sham (NS); dor neuropática sham mais tratamento ETCC sham (NSS); dor neuropática sham mais tratamento ETCC (NST); modelo de dor neuropática (DN); dor neuropática mais tratamento ETCC sham (DNS); dor neuropática mais tratamento ETCC (DNT).

§ efeito significativo do modelo de dor (ANOVA de três vias/ Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Neste estudo, foi encontrado um efeito interessante do modelo CCI com níveis aumentados de NGF na medula espinhal e no córtex cerebral. No nervo isquiático, foi observado um aumento do nível de NGF a curto prazo após a observação do modelo CCI. Por outro lado, os efeitos analgésicos do ETCC não estão ligados a modificações nos níveis de NGF.

Modelos pré-clínicos de inflamação e dor neuropática demonstraram que a hiperalgisia exibida pelos animais está ligada a alterações nos níveis de NGF<sup>27-29</sup>. Além disso, estudos clínicos utilizando voluntários saudáveis sustentam o papel do NGF na indução de estados anormais de dor, tais como hiperalgisia mecânica e térmica<sup>30,31</sup>. Poucas evidências mostram a função do NGF no sistema nervoso central atuando na geração e manutenção da dor neuropática no modelo de dor CCI<sup>32</sup>.

É interessante destacar que um aumento dos níveis de NGF a longo prazo após o modelo CCI foi observado. Este efeito só foi observado aproximadamente 30 dias após o modelo de dor neuropática no córtex cerebral; no entanto, níveis aumentados já apareceram no 24º dia pós-cirurgia com um aumento progressivo no 30º dia pós-cirurgia na medula espinhal. Estudos anteriores demonstraram o papel do NGF em alguns modelos de lesão nervosa periférica: após uma compressão unilateral do nervo isquiático, foi encontrada maior síntese de NGF nos gânglios radiculares dorsais<sup>33</sup> e após o modelo CCI, a dor neuropática foi ligada a uma superexpressão glial do NGF<sup>34-36</sup>. No sistema nervoso central, pensa-se que a produção de NGF é feita por células gliais, tais como microglia<sup>37</sup> e oligodendrócitos<sup>38</sup>; no entanto, a principal fonte de NGF são os astrócitos<sup>39,40</sup>. Vários estudos têm

mostrado a complexa interação entre o sistema central imunológico e o processo de dor neuropática<sup>41-43</sup>. A pesquisa anterior deste grupo<sup>14</sup> mostrou um aumento duradouro dos níveis de IL-1 $\beta$  nas estruturas nervosas centrais, como o córtex cerebral e a medula espinhal; um padrão semelhante foi observado nos níveis de NGF nas mesmas estruturas, como demonstrado no presente estudo. Sugere-se que o NGF age sobre o eixo imunológico, uma vez que é caracterizado pela presença do receptor TrkA, corroborando a interação entre o sistema nervoso central e o sistema imunológico<sup>44</sup>. Considerando o desafio do tratamento para aliviar os sintomas da dor em variadas condições de dor neuropática, novas abordagens terapêuticas têm sido investigadas. Estudos demonstraram que o aumento de neurotrofinas na medula espinhal, como o NGF, parece estar correlacionado com a incidência de dor<sup>45</sup>. Desta forma, alguns estudos mostraram que o tratamento com anti-NGF em dor neuropática pode prevenir e reverter a hiperalgisia e a alodínia mecânica<sup>36,46-48</sup>. Particularmente no modelo CCI, o estudo<sup>49</sup> sugeriu que o tratamento com anti-NGF melhora a dor neuropática crônica por meio da redução do NGF e da substância P em locais periféricos e pelo efeito indireto na sensibilização central, modulando as vias descendentes da percepção da dor<sup>49</sup>.

O presente estudo se propôs a compreender os mecanismos de uma nova ferramenta terapêutica para a dor neuropática, que atualmente demonstra eficácia em estudos clínicos<sup>50-52</sup> e pré-clínicos<sup>12,13</sup>. Apesar da reversão da hiperalgisia térmica e mecânica após o modelo CCI por meio da repetida ETCC bicefálica<sup>14</sup>, não foi encontrada uma relação entre seu efeito e a via de NGF no sistema nervoso central e no nervo periférico.

Apesar da crescente evidência do papel do NGF na indução e manutenção da dor neuropática, poucos estudos têm mostrado seus níveis centrais de estruturas. Os resultados atuais demonstraram a importância dos níveis de NGF no córtex cerebral e nas estruturas da medula espinhal. Por outro lado, algumas limitações do presente estudo precisam ser notadas: i) falta de um curso de tempo dos níveis de NGF desde o estágio inicial pós-cirurgia; ii) avaliação a longo prazo dos níveis de NGF; iii) avaliação dos níveis de NGF no nervo periférico e nas diferentes estruturas do sistema nervoso central.

## CONCLUSÃO

O modelo CCI aumentou os níveis de NGF no córtex cerebral e na medula espinhal, evidenciando a importante característica desta neurotrofina na condição de dor neuropática. Além disso, as evidências mostraram que a ETCC bicefálica pode modular as vias nociceptivas; este efeito não está ligado à sinalização da NGF. São necessários novos estudos para elucidar o papel dos níveis centrais do NGF na dor neuropática.

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

### Stefania Giotti Cioato

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

### Liciane Fernandes Medeiros

Análise estatística, Conceitualização, Investigação, Metodologia, Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição.

### Bettega Costa Lopes

Análise estatística, Conceitualização, Investigação, Metodologia, Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição.

### Andressa de Souza

Análise estatística, Coleta de Dados, Investigação, Metodologia.

### Wolnei Caumo

Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição, Supervisão.

### Iraci Lucena da Silva Torres

Aquisição de financiamento, Conceitualização, Metodologia, Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição, Supervisão.

## REFERÊNCIAS

1. Anand P. Nerve growth factor regulates nociception in human health and disease. *Br J Anaesth.* 1995;75(2):201-8.
2. Richner M, Ulrichsen M, Elmegaard SL, Dieu R, Pallesen LT, Vaegter CB. Peripheral Nerve Injury Modulates Neurotrophin Signaling in the Peripheral and Central Nervous System. *Mol Neurobiol.* 2014;50(3):945-70.
3. Hirose M, Kuroda Y, Murata E. NGF/TrkA signaling as a therapeutic target for pain. *Pain Pract.* 2016;16(2):175-82.
4. Kashyap MP, Roberts C, Waseem M, Tyagi P. Drug Targets in neurotrophin signaling in the central and peripheral nervous system. *Mol Neurobiol.* 2018;55(8):6939-55.
5. Kumar V, Mahal BA. NGF - the TrkA to successful pain treatment. *J Pain Res.* 2012;5:279-87.
6. Herzberg U, Eliav, EDorsey JM, Gracely R, Kopin IJ. NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Neuroreport.* 1997;8(7):1613-8.
7. Ro LS, Chen ST, Tang LM, Jacobs JM. Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain.* 1999;79(3):265-74.
8. Ramer MS, Kawaja MD, Henderson JT, Roder JC, Bisby MA. Glial overexpression of NGF enhances neuropathic pain and adrenergic sprouting into DRG following chronic sciatic constriction in mice. *Neurosci Lett.* 1998;251:53-6.
9. Tender GC, Li YY, Cui JG. The role of nerve growth factor in neuropathic pain inhibition produced by resiniferatoxin treatment in the dorsal root ganglia. *Neurosurgery.* 2013;73(1):158-66.
10. Wu C, Erickson MA, Xu J, Wild KD, Brennan TJ. Expression profile of nerve growth factor after muscle incision in the rat. *Anesthesiology.* 2009;110(1):140-9.
11. Lang N, Siebner HR, Wård NS, Lee L, Nitsche MA, Paulus W, et al. How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? *Eur J Neurosci.* 2005;22(2):495-504.
12. Laste G, Caumo W, Adachi LN, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PR, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp Brain Res.* 2012;221(1):75-83.
13. Spezia Adachi LN, Caumo W, Laste G, Fernandes Medeiros L, Ripoll Rozisky J, de Souza A, et al. Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Res.* 2012;1489:17-26.
14. Cioato SG, Medeiros LF, Marques Filho PR, Vercelino R, de Souza A, Scarabelot VL, 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 Stimul.* 2015;9(2):209-17.
15. Medeiros LF, de Souza IC, Vidor LP, de Souza A, Deitos A, Volz MS, et al. Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: a review. *Front Psychiatry.* 2012;3:110.
16. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eight. Washington, D.C.: The National Academies Press; 2011. 1-102p.
17. Killkenny 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):1-6.
18. 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.
19. Lopes BC, Medeiros LF, Silva de Souza V, Cioato SG, Medeiros HR, Regner GG, 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.* 2020;13(3):774-82.
20. Filho PR, Vercelino R, Cioato SG, Medeiros LF, de Oliveira C, Scarabelot VL, 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-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2016;64:44-51.
21. Spezia Adachi LN, Quevedo AS, de Souza A, Scarabelot VL, Rozisky JR, de Oliveira C, et al. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Exp Brain Res.* 2015;233(5):1377-89.
22. Takano Y, Yokawa T, Masuda A, Niimi J, Tanaka S, Hironaka N. A rat model for mea-

- suring the effectiveness of transcranial direct current stimulation using fMRI. *Neurosci Lett.* 2011;491(1):40-3.
23. Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimul.* 2008;1(3):206-23.
24. Antal A, Nitsche MA, Paulus W. Transcranial direct current stimulation and the visual cortex. *Brain Res Bull.* 2006;68(6):459-63.
25. Rosen A, Ramkumar M, Nguyen T, Hoeft F. Noninvasive transcranial brain stimulation and pain. *Curr Pain Headache Rep.* 2009;13(1):12-7.
26. Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJL, Rocha RR, Natalle L, et al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 2006;54(12):3988-98.
27. Ozaki Y, Kitamura N, Tsutsumi A, Dayanithi G, Shibuya I. NGF-induced hyperexcitability causes spontaneous fluctuations of intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat nociceptive dorsal root ganglion neurons. *Cell Calcium.* 2009;45(3):209-15.
28. Taiwo YO, Levine JD, Bruch RM, Woo JE, Mobley WC. Hyperalgesia induced in the rat by the amino-terminal octapeptide of nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:5144-8.
29. Lin CL, Heron P, Hamann SR, Smith GM. Functional distinction between NGF-mediated plasticity and regeneration of nociceptive axons within the spinal cord. *Neuroscience.* 2014;272:76-87.
30. Svensson P, Cairns BE, Wang K, Arendt-Nielsen L. Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain.* 2003;104(1-2):241-7.
31. Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT, Chaudhury V, Flexner C, Wachsmann M, et al. The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann Neurol.* 1994;36(2):244-6.
32. Khan N, Smith MT. Neurotrophins and neuropathic pain: role in pathobiology. *Molecules.* 2015;20(6):10657-88.
33. Huang J, Zhang X, McNaughton P. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol.* 2006;4(3):197-206.
34. Sevcik MA, Ghilardi JR, Peters CM, Lindsay TH, Halvorson KG, Jonas BM, et al. Anti-NGF therapy profoundly reduces bone cancer pain and the accompanying increase in markers of peripheral and central sensitization. *Pain.* 2005;115(1-2):128-41.
35. Shelton DL, Zeller J, Ho W-H, Pons J, Rosenthal A. Nerve growth factor mediates hyperalgesia and cachexia in auto-immune arthritis. *Pain.* 2005;116(1-2):8-16.
36. Röhn TA, Ralvenius WT, Paul J, Bortner P, Hernandez M, Witschi R, et al. A virus-like particle-based anti-nerve growth factor vaccine reduces inflammatory hyperalgesia: potential long-term therapy for chronic pain. *J Immunol.* 2011;186(3):1769-80.
37. Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. Brain microglia/macrophages selectively regulate microglial express neurotrophins that proliferation and function. *J Neurosci.* 1996;7(8):2508-21.
38. Du Y, Dreyfus CF. Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J Neurosci Res.* 2002;68(6):647-54.
39. Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes--Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 1993;54(1):15-36.
40. Øren A, Falk K, Röttschke O, Bechmann I, Nitsch R, Gimsa U. Production of neuroprotective NGF in astrocyte - T helper cell cocultures is upregulated following antigen recognition. *J Neuroimmunol.* 2004;149(1-2):59-65.
41. Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev.* 2006;51(2):240-64.
42. Austin PJ, Moalem-Taylor G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol.* 2010;229(1-2):26-50.
43. Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract.* 2010;10(3):167-84.
44. Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A. Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokin. *Trends Neurosci.* 1996;19(11):514-20.
45. Brown A, Weaver LC. The dark side of neuroplasticity. *Exp Neurol.* 2012;235(1):133-41.
46. Lane NE, Schnitzer TJ, Birbara CA, Mokhtarani M, Shelton DL, Smith MD, et al. Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med.* 2010;363(16):1521-31.
47. Bergmann I, Reiter R, Toyka K V, Koltzenburg M. Nerve growth factor evokes hyperalgesia in mice lacking the low-affinity neurotrophin receptor p75. *Neurosci Lett.* 1998;255(2):87-90.
48. Wild KD, Bian D, Zhu D, Davis J, Bannon AW, Zhang TJ, et al. Antibodies to nerve growth factor reverse established tactile allodynia in rodent models of neuropathic pain without tolerance. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;322(1):282-7.
49. Bellaver B, dos Santos JB, Leffa DT, Bobermin LD, Roppa PHA, da Silva Torres IL, et al. Systemic inflammation as a driver of brain injury: the astrocyte as an emerging player. *Mol Neurobiol.* 2018;55(3):2685-95.
50. Fregni F, Freedman S, Pascual-Leone A. Recent advances in the treatment of chronic pain with non-invasive brain stimulation techniques. *Lancet Neurol.* 2007;6(2):188-91.
51. Moreno-Duarte I, Morse LR, Alam M, Bikson M, Zafonte R, Fregni F. Targeted therapies using electrical and magnetic neural stimulation for the treatment of chronic pain in spinal cord injury. *Neuroimage.* 2014;85(3):1003-13.
52. Pascoal-Faria P, Yalcin N, Fregni F. Neural markers of neuropathic pain associated with maladaptive plasticity in spinal cord injury. *Pain Pract.* 2015;15(4):371-7.

