

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



**TESE DE DOUTORADO**

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA RESPOSTA ANTINOCICEPTIVA  
INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE  
CONTÍNUA (ETCC) EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DOR  
NEUROPÁTICA

BETTEGA COSTA LOPES

Porto Alegre, 2021

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



**TESE DE DOUTORADO**

EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA RESPOSTA ANTINOCICEPTIVA  
INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE  
CONTÍNUA (ETCC) EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DOR  
NEUROPÁTICA

BETTEGA COSTA LOPES

**Orientadora:** Profa. Dra. Iraci L. S. Torres

**Coorientadora:** Profa. Dra. Liciane F. Medeiros

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Fisiologia – UFRGS, como  
requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, 2021

*“If you think education is expensive, try ignorance”.*

**- Derek Bok**

*Aos meus pais*

ii

## AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial, meu pai João F. B. Lopes (*in memoriam*) meu maior amigo, companheiro e incentivador. A minha mãe, Rozalia C. Lopes e meus irmãos Ítalo C. Lopes e Yuri C. Lopes pelo apoio incondicional ao longo destes anos. Amo vocês.

A minha orientadora, Profa. Dra. Iraci L. S. Torres, pela sapiência, dedicação e orientação. Obrigado por acreditar em mim. Serei eternamente grato.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Liciane F. Medeiros pelo companheirismo pessoal e científico.

Pela convivência, amizades, e discussões científicas oportunizadas por todos os integrantes do Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-Clínicas – LaFDor do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-HCPA.

Aos integrantes e companheiros de “repartição” do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia-LEHG.

Ao HCPA pelas excelentes condições de trabalho, em especial: a Unidade de Experimentação Animal-UEA, Unidade de Análise Molecular e de Proteínas-UAMP, Unidade de Patologia Experimental-UPE, e Engenharia Biomédica pelo suporte na realização dos experimentos comportamentais, bioquímicos e moleculares.

A UFRGS, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, onde fiz toda minha formação (iniciação científica, mestrado e doutorado).

Aos Professores e colegas da Pós-Graduação e todos os demais funcionários do Instituto de Ciências Básicas da Saúde-ICBS pelos ensinamentos perpetuados ao longo destes anos.

As agências de fomento e amparo à pesquisa pelos financiamentos concedidos, porém cada vez mais dizimadas em tempos de obscurantismo, negacionismo e ataques a soberania da ciência: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (bolsa de Doutorado), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Edital Universal), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul-FAPERGS (Pesquisador Gaúcho e Internacionalização), Fundo de Incentivo à Pesquisa-FIPE-HCPA (financiamento para realização dos experimentos).

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Dor: uma abordagem fisiológica, neuroimune e comportamental integradas .....	2
1.2 ETCC na dor crônica .....	10
1.3 Exercício físico na saúde e na doença .....	15
1.4 ETCC e exercício físico .....	20
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>3. HIPÓTESES</b> .....	24
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	26
4.1 Geral .....	27
4.2 Específicos .....	27
<b>5. MÉTODOS E RESULTADOS</b> .....	28
5.1 Artigo 1 .....	29
5.2 Artigo 2 .....	39
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	76
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83
<b>8. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	85
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	87
<b>ANEXOS</b> .....	122
Anexo Ia. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais .....	123
Anexo Ib. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais .....	124
Anexo II. Produção acadêmica durante o doutorado .....	125
<b>APÊNDICE</b> .....	135
Apêndice I .....	136

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACSM	colégio americano de medicina do esporte
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico
ATP	trifosfato de adenosina
BDNF	fator neurotrófico derivado do encéfalo
Ca <sup>2+</sup>	íons cálcio
CB	receptores ligantes de canabinoides
CCA	córtex cingulado anterior
CCI	constrição crônica do nervo isquiático
dICPF	córtex pré-frontal dorsolateral
DNIC	controle inibitório nocivo difuso
DRG	gânglio da raiz dorsal
ETCC	estimulação transcraniana por corrente contínua
GABA	ácido gama aminobutírico
GluA 2	subunidade 2 do receptor de glutamato do tipo AMPA
HHA	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IL	interleucina
JAK	janus cinase
KCC2	cotransportador que extrui 1 potássio e 2 íons cloreto
LC	<i>locus coeruleus</i>
LTP	potenciação de longo prazo
M1 ou M2	classe de macrófagos pró e anti-inflamatórios, respectivamente
Na <sup>+</sup>	íons sódio
NF-κB	nuclear factor kappa B
NGF	fator de crescimento do nervo
NK-1R	receptor de neurocinina do tipo 1
NMDA	<i>N</i> -metyl-D-aspartato
NR	núcleos da rafe
NR2B	subunidade 2B do receptor de glutamato do tipo NMDA
P2X	receptor purinérgico
p38/MAPK	proteínas cinases ativadas por mitógenos
PAG	substância cinzenta periaquedutal
RVM	bulbo rostroventromedial

sTNFr	receptor solúvel de TNF- $\alpha$
SERT	transportador de serotonina
Smad	fatores de transcrição relacionados a proteínas Smad
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
STAT	transdutor de sinal e ativador de fatores de transcrição
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
TGF- $\beta$	fator de transformação de crescimento beta
TLR-4	receptor do tipo “ <i>toll</i> ” 4
TrkA	receptor de tropomiosina cinase A
TrkB	receptor de tropomiosina cinase B
TRPV1	potencial receptor transitório vaniloide do tipo 1
WDR	neurônios de amplo espectro dinâmico
5-HTR	receptores de serotonina
$\alpha$ -2R	receptores alfa 2 adrenérgicos
$\mu$ , $\kappa$ e $\delta$	receptores opioides do tipo mu, kappa e delta, respectivamente



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Neurobiologia da dor: interface entre o SNP e o SNC .....	8
<b>Figura 2.</b> Mecanismos moduladores do comportamento nociceptivo .....	13
<b>Figura 3.</b> Efeitos benéficos do exercício físico sobre o comportamento .....	18

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Síntese dos resultados sobre os parâmetros comportamentais .....	82
<b>Tabela 2.</b> Síntese dos resultados sobre os parâmetros bioquímicos.....	82

## RESUMO

**Introdução:** Dor neuropática crônica origina-se por lesão ou doença no sistema nervoso somatossensorial, e é frequentemente acompanhada por comorbidades como ansiedade, depressão, *déficits* cognitivos, redução na qualidade de vida, dentre outros. Além do aspecto multidimensional, a refratariedade ao tratamento farmacológico faz com que o manejo desta doença se torne um desafio. Logo, a busca por terapêuticas complementares que contribuam no tratamento da dor crônica e suas comorbidades devem ser encorajados.

**Objetivos:** Investigar os efeitos da associação entre a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) e exercício sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em ratos submetidos a um modelo de dor neuropática. **Materiais e métodos:** Ratos Wistar (~ 60 dias) foram inicialmente divididos em 3 grupos: controle; *sham*-dor e dor. A dor neuropática foi induzida pela constrição crônica do nervo isquiático esquerdo (CCI) sob anestesia com isoflurano. No 14º dia, os animais foram subdivididos em 13 grupos: controle; *sham*-dor; *sham*-dor+*sham*/ETCC; *sham*-dor+exercício; *sham*-dor+ETCC; *sham*-dor+*sham*/ETCC+exercício; *sham*-dor+ETCC+exercício; dor; dor+*sham*/ETCC; dor+exercício; dor+ETCC; dor+*sham*/ETCC+exercício; dor+ETCC+exercício. Hiperalgia mecânica e térmica foram avaliadas pelos testes do von Frey e placa quente nos tempos: basal; 7º e 14º dias após a CCI, e imediatamente, 24h e 7 dias após os tratamentos. O comportamento do tipo ansioso foi avaliado por meio do labirinto em cruz elevado (*elevated plus maze-EPM*) 24h e 7 dias após a última sessão de tratamento. Do 15º ao 22º dia, os ratos receberam ETCC bimodal (0.5mA), exercício (70%  $VO_{2máx}$ ) ou a combinação de ambos uma vez ao dia por 20 minutos. Em 48h ou 7 dias após o final dos tratamentos, os ratos foram eutanasiados, e o córtex cerebral, hipocampo, tronco encefálico, medula espinhal e nervo isquiático foram coletados para dosagens de citocinas e fatores neurotróficos pela técnica de ELISA. Dados comportamentais foram analisados pela equação de estimativas generalizadas (GEE) ou ANOVA de 3 vias seguida de Bonferroni; e os resultados bioquímicos foram analisados por ANOVA de 3 ou 4 vias seguida de Bonferroni. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela CEUA/HCPA: #20170061; #20180034. **Resultados:** Em nosso estudo observamos que a ETCC e/ou exercício físico reverteram completamente a hiperalgia térmica em todos os períodos de tempo analisados, enquanto que a hiperalgia mecânica foi parcialmente revertida e promoveu um efeito sinérgico em 7 dias após o término do tratamento. Em relação ao comportamento do tipo ansioso, foi observado que a ETCC combinado ao

exercício aumentou o número de entradas nos braços abertos (EOA) e reduziu o tempo de permanência nos braços fechados (TCA). Do ponto de vista bioquímico, observamos que a associação entre ETCC e exercício, aumentou os níveis de BDNF (7 dias) e reduziu a IL-4 no córtex cerebral. No hipocampo, a combinação entre tratamentos desencadeou efeitos opostos ao longo do tempo, em 48h após o final dos tratamentos houve um aumento no conteúdo de BDNF, enquanto que no 7º dia, foi observado uma redução nos níveis desta neurotrofina e de TNF- $\alpha$ . Em relação ao tronco encefálico e medula espinhal (7 dias), a ETCC combinada ao exercício aumentou os níveis de IL-4, enquanto que no nervo isquiático houve um aumento no BDNF (48 h) e IL-10 (7 dias) promovidos pelas técnicas combinadas. **Conclusão:** Em resumo, nossos achados demonstram que a combinação de técnicas neuromoduladoras é eficaz em promover efeitos antinociceptivos e ansiolíticos por meio da modulação de parâmetros bioquímicos e moleculares em estruturas do sistema nervoso periférico e central. Portanto, estas terapêuticas não farmacológicas são promissoras adjuvantes no tratamento da dor crônica e suas comorbidades. Adicionalmente, é possível observar que estas técnicas promovem a modulação de parâmetros neuroquímicos de forma tecido, estado ou tempo-dependente.

**Palavras-chave:** dor neuropática; ansiedade; ETCC; exercício físico; citocinas; fatores neurotróficos

## ABSTRACT

**Background:** Neuropathic pain arises from an injury or disease in the peripheral or central nervous system, being accompanied by comorbidities such as anxiety, depression, cognitive impairments, reduction of quality of life, among others. In addition to the multidimensional aspect, the refractoriness to the pharmacological treatment makes the management of this disease a challenge. Therefore, the search for complementary therapies that add to the chronic pain treatment and its comorbidities should be encouraged. **Aim:** To investigate the effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) combined with exercise on behavioral and biochemical parameters in rats subjected to a neuropathic pain model. **Material and methods:** Male Wistar rats (~ 60 days) were divided into 3 groups: control; sham-pain e pain. Neuropathic pain was induced by chronic constriction injury of the left sciatic nerve (CCI) under isoflurane anesthesia. On 14<sup>o</sup> day, rats were subdivided into 13 groups: control; sham-pain; *sham-pain+sham/tDCS*; *sham-pain+exercise*; *sham-pain+tDCS*; *sham-pain+sham/tDCS+exercise*; *sham-pain+tDCS+exercise*; pain; pain+*sham/tDCS*; pain+exercise; pain+tDCS; pain+*sham/tDCS+exercise*; pain+tDCS+exercise. Mechanical and thermal hyperalgesia were assessed by von Frey e hot plate tests at: baseline; 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> days after CCI, and immediately, 24h e 7 days after the end of treatments. Anxiety-like behavior was assessed in the elevated plus maze (EPM) at 24h e 7 days after the last treatment session. From 15<sup>th</sup> up to 22<sup>nd</sup> day, rats received bimodal tDCS (0.5mA), exercise (70% VO<sub>2max</sub>) or the combination of both once a day for 20 minutes. At 48h or 7 days after the end of treatments, rats were killed, and the cerebral cortex, hippocampi, brainstem, spinal cord and sciatic nerve were harvested for cytokines and growth factors quantification by ELISA. Behavioral data were analyzed by generalized estimate equations (GEE) or 3-way ANOVA followed by Bonferroni; whilst biochemical data were analyzed by 3 or 4-way ANOVA/Bonferroni. All experimental procedures were approved by CEUA/HCPA #20170061; #20180034. **Results:** In our study, it was observed that tDCS and/or physical exercise fully reverted thermal hyperalgesia in all time point assessed, while mechanical hyperalgesia was partially reverted and promoted a synergistic effect on the nociceptive threshold at 7 days after the end of treatment. Regarding anxiety-like behavior, it was noted that tDCS combined with exercise increased the number of entries in the open arms (EOA), and decreased the time spent in the closed arms (TCA). Of a biochemistry point-of-view, it was observed that the

combination of tDCS and exercise, increased BDNF levels (7 days) and decreased IL-4 levels in the cerebral cortex. In the hippocampi, the combination of treatments triggered opposite effects throughout time; at 48h after the end of treatments, there was an increased BDNF levels, whilst at 7<sup>o</sup> day, it was observed a decreased BDNF and TNF- $\alpha$  levels. Regarding brainstem and spinal cord (7 days), the combination of both therapies increased the IL-4 levels, whilst in the sciatic nerve, there was an increased BDNF (48h) e IL-10 (7 days) levels promoted by both. **Conclusion:** In sum, our findings demonstrate that the combination of neuromodulatory techniques promote antinociceptive and anxiolytic-like effects. Therefore, such non-pharmacological approaches are promising adjuvants in the chronic pain management and its comorbidities. Additionally, it is possible to observe that these techniques promote the modulation of neurochemical parameters in a tissue, state or time-dependent fashion.

**Keywords:** neuropathic pain; anxiety; tDCS; physical exercise; cytokines; neurotrophic factors



## 1.1 Dor: uma abordagem fisiológica, neuroimune e comportamental integradas

Experiências cotidianamente vivenciadas estão sempre vinculadas, mesmo que indiretamente, a um determinado estímulo sensorial. Nocicepção e dor, por exemplo, apesar de apresentarem componentes evolutivos essencialmente protetores interespecies (Lister et al., 2020; Khuong et al., 2019), também são experiências complexas e amplamente dinâmicas, em que, um dado estímulo promove distintos padrões de respostas entre indivíduos (Perrot-Minott et al., 2017; Crook et al., 2014). Isto significa que a natureza dos componentes sensorial-discriminativo, e as qualidades afetivo-emocionais envolvidas são diferentemente moldados de indivíduo para indivíduo. É baseado na pluralidade dos mecanismos e sistemas envolvidos, que a Associação Internacional para Estudos da Dor (do inglês: *International Association for the Study of Pain - IASP*), conceitualmente a define como uma experiência sensorial e emocional, associada ou semelhante àquela associada com dano real ou potencial ao tecido (Raja et al., 2020).

Em casos onde há lesão aguda, a inflamação local resultante desencadeia inicialmente a ativação de terminações nervosas livres por meio da liberação e síntese de inúmeros mediadores como glutamato, prostaglandinas, citocinas, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), bradicinina, trifosfato de adenosina (ATP), dentre outros (Iyengar et al., 2017; Kawasaki et al., 2008). Estas substâncias, por sua vez, atuam sobre nociceptores do tipo A $\delta$  e C (Djoughri et al., 2006), promovendo direta ou indiretamente aumentos na expressão gênica de receptores e abertura de canais iônicos. Estes eventos dão origem a subsequente transmissão da informação nociceptiva ao longo do sistema ântero-lateral até as diversas regiões do córtex cerebral onde a informação nociceptiva é interpretada sob múltiplos contextos (Fishman et al., 2010). Recentemente, estudos demonstraram que células de Schwann especializadas localizadas na epiderme e queratinócitos (Abdo et al., 2019; Baumbauer et al., 2015) iniciam a transdução do estímulo nociceptivo antes mesmo da ativação dos nociceptores. Embora tenha uma relação causa-efeito bem definida e seja fundamentalmente necessária em resposta a processos regenerativos, a dor inflamatória aguda tende a fisiologicamente se dissipar dentro de até 2 semanas, conforme a resolução do processo inflamatório.

Por outro lado, a dor crônica não é um simples continuum da dor aguda. A dor crônica pode originar-se por neuropatias provenientes de lesões no sistema nervoso periférico e/ou central (Treede et al., 2015), tratamento com quimioterápico (Seretny et



al., 2014), ou mesmo por causas não completamente elucidadas como fibromialgia e dor psicogênica (Nakamura et al., 2014; Wolfe et al., 1990). A dor crônica, caracteriza-se por não apresentar relação causa-efeito bem definida, ser incapacitante e geralmente tem duração igual ou superior a 3 meses. Contudo, deve-se enfatizar que, independentemente do padrão temporal da dor (aguda ou crônica), a exposição a estímulos aparentemente inócuos produz dor (alodinia), enquanto que estímulos geralmente dolorosos exacerbam a sensibilidade a dor (hiperalgesia primária) ou ao redor de uma área previamente sensibilizada (hiperalgesia secundária) em virtude do aumento no campo receptivo e perda da inibição lateral (Basbaum et al., 2009).

As alterações envolvidas no processo de cronificação da dor incluem, por exemplo, a perda do controle inibitório exercido pelas fibras do tipo A $\beta$ , aumentos na excitabilidade celular por meio da geração de focos ectópicos, que então alteram as propriedades intrínsecas dos neurônios, gerando disfunções no sistema de analgesia descendente, bem como, modificações de longo prazo no sistema imune (Nijs et al., 2012; Balasubramanyan et al., 2006; Melzack & Wall, 1965). É importante acrescentar que em nível celular; especificamente no corno dorsal da medula espinhal, local onde ocorre a primeira sinapse e a subsequente integração das aferências nociceptivas periféricas (principalmente nas lâminas I e II), outros 2 fenômenos estão presentes: a somação gradual e repetitiva de *inputs* de baixa frequência em fibras do tipo C (*wind-up*) mediada pelo glutamato e substância P sobre seus receptores do tipo N-metil-D-aspartato e neurocinina (NMDA e NK-1R, respectivamente), e a facilitação hetero sináptica de alta frequência (do inglês: *long-term potentiation - LTP*) (Latremoliere & Woolf, 2009). Estes fatores são características elementares no processo de cronificação da dor e contribuem para o fenômeno denominado de sensibilização central, onde a dor, já não resulta unicamente na presença de um estímulo nociceptivo periférico, mas é ocasionada por meio de uma série de alterações mal adaptativas e neuro funcionais ao longo da matriz da dor (Woolf, 2011).

Esta plasticidade não se restringe apenas às alterações em nível periférico e medular, mas compromete também regiões do tronco encefálico, tálamo e, principalmente, do neocórtex (Baliki et al., 2008). A reorganização promove o remodelamento funcional em regiões envolvidas no controle motor, processamento executivo e controle emocional (Rusanescu & Mao, 2017; Yalcin et al., 2014). Desta forma, é inerente inferirmos que quadros de dor crônica, geralmente cursam com outros transtornos como ansiedade, depressão, *déficits* mnemônicos e cognitivos (Cardoso-Cruz

et al., 2013; Metz et al., 2009). Corroborando o exposto acima, estudos demonstraram que, indivíduos com dor crônica apresentaram reduções em até 11% no volume do córtex pré-frontal dorsolateral (dlCPF) (Apkarian et al., 2004), e do hipocampo (Mutso et al., 2012). Por outro lado, não está totalmente elucidado como “ser ou estar” ansioso e/ou depressivo influencia no desenvolvimento de dor crônica. Por exemplo, estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que, indivíduos com sintomas de depressão ou de ansiedade que foram submetidos a um teste sensorial de dor, eram mais predispostos a apresentarem uma condição sensibilizada quando comparados a seus respectivos pares (Berna et al., 2010; Roeska et al., 2009; Ploghaus et al., 2001) evidenciando que as expectativas prévias, modulam a percepção sobre como um determinado estímulo é percebido.

Deve-se ressaltar que diferentes estruturas corticais e subcorticais exercem importante influência no processamento nociceptivo ao modular direta ou indiretamente áreas fundamentais para o controle da nocicepção por meio de projeções descendentes para o tronco encefálico e medula espinhal (Huang et al., 2019; Chen et al., 2018; Cheriyan & Sheets, 2018; Sellmeijer et al., 2018). A substância cinzenta periaquedutal (PAG), bem como o bulbo rostroventromedial (RVM), constituem-se de importantes centros que recebem, integram e projetam para regiões adjacentes envolvidas no processamento nociceptivo incluindo a ativação de neurônios noradrenérgicos no *locus ceruleus* (LC) e serotoninérgicos nos núcleos da rafe (RN) (Mills et al., 2018). Estas estruturas, por sua vez, exercem papel determinantemente bidirecional sobre a nocicepção, em que a resultante ativação destas vias, dependerá de uma série de fatores, como o neurotransmissor e o tipo de receptor envolvido. Por exemplo, PAG e RVM são estruturas responsivas a analgesia mediada por opioides como a morfina, podendo também exercer efeitos pró nociceptivos e ansiogênicos quando um neuropeptídeo (colecistocinina) foi administrado (Jiang et al., 2019; Lovick, 2008). Esta dicotomia também é observada nos efeitos promovidos pela serotonina: enquanto a ativação do receptor 5-HT<sub>1</sub> (Viisanen & Pertovaara, 2010) e 5-HT<sub>7</sub> promove efeitos antinociceptivos; os receptores 5-HT<sub>2/3</sub>, desencadeiam efeitos pró nociceptivos (Dogrul et al., 2009; Sasaki et al., 2006), que na RVM é mediada também via ativação de células do tipo ON, em detrimento das OFF (Fields et al., 1995). Em síntese, deve-se enfatizar que tanto vias corticopetais quanto corticofugais desempenham um papel primordial sobre o controle da informação nociceptiva contribuindo assim para a modulação da informação em diferentes níveis. No entanto, é importante salientar que o processo de cronificação da

dor e o desenvolvimento de estados patológicos envolve também a tríade entre sistema nervoso periférico-central e imunológico (Scholz & Woolf, 2007).

Na dor neuropática desencadeada por uma lesão ou doença no sistema nervoso somatossensorial (Colloca et al., 2017), a interação entre neurônios e neurotransmissores com células da glia periférica (Schwann) e central (astrócitos e micróglia), (Nam et al., 2016) além da supressão da atividade de células T regulatórias (Treg) e aumento na resposta Th1, contribuem para o desenvolvimento e na manutenção da hiperalgesia térmica e alodinia mecânica (Davoli-Ferreira et al., 2020). Estas alterações fisiopatológicas potencializam o desequilíbrio entre excitação vs inibição e são mediadas via liberação de citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos que exercem um papel predominantemente facilitador ao diminuírem o limiar de ativação dos nociceptores (Ji et al., 2018).

Acredita-se que os efeitos promovidos pelas citocinas e algumas neurotrofinas ocorram por meio da fosforilação de diversas vias de sinalização intracelulares, incluindo o NF- $\kappa$ B e p38/MAPK (principalmente pró inflamatórias) (Gonçalves dos Santos et al., 2020), bem como JAK/STAT e Smad (principalmente anti-inflamatórias) (de la Puerta et al., 2019; Chen et al., 2013; Gadani et al., 2012), sua subsequente translocação para o núcleo, seguida pela ativação de fatores de transcrição e regulação da expressão gênica. Em suporte a este ponto de vista, tem sido sugerida a hipótese de que, o aumento sustentado no conteúdo de citocinas pró inflamatórias tenha relação direta com o desenvolvimento de inúmeras outras comorbidades como ansiedade e depressão (Maldonado-Bouchard et al., 2016; Zhu et al., 2006). Logo, a atenuação da hiperexcitabilidade induzida por mediadores pró-inflamatórios, bem como o uso de anticorpos monoclonais constituem-se em importantes meios terapêuticos para o desenvolvimento de estratégias destinadas ao manejo da dor crônica, dado que, atualmente, não existe tratamento eficaz para esta condição, somado ao fato de que o uso indevido de potentes analgésicos como os opioides têm promovido crises sanitárias de grandes proporções (Dowell et al., 2016).

Considerando o exposto acima, deve se enfatizar ainda, que, as ativações das vias do TLR-4, NF- $\kappa$ B e do inflamassoma na micróglia pela administração intraperitoneal de morfina em ratos, postergou a recuperação da dor inflamatória (Green-Fulghan et al., 2019) e, paradoxalmente, da dor neuropática crônica (Grace et al., 2016), comparado a seus pares, pelo aumento na produção de mediadores da inflamação. Estes achados reforçam que a utilização de fármacos opioides em determinadas situações não deve ser

adotada no manejo farmacológico da dor crônica, principalmente para evitar a dependência e demais efeitos adversos como constipação, depressão respiratória e até mesmo a morte (Dowell et al., 2016). Além disso, estudos corroboram a hipótese de que opioides sejam recomendados apenas na menor dose efetiva sob controle de diversas variáveis de risco, e que a utilização de inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina sejam priorizados como primeira linha de tratamento para pacientes com dor crônica (Finnerup et al., 2015). Ademais, é importante destacar a contribuição que outros mediadores neuroquímicos têm, quando levamos em consideração o binômio dor e comportamento nociceptivo como, por exemplo, o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias.

Estudos demonstraram que, a porcentagem de macrófagos (M1, ou pró inflamatório) e o receptor de IL-4 (IL-4R $\alpha$ ), mas não sua proteína (IL-4) foram sensibilizados (*upregulation*), na medula espinhal de ratos submetidos a um modelo de dor crônica e inflamatória (Kiguchi et al., 2015; Fenn et al., 2011). Dado que a IL-4 apresenta potentes efeitos anti-inflamatórios, é possível que seu *downregulation* seja um fator predisponente para o desenvolvimento da dor crônica, já que a aplicação desta citocina na medula espinhal de ratos submetidos à CCI promoveu uma mudança de classe dos macrófagos para M2 (anti-inflamatório), que também começaram a secretar peptídeos opioides (Celik et al., 2020). Da mesma forma que as citocinas anti-inflamatórias, a administração intratecal de IL-1ra (o antagonista do receptor de IL-1 $\beta$ ) e o bloqueio do receptor de TNF- $\alpha$  apresentaram efeitos antinociceptivos (Sweitzer et al., 2001). Adicionalmente, também foi demonstrado que a IL-10, bem como TGF- $\beta$ 1 exercem importantes efeitos antinociceptivos e na regeneração por meio da inibição da produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 (He et al., 2013; Chen et al., 2013). Por outro lado, apesar dos indesejados papéis pró nociceptivos, animais *knockout* para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e a ausência de IL-6 desencadearam *déficits* locomotores durante a recuperação da lesão no nervo isquiático e na medula espinhal (Leibinger et al., 2021; Nadeau et al., 2011), sugerindo que a neutralização da ação pró-inflamatória é prejudicial para finalidades regenerativas. Estes resultados sugerem que, apesar das citocinas pró inflamatórias terem um papel fisiopatológico em aumentarem a responsividade de neurônios nociceptivos; também há uma inerente participação na regeneração dos nervos periféricos e, que estratégias terapêuticas com enfoque na indução do fenótipo M2 para consequente inibição da nocicepção podem ser alternativas para o manejo da dor crônica.

De modo geral, os mecanismos envolvidos na neuroinflamação ainda permanecem pouco compreendidos (Chapman & Vierck, 2017). Contudo, estudos demonstraram que a aplicação de capsaicina ou a lesão no nervo isquiático resultaram no aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica e a subsequente infiltração de linfócitos T nas leptomeninges (espaço compreendido entre a aracnoide e a pia-máter), contribuindo assim para a disseminação da neuroinflamação ao longo do SNC (Beggs et al., 2010; Costigan et al., 2009). Também foram observadas possíveis associações entre o aumento no comportamento do tipo ansioso e depressivo após o *upregulation* de uma série de marcadores pró-inflamatórios na micróglia, incluindo IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática (Xu et al., 2018; Liu et al., 2017). Além disso, o elevado conteúdo de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo de ratos submetidos a modelo de dor crônica, ou inflamatória assim como ao estresse crônico impactou negativamente a neurogênese hipocampal (Romero-Grimaldi et al., 2015; del Rey et al., 2011; Duric & McCarson, 2006). Já em estudos clínicos, elevados níveis do receptor solúvel de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no líquido, e relações TNF- $\alpha$ /IL-10 e TNF- $\alpha$ /IL-4 aumentadas no soro, correlacionaram-se positivamente com a intensidade da dor, e com maiores escores de ansiedade, respectivamente (Hou et al., 2017; Backonja et al., 2008). Estes achados demonstram que os aspectos afetivos e emocionais como ansiedade e sinalização imune estão intimamente relacionados e que a compreensão mais detalhada sobre como estes e outros mediadores neuroquímicos, incluindo as neurotrofinas desencadeiam uma série de respostas comportamentais e neuroquímicas, necessita ser melhor investigada.

As neurotrofinas, especificamente em sua forma madura, exercem um papel primordial na sobrevivência, nutrição, proliferação e, principalmente, regeneração neuronal, porém paradoxal frente a diferentes condições de dor crônica (Khan & Smith, 2015). Por exemplo, quando aplicado por via intratecal, o complexo NGF/TrkA promove efeitos antinociceptivos e reduz a astrogliose no DRG (Cirillo et al., 2010). Em contrapartida, quando a aplicação foi feita periféricamente (nervo isquiático) (Jing et al., 2009) os efeitos observados foram, majoritariamente, pró nociceptivos. Contrariamente, foi observado que a recuperação da função sensorial está condicionada à dose e duração da aplicação de NGF diretamente no local da lesão (Kemp et al., 2011). Portanto, acredita-se que NGF exerça um mecanismo indireto de sensibilização, envolvendo principalmente a ativação de vias intracelulares e a subsequente translocação e ativação de receptores TRPV1 na membrana celular (Zhang et al., 2005), um canal não seletivo para cátions

envolvido na transdução de estímulos térmicos nociceptivos (Cui et al., 2006). Em síntese, a compreensão detalhada dos mecanismos de ação pelos quais o NGF ora desempenhe efeitos pró, ora antinociceptivos deve ser melhor elucidada.

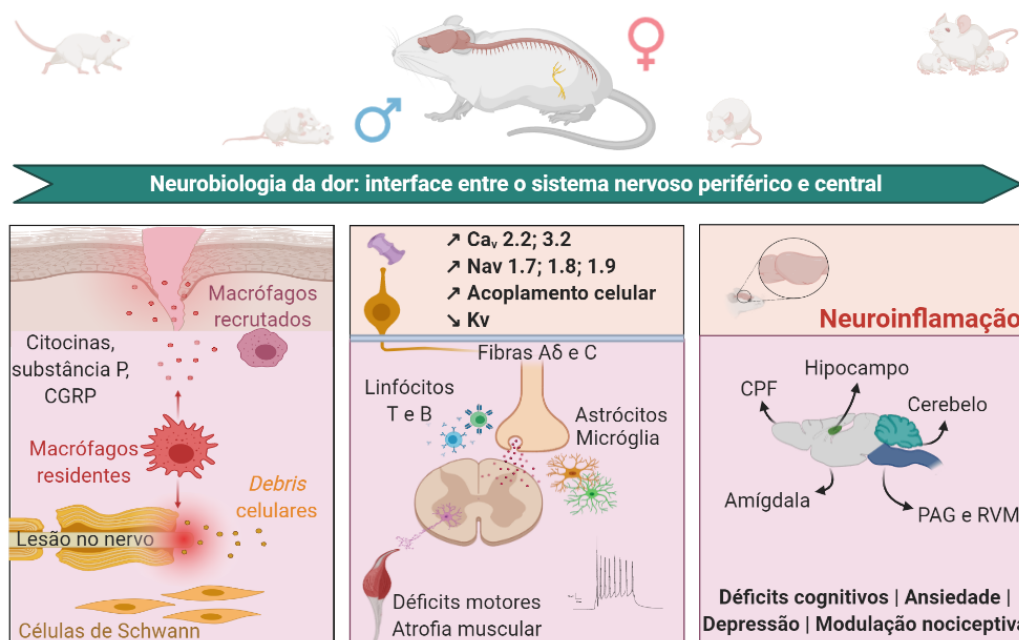
Na dor neuropática crônica, por exemplo, acredita-se ainda que o BDNF tenha um papel fundamental na regeneração, bem como no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia térmica e alodinia mecânica (Su et al., 2018; Chen et al., 2014). Estes efeitos pró nociceptivos são promovidos por meio do aumento na excitabilidade celular desencadeada pelo *downregulation* do cotransportador KCC2 em estruturas chaves para o processamento nociceptivo como medula espinhal, tálamo ventro-póstero-lateral e córtex somatossensorial primário (Mòdol et al., 2014), bem como pela ativação de receptores purinérgicos (P2X<sub>4</sub> e P2X<sub>7</sub>) em resposta ao ATP e a subsequente liberação de BDNF por células gliais no corno dorsal da medula espinhal (Ulmann et al., 2008). Adicionalmente, deve-se ressaltar que a sinalização entre BDNF/TrkB promove a LTP em nociceptores do tipo C mediada pelo *upregulation* e ativação de receptores glutamatérgicos permeáveis ao cálcio (NR2B e GluA2) e o subsequente aumento na atividade em neurônios de amplo espectro dinâmico (WDR) na medula espinhal, contribuindo assim para sensibilização central observada na dor neuropática (Ding et al., 2015; Goffer et al., 2013).

Ao encontro do que tem sido abordado até aqui, as alterações fisiopatológicas, comportamentais e bioquímicas observadas em modelos de dor crônica ocorrem ao longo de todo neuroeixo. Por exemplo, foi demonstrado que os níveis de BDNF no núcleo accumbens e amígdala, importantes estruturas envolvidas com o sistema de recompensa e as emoções, estavam elevados em um modelo de CCI (Zhang et al., 2017) e que animais submetidos a um modelo de dor neuropática seguido pelo teste de preferência condicionada por lugar apresentaram preferência pelo compartimento previamente pareado com o fármaco analgésico, evidenciando que o alívio da dor também é uma experiência recompensadora (Navratilova et al., 2015). Corroborando estes achados, foi demonstrado que ratos submetidos a um modelo de dor neuropática apresentaram reduções no conteúdo de BDNF no hipocampo, um achado que foi correlacionado com desfechos de ansiedade, depressão e *déficits* mnemônicos (Zong et al., 2018; Autry & Monteggia, 2012).

Recentes avanços têm revelado ainda importantes dimorfismos sexuais na resposta inflamatória, imunológica, fisiológica e epigenética em estudos pré-clínicos, demonstrando que, diferente do que foi observado em machos, as fêmeas da geração F1

de roedores submetidos à CCI apresentaram um aumento na sensibilidade basal, enquanto que a manutenção da hiperalgesia mecânica induzida por um modelo de dor crônica foi mediado por linfócitos T, ao invés da micróglia (Tao et al., 2020; Sorge et al., 2015). Interessantemente, tais dimorfismos também foram observados sobre circuitos GABAérgicos no córtex responsáveis pelo controle da atividade antinociceptiva e do processamento executivo (Jones & Sheets, 2020; Shiers et al., 2018). Estes achados devem ser levados em consideração durante a elaboração e a condução de futuros estudos, bem como, na prática clínica, dado que a dor crônica acomete principalmente mulheres e que a responsividade a um determinado tratamento está suscetível a diversos fatores intervenientes, principalmente os hormonais (Mogil, 2012; Vanderhorst et al., 2005).

Em resumo, estes estudos reforçam nosso entendimento em relação à pluralidade e ao aspecto multidimensional de sistemas envolvidos demonstrando a importância de uma abordagem multidisciplinar no tratamento da dor crônica (Figura 1). Além disso, os tratamentos disponíveis atualmente para o manejo da dor crônica carecem de desfechos adequados na prática clínica. Desta forma, a utilização de estratégias não farmacológicas emerge como uma alternativa de baixo custo e de fácil acesso para o tratamento da dor e suas comorbidades.



**Figura 1.** Neurobiologia da dor: interface entre o SNP e SNC. CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; Na<sub>v</sub>, Ca<sub>v</sub> e K<sub>v</sub>: canais de sódio, cálcio e potássio regulados por voltagem, respectivamente. Fonte: o autor

## 1.2 ETCC na dor crônica

A aplicação de correntes elétricas em seres humanos data de séculos, sendo comumente utilizada para diversas finalidades, principalmente as terapêuticas. No entanto, as dificuldades na aplicação dessas técnicas, incluindo sérios eventos adversos e desconhecimento dos seus mecanismos de ação fez com que fossem ignoradas durante anos (Brunoni et al., 2012; Priori, 2003). Com o passar do tempo, contudo, dispositivos mais sofisticados e com controles mais precisos/adequados dos parâmetros de estimulação possibilitaram que diretrizes fossem desenvolvidas, ressurgindo assim, um novo campo de abordagem não farmacológica para o manejo de condições de doenças ou melhora da performance física e cognitiva (Okano et al., 2015; Fregni et al., 2005). Atualmente, tais técnicas têm sido utilizadas para fins diagnósticos e terapêuticos como é o caso da estimulação magnética transcraniana (do inglês: *transcranial magnetic stimulation* - *TMS*), e para fins reabilitadores como a estimulação transcraniana por corrente contínua (do inglês: *transcranial direct current stimulation* - *tDCS*) (Valero-Cabré et al., 2017).

ETCC é uma técnica de estimulação cerebral não invasiva, segura e de baixo custo, e que apresenta poucas contra indicações (implantes metálicos; marcapasso) e efeitos adversos (tontura; dor de cabeça) (Bikson et al., 2016). O princípio desta técnica, baseia-se na modulação da função e plasticidade cortical, por meio de uma fraca corrente elétrica aplicada sobre couro cabeludo. No entanto, é importante salientar que essas correntes não despolarizam os neurônios, mas os tornam mais ou menos susceptíveis a despolarização/hiperpolarização ao aumentarem ou diminuírem o limiar de repouso neuronal por meio de um campo elétrico estabelecido entre o ânodo e o cátodo, respectivamente (Nitsche et al., 2008; Liebetanz et al., 2002). Deve-se ressaltar ainda que, apesar da montagem dos eletrodos para estimulação ser direcionada para áreas em que se pretende estimular, a interconexão entre diferentes estruturas possibilita que outras regiões também sejam afetadas (Morya et al., 2019; Polanía et al., 2012). Portanto, protocolos de ETCC para a modulação de redes corticais neuronais devem levar em consideração parâmetros de estimulação como: polaridade aplicada (anodal/catodal), montagem dos eletrodos (bimodal ou extra cefálico), densidade de corrente (diâmetro do eletrodo vs corrente aplicada), frequência, número de sessões, bem como, parâmetros fisiológicos individuais como a condição do indivíduo (incluindo o uso de medicações), além de possíveis variáveis intervenientes, como a orientação das fibras que estão sendo



estimuladas e a condutividade tecidual (Vöröslakos et al., 2018; Kronberg et al., 2016; Datta et al., 2009; Nitsche et al., 2007).

Atualmente, apenas um estudo na literatura investigou o efeito de diversas intensidades e durações da estimulação em diferentes períodos de tempo após a indução de dor neuropática em ratos. No referido trabalho, os autores demonstraram que os efeitos antinociceptivos promovidos pela ETCC foram mais pronunciados quando aplicados repetitivamente e em maiores intensidades, do que com apenas 1 sessão, bem como teve desfechos mais promissores quando aplicados logo após o procedimento cirúrgico. Estes efeitos foram observados independente se o hemisfério cerebral estimulado foi o córtex motor ipsi ou contralateral (Wen et al., 2017). Paralelamente, um estudo prévio demonstrou que a estimulação do córtex motor de ratos com dor neuropática aumentou os níveis de GABA e glicina na PAG, enquanto que os níveis de glutamato não foram alterados nesta estrutura (Andrade et al., 2019). Estes resultados demonstram que mesmo pequenas intensidades de correntes aplicadas continuamente no couro cabeludo são eficazes em modular o conteúdo de neurotransmissores em importantes estruturas envolvidas com o processamento nociceptivo.

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa têm demonstrado o papel antinociceptivo e neuromodulador da ETCC em inúmeras condições dolorosas. Por exemplo, quando aplicada por 8 dias consecutivos, a ETCC não apenas preveniu o desenvolvimento de alodinia induzida pelo estresse crônico (Fregni et al., 2018) como também reduziu os níveis de TNF- $\alpha$ , e inversamente, aumentou o BDNF, ambos no hipocampo de ratos (Spezia-Adachi et al., 2015; 2012). Estes resultados podem ter importantes implicações clínicas, visto que, o aumento na concentração de mediadores pró inflamatórios em nível central, mas não periférico (Brunoni et al., 2014), estão relacionados a neuroinflamação e a potenciais implicações para o desenvolvimento de outros transtornos psiquiátricos (Leffa et al., 2018). Corroborando tais achados, Cioato et al., (2016) observaram que na dor neuropática, elevados níveis de IL-1 $\beta$  na medula espinhal correlacionaram-se inversamente com o limiar nociceptivo; um efeito que foi revertido pela ETCC. Em conformidade com estes resultados, a ETCC também promoveu a reversão do comportamento do tipo ansioso e dos *déficits* locomotores induzidos pela lesão no nervo isquiático (Marques-Filho et al., 2016). Desfechos semelhantes também foram encontrados em outros modelos de dor crônica, incluindo neuralgia trigeminal (Callai et al., 2019; Scarabelot et al., 2018), hiperalgesia induzida pela ovariectomia

(Moreira et al., 2016), inflamação crônica (Laste et al., 2012), e dor pós operatória e fibromialgia (dados ainda não publicados).

Estudos clínicos visando a busca de biomarcadores de dor crônica também demonstraram que a ETCC alterou os níveis de mediadores pró e anti-inflamatórios (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e  $\beta$ -endorfina) no soro de pacientes com osteoartrite e fibromialgia (Suchting et al., 2020; Khedr et al., 2017). Por outro lado, um outro estudo clínico reportou que os níveis de diversas citocinas anti e pró inflamatórias incluindo TNF- $\alpha$ , e seus receptores solúveis (sTNFr1 e sTNFr2) no soro, não se correlacionaram com a melhora nos escores clínicos de pacientes com depressão unipolar e tratados com ETCC (Brunoni et al., 2018). Contudo, elevados níveis de NGF basais no soro (Brunoni et al., 2018), e de BDNF no líquido de indivíduos submetidos previamente a um protocolo de ETCC (Ribeiro et al., 2018) predisseram a melhora no quadro clínico destes pacientes. Além disso, os níveis de BDNF foram inversamente correlacionados com o aumento da dor em mulheres fibromiálgicas; um efeito revertido pela ETCC (Brietzke et al., 2020). Estes resultados sugerem um maior envolvimento de fatores neurotróficos do que de mediadores pró-inflamatórios humorais, na fisiopatologia da dor crônica. Assim como, estes resultados alertam para a necessidade de mais estudos que busquem elucidar tais dicotomias e determinar biomarcadores relacionados a estas doenças. Além disso, a utilização de métodos não invasivos focados na estimulação contínua de regiões corticais representa uma alternativa viável e consistente no manejo da dor e comorbidades, principalmente pela atenuação da resposta pró inflamatória central, e diferentemente de métodos invasivos e com limitado papel translacional (Bassi et al., 2017; Koopman et al., 2016).

Evidentemente os efeitos exercidos pela ETCC não se restringem apenas a modulação da nocicepção, mas se estendem também a efeitos sobre o potencial visual evocado (Accornero et al., 2007), alterações do fluxo sanguíneo cerebral (Lang et al., 2005), em tarefas motoras e não motoras envolvendo o cerebelo (Ferrucci et al., 2013), enquanto que seus efeitos sobre a linguagem têm demonstrado resultados controversos (Westwood et al., 2017; Wirth et al., 2011). Adicionalmente, a modulação de parâmetros cognitivos por meio da alteração no padrão de conectividade cerebral no córtex pré-frontal dorsolateral direito melhorou o desempenho em tarefas de aprendizado associativo (Krause et al., 2017; Márquez-Ruiz et al., 2012). Estes resultados reforçam que esta técnica de neuromodulação possa ser utilizada visando a melhora da performance

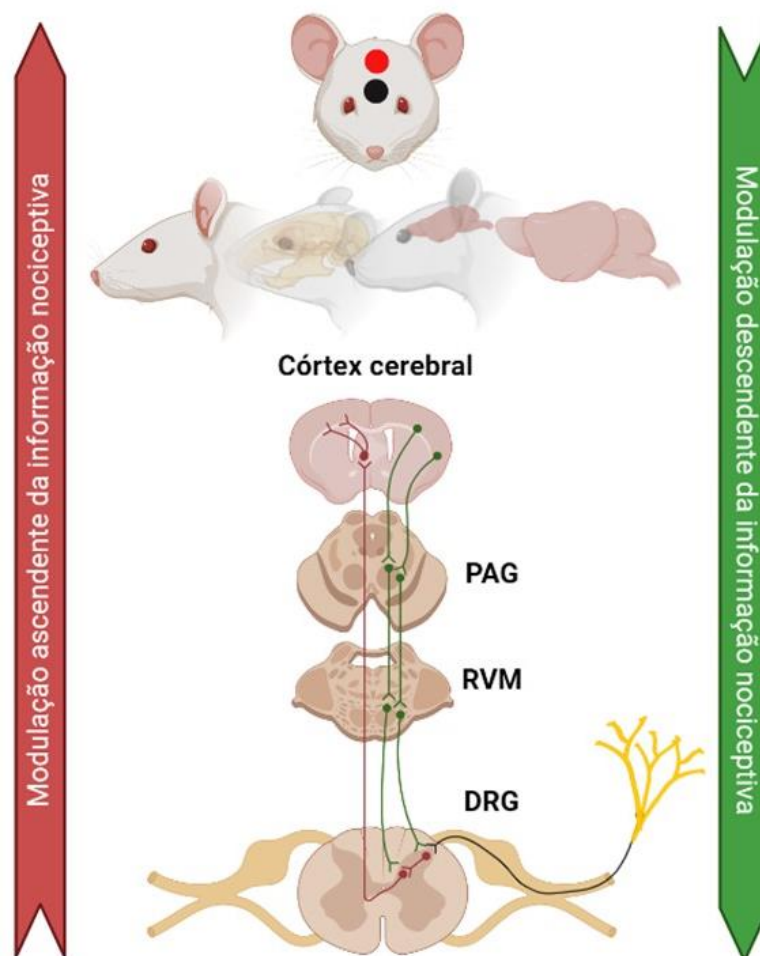
cognitiva, física e hemodinâmica dado seu eventual comprometimento observado em indivíduos com dor crônica (Braun et al., 2016).

ETCC tem demonstrado efeitos benéficos sobre a modulação de uma ampla variedade de transtornos e doenças (Kuo et al., 2014). Estudos demonstraram que em indivíduos que desenvolveram dor neuropática decorrente da esclerose múltipla, ou pela lesão traumática na medula espinhal, a estimulação anodal aplicada no córtex motor primário apresentou benefícios no alívio da dor, porém, nenhum efeito sobre os escores de ansiedade ou depressão (Mori et al., 2010; Fregni et al., 2006), que foram atenuados apenas quando a ETCC foi aplicada no dlCPF (Boggio et al., 2009). Corroborando a eficácia da ETCC sobre a modulação de parâmetros afetivos e emocionais, a estimulação do dlCPF de 94 pacientes com depressão durante 10 semanas, promoveu um efeito antidepressivo semelhante ao citalopram (Brunoni et al., 2017). A partir desses resultados conclui-se que o desequilíbrio entre ativação vs inibição inter-hemisférico entre o dlCPF esquerdo e direito contribua para a disfuncionalidade observada nos transtornos afetivos e emocionais, como ansiedade e depressão, enquanto que a estimulação do córtex motor primário está envolvida na modulação na função sensorial.

Embora haja evidências suficientes de que a ETCC seja capaz de modular diversos parâmetros comportamentais e neuroquímicos, mais estudos são necessários visando elucidar os mecanismos de ação celulares envolvidos em tais efeitos. Desta forma, postula-se que os efeitos em curto prazo, mediados pela ETCC, sejam dependentes de canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dependentes de voltagem, enquanto que os efeitos que perduram por 24 horas ou mais parecem depender da neuroplasticidade cortical mediada por receptores do tipo NMDA (Nitsche et al., 2003; Liebetanz et al., 2002). Além disso, é importante salientarmos que os receptores NMDA exercem um papel determinante na LTP hipocampal (Monte-Silva et al., 2013) e no aprendizado motor, que parecem ser dependentes da regulação epigenética do BDNF e seu receptor TrkB no local da estimulação (Podda et al., 2016; Fritsch et al., 2010). Adicionalmente, estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que os efeitos antinociceptivos da ETCC estão sob influência de diversas vias incluindo, opioidérgica (dos Santos et al., 2012), canabinoide, adenosinérgica, monoaminérgica, glutamatérgica e GABAérgica (de Souza et al., 2018; Medeiros et al., 2012). Estudos recentes utilizando uma linhagem transgênica que expressa um sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  em células da glia mostraram, *in vivo*, que a ETCC anodal aumentou as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  em astrócitos e micróglia de ratos (Mishima et al., 2019; Monai et al., 2016). Do ponto de vista fisiológico, estes achados têm grande

relevância dado o potencial papel destas células na manutenção da homeostase celular, incluindo a prevenção da excitotoxicidade induzida por elevados níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e glutamato extracelular, bem como, no início da resposta inflamatória e na sua implicação no desenvolvimento e manutenção da dor crônica (Gellner et al., 2016).

Em resumo, a ETCC constitui-se de um método seguro e não invasivo de estimulação cerebral capaz de induzir efeitos a curto e longo prazo (Figura 2). Entretanto, a adequação dos parâmetros de estimulação, pode promover a otimização destes efeitos sobre determinados desfechos.



**Figura 2.** Mecanismos moduladores do comportamento nociceptivo. PAG.: substância cinzenta periaquedutal; RVM.: bulbo rostroventromedial; DRG.: gânglio da raiz dorsal. Linhas vermelhas representam a transmissão da informação nociceptiva da periferia para o sistema nervoso central; enquanto as linhas verdes, ilustram as eferências provenientes de estruturas supracorticais em direção à periferia. Fonte: o autor

### 1.3 Exercício físico na saúde e na doença

Semelhante ao ETCC, inúmeras evidências apontam o exercício físico como uma atividade neuromoduladora capaz de conferir neuroproteção em neuropatias associadas ao diabetes (Kluding et al., 2012; Shankarappa et al., 2011), bem como, em doenças potencialmente degenerativas incluindo Alzheimer e Parkinson, tanto em modelos pré-clínicos, quanto clínicos (Binda et al., 2020; Bayod et al., 2011). Da mesma forma, a capacidade do exercício físico modular a percepção de dor é decorrente da combinação de diversos fatores, incluindo: tipo de exercício (modalidade), sua intensidade (anaeróbio ou aeróbio), duração (volume) e frequência (número de sessões dia/semana) (Naugle et al., 2014). Atualmente, as diretrizes do Colégio Americano de Medicina do Esporte (do inglês: *American College Sports Medicine - ACSM*) preconizam que adultos jovens saudáveis se envolvam por pelo menos 30 minutos ao dia, 5 ou mais dias da semana na prática de exercícios físicos visando a manutenção da saúde (ACSM, 2014). Contudo, embora não haja consenso sobre a prescrição segura e adequada para essa população, sabe-se que a adoção de hábitos de vida saudáveis é um importante aliado na prevenção, tratamento ou até mesmo na reversão de quadros de dor crônica (Booth et al., 2012).

Evidências sugerem que os efeitos analgésicos desencadeados pelo exercício são mediados principalmente por mecanismos opioides, mas também não opioides, ou uma interação entre estas vias, além de fatores biopsicossociais (Rice et al., 2019; Mazzardo-Martins et al., 2010). A priori, sabe-se que o aumento na produção e liberação de opioides pela hipófise anterior em resposta ao exercício, tem efeitos sobre receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  (Arida et al., 2015). Estes receptores modulam importantes conexões e estruturas chaves envolvidas com o processamento nociceptivo como, interneurônios inibitórios locais na medula espinhal, tronco encefálico e em centros corticais superiores (Chuganji et al., 2015; Sluka et al., 2012). Estes efeitos analgésicos são, geralmente, bloqueados pela administração de antagonistas  $\mu$ -opioide como a naloxona (Kim et al., 2015; Stagg et al., 2011).

O envolvimento ou interação entre tais mecanismos envolve a participação de projeções serotoninérgicas por meio da redução e/ou modulação na expressão de SERT e 5-HT nos núcleos magno, obscuro e pálido da rafe em animais exercitados (Bobinski et al., 2015). Estudos também demonstraram que a antinocicepção por meio de projeções noradrenérgicas para medula espinhal ocorrem via locus ceruleus e são mediadas

principalmente por receptor  $\alpha$ -2R (López-Álvarez et al., 2018), uma vez que tais efeitos foram bloqueados em animais *knockout* ou pela administração periférica de inibidores deste receptor (ioimbina) (de Souza et al., 2013). Somando-se aos efeitos já descritos das monoaminas sobre a transmissão nociceptiva, sabe-se que os ligantes canabinoides principalmente em receptores CB1, mas também CB2 (Dos Santos et al., 2019; Galdino et al., 2014) exercem um papel determinante na hipoalgesia induzida pelo exercício. Estes efeitos analgésicos também foram, surpreendentemente, mediados via receptores do tipo TRPV1 (Starowicz et al., 2012; Horvath et al., 2008) em um modelo de CCI e inflamação induzida por carragenina por meio da ligação de outro endocanabinoide induzido pelo exercício (anandamida) (Koltyn et al., 2014).

Embora pareça haver um consenso que o exercício físico seja uma estratégia terapêutica no manejo de diversas comorbidades, devemos salientar que o exercício físico é um fator de estresse físico capaz de ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), exercendo efeitos nos sistemas cardiovascular e o musculoesquelético (Chen et al., 2017). Logo, deve-se reconhecer que os efeitos modulatórios nociceptivos também possam ser bidirecionais (facilitatórios ou inibitórios) (Brown et al., 2007). Intensidades próximas à exaustão, por exemplo, desencadeiam aumentos na fosforilação dos receptores de glutamato e na expressão de transportadores de serotonina no bulbo rostroventromedial (pNR1 e SERT, respectivamente) resultando em hiperalgesia (Lima et al., 2017). Tais efeitos estão vinculados a reduções no tônus noradrenérgico e ao comprometimento do controle inibitório nocivo difuso (DNICs) observado em ratos com lesão no nervo isquiático, e corroborado pela ativação de receptores 5-HT<sub>2/3</sub> mediada por um agonista seletivo (Ondansetrona) em animais *naïve* (Bannister et al., 2015; Sasaki et al., 2006). De qualquer modo, estes estudos sugerem que parâmetros norteadores em um programa de exercício físico devam ser otimizados a fim de que se consiga deslocar essa relação a favor da inibição ao invés da facilitação do processamento nociceptivo.

Apesar de não existir uma correlação entre, distância percorrida com o grau de hipoalgesia induzida pelo exercício (Pitcher et al., 2017; Grace et al., 2016), estudos mostram que ratos exercitados por até 5 dias antes ou após indução de um modelo de dor crônica, apresentaram redução na alodinia mecânica, e na excitabilidade de neurônios da medula espinhal, acompanhada pelo *downregulation* na expressão de marcadores de reatividade da glia (Cd11b, OX-42, GFAP e IBA-1) e citocinas pró-inflamatórias no corno dorsal da medula espinhal (Ross et al., 2018; Azambuja et al., 2018; Lima et al., 2017; Cobianchi et al., 2010). Estudos também sugerem que a alternância de variáveis

como a intensidade dos exercícios, realizados na esteira por meio de diferentes graus de inclinação, apresenta maior eficácia em reduzir a resposta pró inflamatória no nervo isquiático e no músculo esquelético, quando comparado a animais sedentários ou que se exercitavam sem nenhuma inclinação (Tsai et al., 2017; Martins et al., 2017). Além dos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos do exercício, animais sedentários apresentaram menor sensibilidade barorreflexa, aumentada variabilidade da pressão arterial e diminuição na variabilidade da frequência cardíaca, comparados àqueles que se exercitavam por 5 dias consecutivos ou por 8 semanas (Pitcher et al., 2017; Sabharwal et al., 2016). Estes resultados enfatizam que não apenas a função sensorial, mas também a autonômica está evidentemente comprometida na dor crônica, e que mesmo modestas quantidades de exercício podem promover efeitos benéficos, principalmente para aqueles que estão iniciando em programas de atividades físicas.

Estudos prévios destacam que o papel anti-inflamatório do exercício físico, é pelo menos em parte, devido à sua capacidade em estimular as células musculares a produzirem de IL-6 mediante trabalho mecânico (Pedersen et al., 2007). Esta citocina, por sua vez, tem um papel permissivo sobre a síntese e produção de mediadores anti-inflamatórios como IL-1ra, IL-4 e IL-10 e a redução da produção de substâncias envolvidas com o processo doloroso e de cronificação da dor como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Bobinski et al., 2017; 2011). Corroborando o exposto acima, estudos demonstram que, camundongos fisicamente ativos não apresentam aumentos na sensibilidade mecânica induzida pela injeção de salina ácida no músculo gastrocnêmio, e que o fenótipo na polarização de macrófagos em direção a M2 previamente induzida pelo exercício, foi prevenida pelo bloqueio da IL-10 (Leung et al., 2016). Deve-se ressaltar, que os efeitos do exercício ocorrem por meio da modulação de diversas vias de sinalização intracelular, incluindo a redução na fosforilação da proteína cinase A (PKA) induzida pelo glutamato e da p38/MAPK e inflamassoma (Martins et al., 2017; Grace et al., 2016). Estes resultados reforçam a contribuição do exercício físico como um mediador da modulação neuroinflamatória local e sistêmica embora existam outros mecanismos envolvidos.

É importante salientar que a composição mista de fibras sensoriais e motoras no nervo isquiático faz com que lesões neste nervo resultem não apenas em *déficits* sensoriais como também locomotores, decorrentes da degeneração Walleriana e da perda de inervação motora eferente, respectivamente (Nishihara et al., 2020). Por exemplo, estudos têm demonstrado, entretanto, que iniciar um programa de exercícios na 2ª semana ao invés da 4ª após a contusão medular é eficaz em reverter a plasticidade mal adaptativa

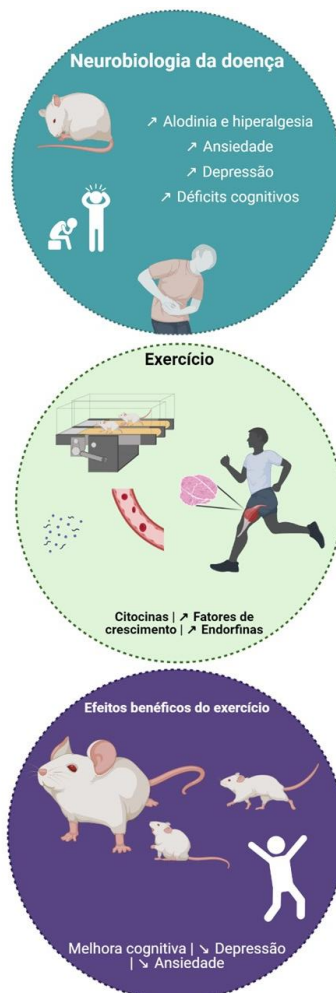
observada em neurônios sensoriais (Detloff et al., 2016), enquanto que em axônios motores tanto o exercício iniciado no 3º dia quanto no 21º dia após a transecção do nervo isquiático promove a regeneração de axônios motores e a reinervação das fibras musculares (Brandt et al., 2015). Estes resultados mostram que a recuperação da função sensorial depende da aplicação do exercício dentro da melhor janela terapêutica após a lesão e que a recuperação da função motora parece estar condicionada ao tratamento, independentemente do tempo de aplicação.

A hiperresponsividade sensorial originada pelo aumento de mediadores pronociceptivos em resposta à lesão no nervo, também é desencadeada pela produção de fatores neurotróficos que, embora primordiais para sobrevivência, plasticidade e regeneração, também têm um papel facilitatório na transmissão nociceptiva (Richner et al., 2014). Corroborando o exposto acima, estudos observaram o *upregulation* nos níveis de BDNF e NGF nos DRG (L4-L6) de ratos sedentários com dor neuropática, efeito que foi revertido pelo exercício (Tian et al., 2018; Almeida et al., 2015). Contrariamente, estudos demonstraram que a regeneração de nervos periféricos após a lesão correlacionou-se positivamente com o aumento na expressão de fatores neurotróficos no coto distal do nervo, músculo esquelético e soro de ratos exercitados (Park & Höke, 2014), e que o BDNF proveniente de células neuronais e de Schwann é primordial para o processo regenerativo induzido pelo exercício (Wilhelm et al., 2012). Sendo assim, tais efeitos antinociceptivos corroboram aqueles já previamente descritos na literatura mostrando que o exercício reduz a hiperexcitabilidade neuronal na medula espinhal, por seu importante papel em restaurar o tônus inibitório GABAérgico previamente comprometido em um modelo de dor neuropática (Kami et al., 2018), bem como, restaurando a hiperexcitabilidade produzida pela disfunção na homeostase do cloreto induzida pelo BDNF (López-Álvarez et al., 2015; Côté et al., 2014). Apesar da indubitável dicotomia sobre os efeitos aqui descritos, sabe-se que estes desfechos podem estar sob influência do modelo de dor empregado (inflamatória vs crônica), diferenças intra/inter espécies (camundongos vs ratos), e no padrão temporal, incluindo ciclo estral nas fêmeas, em que as medidas e/ou tratamento foram realizadas.

Dado que o desequilíbrio entre excitação e inibição observado na dor crônica influencia a atividade de inúmeros sistemas de neurotransmissores, e assumindo que o processamento dessas informações em múltiplas estruturas dentro do SNC é dinâmico, uma relação tênue com o desenvolvimento de outras comorbidades também se faz presente (Cheng et al., 2018). Além do mais, é interessante observar que a base



neurobiológica das doenças neuropsiquiátricas associadas à dor crônica, também envolve a participação de outros neuromoduladores. Interessantemente, um estudo pré-clínico demonstrou que o exercício físico apresentou um efeito ansiolítico e antidepressivo similar ao ser comparado ao controle positivo (amitriptilina) (Duman et al., 2008), e que tais efeitos ocorreram mediante a modulação das vias da PI3K/Akt/mTOR, principalmente no hipocampo (Fang et al., 2013). Além disso, projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral para o núcleo accumbens também estão envolvidas na antinocicepção induzida pelo exercício físico (Liu et al., 2019; Wakaizumi et al., 2016) destacando seu potencial efeito dinâmico em comorbidades relacionadas à dor, incluindo a participação no sistema de recompensa (Figura 3). Em resumo, o exercício físico constitui-se de uma importante ferramenta, capaz de modular inúmeros parâmetros comportamentais e neuroquímicos sobre diversas estruturas.



**Figura 3.** Efeitos benéficos do exercício físico sobre o comportamento. Fonte: o autor

#### 1.4 ETCC e exercício

A combinação entre terapias farmacológicas tem por finalidade, a promoção de um efeito que, somado, se sobrepõem àqueles apresentados por um dado tratamento isolado (Gilron et al., 2005). Por exemplo, a combinação entre ETCC e cicloserina (agonista parcial NMDA) (Nitsche et al., 2004a), inibidores da recaptação de serotonina (Nitsche et al., 2009), ou de catecolaminas (Nitsche et al., 2006; 2004b) promoveu efeitos sinérgicos quando comparados apenas à estimulação ou aos efeitos isolados dos fármacos. No entanto, a recapitulação desta estratégia terapêutica envolvendo as associações entre uma técnica de neuromodulação não invasiva como o ETCC e o exercício tem sido empregada em estudos pré-clínicos (Lopes et al., 2021; 2020) e clínicos (Rocha et al., 2016; Oliveira et al., 2015), apresentando efeitos que variam de moderados a intensos, demonstrados em uma recente meta-análise envolvendo dor crônica (Cardenas-Rojas et al., 2020).

Em estudos clínicos, a associação entre ETCC e exercícios de mobilização e estabilização para músculos do tronco realizados de 2 a 3 vezes por semana em indivíduos com dor lombar crônica, promoveu a redução da dor, efeito que perdurou por até 1 mês após o término do tratamento (Straudi et al., 2018). Já em indivíduos com osteoartrite, a combinação entre ETCC e exercícios de fortalecimento para músculos do quadríceps, demonstrou que esta associação pode ser mais efetiva para o alívio da dor e melhora da função quando comparado com ETCC *sham* e exercício (Chang et al., 2017), enquanto que em mulheres fibromiálgicas a associação entre estas técnicas reduziu os escores de dor (Mendonca et al., 2016). Contudo, a combinação entre técnicas não se restringe apenas ao exercício, mas a combinação entre ETCC e ilusão visual/DNIC (Reidler et al., 2012; Soler et al., 2010) reduziu de maneira ainda mais pronunciada os escores de dor destes pacientes quando comparado ao tratamento isolado.

Contudo, dada a limitação e complexidade na execução de estudos clínicos, bem como da necessidade de elucidação de mecanismos e estratégias terapêuticas, estudos pré-clínicos tornam-se primordiais para o avanço no entendimento da dor e sua fisiopatologia. Desta forma, estudos prévios realizados em modelos pré-clínicos demonstraram que a combinação entre exercício físico e ultrassom de alta frequência (100 Hz) em animais submetidos a cirurgia de constrição crônica do nervo isquiático (Huang et al., 2017) ou a reposição insulínica em um modelo de neuropatia diabética periférica (Chen et al., 2015), promoveram a redução da hipernocicepção relacionada ao

*downregulation* de citocinas pró inflamatórias e o *upregulation* de citocinas anti-inflamatórias. Um outro estudo demonstrou ainda que a estimulação elétrica do nervo isquiático combinada com exercícios físicos aumentou a regeneração axonal após lesão do nervo em ratos (Asensio-Pinilla et al., 2009).

Em resumo, as associações de terapêuticas *top-down* (ETCC) e *bottom-up* (exercício) podem ser utilizadas como complemento para o manejo da dor visando promover efeitos sinérgicos, e surgem como alternativas de baixo custo, indolor, e com poucos efeitos adversos que podem ser implementadas como estratégias terapêuticas visando o alívio da dor, o remodelamento e regeneração de sinapses (Gordon & English, 2016). Além disso, uma melhor compreensão dos mecanismos de ação de ambas as técnicas deve ser melhor investigada, já que a associação entre tais técnicas influencia uma ampla variedade de sistemas e neurotransmissores, incluindo vias similares entre ETCC e exercício (de Souza et al., 2018; Meeusen & De Meirleir, 1995). Por outro lado, a maneira pela qual ambas intervenções interagem entre si, permanecem ainda obscuras e necessitam ser melhor elucidadas, principalmente em quadros de dor crônica onde o ETCC provavelmente desempenhe desfechos mais efetivos quando associado e/ou aplicado previamente a outras terapias (Stein et al., 2020; Cabral et al., 2015).



## 2. **Justificativa**

A dor crônica manifesta-se a partir de múltiplos fatores e suas consequências induzem a diversas implicações fisiológicas e comportamentais. No Brasil, estudos envolvendo aproximadamente 30 mil participantes demonstram que cerca de 2/3 da população analisada apresenta dor crônica, com destaque para mulheres com idade  $\geq 65$  anos com baixos níveis de renda familiar como fatores de risco (Carvalho et al., 2018; de Souza et al., 2017). Juntos, estes dados epidemiológicos revelam a cifra de bilhões em gastos com saúde, evidenciando a importância no manejo adequado da dor e suas comorbidades. Dentre os principais transtornos associados a quadros algícos crônicos estão depressão, ansiedade, problemas cognitivos, sociais e redução na qualidade de vida (Dahlhamer et al., 2018). Contudo, sua terapêutica é um desafio na prática clínica devido à grande refratariedade ao tratamento farmacológico geralmente empregado. Soma-se a isso a complexidade observada em algumas situações, incluindo a presença de comorbidades como ansiedade e depressão, que muitas vezes acompanham ou agravam ainda mais a condição preexistente, fazendo com que fármacos que promovam efeitos prolongados sobre as monoaminas sejam comumente utilizados. Por outro lado, sabe-se que a retirada da medicação, também é um fator de enorme complexidade. Desta forma, a busca por alternativas não farmacológicas que auxiliem no manejo da dor, e que minimizem os efeitos dos fármacos, têm se intensificado. Dentre estas, o uso da estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC), bem como o exercício físico, constituem-se de técnicas neuromoduladoras promissoras e que podem ter seus efeitos potencializados ao serem utilizadas em associação, constituindo-se como importantes ferramentas complementares para o alívio da dor.



### 3. Hipóteses

$H_0$ : Os efeitos da associação entre ETCC e exercício, são semelhantes aos observados entre os tratamentos isolados sobre os desfechos comportamentais e neuroquímicos;

$H_1$ : Os efeitos promovidos pela associação entre ETCC e exercício, são superiores aos observados entre os tratamentos isolados sobre os desfechos comportamentais e neuroquímicos;





**4.1 Objetivo geral:**

Investigar o efeito da associação entre ETCC e exercício físico sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em ratos submetidos a um modelo de dor neuropática.

**4.2 Objetivos específicos:**

Comparar os efeitos da associação entre ETCC e exercício com os tratamentos isolados sobre:

- a hiperalgesia mecânica e térmica;
- o comportamento do tipo ansioso;
- o perfil de citocinas pró (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), bem como, neurotrofinas (NGF e BDNF) em estruturas do sistema nervo periférico (nervo isquiático) e central (medula espinhal, tronco encefálico, córtex cerebral e hipocampo).



---

**5.1 Artigo 1.** *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*

**Status:** *Publicado no Periódico Brain Stimulation (2020)*

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## Brain Stimulation

journal homepage: <http://www.journals.elsevier.com/brain-stimulation>

## 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



Bettega Costa Lopes <sup>a, b</sup>, Liciane Fernandes Medeiros <sup>a, f, \*\*</sup>, Vanessa Silva de Souza <sup>a, e</sup>, Stefania Giotti Cioato <sup>a, e</sup>, Helouise Richardt Medeiros <sup>a, c</sup>, Gabriela Gregory Regner <sup>e</sup>, Camila Lino de Oliveira <sup>a, e</sup>, Felipe Fregni <sup>d</sup>, Wolnei Caumo <sup>c</sup>, Iraci L.S. Torres <sup>a, b, c, e, \*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-Clinicas, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-007, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação Em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, (ICBS), Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul (UFRGS), 90050-170, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação Em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, 90035-003, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Berenson-Allen Center for Noninvasive Brain Stimulation, Department of Neurology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, United States

<sup>e</sup> Programa de Pós-Graduação Em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil

<sup>f</sup> Programa de Pós-Graduação Em Saúde e Desenvolvimento Humano, Centro Universitário Unilasalle, Canoas, RS, 92010-000, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 October 2019

Received in revised form

6 February 2020

Accepted 19 February 2020

Available online 24 February 2020

## Keywords:

Bimodal tDCS

Aerobic exercise

Neuropathic pain

Cytokines

Rats

## ABSTRACT

**Background:** Behavioral alterations, like mechanical and thermal hyperalgesia, and modulation of biomarkers in the peripheral and central nervous systems (CNS) are markers of chronic pain. Transcranial direct current stimulation (tDCS) with exercise is a promising therapy for pain due to its neuro-modulatory capacity.

**Objective:** To assess the individual effects of tDCS, exercise, and the two combined on the nociceptive response and BDNF, IL-1 $\beta$ , and IL-4 levels in the CNS structures of rats in a chronic pain model.

**Methods:** For 8 consecutive days after the establishment of chronic neuropathic pain by inducing a constriction injury to the sciatic nerve (CCI), the rats received tDCS, exercise, or both treatments combined (20 min/day). The hyperalgesic response was assessed by von Frey and hot plate tests at baseline, 7, and 14 days after CCI surgery and immediately, 24 h, and 7 days after the end of treatment. The BDNF, IL-1 $\beta$ , and IL-4 levels were assessed in the cerebral cortex, brainstem, and spinal cord by enzyme-linked immunosorbent assay at 48 h and 7 days after the end of treatment.

**Results:** The CCI model triggered marked mechanical and thermal hyperalgesia. However, bimodal tDCS, aerobic exercise, and the two combined relieved nociceptive behavior for up to 7 days following treatment completion.

**Conclusions:** Bimodal tDCS, aerobic exercise, or both treatments combined promoted analgesic effects for neuropathic pain. Such effects were reflected by cytokine modulation throughout the spinal cord-brainstem-cerebral cortex axis.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introduction

Neuropathic pain (NP) arises from complex changes involving the peripheral and/or central nervous systems in response somatosensory system injury [1]. Its main behavioral feature is the presence of hyperalgesia and allodynia, leading to impaired functional and cognitive capacities, motor deficits, and a reduction in

\* Corresponding author. Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-Clinicas Centro de Pesquisa Experimental Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CEP:90035-007, Porto Alegre, Brazil.

\*\* Corresponding author. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano, Centro Universitário Unilasalle, Canoas, RS, CEP: 92010-000, Brazil.

E-mail addresses: [liciane.medeiros@unilasalle.edu.br](mailto:liciane.medeiros@unilasalle.edu.br) (L.F. Medeiros), [iltorres@hcpa.edu.br](mailto:iltorres@hcpa.edu.br) (I.L.S. Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.brs.2020.02.025>

1935-861X/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

the quality of life [2]. However, the underlying mechanisms remain unclear.

Increased nociceptive input occurs due to an imbalance between facilitatory and inhibitory synaptic mechanisms driven by upregulation and chronic activation of receptors [3]. Glial cells play an essential role for dealing with injury by changing their phenotype from a basal to a pro-inflammatory state by releasing several neuroimmune mediators, such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), calcitonin gene-related peptide (CGRP), and substance P (SP) [4,5]. Furthermore, while the upregulation of key neurotrophic factors is needed to maintain cell integrity, they also promote sensitization of afferent terminals in chronic pain conditions, giving rise to aberrant nociceptive inputs that modulate pain signaling throughout the nociceptive pathways [6]. Therefore, neuromodulatory strategies for modulating hypernociceptive inputs are important in preventing and treating chronic pain conditions.

Transcranial direct current stimulation (tDCS) is a safe, non-invasive technique that modulates neuronal thresholds with anodal and cathodal currents that increase or decrease cortical excitability, respectively [7]. The effects of a weak electrical current delivered over the scalp depend on the brain regions, electrode diameters, and polarity applied; its effects can persist for hours or days [8]. While the short-term effects of tDCS are mediated by ionic channel modulation, the long-term effects are mediated by N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors [9]. Moreover, bimodal tDCS applied over the scalp has been reported to revert inflammatory and chronic stress-induced pain in rats [10,11].

Physical inactivity contributes to the development of cardiovascular diseases, diabetes, depressive symptoms, and chronic pain [12]. Systemic effects of exercise also play a neuroprotective role in rats in inflammatory and chronic pain models [13,14] and increase hippocampal volumes in older adults [15]. Even though the underlying mechanisms of the prophylactic and therapeutic effects of exercise remain unknown, opioid antagonists have been reported to alleviate exercise-induced analgesia, suggesting that the aerobic exercise effects are, at least partly, due to activation of the opioid system [16]. Furthermore, physical exercise induces IL-6 mRNA and protein production in the skeletal muscle, leading to an increase in the release of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) and the inhibition of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  synthesis [17].

Despite these top-down and bottom-up neuromodulatory techniques need further elucidation, studies targeting to investigate the effects of tDCS or exercise have shown resembling effects mediated by both interventions, which includes, opioid, monoamines, endocannabinoids, glutamate releasing, and corticospinal tract modulation parameters [18–20]. Regarding these modulations of intracortical inhibition or facilitation parameters, Stagg et al. [21] have demonstrated that anodal tDCS applied upon motor cortex (M1) lead to a reduction of GABA levels, whilst cathodal stimulation reduced the glutamate levels. These results suggest that the effects provided by anodal or cathodal stimulation might have effects upon neuronal circuitry, similar those triggered by exercise.

Neuromodulation techniques combined with exercise may be an alternative non-invasive method to improve functional recovery [22]. However, little is known about the combined effects of tDCS and exercise on pain relief. We aimed to investigate if the association between tDCS and exercise provide more pronounced antinociceptive effects rather than each isolated treatment in a neuropathic pain model; and if the antinociceptive effects are involved with neurochemical biomarkers central levels.

## Materials and methods

### Animals

Male Wistar rats ( $n = 156$ ; 8 weeks old, weight  $280 \pm 20$  g) were randomly assigned by weight and housed in polypropylene cages ( $49 \times 34 \times 16$  cm) with sawdust-covered flooring. All rats were maintained in a controlled environment ( $23 \pm 2$  °C) with a standard light-dark cycle (12 h/12 h) with water and chow *ad libitum*. The sample size was calculated to detect the statistical significance between means considering an alpha = 0.05 and power of 90% [23–25]. All experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (GPPG-HCPA no. 20170061) and met the ethical and methodological ARRIVE guidelines [26].

### Experimental design

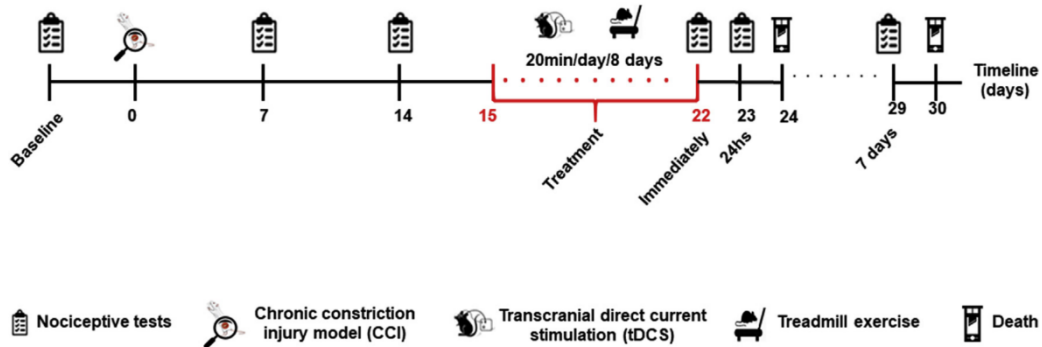
Rats were initially divided into three groups: Control, Sham-Pain and Pain. In the 14th day the rats were subdivided into thirteen groups: Control-Group (C), Sham-Pain (S), Sham-Pain + Sham-tDCS (SS), Sham-Pain + Exercise (SE), Sham-Pain + tDCS (ST), Sham-Pain + Sham-tDCS + Exercise (SSE), Sham-Pain + tDCS + Exercise (STE) Pain-Group (P), Pain-Sham-tDCS (PS), Pain + Exercise (PE), Pain + tDCS (PT), Pain + Sham-tDCS + exercise (PSE), and Pain + tDCS + exercise (PTE). Nociceptive tests were assessed at baseline, 7, and 14 days after CCI procedure, and immediately, 24 h, and 7 days post-treatments. First, bimodal tDCS was performed; after that, rats were made to exercise on a treadmill from days 15–22 post-CCI. Rats were killed by decapitation at 48 h and 7 days after treatment completion (Fig. 1).

### Neuropathic pain model

Animals were anesthetized with isoflurane (5% for induction, 2.5% for maintenance) and placed in the lateral decubitus for hair shaving and skin antisepsis with 2% alcohol as described in an earlier study [27]. After skin incision in the middle third of the left hind limb to expose the biceps femoralis muscle, the common sciatic nerve was exposed and three ligatures were tied (Vycril 4.0) with minor modifications [25]. For sham groups, the sciatic nerve was similarly exposed, but the nerve was not ligated. The same investigator performed the ligatures in all rats. After surgery, the wound was sutured using Mononylon 4.0 and the rats (Sham and CCI groups) received tramadol intraperitoneally during the first 3 days post-surgery (7:00 a.m. and 7:00 p.m.) to minimize excessive suffering.

### tDCS protocol

Fourteen days post-surgery, the rats were submitted to a 20-min session of bimodal tDCS treatment for eight consecutive days in a constant direct current of 0.5 mA delivered from a battery-powered stimulation source, as described in a previous method [28]. Rats subjected to active or sham stimulation had their scalp shaved. The electrode size was trimmed to  $1.5 \text{ cm}^2$  and a constant current intensity of 0.5 mA was applied upon the scalp. It provided a current density of  $0.33 \text{ mA/cm}^2$  with no lesions previously reported [23,29]. The anode was placed on the head using landmarks of the neck and shoulder lines as a guide (the anterior and posterior regions of the midline between the two hemispheres of the parietal cortex), while the cathode was positioned at the midpoint between the lateral angles of both eyes (supraorbital area). For the sham groups, the electrodes were placed and fixed in the same position as for active



**Fig. 1.** Experimental Design.

Nociceptive tests were von Frey and hot plate to assess mechanical and thermal hyperalgesia, respectively. Bimodal tDCS and/or treadmill exercise was provided from 15th to 22nd days after CCI.

stimulation; however, the stimulator remained turned off throughout the experiments.

#### Exercise protocol

One week before surgery, the rats were habituated daily on a treadmill. On day 1, rats were placed for 20 min on a turned-off treadmill to recognize a new apparatus. Next, the rats were gradually conditioned to run by increasing the exposure time on the treadmill from 10 to 20 and 30 min at days 2, 3, and 4, respectively, at low speed (5 m/min). On day 5, we used an indirect method to determine the  $VO_{2max}$  [30]. Briefly, the rats ran at 7 m/min for 3 min, with an increase of speed at 5 m/min until the point of exhaustion, perceived as the incapacity to continue running. The time to fatigue (in min) and workload (in m/min) were obtained as indexes of aerobic capacity, which, in turn, were taken as  $VO_{2max}$ . The exercise protocol consisted of running sessions at 70% of  $VO_{2max}$ . The rats were subjected to one 20-min running session daily for 8 days (08:00–09:30 a.m.) on a 0° slope. No electric shocks were delivered to incite them to run.

#### Nociceptive tests

##### Mechanical allodynia

We used an automatic von Frey aesthesiometer (Insight, São Paulo, Brazil) to assess mechanical hyperalgesia. Rats were habituated in polypropylene cages (12 × 20 × 17 cm) with wire grid flooring 24 h prior and for 15 min before tests to minimize analgesia induced by novelty [31]. For testing, a polypropylene tip was applied underneath the floor grid and between the five distal foot pads, gradually increasing the pressure. Measurements were assessed in triplicate and means were expressed in grams (g) per paw withdrawal.

##### Thermal hyperalgesia

All rats were exposed to a hot plate (HP) for 5 min, 24 h prior to the test in order to avoid analgesia induced by novelty [31]. On the test day, the surface of the hot plate was pre-heated and kept at a constant temperature ( $55 \pm 0.1$  °C). The rats were placed on the heated surface surrounded by glass funnels. The time in seconds for the first behavioral response (foot-licking, jumping, or rapidly removing paws) was recorded as the latency of nociceptive response [32].

#### Tissue collection

At 48 h or 7 days after the last treatment, rats were killed by decapitation, and tissue samples (cerebral cortex, brainstem, and spinal cord) were harvested. The structures were kept at  $-80$  °C until the assays were performed.

#### Biochemical assays

Cerebral cortex, spinal cord, and brainstem BDNF (DY248), IL-1 $\beta$  (DY501) and IL-4 (DY504) levels were determined by sandwich ELISA using monoclonal antibodies (R&D; Minneapolis, MN). The total protein was measured by the Bradford method using bovine serum albumin as a standard [33]. The results were corrected by total protein and expressed in pg/mg of protein.

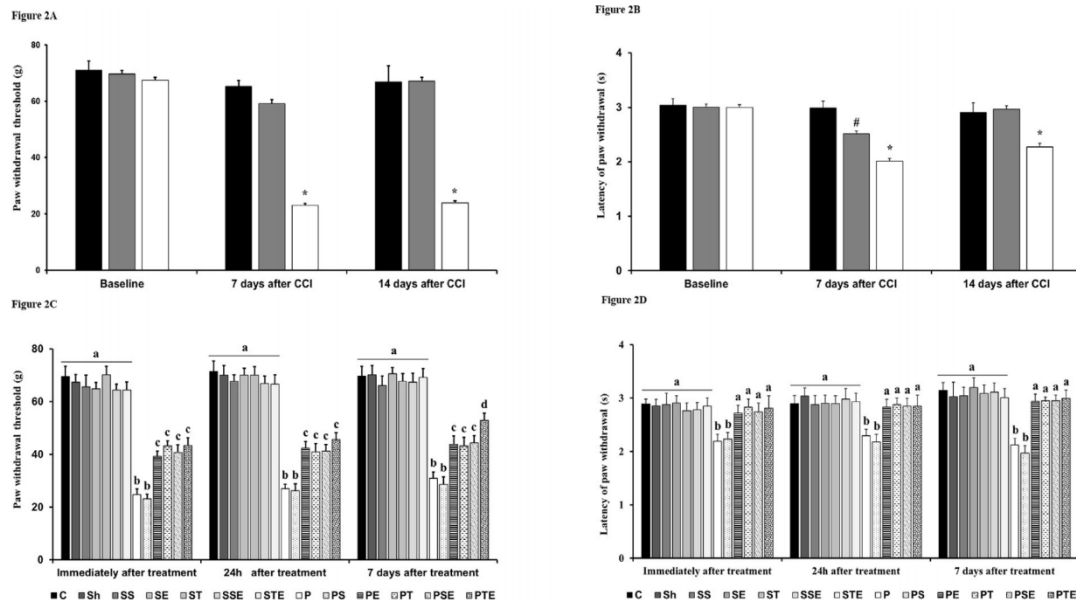
#### Statistical analysis

Data were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). Generalized estimating equations (GEE) followed by Bonferroni testing was used to analyze behavioral data [34]. For biochemical assays, a four-way ANOVA followed by post-hoc Bonferroni correction was used, considering the interactions between independent variables (pain, tDCS, exercise, time). A p-value < 0.05 was considered significant. Data were analyzed with SPSS for Windows (version 20.0; IBM, Armonk, NY).

## Results

#### Effects of isolated bimodal tDCS treatment or combined with aerobic exercise on mechanical hyperalgesia

We found no difference between groups at baseline ( $p > 0.05$ ). There was an interaction between group and time in mechanical hyperalgesia as assessed in the von Frey test (Wald's  $\chi^2 = 429,286$ ;  $p < 0.05$ ,  $n = 156$ ; Fig. 2A). From 7 to 14 days post-surgery, all CCI groups displayed marked mechanical hyperalgesia ( $p < 0.05$ ) compared to control and sham groups. Immediately, 24 h, and 7 days post-treatment, the PE, PT, PSE, and PTE groups displayed increased nociceptive thresholds in response to treatment. Interestingly, at 7 days post-treatment, the PTE group displayed a slightly increase in the nociceptive threshold than the treatment alone (Wald's  $\chi^2 = 1714,912$  for group effect and Wald's  $\chi^2 = 10,512$  for time effect;  $p < 0.05$ ,  $n = 156$ ; Fig. 2C).



**Fig. 2.** Mechanical and thermal hyperalgesia assessed by von Frey and hot plate tests, at baseline, 7 and 14 days after the CCI model ( $n = 12$  to control group, and 72 to Sham-Pain and Pain groups; Fig. 2A and B, respectively).

\*. Mean statistically significant difference from Control, and Sham-Pain groups (GEE,  $p < 0.05$ ). \* and #. Mean statistically significant difference between all 3 groups (GEE,  $p < 0.05$ ). Mechanical and thermal hyperalgesia assessed by von Frey and hot plate tests at immediately, 24 h, and 7 days after bimodal tDCS treatment and/or treadmill exercise ( $n = 12$  per group; Fig. 2C and D, respectively). Different letters mean statistically significant difference between the groups (GEE,  $p < 0.05$ ). Data presented as mean standard error of the mean (SEM) of paw withdrawal threshold (g). Control-Group (C), Sham-Pain (S), Sham-Pain + Sham-tDCS (SS), Sham-Pain + Exercise (SE), Sham-Pain + tDCS (ST), Sham-Pain + Sham-tDCS + Exercise (SSE), Sham-Pain + tDCS + Exercise (STE) Pain-Group (P), Pain-Sham-tDCS (PS), Pain + Exercise (PE), Pain + tDCS (PT), Pain + Sham-tDCS + Exercise (PSE) and Pain + tDCS + Exercise (PTE).

#### Effects of isolated bimodal tDCS treatment or combined with exercise on thermal hyperalgesia

We found no difference between groups at baseline ( $p > 0.05$ ). There was an interaction between group and time in thermal hyperalgesia (Wald's  $\chi^2 = 88,462$ ;  $p < 0.05$ ,  $n = 156$ , Fig. 2B). At 7 days post-surgery, the Sham-Pain groups displayed decreased thermal withdrawal latency, which was even pronounced in the Pain groups. At 14 days post-surgery, only the Pain groups displayed marked thermal hyperalgesia compared to the Control and Sham-Pain groups ( $p < 0.05$ ). From immediately to 7 days after the last treatment, all groups subjected to tDCS or exercise alone and to combined treatment showed no thermal hyperalgesia, compared to the P and PS groups (Wald's  $\chi^2 = 153,658$  for group effect;  $p < 0.05$ ,  $n = 156$ , Fig. 2D).

#### Cerebral cortex BDNF, IL-1 $\beta$ , and IL-4 levels

Regarding cerebral cortex BDNF levels, there was an interaction between pain, tDCS, exercise, and time (four-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,120)} = 5.064$ ,  $p < 0.01$ ; Table 1). At 48 h post-treatment, the PT group showed increased BDNF levels compared to the ST group. At 7 days post-treatment, the PSE group displayed decreased BDNF levels compared to the SSE group. At 7 days post-treatment, the PTE group displayed increased BDNF levels compared to the STE group. Additionally, there were interactions between exercise, tDCS, and time ( $F_{(2,120)} = 4.168$ ,  $p < 0.02$ ); exercise and time ( $F_{(1,120)} = 6.154$ ,  $p < 0.02$ ); tDCS, exercise, and time ( $F_{(2,120)} = 6.255$ ,  $p < 0.01$ ); and pain and stimulation ( $F_{(2,120)} = 10.734$ ,  $p < 0.001$ ). There were main effects of tDCS ( $F_{(2,120)} = 6.249$ ,  $p < 0.01$ ), exercise ( $F_{(1,120)} = 36.409$ ,  $p < 0.001$ ), and time ( $F_{(1,120)} = 3495.979$ ,  $p < 0.001$ ).

Regarding cerebral cortex IL-1 $\beta$  levels, there was a main effect of pain (four-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(1,120)} = 12.168$ ,  $p < 0.01$ ; Table 1). The pain groups displayed increased IL-1 $\beta$  levels in the cerebral cortex compared to the Sham-Pain groups. There was a main effect of time ( $F_{(1,120)} = 25.444$ ,  $p < 0.01$ ). Compared to 48 h post-treatment, the Pain groups displayed increased IL-1 $\beta$  levels at 7 days post-treatment.

Regarding IL-4 levels, there was an interaction between pain, tDCS, and exercise (four-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,120)} = 5.354$ ,  $p < 0.01$ ; Table 1). The PTE group displayed reduced IL-4 levels compared to the STE group. Moreover, there were interactions between pain, tDCS, and time ( $F_{(2,120)} = 4.318$ ,  $p < 0.02$ ); pain and tDCS ( $F_{(2,120)} = 4.832$ ,  $p < 0.02$ ); tDCS and exercise ( $F_{(2,120)} = 3.852$ ,  $p < 0.05$ ); exercise and time ( $F_{(1,120)} = 6.440$ ,  $p < 0.02$ ); and pain and time ( $F_{(1,120)} = 7.429$ ,  $p < 0.001$ ). There were main effects of pain ( $F_{(1,120)} = 8.160$ ,  $p < 0.001$ ), exercise ( $F_{(1,120)} = 15.973$ ,  $p < 0.001$ ), and time ( $F_{(1,120)} = 998.533$ ,  $p < 0.001$ ).

#### Brainstem BDNF, IL-1 $\beta$ , and IL-4 levels

Regarding BDNF levels, there was an interaction between pain, tDCS, and exercise (four-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,120)} = 4.833$ ,  $p < 0.05$ ; Table 2). The PT group displayed decreased BDNF levels compared to the ST group. Moreover, there were interactions between: pain, exercise, and time ( $F_{(1,120)} = 8.488$ ,  $p < 0.01$ ); pain and tDCS ( $F_{(3,503)} = 4.833$ ,  $p < 0.05$ ); pain and exercise ( $F_{(1,120)} = 6.991$ ,  $p < 0.01$ ); and tDCS and time ( $F_{(2,120)} = 5.907$ ,  $p < 0.01$ ). There was a main effect of time ( $F_{(1,120)} = 29.549$ ,  $p < 0.001$ ).

Regarding IL-1 $\beta$  levels, there was an interaction between pain, tDCS, and exercise (four-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,120)} = 5.171$ ,  $p < 0.01$ ; Table 2). The Pain groups displayed increased IL-1 $\beta$  levels

**Table 1**

BDNF, IL-1 $\beta$  and IL-4 levels in the cerebral cortex assessed at 48 h and 7 days after the bimodal tDCS treatment and/or treadmill exercise (n = 6 per group). Data presented as mean standard error of the mean (SEM) pg/mg of protein. Sham-Pain (S), Sham-Pain + Sham-tDCS (SS), Sham-Pain + Exercise (SE), Sham-Pain + tDCS (ST), Sham-Pain + Sham-tDCS + Exercise (SSE), Sham-Pain + tDCS + Exercise (STE) Pain-Group (P), Pain-Sham-tDCS (PS), Pain + Exercise (PE), Pain + tDCS (PT), Pain + Sham-tDCS + Exercise (PSE) and Pain + tDCS + Exercise (PTE).  
BDNF: significant 4-way ANOVA interactions between: pain vs exercise vs tDCS vs time (p < 0.01); exercise vs tDCS vs time (p < 0.02); exercise vs time (p < 0.02); exercise vs tDCS vs time (p < 0.01); pain vs tDCS (p < 0.001). There were main effects of: exercise; (p < 0.001); tDCS (p < 0.01); and time (p < 0.001). IL-1 $\beta$ : significant 4-way ANOVA, pain and time main effects (p < 0.01 for both). IL-4: significant 4-way ANOVA, interactions between: pain vs tDCS vs exercise (p < 0.01); pain vs tDCS vs time (p < 0.02); exercise vs time (p < 0.02); exercise vs tDCS (p < 0.05); pain vs time (p < 0.001) and pain vs tDCS (p < 0.02). There were main effects of time (p < 0.001); exercise (p < 0.001) and pain (p < 0.001).

Cerebral Cortex		BDNF levels (pg/mg of protein)		IL-1 $\beta$ levels (pg/mg of protein)		IL-4 levels (pg/mg of protein)	
Biomarkers							
Groups		48 h	7 days	48 h	7 days	48 h	7 days
Sham NP	Sham-Pain	7.57 $\pm$ 0.10	2.60 $\pm$ 0.08	8.57 $\pm$ 1.31	11.10 $\pm$ 1.18	2.88 $\pm$ 0.02	8.13 $\pm$ 0.35
	Sham-tDCS	8.09 $\pm$ 0.18	2.62 $\pm$ 0.21	10.47 $\pm$ 0.69	13.91 $\pm$ 1.19	2.82 $\pm$ 0.05	7.92 $\pm$ 0.43
	Exercise	7.72 $\pm$ 0.36	2.58 $\pm$ 0.14	12.78 $\pm$ 1.80	15.88 $\pm$ 1.13	2.80 $\pm$ 0.04	6.36 $\pm$ 0.70
	tDCS	7.58 $\pm$ 0.27	2.53 $\pm$ 0.15	11.36 $\pm$ 1.05	13.26 $\pm$ 0.89	3.24 $\pm$ 0.05	7.10 $\pm$ 0.29
	Sham-tDCS + Exercise	9.20 $\pm$ 0.37	3.42 $\pm$ 0.13	11.66 $\pm$ 0.73	16.79 $\pm$ 0.72	3.16 $\pm$ 0.03	7.11 $\pm$ 0.21
	tDCS + Exercise	8.62 $\pm$ 0.26	2.56 $\pm$ 0.11	13.28 $\pm$ 1.55	15.04 $\pm$ 1.44	3.50 $\pm$ 0.14	7.98 $\pm$ 0.58
NP	Pain	8.08 $\pm$ 0.26	2.43 $\pm$ 0.14	12.40 $\pm$ 1.96	16.50 $\pm$ 1.43	2.78 $\pm$ 0.07	5.55 $\pm$ 0.28
	Sham-tDCS	7.98 $\pm$ 0.13	2.90 $\pm$ 0.06	14.11 $\pm$ 2.09	16.88 $\pm$ 2.19	2.74 $\pm$ 0.01	7.35 $\pm$ 0.59
	Exercise	7.14 $\pm$ 0.11	2.86 $\pm$ 0.16	11.05 $\pm$ 1.00	16.78 $\pm$ 1.21	2.53 $\pm$ 0.08	6.03 $\pm$ 0.42
	tDCS	8.73 $\pm$ 0.38	2.97 $\pm$ 0.21	12.39 $\pm$ 0.87	17.68 $\pm$ 3.06	3.57 $\pm$ 0.05	6.80 $\pm$ 0.49
	Sham-tDCS + Exercise	8.81 $\pm$ 0.38	2.78 $\pm$ 0.19	14.89 $\pm$ 0.24	17.44 $\pm$ 2.41	3.39 $\pm$ 0.12	8.02 $\pm$ 0.14
	tDCS + Exercise	8.77 $\pm$ 0.30	3.58 $\pm$ 0.12	15.36 $\pm$ 0.72	14.53 $\pm$ 2.07	3.29 $\pm$ 0.15	6.58 $\pm$ 0.36

compared to the Sham-Pain groups. Moreover, the PS group displayed increased IL-1 $\beta$  levels compared to the SS group; the PE group also displayed increased IL-1 $\beta$  levels compared to the SE group. Furthermore, there were interactions between pain and exercise ( $F_{(1,120)} = 11.121$ , p < 0.001) and pain and time ( $F_{(1,120)} = 5.578$ , p < 0.05). There was a main effect of pain ( $F_{(1,120)} = 17.092$ , p < 0.001).

Regarding IL-4 levels, there was an interaction between pain, tDCS, and exercise (four-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,120)} = 3.357$ , p < 0.05; Table 2). The Pain, PS, and PT groups showed increased IL-4 levels compared to the Sham-Pain, SS, and ST groups. Moreover, the PTE group showed increased IL-4 levels compared to the STE group. Furthermore, there were interactions between pain, tDCS,

and time ( $F_{(2,120)} = 3.091$ , p < 0.05); tDCS, exercise, and time ( $F_{(2,120)} = 3.401$ , p < 0.05); pain and exercise ( $F_{(1,120)} = 6.889$ , p < 0.02); and pain and time ( $F_{(1,120)} = 5.778$ , p < 0.02). There were main effects of pain ( $F_{(1,120)} = 35.294$ , p < 0.001); tDCS ( $F_{(2,120)} = 6.369$ , p < 0.01) and time ( $F_{(1,120)} = 156.300$ , p < 0.001).

*Spinal cord BDNF, IL-1 $\beta$ , and IL-4 levels*

Regarding BDNF levels, there was an interaction between pain, tDCS, exercise, and time (four-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,120)} = 3.150$ , p < 0.05; Table 3). At 48 h and 7 days post-treatment, the Pain group displayed increased BDNF levels compared to the Sham-Pain group. At 48 h post-treatment, the PS

**Table 2**

BDNF, IL-1 $\beta$  and IL-4 levels in the brainstem assessed at 48 h and 7 days after the bimodal tDCS treatment and/or treadmill exercise (n = 6 per group). Data presented as mean standard error of the mean (SEM) pg/mg of protein. Sham-Pain (S), Sham-Pain + Sham-tDCS (SS), Sham-Pain + Exercise (SE), Sham-Pain + tDCS (ST), Sham-Pain + Sham-tDCS + Exercise (SSE), Sham-Pain + tDCS + Exercise (STE) Pain-Group (P), Pain-Sham-tDCS (PS), Pain + Exercise (PE), Pain + tDCS (PT), Pain + Sham-tDCS + Exercise (PSE) and Pain + tDCS + Exercise (PTE).  
BDNF: significant 4-way interactions between: pain vs exercise vs tDCS (p < 0.05); pain vs exercise vs time (p < 0.01); tDCS vs time (p < 0.01); pain vs tDCS (p < 0.05) and pain vs exercise (p < 0.01). There was a main effect of time (p < 0.001). IL-1 $\beta$ : significant 4-way interactions between: pain vs exercise vs tDCS (p < 0.01); pain vs time (p < 0.05); and pain vs exercise (p < 0.001). There was a main effect of pain (p < 0.001). IL-4: significant 4-way ANOVA interaction between: pain vs tDCS vs exercise (p < 0.05); exercise vs tDCS vs time (p < 0.05); pain vs tDCS vs time (p < 0.05); pain vs time (p < 0.02); and pain vs exercise (p < 0.02). There were main effects of time (p < 0.001); tDCS (p < 0.01); and pain (p < 0.001).

Brainstem		BDNF levels (pg/mg of protein)		IL-1 $\beta$ levels (pg/mg of protein)		IL-4 levels (pg/mg of protein)	
Biomarkers							
Groups		48 h	7 days	48 h	7 days	48 h	7 days
Sham NP	Sham-Pain	16.28 $\pm$ 1.28	12.90 $\pm$ 0.39	78.15 $\pm$ 22.82	67.1 $\pm$ 6.06	10.86 $\pm$ 2.68	3.65 $\pm$ 0.40
	Sham-tDCS	15.68 $\pm$ 1.35	13.29 $\pm$ 0.28	50.67 $\pm$ 21.09	72.6 $\pm$ 4.17	11.42 $\pm$ 2.94	3.88 $\pm$ 0.43
	Exercise	14.96 $\pm$ 1.37	12.30 $\pm$ 0.38	38.92 $\pm$ 19.38	87.5 $\pm$ 9.39	9.31 $\pm$ 1.98	4.88 $\pm$ 0.49
	tDCS	18.84 $\pm$ 0.50	14.15 $\pm$ 0.35	106 $\pm$ 26.2	87 $\pm$ 2.35	13.92 $\pm$ 2.71	6.12 $\pm$ 1.13
	Sham-tDCS + Exercise	15.95 $\pm$ 1.15	13.66 $\pm$ 0.50	135.9 $\pm$ 42.84	131 $\pm$ 8.55	18.02 $\pm$ 2.49	7.55 $\pm$ 0.72
	tDCS + Exercise	13.40 $\pm$ 0.45	14.22 $\pm$ 0.87	77.79 $\pm$ 28.54	120 $\pm$ 19	14.12 $\pm$ 2.14	9.02 $\pm$ 1.16
NP	Pain	16.08 $\pm$ 1.01	12.58 $\pm$ 0.32	151.1 $\pm$ 16.14	102 $\pm$ 11.9	13.69 $\pm$ 2.02	8.70 $\pm$ 0.71
	Sham-tDCS	19.00 $\pm$ 0.70	13.51 $\pm$ 0.90	135.9 $\pm$ 32.66	94 $\pm$ 5.57	16.36 $\pm$ 3.04	9.66 $\pm$ 1.62
	Exercise	16.41 $\pm$ 1.82	14.36 $\pm$ 1.08	214.1 $\pm$ 26.03	133 $\pm$ 9.83	19.69 $\pm$ 1.16	9.17 $\pm$ 0.77
	tDCS	11.06 $\pm$ 0.50	14.43 $\pm$ 0.49	132.3 $\pm$ 33.86	130 $\pm$ 6.36	24.32 $\pm$ 2.21	9.26 $\pm$ 0.40
	Sham-tDCS + Exercise	17.08 $\pm$ 1.44	14.27 $\pm$ 1.20	112.6 $\pm$ 36.27	101 $\pm$ 1.25	20.91 $\pm$ 2.13	5.82 $\pm$ 0.77
	tDCS + Exercise	15.73 $\pm$ 1.39	14.76 $\pm$ 1.23	88.39 $\pm$ 30.87	98.4 $\pm$ 16.5	17.84 $\pm$ 0.81	7.40 $\pm$ 0.51



**Table 3**

BDNF, IL-1 $\beta$  and IL-4 levels in the spinal cord assessed at 48 h and 7 days after the bimodal tDCS treatment and/or treadmill exercise (n = 6 per group). Data presented as mean standard error of the mean (SEM) pg/mg of protein. Sham-Pain (S), Sham-Pain + Sham-tDCS (SS), Sham-Pain + Exercise (SE), Sham-Pain + tDCS (ST), Sham-Pain + Sham-tDCS + Exercise (SSE), Sham-Pain + tDCS + Exercise (STE) Pain-Group (P), Pain-Sham-tDCS (PS), Pain + Exercise (PE), Pain + tDCS (PT), Pain + Sham-tDCS + Exercise (PSE) and Pain + tDCS + Exercise (PTE).BDNF: significant 4-way ANOVA interactions between: pain vs exercise vs tDCS vs time (p < 0.05); pain vs exercise vs time (p < 0.05); pain vs exercise vs tDCS (p < 0.001); tDCS vs time (p < 0.05); exercise vs time (p < 0.05); exercise vs tDCS (p < 0.02); pain vs tDCS (p < 0.01) and pain vs exercise (p < 0.01). There were main effects of time (p < 0.001) and pain (p < 0.01).

IL-1 $\beta$ : significant 4-way ANOVA interactions between: pain vs tDCS (p < 0.01); tDCS vs time (p < 0.001) and pain vs time (p < 0.001). There were main effects of time (p < 0.001); tDCS (p < 0.01) and pain (p < 0.001). IL-4: significant 4-way ANOVA interactions between: pain vs exercise vs tDCS vs time (p < 0.01); exercise vs tDCS vs time (p < 0.05); tDCS vs time (p < 0.01); exercise vs time (p < 0.001); pain vs exercise (p < 0.01). There were main effects of time (p < 0.01); tDCS (p < 0.01); exercise (p < 0.05) and pain (p < 0.01).

Spinal Cord		BDNF levels (pg/mg of protein)		IL-1 $\beta$ levels (pg/mg of protein)		IL-4 levels (pg/mg of protein)	
Biomarkers							
Groups		48 h	7 days	48 h	7 days	48 h	7 days
Sham NP	Sham-Pain	2.92 $\pm$ 0.22	3.43 $\pm$ 0.45	53.58 $\pm$ 8.08	51.35 $\pm$ 3.37	11.69 $\pm$ 1.35	12.85 $\pm$ 2.26
	Sham-tDCS	3.34 $\pm$ 0.48	3.19 $\pm$ 0.23	67.30 $\pm$ 4.05	59.09 $\pm$ 5.14	14.01 $\pm$ 1.28	12.66 $\pm$ 1.67
	Exercise	3.73 $\pm$ 0.38	3.48 $\pm$ 0.07	79.28 $\pm$ 4.17	68.14 $\pm$ 9.13	15.31 $\pm$ 0.81	12.58 $\pm$ 0.51
	tDCS	3.24 $\pm$ 0.35	5.34 $\pm$ 0.42	63.66 $\pm$ 5.53	94.79 $\pm$ 0.63	17.39 $\pm$ 1.33	17.82 $\pm$ 0.84
	Sham-tDCS + Exercise	4.93 $\pm$ 0.40	4.16 $\pm$ 0.35	67.06 $\pm$ 1.74	73.32 $\pm$ 4.19	12.70 $\pm$ 0.92	15.35 $\pm$ 2.49
	tDCS + Exercise	2.82 $\pm$ 0.44	6.07 $\pm$ 0.48	61.49 $\pm$ 2.76	92.93 $\pm$ 9.57	11.41 $\pm$ 0.57	19.75 $\pm$ 1.63
NP	Pain	6.64 $\pm$ 0.24	6.89 $\pm$ 0.59	80.60 $\pm$ 3.98	104.99 $\pm$ 5.51	14.28 $\pm$ 0.41	7.69 $\pm$ 0.79
	Sham-tDCS	3.53 $\pm$ 0.57	4.27 $\pm$ 0.61	68.21 $\pm$ 1.60	115.22 $\pm$ 13.47	14.51 $\pm$ 1.19	19.36 $\pm$ 0.59
	Exercise	6.26 $\pm$ 0.42	4.41 $\pm$ 1.02	75.70 $\pm$ 8.36	85.45 $\pm$ 18.88	13.08 $\pm$ 1.77	14.36 $\pm$ 1.96
	tDCS	2.86 $\pm$ 0.48	4.44 $\pm$ 0.98	63.51 $\pm$ 6.79	120.08 $\pm$ 5.32	18.91 $\pm$ 0.85	17.19 $\pm$ 2.95
	Sham-tDCS + Exercise	2.50 $\pm$ 0.28	5.63 $\pm$ 1.42	77.39 $\pm$ 3.38	89.43 $\pm$ 11.58	15.67 $\pm$ 1.33	17.14 $\pm$ 1.45
	tDCS + Exercise	3.16 $\pm$ 0.39	5.55 $\pm$ 1.09	80.43 $\pm$ 4.36	122.84 $\pm$ 3.07	14.87 $\pm$ 1.77	26.73 $\pm$ 1.86

group displayed increased BDNF levels compared to the SS group; the PSE group displayed decreased BDNF levels compared to the SSE group. Furthermore, there were interactions between pain, tDCS, and exercise ( $F_{(2,120)} = 4.687$ ,  $p < 0.001$ ); pain, exercise, and time ( $F_{(1,120)} = 4.634$ ,  $p < 0.05$ ); pain and tDCS ( $F_{(2,120)} = 8.595$ ,  $p < 0.01$ ); pain and exercise ( $F_{(1,120)} = 9.909$ ,  $p < 0.01$ ); tDCS and exercise ( $F_{(2,120)} = 4.744$ ,  $p < 0.02$ ); tDCS and time ( $F_{(2,120)} = 8.421$ ,  $p < 0.05$ ); and exercise and time ( $F_{(1,120)} = 4.541$ ,  $p < 0.05$ ). There were main effects of time ( $F_{(1,120)} = 13.780$ ,  $p < 0.001$ ), and pain ( $F_{(1,120)} = 10.577$ ,  $p < 0.01$ ).

Regarding IL-1 $\beta$  levels, there was an interaction between pain and tDCS (four-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,120)} = 5.767$ ,  $p < 0.01$ ; Table 3). The PT groups displayed increased IL-1 $\beta$  levels compared to the ST groups. Moreover, there were interactions between pain and time ( $F_{(1,120)} = 16.458$ ,  $p < 0.001$ ) and tDCS and time ( $F_{(2,120)} = 12.925$ ,  $p < 0.001$ ). There were main effects of pain ( $F_{(1,120)} = 49.720$ ,  $p < 0.001$ ), tDCS ( $F_{(2,120)} = 6.728$ ,  $p < 0.01$ ), and time ( $F_{(1,120)} = 44.936$ ,  $p < 0.001$ ).

Regarding IL-4 levels, there was an interaction between pain, tDCS, exercise, and time (four-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,120)} = 5.100$ ,  $p < 0.01$ ; Table 3). At 7 days post-treatment, the Pain group displayed decreased IL-4 levels compared to the Sham-Pain group. Moreover, at 7 days post-treatment, the PE group displayed increased IL-4 levels compared to the SE group; the PTE group displayed increased IL-4 levels compared to the STE group. Moreover, there were interactions between tDCS, exercise, and time ( $F_{(2,120)} = 3.904$ ,  $p < 0.05$ ); pain and exercise ( $F_{(1,120)} = 11.118$ ,  $p < 0.01$ ); tDCS and time ( $F_{(2,120)} = 6.630$ ,  $p < 0.01$ ); and exercise and time ( $F_{(1,120)} = 23.886$ ,  $p < 0.001$ ). There were main effects of pain ( $F_{(1,120)} = 7.598$ ,  $p < 0.01$ ), tDCS ( $F_{(2,120)} = 20.603$ ,  $p < 0.01$ ), exercise ( $F_{(1,120)} = 8.147$ ,  $p < 0.05$ ), and time ( $F_{(1,120)} = 7.134$ ,  $p < 0.01$ ).

## Discussion

In this study, we showed that bimodal tDCS, aerobic exercise, or the combined treatments reverted thermal hyperalgesia in rats subjected to CCI. This effect was associated by a remarkable

increase of the nociceptive threshold in all times assessed. tDCS or aerobic exercise alone partially increased the mechanical threshold immediately and 24 h after the last treatment. However, the combined treatments only displayed a slight improvement in the mechanical threshold at 7 days after the last treatment. We also showed modulations of central biomarker levels indexed by interactions observed among independent variables (pain, tDCS, exercise, and time) or main effects. The combination of tDCS and exercise has been poorly investigated as an adjuvant treatment against chronic pain. To our knowledge, this is the first study evaluating the combined effect of tDCS and aerobic exercise on nociceptive behavior in a neuropathic chronic pain model.

The differences found in the analgesic response induced by treatments may be related to different pathways activated by mechanical or thermal stimuli; while the first test activates A $\beta$  fibers, the second mainly activates the A $\delta$  and C fibers [35]. Current data corroborate our previous study, which showed that tDCS abolished the thermal hyperalgesia induced by CCI but was less effective on mechanical hyperalgesia [25]. It should be stressed that the central sensitization process triggered by neuropathic pain modulates the activity of wide dynamic range (WDR) neurons in the deepest laminae of the dorsal horn. This occurs in response to injury, contributing to behavioral and electrophysiological changes in chronic pain models [36]. Therefore, we hypothesized that synaptic transmission in neurons of pain pathways is mostly affected by nerve injury.

Numerous studies have used tDCS to treat neurological disorders [37,38], and chronic pain [39,40]. Although the main action mechanism of tDCS remains unclear, its analgesic effects comprise the modulation of a wide range of neurotransmitters, receptors, and ionic channels, including glutamatergic, serotonergic, GABAergic, cannabinoid, and adenosinergic pathways [9,18]. Moreover, long-term effects triggered by tDCS are related to the facilitation of long-term potentiation phenomena [41].

However, exercise can provide both beneficial or detrimental effects [42]. The antinociceptive effects of exercise are mediated by opioid and non-opioid mechanisms, or an interaction between them [16,43]. Wheel running for 5 days before inducing muscle

pain has been reported to prevent the development of activity-induced hyperalgesia through modulation of serotonin transporters, mediated by mu-opioid receptors [44]. Cobiañchi et al. [45] showed that short- (from 3 to 7 days post-CCI), but not long-lasting treadmill running, fully reverted mechanical allodynia. In our study, 7 days post-surgery, the Sham-Pain groups still exhibited a mild response to thermal stimulus, implying that inflammatory pain signaling was still occurring.

Consistent with our previous study [46], the neuromodulatory effects of tDCS on central biomarker levels depended on the structure assessed. For instance, bimodal tDCS increased BDNF in the cerebral cortex but decreased BDNF in the brainstem. Several connections among midbrain structures might act to affect the pronociceptive process. Such studies hold that descending facilitation involving BDNF/trkB and p38/MAPK signaling pathways throughout the periaqueductal grey (PAG), rostroventromedial medulla (RVM), and spinal cord increases NMDAR phosphorylation to yield a pronociceptive effect [47,48].

The top-down effects triggered by tDCS have the ability to modulate peripheral and central cytokine levels. For example, IL-1 $\beta$  and IL-10 levels were changed by tDCS in a model of chronic pain [25], while in chronically stressed rats, tDCS modulated hippocampal TNF- $\alpha$  levels [28]. Moreover, tDCS decreased mostly interleukin (IL-4, IL-6, IL-10) levels in the serum in depressed patients [49]. These effects demonstrate the ability of tDCS to modulate cytokines levels in cortical and subcortical structures, beyond a humoral response, highlighting that their potential effects might be implicated in biomarker development.

Additionally, exercise reverted the increase in pain-induced BDNF levels in the spinal cord. This corroborates a previous study showing that neurotrophic factors and interleukins are modulated differently in response to exercise [50,51]. BDNF released from pain-activated glial cells in the spinal cord has been reported to drive a neuronal gradient shift inducing sensitization of primary

afferent neurons, which is restored by a BDNF antagonist [52] or exercise [53].

Our exercise protocol increased IL-4 levels in the brainstem and spinal cord but not in the cerebral cortex. Consistently, Bobinski et al. [54] showed that treadmill exercise increased IL-4 levels in the spinal cord in mice subjected to peripheral nerve injury. The anti-inflammatory and protective properties of IL-4 levels might be related to the preservation of spinal motor pathways through upregulation of arginase-1, IL-10, and CD206+ cells [55]. However, no effect was observed on IL-4 levels in the muscles and nerves in an axotomy mouse model after eccentric treadmill exercise [56]. Therefore, we hypothesize that the pattern of IL-4 expression depends on the exercise protocol (duration and intensity), pain model, and central structure analyzed. Furthermore, we also showed that IL-1 $\beta$  levels in the brainstem remained high after treadmill exercise. Contrastingly, Bobinski et al. [57] found decreased IL-1 $\beta$  levels in mice subjected to treadmill exercise. However, our exercise protocol began 15 days post-injury and lasted for 8 days, whereas their protocol began 3 days post-surgery and lasted for 10 days.

We also showed that exercise and/or tDCS modulates the hyperalgesic response and inflammatory profile in rats subjected to neuropathic pain. The reduction of the hypernociceptive response occurred from immediately to 7 days after the end of treatment (21 days post-surgery). However, we found no synergic effects between tDCS and aerobic exercise on the mechanical threshold in the short-term, but only a slight improvement in the long-term. Contrastingly, we showed a full reversal in thermal hyperalgesia. These discrepancies might be due to unknown mechanisms by which both treatments interact when applied in association [58]. Another explanation for such results is a ceiling effect, probably involving similar mechanisms between treatments [18,59]. Beyond that, it should be noted that exercise imposes stress upon the hypothalamic-pituitary-adrenal axis [60]. Therefore, we cannot

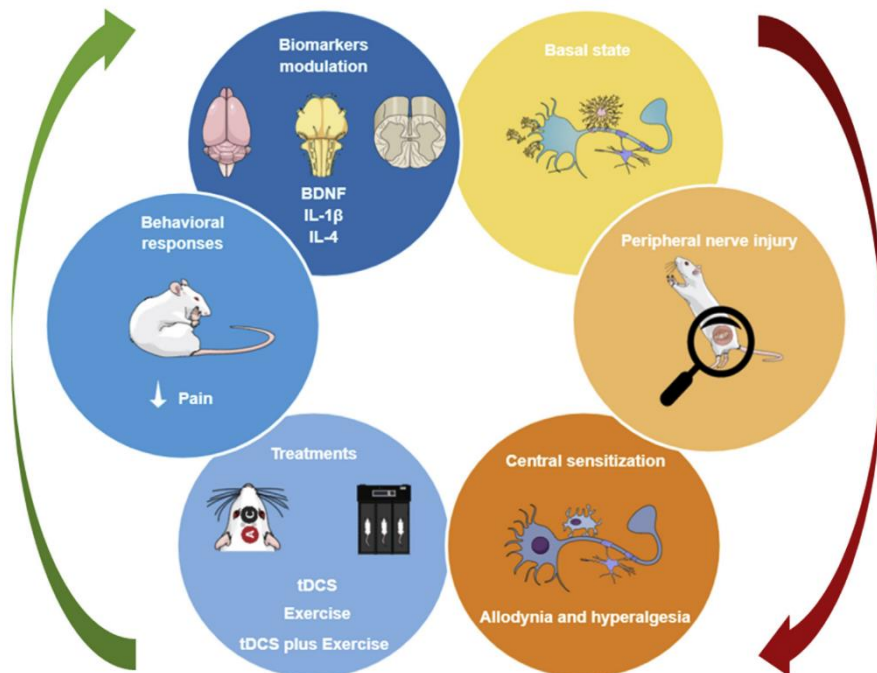


Fig. 3. Schematic representation of neuroimmunomodulatory effects of tDCS and/or exercise on neuropathic pain model in rats.

rule out that our employed protocol (treadmill exercise) had a stressor component, and that it may have interfered with the short-term effects. Contrastingly, a randomized placebo-controlled clinical trial has shown that tDCS to the primary motor cortex (M1) simultaneously applied with aerobic exercise reduced pain-related outcomes in human females with fibromyalgia [61]. We also found that the combined treatments increased BDNF and IL-4 levels in the rat cerebral cortex and brainstem, respectively. However, the combined treatments decreased IL-4 levels in the cerebral cortex. An explanation for that might be attributed to a structure-dependent function or interaction among pathways involved in exercise and/or tDCS mechanisms. More studies are required to elucidate the underlying mechanisms of combining these therapies and their effect on pain-related outcomes.

Our study has some limitations. Firstly, we only assessed the outcomes related to chronic pain in males, not females. Secondly, our protocol for  $VO_{2max}$  determination was based on an indirect method, and it is possible that some animals ran slightly above or below the maximal lactate steady state. Thirdly, the small head size of the rat and the restraint required for tDCS application allowed for only bimodal stimulation.

### Conclusions

Our study showed that tDCS and aerobic exercise can treat chronic pain. According with Fig. 3, it is possible to observe the neuroimmunomodulatory effects of the therapies applied. Both methods are safe, inexpensive, and accessible strategies in chronic pain management by reducing the side effects of a sedentary lifestyle, and providing whole-body benefits. To date, most studies have focused on non-specific drugs that trigger several side effects in addition to not treating the pathology. Therefore, tDCS or exercise treatments should take into account the situation of each individual, while adjusting parameters to produce more efficient results (stimulation intensity vs. exercise intensity; time to stimulation vs. exercise). More studies are required to elucidate how tDCS and exercise might be applied more efficiently and whether both interventions may be used as a treatment approach.

### Declaration of competing interest

None.

### CRediT authorship contribution statement

**Betega Costa Lopes:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Liciane Fernandes Medeiros:** Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. **Vanessa Silva de Souza:** Investigation, Writing - review & editing. **Stefania Giotti Cioato:** Investigation, Writing - review & editing. **Helouise Richardt Medeiros:** Investigation, Writing - review & editing. **Gabriela Gregory Regner:** Investigation, Writing - review & editing. **Camila Lino de Oliveira:** Investigation, Writing - review & editing. **Felipe Fregni:** Writing - review & editing. **Wolnei Caumo:** Writing - review & editing. **Iraci L.S. Torres:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

### Acknowledgements

This study was supported by the following Brazilian funding agencies: the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; I.L.S. Torres, W. Caumo); the Committee for

the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; B. C. Lopes, V.S. de Souza, H.R. Medeiros, G.G. Regner, C. L. de Oliveira); the Graduate Research Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG; I.L.S. Torres, Grant 20170061); MCT/FINEP – COENG/2013 (I.L.S. Torres, W. Caumo); Grant Doc-Fix FAPERGS/CAPES/04–2018; Grant Pesquisador Gaúcho/FAPERGS/02/2017 - 17/2551-0001.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.brs.2020.02.025>.

### References

- Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 2008;70:1630–5. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59>.
- Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ* 2014;348:1–12. <https://doi.org/10.1136/bmj.f7656>.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 2009;32:1–32. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135531>.
- Kawasaki Y, Zhang L, Cheng J-K, Ji R-R. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci* 2008;28:5189–94. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3338-07.2008>.
- Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>.
- Khan N, Smith MT. Neurotrophins and neuropathic pain: role in pathobiology. *Molecules* 2015;20:10657–88. <https://doi.org/10.3390/molecules200610657>.
- Nitsche M, Cohen L, Wassermann E, Priori A, Lang N, Antal A, et al. Transcranial direct current stimulation: state of the art 2008. *Brain Stimul* 2008;1:206–23. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2008.06.004>.
- Stagg CJ, Nitsche MA. Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *Neuroscientist* 2011;17:37–53. <https://doi.org/10.1177/1073858410386614>.
- Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N, et al. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *J Physiol* 2003;553:293–301. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049916>.
- Fregni F, Macedo IC, Spezia-Adachi LN, Scarabelot VL, Laste G, Souza A, et al. Transcranial direct current stimulation (tDCS) prevents chronic stress-induced hyperalgesia in rats. *Brain Stimul* 2018;11:299–301. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.11.009>.
- Laste G, Caumo W, Adachi LNS, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PRM, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp Brain Res* 2012;212:75–83. <https://doi.org/10.1007/s00221-012-3149-x>.
- Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Comp Physiol* 2012;2:1143–211. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110025>.
- Bobinski F, Martins DF, Bratti T, Mazzardo-Martins L, Winkelmann-Duarte EC, Guglielmo LG a, et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience* 2011;194:337–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.075>.
- Kuphal KE, Fibuch EE, Taylor BK. Extended swimming exercise reduces inflammation and peripheral neuropathic pain in rodents. *J Pain* 2007;8:989–97. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2007.08.001>.
- Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:3017–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015950108>.
- Stagg NJ, Mata HP, Ibrahim MM, Henriksen EJ, Porreca F, Vanderah TW, et al. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. *Anesthesiology* 2011;114:940–8. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318210f880>.
- Marie Petersen AW, Klarlund Pedersen B, Clin Biochem Stephen Bird AR, Linden M, Hawley JA, Rehabil Carlos Marcelo Pastre C, et al. The anti-inflammatory effect of exercise evidence for anti-inflammatory effects of exercise in CKD. *J Appl Physiol* 2005;1154:1154–62. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00164.2004>.
- Souza A, Martins DF, Medeiros LF, Nucci-Martins C, Martins TC, Siteneski A, et al. Neurobiological mechanisms of antiallodynic effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a mice model of neuropathic pain. *Brain Res* 2018;1682:14–23. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.005>.
- DosSantos MF, Love TM, Martikainen IK, Nascimento TD, Fregni F, Cummiford C, et al. Immediate effects of tDCS on the  $\mu$ -opioid system of a

- chronic pain patient. *Front Psychiatr* 2012;3:1–6. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2012.00093>.
- [20] Hoeger Bement MK, Weyer A, Hartley S, Yoon T, Hunter SK. Fatiguing exercise attenuates pain-induced corticomotor excitability. *Neurosci Lett* 2009;452:209–13. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.038>.
- [21] Stagg CJ, Best JG, Stephenson MC, O'Shea J, Wylezinska M, Kineses ZT, et al. Polarity-sensitive modulation of cortical neurotransmitters by transcranial stimulation. *J Neurosci* 2009;29:5202–6. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4432-08.2009>.
- [22] Hendrikse J, Kandola A, Coxon J, Rogasch N, Yücel M. Combining aerobic exercise and repetitive transcranial magnetic stimulation to improve brain function in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev* 2017;83:11–20. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.09.023>.
- [23] 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;233:1377–89. <https://doi.org/10.1007/s00221-015-4212-1>.
- [24] Schunck RVA, Torres ILS, Laste G, De Souza A, Macedo IC, Valle MTC, et al. Protracted alcohol abstinence induces analgesia in rats: possible relationships with BDNF and interleukin-10. *Pharmacol Biochem Behav* 2015;135:64–9. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.011>.
- [25] 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* 2016;9:209–17. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.12.001>.
- [26] Kilkenny C, Altman DG. Letter to the editor, 8; 2010. p. 377–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.
- [27] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result. *Pain* 1988;33:87–107. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6).
- [28] 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. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.10.009>.
- [29] Lefia DT, Bellaver B, Salvi AA, de Oliveira C, Caumo W, Grevet EH, 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 Stimul* 2018;11:743–51. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.04.001>.
- [30] Arida RM, Scorza FA, Dos Santos NF, Peres CA, Cavalheiro EA. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res* 1999;37:45–52. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(99\)00032-7](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(99)00032-7).
- [31] Netto CA, Siegfried B, Izquierdo I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol* 1987;48:304–9. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(87\)90850-8](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(87)90850-8).
- [32] Woolfe G, Macdonald ADA. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *J Pharmacol Exp Therapeut* 1944;80:300–7.
- [33] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [34] Ballinger GA. Using generalized estimating equations for longitudinal data analysis. *Organ Res Methods* 2004;7:127–50. <https://doi.org/10.1177/1094428104263672>.
- [35] Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain* 2011;152:S2–15. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.09.030>.
- [36] Nazemi S, Manaeji H, Noorbakhsh SM, Zaringhalam J, Sadeghi M, Mohammad-Zadeh M, et al. Inhibition of microglial activity alters spinal wide dynamic range neuron discharge and reduces microglial Toll-like receptor 4 expression in neuropathic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015;42:772–9. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12414>.
- [37] Lefia DT, de Souza A, Scarabelot VL, Medeiros LF, de Oliveira C, Grevet EH, et al. Transcranial direct current stimulation improves short-term memory in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 2016;26:368–77. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.11.012>.
- [38] Brunoni AR, Moffa AH, Sampaio B, Borrione L, Moreno ML, Fernandes RA, et al. Trial of electrical direct-current therapy versus escitalopram for depression. *N Engl J Med* 2017;376:2523–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1612999>.
- [39] Wen HZ, Gao SH, Zhao YD, He WJ, Tian XL, Ruan HZ. Parameter optimization analysis of prolonged analgesia effect of tDCS on neuropathic pain rats. *Front Behav Neurosci* 2017;11:1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00115>.
- [40] Antal A, Terney D, Kühnl S, Paulus W. Anodal transcranial direct current stimulation of the motor cortex ameliorates chronic pain and reduces short intracortical inhibition. *J Pain Symptom Manag* 2010;39:890–903. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2009.09.023>.
- [41] Podda MV, Cocco S, Mastrodonato A, Fusco S, Leone L, Barbati SA, et al. Anodal transcranial direct current stimulation boosts synaptic plasticity and memory in mice via epigenetic regulation of Bdnf expression. *Sci Rep* 2016;6. <https://doi.org/10.1038/srep22180>.
- [42] Lima LV, Abner TSS, Sluka KA. Does exercise increase or decrease pain? Central mechanisms underlying these two phenomena. *J Physiol* 2017;595:4141–50. <https://doi.org/10.1113/jp273355>.
- [43] Koltyn KF, Brellenthin AG, Cook DB, Sehgal N, Hillard C. A ut or iza po r C a a Co or da. *J Pain* 2015;15:1294–304. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.09.006>.
- [44] Lima LV, Desantana JM, Rasmussen LA, Sluka KA. Short-duration physical activity prevents the development of activity-induced hyperalgesia through opioid and serotonergic mechanisms, 158; 2017. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000967>.
- [45] Cobiauchi S, Marinelli S, Florenzano F, Pavone F, Luvisetto S. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 2010;168:273–87. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.035>.
- [46] Filho PRM, 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-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2016;64:44–51. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016>.
- [47] Ni HD, Yao M, Huang B, Xu LS, Zheng Y, Chu YX, et al. Glial activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation of neuropathic pain through the p38 MAPK signaling pathway. *J Neurosci Res* 2016;94:50–61. <https://doi.org/10.1002/jnr.23672>.
- [48] Guo W, Robbins MT, Wei F, Zou S, Dubner R, Ren K. Supraspinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for descending pain facilitation. *J Neurosci* 2006;26:126–37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3686-05.2006>.
- [49] Brunoni AR, Machado-Vieira R, Zarate CA, Valiengo L, Vieira EL, Bensenor IM, et al. Cytokines plasma levels during antidepressant treatment with sertraline and transcranial direct current stimulation (tDCS): results from a factorial, randomized, controlled trial 49. *Psychopharmacol* 2014;231:1315–23. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3322-3>.
- [50] Leung A, Gregory NS, Allen LAH, Sluka KA. Regular physical activity prevents chronic pain by altering resident muscle macrophage phenotype and increasing interleukin-10 in mice. *Pain* 2016;157:70–9. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000312>.
- [51] Gómez-Pinilla F, Ying Z, Opazo P, Roy RR, Edgerton VR. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci* 2001;13:1078–84. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01484.x>.
- [52] Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 2005;438:1017–21. <https://doi.org/10.1038/nature04223>.
- [53] López-Álvarez VM, Modol L, Navarro X, Cobiauchi S. Early increasing-intensity treadmill exercise reduces neuropathic pain by preventing nociceptor collateral sprouting and disruption of chloride cotransporters homeostasis after peripheral nerve injury. *Pain* 2015;156:1812–25. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000268>.
- [54] Bobinski F, Teixeira JM, Sluka KA, Santos ARS. Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain, 159; 2018. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001109>.
- [55] Francos-Quijorna I, Amo-Aparicio J, Martínez-Muriana A, López-Vales R. IL-4 drives microglia and macrophages toward a phenotype conducive for tissue repair and functional recovery after spinal cord injury. *Glia* 2016;64:2079–92. <https://doi.org/10.1002/glia.23041>.
- [56] Martins DF, Martins TC, Batisti AP, dos Santos Leonel L, Bobinski F, Belmonte LAO, et al. Long-term regular eccentric exercise decreases neuropathic pain-like behavior and improves motor functional recovery in an axonotmesis mouse model: the role of insulin-like growth factor-1. *Mol Neurobiol* 2018;55:6155–68. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0829-3>.
- [57] Bobinski F, Ferreira TAA, Córdova MM, Dombrowski PA, Da Cunha C, Santo CCDE, et al. Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low-intensity exercise on neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice. *Pain* 2015;156:2595–606. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000372>.
- [58] Steinberg F, Pixa NH, Fregni F. A review of acute aerobic exercise and transcranial direct current stimulation effects on cognitive functions and their potential synergies. *Front Hum Neurosci* 2019;12:1–21. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00534>.
- [59] Meeusen R, De Meirleir K. Exercise and brain neurotransmission. *Sports Med* 1995;20:160–88. <https://doi.org/10.2165/00007256-199520030-00004>.
- [60] Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-Kandarakis E, Chrousos GP. Exercise and the stress system. *Hormones (Athens)* 2005;4:73–89.
- [61] Mendonca ME, Simis M, Grecco LC, Battistella LR, Baptista AF, Fregni F. Transcranial direct current stimulation combined with aerobic exercise to optimize analgesic responses in fibromyalgia: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Front Hum Neurosci* 2016;10. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00068>.

---

*5.2 Artigo 2. tDCS and exercise improve anxiety-like behavior and locomotion in chronic pain rats via modulation of neurotrophins and inflammatory mediators*

*Status: Publicado no periódico Behavioural Brain Research (2021)*

**tDCS and exercise improve anxiety-like behavior and locomotion in chronic pain rats via modulation of neurotrophins and inflammatory mediators**

Bettega Costa Lopes<sup>a,b</sup>, Liciane Fernandes Medeiros<sup>a,f,g\*</sup>, Dirson João Stein<sup>a,c</sup>, Stefania Giotti Cioato<sup>a</sup>, Vanessa Silva de Souza<sup>a,f</sup>, Helouise Richardt Medeiros<sup>a,c</sup>, Paulo Roberto Stefani Sanches<sup>d</sup>, Felipe Fregni<sup>e</sup>, Wolnei Caumo<sup>c</sup>, Iraci L.S. Torres<sup>a,b,c,f\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-Clínicas, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-007 Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Engenharia Biomédica, Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003 Porto Alegre, Brazil

<sup>e</sup> Laboratory of Neuromodulation, Department of Physical Medicine & Rehabilitation, Spaulding Rehabilitation Hospital & Massachusetts General Hospital. Harvard Medical School and Center for Non-invasive Brain Stimulation, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, 02215 Boston, USA

<sup>f</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, Brazil

<sup>g</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano, Universidade La Salle, 92010-000 Canoas, Brazil

Declarations of interest: none

\* Corresponding authors:

\* Iraci L.S. Torres

Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-Clínicas

Centro de Pesquisa Experimental

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

CEP: 90035-007 Porto Alegre, Brazil

Phone: +55-51 3359-8847

E-mail: [iltorres@hcpa.edu.br](mailto:iltorres@hcpa.edu.br)

\* Liciane F. Medeiros

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano

Universidade La Salle

CEP: 92010-000, Canoas, RS, Brazil

Phone: +55-51 3476-8481

e-mail: [licimedeiros@gmail.com](mailto:licimedeiros@gmail.com)

## Highlights

- Neuropathic pain triggered anxiogenic-like behavior in rats.
- There was a synergic anxiolytic effect of the combination between tDCS and exercise.
- Repeated bimodal tDCS was effective in relieving the anxiety-like behavior.
- Eight sessions of exercise were able to relief the anxiety-like behavior.
- Peripheral and central neuroimmunomodulatory effects of exercise and/or tDCS.



### **Abstract**

Anxiety disorders cause distress and are commonly found comorbid with chronic pain. Both are difficult to treat conditions, for which alternative treatment options are being pursued. This study aimed to evaluate the effects of transcranial direct current stimulation (tDCS), treadmill exercise or both combined on the anxiety-like behavior and associated growth factors and inflammatory markers in the hippocampus and sciatic nerve of neuropathic pain rats. Male Wistar rats (n=216) were subjected to sham-surgery or sciatic nerve constriction for pain induction. Fourteen days following neuropathic pain establishment, bimodal tDCS, treadmill exercise or the combination of both were used for 20 minutes a day during 8 consecutive days. Elevated Plus Maze test was used to assess anxiety-like behavior and locomotor activity at early (24 h) or late (7 days) phase after the end of treatment. BDNF, TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels in the hippocampus, and BDNF, NGF and IL-10 levels in the sciatic nerve were assessed at 48h or 7 days after the end of treatment. Rats from the pain groups developed an anxiety-like state. Both tDCS and treadmill exercise provided ethological and neurochemical alterations induced by pain at early and/or late phase; also, a modest synergic effect between tDCS and exercise was observed. These results indicate that non-invasive neuromodulatory approaches can attenuate the anxiety-like status, locomotor activity and alter the biochemical profile in the hippocampus and sciatic nerve of neuropathic pain rats, and that combined interventions may be considered as treatment options.

**Keywords:** pain, anxiety, tDCS, exercise, biomarkers

## 1. Introduction

Chronic pain and neuropsychiatric diseases share broad neurobiological features, which makes it difficult to identify whether depression and/or anxiety disorders result from chronic pain conditions or vice versa. A useful example comes from a study in which prime anxiety increased pain intensity and changed the activation pattern in the human hippocampus [1]. However, other central and peripheral structures in different pain conditions should be investigated for these neurofunctional and neurochemical alterations, in order to unravel the causes of pain-induced anxiety behaviors [2].

It should also be emphasized that chronic pain unleashes widespread physiological impairment in limbic structures. These effects range from an increase in anxiety-like behavior and in the inability to extinguish context fear conditioning to a marked shrink in hippocampal volume in mice and humans with chronic pain, respectively [3]. Moreover, chronic pain seems to be implicated in higher TNF- $\alpha$ /BDNF ratio in both hippocampi in mice [4], and TNF- $\alpha$ /IL-10, as well as TNF- $\alpha$ /IL-4 ratios in serum of humans with generalized anxiety disorder [5].

The role that neurotrophic factors, as BDNF and NGF, have in neuronal survival, plasticity and regeneration, is well described. On the other hand, these neurotrophins are also involved in central pain sensitization in both mice and humans [6,7]. Notably, the upregulation of neurotrophins, prostaglandins and proinflammatory cytokines following an injury, along with synaptic facilitation through overexpression of sodium channels in dorsal root ganglia (DRG) neurons contribute to central sensitization [8]. These effects might be abrogated, in part, by the antinociceptive role that interleukin-10 (IL-10) has, which downregulates voltage-gated sodium channels in neuropathic pain conditions [9], being a potential therapeutic target for pain management. Altogether, these reports warn for a key role of pain, neurotrophins and cytokines as drivers of neuroinflammatory-induced anxiety disorders, and outline that use of non-pharmacological approaches may be paramount to cope with disease-related outcomes.

Neuromodulatory techniques such as transcranial direct current stimulation (tDCS) and physical exercise have increasingly been investigated in preclinical and clinical settings. Although the tDCS action mechanisms are not yet well elucidated, it has been thought that it involves a top-down modulation of neural networks, including glial cells, through weak electrical currents applied upon the scalp [10,11]. tDCS has also shown promising effects in the treatment of neuropsychiatric diseases such as chronic

pain-induced anxiety, generalized anxiety disorder and depression [12]. On the other hand, a wealth of studies assessing the effects of exercise on anxiety have shown conflicting results. For instance, a report showed that the anxiolytic effects triggered by exercise were similar to those provided by anxiolytic drugs in rats [13], while others pointed out that treadmill or voluntary running exercise protocols in rodents prompt anxiogenic effects, probably reflecting assessment at different time points after exercise have ceased [14–16].

It is noteworthy that both neuromodulatory approaches lie upon modification of a wide range of systems and neurotransmitters, including some that are similar pathways between tDCS and exercise such as serotonergic, noradrenergic and dopaminergic [17–19]. On the other hand, the means by which both interventions interact remains unclear and should be further pursued, mainly over chronic pain states, once tDCS likely has more effective outcomes when associated with other therapies [20]. Therefore, we hypothesized that the combination of tDCS and exercise would trigger even more pronounced anxiolytic effects upon anxiety-related behavior induced by neuropathic pain, and neurochemical profile when compared to single treatment.

## 2. Material and Methods

Male Wistar rats (n=216; 8 weeks old, weighing 300±20g) were weighed and assigned in a number of 3 into polypropylene cages (49 × 34 × 16 cm) with sawdust-covering flooring. All rats were kept in a controlled environment (22±2°C room temperature, ~60% relative air humidity, and dark/light cycle 12h/12h – lights on at 7 a.m.) with water and rodent chow available *ad libitum*. The experiments followed the ARRIVE Guidelines [21] and the Brazilian Law #11.794 and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (GPPG-HCPA #20170061 and #20180034).

### 2.1 Groups

On day 0, weight-matched rats were initially assigned in two groups for Sham-Pain or Pain surgery. Fourteen days after surgical procedure, rats were then subdivided to 12 subgroups (n = 9 rats/group) according to the treatments: Sham-Pain; Sham-Pain+Sham-tDCS; Sham-Pain+Exercise; Sham-Pain+tDCS; Sham-Pain+Sham-

tDCS+Exercise; Sham-Pain+tDCS+Exercise, Pain; Pain+Sham-tDCS; Pain+Exercise; Pain+tDCS; Pain+Sham-tDCS+Exercise; Pain+tDCS+Exercise.

## 2.2 Experimental Design

As depicted in Figure 1, throughout 14 days after CCI or sham surgery, rats from the pain groups gradually developed mechanical and thermal hypersensitivity, features of chronic neuropathic pain [22,23]. Weight-matched rats were then assigned to 12 subgroups, as described above. From day 15 to 22, rats were treated with tDCS, exercise or both combined, during 8 consecutive days. Twenty-four hours (early-phase, day 23; n=108) and 7 days (late-phase, day 29; n=108) after the end of treatment, rats were assessed for anxiety-like behavior. Finally, 24 hours after the end of behavioral tests, rats were euthanized by decapitation and the left sciatic nerve and hippocampi were harvested (Fig. 1).

---Figure 1---

## 2.3 Chronic Neuropathic Pain Model

Initially, rats were anesthetized by isoflurane inhalation (5% for induction, and 3% to maintenance), and placed in lateral position on a heating pad surface at 30°C (to maintain the body temperature). The fur was shaved on the left paw and skin antiseptics was performed using 2% Povidone Iodine. Under the absence of any paw pinch response and eye blink, the common left sciatic nerve was exposed in the middle third of the thigh, and three loose ligatures (4.0 Vycril) were tied at 1mm intervals. All care was taken to not interrupt epineurial blood flow [24]. Similar procedures were used for sham surgery, but the nerve was not ligated. At the end of surgery, the sciatic nerve was returned to its position and the skin was sutured using 4.0 mononylon.

## 2.4 Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS)

First, the top of the head of all rats were shaved. Next, pediatric electrocardiogram (ECG) electrodes with conductive gel were trimmed to 1.5mm<sup>2</sup>, and connected to a battery-driven stimulator of 0.5mA current, which provided a current

density of  $0.33\text{mA}/\text{cm}^2$ , avoiding lesions [25]. Then, rats were gently restrained and had their heads soaked with saline (0.9% NaCl). After that, the anodal and cathodal electrodes were placed on the head (bimodal stimulation) using landmarks of the neck and shoulder lines as a guide, and at the midpoint between the lateral angles of both eyes, respectively. Finally, our stimulation protocol lasted 20 min a day, for 8 consecutive days (8:00 – 9:30 a.m.). Sham stimulated rats underwent similar procedures, yet the stimulator was switched off.

## 2.5 Exercise Protocol

A week before surgery, the rats were gradually habituated to the treadmill. On day 1 of training, rats were allowed to recognize the apparatus during 20 minutes in the switched off mode. From day 2 to 4, rats were gradually conditioned to run by increasing the exposure time on the treadmill from 10 to 20 and 30 minutes, respectively, at low speed (5m/min). Finally, we determined the  $\text{VO}_{2\text{max}}$  on the 5 days using an indirect method [26]. Briefly, the rats started to run at 7m/min for 3 minutes, with a ramping up speed of 5m/min each three minutes until the point of exhaustion. The time to fatigue (in min), and workload (in m/min) were obtained as indexes of aerobic capacity, which in turn, were taken as  $\text{VO}_{2\text{max}}$ . The exercise protocol consisted of running sessions at 70% of  $\text{VO}_{2\text{max}}$ , during 20 minutes, for 8 consecutive days, with  $0^\circ$  slope.

## 2.6 Elevated Plus Maze (EPM)

To assess anxiety-like behavior, the elevated plus-maze test was performed. The EPM apparatus is composed of two open and two enclosed arms ( $50 \times 40 \times 10$  cm), extended from a common central platform ( $10 \times 10$  cm) and elevated 50 cm from the floor. Briefly, rats were placed individually in the EPM central area facing one of the open arms, and a video camera attached to the ceiling recorded the test during a 5-min trial session. After each trial, the apparatus was cleaned with 70% alcohol in order to eliminate olfactory cues from previous tested rats. This test was carried out between 8:00 a.m and 12:00 p.m. and rats were tested only once [27]. The videos were afterwards analyzed by a blind experimenter and the following behaviors were evaluated: (1) number of entries in the open arms (EOA); (2) time spent in the open arms (TOA), (3) number of non-protected head-dipping movements (NPHD), (4) number of entries in the closed arms

(ECA), (5) time spent in the closed arms (TCA), and (6) total number of crossing (TC).

## 2.7 Tissue Collection and Molecular Analysis

Forty-eight hours or 7 days after the end of treatment, rats were killed by decapitation. The hippocampi and the left sciatic nerve were readily removed, homogenized in protease inhibitor cocktail (P8340 SIGMA<sup>®</sup>) diluted in phosphate buffer saline (PBS), and centrifuged at 2800 g for 10 minutes. After that, aliquots were collected and stored at -80°C for posterior analysis. BDNF, NGF, TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels were assessed by ELISA according to the manufacturer (R&D; Minneapolis, MN). All values were adjusted by the amount of protein in the sample using bovine serum albumin as standard [28], and the results were expressed as pg/mg of protein.

## 2.8 Statistical Analysis

For behavioral and biochemical analysis, a  $2 \times 3 \times 2$  three-way ANOVA was performed, taking into account the following conditions: sham-pain  $\times$  pain; stimulation: No-tDCS  $\times$  Sham-tDCS  $\times$  tDCS; and treatment: exercise  $\times$  sedentary as independent variables. If a statistical difference was found, the Bonferroni post-hoc test was run to determine the interactions or main effects. All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and p-values  $< .05$  were considered statistically significant using SPSS 26.0.

## 3. Results

### 3.1 Anxiety-like behavior and locomotor activity

Regarding EOA in the early phase, there was an interaction between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,96)} = 3.515$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 2; Panel A); where tDCS applied in the Sham-Pain sedentary group increased the EOA compared to tDCS in Pain sedentary group. On the other hand, the pain group subjected to tDCS plus exercise had a higher number of EOA, compared to its counterpart. Also, there was a main effect of tDCS ( $F_{(2,96)} = 3.395$ ;  $p < 0.04$ ; Fig. 2; Panel A). Concerning EOA in the late phase, we found no significant statistical difference between groups (three-way

ANOVA,  $p > 0.05$ ; Fig. 2; Panel B).

Regarding TOA in the early phase, there was an interaction between pain  $\times$  exercise, where exercise was inclined to reverse the decreasing TOA induced by pain (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(1,96)} = 6.039$ ;  $p < 0.02$ ; adjusted  $p$ -value=0.051; Fig. 2; Panel C). Also, there was a main effect of tDCS ( $F_{(2,96)} = 6.604$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 2; Panel C). Concerning TOA in the late phase, there was an interaction between pain  $\times$  tDCS (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,96)} = 3.732$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 2; Panel D), where tDCS reverted the decreasing TOA induced by pain. Moreover, there was a main effect of pain ( $F_{(1,96)} = 4.439$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 2; Panel D).

Regarding NPHD in the early phase, there was an interaction between pain  $\times$  exercise (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,96)} = 3.476$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 2; Panel E), where exercise increased NPHD in pain groups. There was also a main effect of tDCS ( $F_{(1,96)} = 6.113$ ;  $p < 0.02$ ; Fig. 2; Panel E). Concerning NPHD in the late phase, there was a main effect of exercise (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(1,96)} = 6.898$ ;  $p = 0.01$ ; Fig. 2; Panel F), increasing the NPHD.

**---Insert Figure 2---**

Regarding ECA in the early phase, there was no statistically significant difference of interactions or main effects (three-way ANOVA,  $p > 0.05$ ; Table 1). On the other hand, in the late phase there was a main effect of tDCS ( $F_{(2,96)} = 5.356$ ;  $p < 0.01$ ; Table 1) increasing the ECA.

Regarding TCA in the early phase, there was an interaction between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,96)} = 3.229$ ;  $p < 0.05$ ; Table 1), where tDCS plus exercise reduced the TCA in the pain group. Moreover, there was a main effect of pain and tDCS ( $F_{(1,96)} = 5.619$ ;  $p < 0.05$ ;  $F_{(2,96)} = 3.754$ ;  $p < 0.05$ ; respectively; Table 1). Concerning TCA in the late phase, there was a main effect of exercise (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(1,96)} = 6.975$ ;  $p = 0.01$ ; Table 1) reducing this behavior, and pain ( $F_{(1,96)} = 6.143$ ;  $p < 0.02$ ; Table 1) increasing it.

Regarding total crossings in the early phase, there was no statistical difference between groups (three-way ANOVA;  $p > 0.05$ ; Table 1). Concerning late phase, there was a main effect of tDCS (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,96)} = 6.123$ ;  $p < 0.01$ ; Table 1) increasing the total number of crossings.

---Insert Table 1---

### 3.2 Hippocampal BDNF, TNF- $\alpha$ and IL-10 levels

Regarding BDNF levels in the early phase, there was an interaction between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,60)} = 3.205$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 3; Panel A), where tDCS or exercise in Pain groups showed an increase in the BDNF levels compared to its counterparts. There was also a main effect of pain ( $F_{(1,60)} = 11.498$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel A). In the late phase, there was an interaction between tDCS  $\times$  exercise ( $F_{(2,60)} = 16.277$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel B), where exercise or tDCS prevented a decrease in the BDNF levels associated with Sham-tDCS. However, when both variables were associated, there was a reduction in its levels. Moreover, there was also an interaction between pain  $\times$  exercise ( $F_{(1,60)} = 8.753$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel B), and a main effect of pain ( $F_{(1,60)} = 9.773$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel B), tDCS ( $F_{(2,60)} = 4.587$ ;  $p < 0.02$ ; Fig. 3; Panel B), and exercise ( $F_{(1,60)} = 6.890$ ;  $p < 0.02$ ; Fig. 3; Panel B).

Regarding TNF- $\alpha$  levels in the early phase, there was an interaction between pain  $\times$  exercise (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(1,60)} = 53.961$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel C), where exercise decreased the TNF- $\alpha$  levels in Pain groups. Moreover, there was an interaction between pain  $\times$  tDCS, also reducing TNF- $\alpha$  levels ( $F_{(2,60)} = 6.895$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel C). Also, there was a main effect of exercise ( $F_{(1,60)} = 36.589$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel C), and pain ( $F_{(1,60)} = 12.532$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel C). In the late phase, there was an interaction between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise ( $F_{(2,60)} = 7.031$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel D), where tDCS, exercise or the associated variables decreased TNF- $\alpha$  levels induced by pain. Moreover, there was an interaction between tDCS  $\times$  exercise ( $F_{(2,60)} = 9.889$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel D), pain  $\times$  exercise ( $F_{(1,60)} = 33.167$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel D), and pain  $\times$  tDCS ( $F_{(2,60)} = 18.835$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel D). Also, there was main effect of pain ( $F_{(1,60)} = 13.227$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel D), tDCS ( $F_{(2,60)} = 9.608$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel D), and exercise ( $F_{(2,60)} = 29.517$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 3; Panel D).

Regarding IL-10 levels in the early phase, there was a main effect of pain reducing it (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(1,60)} = 4.163$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 3; Panel E). In the late phase; however, no differences between groups were found (three-way ANOVA;  $p > 0.05$ ; Fig. 3; Panel F).

---Insert Figure 3---



### 3.3 Sciatic nerve NGF, BDNF and IL-10 levels

Regarding NGF levels in the early phase, there was an interaction between pain  $\times$  exercise (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(1,60)} = 4.055$ ;  $p < 0.05$ ; Fig. 4; Panel A), where the exercise in Sham-Pain groups increased the NGF levels. However, this effect was not observed in Pain-groups subjected to exercise. There was also a main effect of Pain, reducing NGF levels ( $F_{(1,60)} = 122.172$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 4; Panel A). In the late phase, there was an interaction between tDCS  $\times$  exercise (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,60)} = 9.475$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 4; Panel B), where tDCS or exercise increased NGF levels. However, when these variables were associated, this effect was not observed. Moreover, there was a main effect of exercise ( $F_{(1,60)} = 29.918$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 4; Panel B), increasing the NGF levels, and of pain, reducing it ( $F_{(1,60)} = 89.111$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 4; Panel B).

Regarding BDNF levels in the early phase, there was an interaction between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,60)} = 715.002$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 4; Panel C), where the association of tDCS and exercise increased BDNF levels only in pain groups. Moreover, there was a main effect of tDCS, exercise ( $F_{(2,60)} = 14.931$ ;  $F_{(1,60)} = 12.693$ ; for both  $p < 0.001$ ; Fig. 4; Panel C), and pain ( $F_{(1,60)} = 150.743$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 4; Panel C). In the late phase, there was an interaction between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(2,60)} = 5.458$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 4; Panel D), where exercise prevented a reduction in the BDNF levels induced by pain. However, this effect was not observed when associated with sham or active tDCS. Moreover, there was an interaction between tDCS  $\times$  exercise ( $F_{(2,60)} = 6.998$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 4; Panel D), pain  $\times$  exercise ( $F_{(1,60)} = 5.581$ ;  $p < 0.03$ ; Fig. 4; Panel D), and a main effect of tDCS ( $F_{(1,60)} = 5.581$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 4; Panel D), exercise ( $F_{(1,60)} = 4.836$ ;  $p < 0.04$ ; Fig. 4; Panel D), and pain ( $F_{(1,60)} = 319.731$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 4; Panel D).

Regarding IL-10 levels in the early phase, there was a main effect of pain (three-way ANOVA/Bonferroni,  $F_{(1,60)} = 223.840$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 4; Panel E), reducing it, whilst tDCS or exercise increased it ( $F_{(2,60)} = 10.499$ ;  $F_{(1,60)} = 13.504$ ; for both  $p < 0.001$ ; Fig. 4; Panel E). In the late phase, there was an interaction between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise ( $F_{(2,60)} = 8.361$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 4; Panel F), where IL-10 levels were reduced in pain groups, whilst tDCS and/or exercise increased its levels. Moreover, there was an interaction between tDCS  $\times$  exercise ( $F_{(2,60)} = 4.553$ ;  $p < 0.02$ ; Fig. 4; Panel F) and pain  $\times$  exercise ( $F_{(1,60)} = 8.113$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 4; Panel F). There was a main effect of pain,

reducing the IL-10 levels ( $F_{(1,60)} = 16.936$ ;  $p < 0.01$ ; Fig. 4; Panel F).

#### 4. Discussion

The main finding of our study was that both tDCS and treadmill exercise provided behavioral and neurochemical alterations in rats subjected to a chronic neuropathic pain model. As such, we observed increased anxiogenic-like behaviors induced by pain, effects that were attenuated by tDCS and/or exercise, in a time-dependent manner, probably reflecting distinct mechanisms of modulation upon neural pathways. In addition, pain and the applied treatments promoted neurochemical alterations in the source of injury (sciatic nerve) and in the hippocampus, an important limbic structure related with anxiety. Our results suggest that the anxiety-like behavior, the locomotor activity, and central and peripheral neurochemical parameters may be altered by neuromodulatory approaches. Thus, we suggest that complementary methods targeting to mitigate the disease-related outcomes might be considered as non-pharmacological treatments.

The neuropathic pain model induced by CCI in this study triggered anxiogenic-like behavior, indexed by a reduction of TOA in both phases, as well as reduced NPHD in the early phase. It is important to note that alterations in these parameters cannot be attributed to impairments in exploratory activity of these animals, since the total number of entries (crossings), commonly used as an index of locomotor activity [29] has not been changed by pain. Corroborating our data, previous studies have shown that neuropathic pain was associated with anxiety-like behavior by a decrease in time spent in the open arms, but not in the number of EOA [30,31]. On the other hand, a study found that neuropathic rats displayed an increased number of EOA and in the time spent in the central zone in the open field test [32].

Bimodal tDCS increased the total crossings in the late phase, an effect indexed by an increased number of ECA, suggesting an action on the corticospinal tract facilitation/modulation [33]. Moreover, pain rats subjected to tDCS plus exercise and sham-pain rats subjected to tDCS displayed a decrease in anxiety-like behavior regarding EOA. These findings suggest that the anxiolytic effect of tDCS observed is state-dependent [34,35], since tDCS alone increases the EOA in the sham-pain group (non-pain rats), while in pain rats, the association of tDCS and exercise was necessary to produce the same effect. Furthermore, in our previous study, we did not find a synergy in

the analgesic effect of tDCS and exercise in the same pain model, highlighting that the tDCS effect is dependent on the neurobiological basis of behavior under evaluation [22].

Exercise was found to have no effect in the TOA at late phase, but reduced TCA. This indicates that animals remained in the center of the apparatus, which is indicative of anxiety [36]. In the current study, neuropathic pain rats spent less TOA (early and late phases), but whilst exercise was inclined to mitigate it, only tDCS reverted this effect at late phase. This temporal difference might be due to the exercise effects through peripheral and central modulatory systems [37], whilst the delayed tDCS effects are attributed to its neuromodulatory feature and after-effects [38,39]. Previous reports have shown acute anxiolytic effects of exercise; however, 10 days after exercise have ceased, rats exhibited anxiety-like behavior [40,41]. Additionally, our previous study showed that tDCS triggered anxiolytic effects that lasted up to 7 days after the end of tDCS stimulation [42]. Surprisingly, we also noted a main effect of tDCS or exercise increased the NPHD at early phase and late phase, respectively, an effect opposed to the observed TOA. In this sense, we cannot exclude the possibility that the two therapeutic approaches used here may have contributed to these discrepant ethological patterns.

A body of evidence has suggested a link between anxiety and immune signaling in the hippocampus [29,43], which plays an important role in mnemonic, as well as in emotional-affective aspects. Here, we found that pain and both interventions modulated differently the hippocampal neurochemical profile. Whereas at early phase tDCS and/or exercise increased BDNF levels in pain rats compared to the sham-pain, at late phase, tDCS or exercise, but not its association, prevented a decrease in the BDNF levels induced by Sham-tDCS. It should be highlighted that a preclinical study showed that inflammatory and chronic pain decreased BDNF levels in the hippocampus and these effects were related with poor cognitive function, impaired neurogenesis, and anxiety [44–46]. On the other hand, it's well known that exercise induces neuroprotection through hippocampal BDNF/TrkB, PI3K/Akt signaling pathways and synaptophysin protein upregulation [47]. Moreover, it reduces the hippocampal TNF- $\alpha$  levels in aged neuroinflammatory rats [48]. Regarding tDCS, studies have pointed out that its long-term potentiation effects are dependent on polarity, NMDA-receptor and BDNF/TrkB downstream activation pathways [49–51]; but in ovariectomized rats that present hyperalgesia, no tDCS effect was found in the hippocampal BDNF levels [52]. Interestingly, the TNF- $\alpha$  levels in this same structure were increased in both phases in pain rats, but were reversed by tDCS and/or exercise. Overall, such results are in

agreement with our previous reports showing that tDCS increases BDNF, and decreases TNF- $\alpha$  levels in the hippocampus [53,54].

An imbalanced immune profile held by an increased production of proinflammatory cytokines, or an inappropriate anti-inflammatory response seems to be determinant on anxiety outcomes. For example, a recent study surprisingly showed that the administration of IL-10 or IL-1 $\beta$  alone produced an anxiogenic effect in rats, but when administered together, this effect was no longer observed [55]. In the current study, pain rats showed a decrease in the hippocampal IL-10 levels at early, without effect at late phase, suggesting that other pro- and/or anti-inflammatory mediators might be influencing these responses. Similarly, studies also demonstrated decreased IL-10 levels in chronic pain models in the ipsilateral dorsal [56], but not ventral or whole hippocampus [57]. In the same way, we cannot rule out the possibility of an overlapping site-specific effect, since BDNF and TNF- $\alpha$  levels have been involved in the tDCS and exercise responses in this structure, while the role of IL-10 in anxiety remains not well understood [58].

Beyond the central levels, we showed that neuropathic pain also reduced the sciatic nerve IL-10 levels up to 30 days after surgery, evidencing a long-lasting peripheral effect; and both treatments, alone or associated, were effective in restoring these levels. Of note, reduced IL-10 levels were also found in the DRG and sciatic nerve, 3 or 8 days following the CCI [59], an effect that has important implications, given its role in motor recovery and sensory function [60]. Furthermore, previous studies showed that combined or isolated therapies involving exercise and ultrasound/insulin also increased the IL-10 levels in the sciatic nerve of neuropathic pain rats [61,62], but not in mice [63]. A rational explanation among the studies may be the different physiological adaptations provided by exercise, including volume, intensity, duration, strain and slope treadmill degree.

Peripheral nerve injuries trigger the loss of a large number of sensory and motor neurons, effects that are closely related with trophic factors, leading to an impaired regeneration, sympathetic fibers sprouting and the development of thermal and mechanical hypersensitivity [64]. In our study, the decreased sciatic nerve NGF levels lasted up to 30 days after surgery. Meanwhile, in the early phase, it was found that NGF levels were upregulated only in sham-pain exercised rats, whilst in the late phase (30 days after surgery), both exercise and tDCS induced an increase in the NGF levels. It should be emphasized that in pain states, neurotrophins play an essential role not only in the initiation, but also in the maintenance of regenerative processes. For instance, systemic

administration of an anti-NGF antibody [65] and central (intrathecal but not in the red nucleus) NGF administration [66,67] displayed antinociceptive effects. In contrast, when injected into the tibialis anterior muscle in humans, NGF produced progressively increase of pain [68]. Of note, in clinical and preclinical pain studies, it was shown that exercise reverted the decrease in the nociceptive thresholds triggered by NGF [69,70]. To sum up, future reports should bridge the gap on how NGF paradoxically modulates nociceptive pathways in order to clarify our comprehension regarding this neurotrophin.

Studies have demonstrated that the hypersensitivity following nerve injuries is accompanied by an upregulation of BDNF in the DRG and spinal cord [71,72]. However, its role in the nerve is less clear and challenging as a therapeutic approach, once BDNF has a crucial role in regeneration and remyelination processes [73]. In the present study, we showed that pain decreased BDNF levels up to 30 days after surgery; besides that, tDCS and/or exercise increased it at early, but not at late phase. Such effects highlight that both interventions might trigger independent neuromodulatory effects, likely interact or even struggle by the same long-term effects when associated [74]. In this sense, the present study reinforces our comprehension regarding the dual role of neurotrophic factors on pain processing, and calls attention on what nerve injury-targeted therapies should take into consideration.

This study has some limitations and strengths that should be emphasized: a) our study used only males; b) while from the biochemical nerve analyses we took in consideration only the affected side, from the hippocampus we used both and whole structures, although it is well known that anatomical differences exist among dorsal and ventral regions; c) in our stimulation protocol, rats were awake, and therefore, there was no confounding factor of either anesthesia or Sham-tDCS (restraint); d) electrical shocks were not delivered during exercise to incite rats to run.

## 5. Conclusions

In summary, our findings showed the synergic effect of the combination of tDCS and exercise in alleviating the anxiogenic-like behavior induced by pain, as we have hypothesized before. This effect was observed in some parameters analyzed in the EPM; however, our results also showed an anxiolytic effect of exercise and tDCS alone. In this way, it highlights that these neuromodulatory techniques might share common mechanism pathways, but also have distinct actions, according to altered behavioral

parameters and lasting after-effects that were observed. In addition, the anxiety-like behavior may be related to an imbalance in the central cytokine levels, for example, increased hippocampal TNF- $\alpha$  levels in pain rats, that were restored to control levels by tDCS or exercise. On the other hand, the role of neurotrophins regarding chronic pain and neuromodulatory techniques highlighted in an increasing number of studies was also shown in this study. Moreover, in the current study, we also show the interface between peripheral and central biochemical alterations in the benefits of these neuromodulatory techniques, as depicted in Figure 5. Our findings have shown that both tDCS and exercise, or the combination of both, may be useful tools to treat anxiety frames associated or not with chronic pain diseases.

**---Insert Figure 5---**

## **Funding**

This work was supported by the following Brazilian funding agencies: The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; I.L.S. Torres, W. Caumo); the Committee for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; B. C. Lopes, V.S. de Souza, H.R. Medeiros, Stein, D.J.); the Graduate Research Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG; I.L.S. Torres, Grant #20170061 and #20180034); MCT/FINEP e COENG/2013 (I.L.S. Torres, W. Caumo, Sanches, P. R. S.); Grant Doc-Fix FAPERGS/CAPES/04e2018; Grant Pesquisador Gaúcho/FAPERGS/02/2017 - 17/2551-0001.

## **CRedit Author Statement**

Bettega C Lopes: Conceptualization, data curation; investigation; methodology, writing - original draft. Liciane F Medeiros: Supervision, writing – review & editing. Dirson Stein: Investigation and writing - review and editing. Stefania G Cioato, Investigation and writing - reviewing and editing. Vanessa S de Souza: Investigation and supervision. Helouise R Medeiros: Investigation. Paulo R S Sanches: Methodology, resources and validation. Felipe Fregni: Visualization. Wolnei Caumo: Formal analysis and writing – review & editing. Iraci L S Torres: Formal analysis, Funding acquisition, resources, supervision visualization and writing – review & editing.

,

## References

- [1] A. Ploghaus, C. Narain, C.F. Beckmann, S. Clare, S. Bantick, R. Wise, P.M. Matthews, J. Nicholas P Rawlins, I. Tracey, Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network, *J. Neurosci.* (2001). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-24-09896.2001>.
- [2] C. Alba-Delgado, A. Cebada-Aleu, J.A. Mico, E. Berrocoso, Comorbid anxietylike behavior and locus coeruleus impairment in diabetic peripheral neuropathy: A comparative study with the chronic constriction injury model, *Prog. NeuroPsychopharmacology Biol. Psychiatry.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.06.007>.
- [3] A.A. Mutso, D. Radzicki, M.N. Baliki, L. Huang, G. Banisadr, M. V. Centeno, J. Radulovic, M. Martina, R.J. Miller, A. Vania Apkarian, Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain, *J. Neurosci.* (2012). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0587-12.2012>.
- [4] Y. Liu, L.J. Zhou, J. Wang, D. Li, W.J. Ren, J. Peng, X. Wei, T. Xu, W.J. Xin, R.P. Pang, Y.Y. Li, Z.H. Qin, M. Murugan, M.P. Mattson, L.J. Wu, X.G. Liu, TNF- $\alpha$  differentially regulates synaptic plasticity in the hippocampus and spinal cord by microglia-dependent mechanisms after peripheral nerve injury, *J. Neurosci.* (2017). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2235-16.2016>.
- [5] R. Hou, M. Garner, C. Holmes, C. Osmond, J. Teeling, L. Lau, D.S. Baldwin, Peripheral inflammatory cytokines and immune balance in Generalised Anxiety Disorder: Case-controlled study, *Brain. Behav. Immun.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.021>.
- [6] Y. Terada, S. Morita-Takemura, A. Isonishi, T. Tanaka, H. Okuda, K. Tatsumi, T. Shinjo, M. Kawaguchi, A. Wanaka, NGF and BDNF expression in mouse DRG after spared nerve injury, *Neurosci. Lett.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.051>.
- [7] S. Paterson, M. Schmelz, F. McGlone, G. Turner, R. Rukwied, Facilitated neurotrophin release in sensitized human skin, *Eur. J. Pain.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2008.05.005>.
- [8] A. Latremoliere, C.J. Woolf, Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity, *J. Pain.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>.



- [9] K.F. Shen, H.Q. Zhu, X.H. Wei, J. Wang, Y.Y. Li, R.P. Pang, X.G. Liu, Interleukin-10 down-regulates voltage gated sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons, *Exp. Neurol.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.018>.
- [10] H. Monai, M. Ohkura, M. Tanaka, Y. Oe, A. Konno, H. Hirai, K. Mikoshiba, S. Itohara, J. Nakai, Y. Iwai, H. Hirase, Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain, *Nat. Commun.* (2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms11100>.
- [11] M. Nitsche, L. Cohen, E. Wassermann, A. Priori, N. Lang, A. Antal, W. Paulus, F. Hummel, P.S. Boggio, F. Fregni, A. Pascual-Leone, Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008, *Brain Stimul.* 1 (2008) 206–223. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2008.06.004>.
- [12] M. Kekic, E. Boysen, I.C. Campbell, U. Schmidt, A systematic review of the clinical efficacy of transcranial direct current stimulation (tDCS) in psychiatric disorders, *J. Psychiatr. Res.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.12.018>.
- [13] C.H. Duman, L. Schlesinger, D.S. Russell, R.S. Duman, Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice, *Brain Res.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.047>.
- [14] M.S. Costa, A.P. Ardais, G.T. Fioreze, S. Mioranza, P.H.S. Botton, L.V. Portela, D.O. Souza, L.O. Porciúncula, Treadmill running frequency on anxiety and hippocampal adenosine receptors density in adult and middle-aged rats, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.10.015>.
- [15] J. Fuss, N.M.B. Ben Abdallah, M.A. Vogt, C. Touma, P.G. Pacifici, R. Palme, V. Witzemann, R. Hellweg, P. Gass, Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis, *Hippocampus.* (2010). <https://doi.org/10.1002/hipo.20634>.
- [16] P.R. Burghardt, L.J. Fulk, G.A. Hand, M.A. Wilson, The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats, *Brain Res.* (2004). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.086>.
- [17] C. Fonteneau, J. Redoute, F. Haesebaert, D. Le Bars, N. Costes, M.F. SuaudChagny, J. Brunelin, Frontal transcranial direct current stimulation induces dopamine release in the ventral striatum in human, *Cereb. Cortex.* (2018).

<https://doi.org/10.1093/cercor/bhy093>.

[18] A. Souza, D.F. Martins, L.F. Medeiros, C. Nucci-Martins, T.C. Martins, A. Siteneski, W. Caumo, A.R.S. dos Santos, I.L.S. Torres, Neurobiological mechanisms of antiallodynic effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a mice model of neuropathic pain, *Brain Res.* 1682 (2018) 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.005>.

[19] R. Meeusen, K. De Meirleir, Exercise and Brain Neurotransmission, *Sport. Med.* 20 (1995) 160–188. <https://doi.org/10.2165/00007256-199520030-00004>.

[20] D.J. Stein, L.F. Medeiros, W. Caumo, I.L.S. Torres, Transcranial direct current stimulation in patients with anxiety: Current perspectives, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* (2020). <https://doi.org/10.2147/NDT.S195840>.

[21] C. Kilkenny, D.G. Altman, Letter to the Editor, 8 (2010) 377–378. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.

[22] B.C. Lopes, L.F. Medeiros, V. Silva de Souza, S.G. Cioato, H.R. Medeiros, G.G. Regner, C. Lino de Oliveira, F. Fregni, W. Caumo, I.L.S. Torres, 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). <https://doi.org/10.1016/j.brs.2020.02.025>.

[23] S.G. Cioato, L.F. Medeiros, P.R. Marques Filho, R. Vercelino, A. De Souza, V.L. Scarabelot, C. De Oliveira, L.N.S. Adachi, F. Fregni, W. Caumo, I.L.S. Torres, Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model, *Brain Stimul.* 9 (2016) 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.12.001>.

[24] G.J. Bennett, Y.K. Xie, A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result, *Pain.* 33 (1988) 87–107. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6).

[25] D.T. Leffa, A. de Souza, V.L. Scarabelot, L.F. Medeiros, C. de Oliveira, E.H. Grevet, W. Caumo, D.O. de Souza, L.A.P. Rohde, I.L.S. Torres, Transcranial direct current stimulation improves short-term memory in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26 (2016) 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.11.012>.

[26] R.M. Arida, F.A. Scorza, N.F. Dos Santos, C.A. Peres, E.A. Cavalheiro, Effect of

physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats, *Epilepsy Res.* 37 (1999) 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(99\)00032-7](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(99)00032-7).

[27] A.A. Walf, C.A. Frye, The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents, *Nat. Protoc.* (2007). <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.

[28] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* (1976). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

[29] M. Skurlova, A. Stofkova, J. Jurcovicova, Anxiety-like behavior in the elevated plus maze tests and enhanced IL-1 $\beta$ , IL-6, NADPH oxidase-1, and iNOS mRNAs in the hippocampus during early stage of adjuvant arthritis in rats, *Neurosci. Lett.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.10.032>.

[30] H. Murasawa, H. Kobayashi, K. Saeki, Y. Kitano, Anxiolytic effects of the novel  $\alpha 2\delta$  ligand miorogabalin in a rat model of chronic constriction injury, an experimental model of neuropathic pain, *Psychopharmacology (Berl.)* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05356-3>.

[31] K. Matsuzawa-Yanagida, M. Narita, M. Nakajima, N. Kuzumaki, K. Niikura, H. Nozaki, T. Takagi, E. Tamai, N. Hareyama, M. Terada, M. Yamazaki, T. Suzuki, Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites, *Neuropsychopharmacology.* (2008). <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301590>.

[32] F.S. Hasnie, V.C.J. Wallace, K. Hefner, A. Holmes, A.S.C. Rice, Mechanical and cold hypersensitivity in nerve-injured C57BL/6J mice is not associated with fearavoidance- and depression-related behaviour, *Br. J. Anaesth.* (2007). <https://doi.org/10.1093/bja/aem087>.

[33] D.T. Jeffery, J.A. Norton, F.D. Roy, M.A. Gorassini, Effects of transcranial direct current stimulation on the excitability of the leg motor cortex, *Exp. Brain Res.* (2007). <https://doi.org/10.1007/s00221-007-1093-y>.

[34] K. Nishida, Y. Koshikawa, Y. Morishima, M. Yoshimura, K. Katsura, S. Ueda, S. Ikeda, R. Ishii, R. Pascual-Marqui, T. Kinoshita, Pre-stimulus Brain Activity Is Associated With State-Anxiety Changes During Single-Session Transcranial Direct Current Stimulation, *Front. Hum. Neurosci.* (2019). <https://doi.org/10.3389/fnhum.2019.00266>.

- [35] A. Shahbabaie, M. Golesorkhi, B. Zamanian, M. Ebrahimipoor, F. Keshvari, V. Nejati, F. Fregni, H. Ekhtiari, State dependent effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) on methamphetamine craving, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* (2014). <https://doi.org/10.1017/S1461145714000686>.
- [36] É. Mikics, B. Barsy, B. Barsvári, J. Haller, Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: Effects on risk assessment in the elevated plusmaze and the open-field, *Horm. Behav.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.02.002>.
- [37] R.K. Dishman, H.R. Berthoud, F.W. Booth, C.W. Cotman, V.R. Edgerton, M.R. Fleshner, S.C. Gandevia, F. Gomez-Pinilla, B.N. Greenwood, C.H. Hillman, A.F. Kramer, B.E. Levin, T.H. Moran, A.A. Russo-Neustadt, J.D. Salamone, J.D. Van Hoomissen, C.E. Wade, D.A. York, M.J. Zigmond, *Neurobiology of exercise, Obesity.* (2006). <https://doi.org/10.1038/oby.2006.46>.
- [38] A. Jamil, G. Batsikadze, H.I. Kuo, L. Labruna, A. Hasan, W. Paulus, M.A. Nitsche, Systematic evaluation of the impact of stimulation intensity on neuroplastic after-effects induced by transcranial direct current stimulation, *J. Physiol.* (2017). <https://doi.org/10.1113/JP272738>.
- [39] D. Liebetanz, Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DCstimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability, *Brain.* (2002). <https://doi.org/10.1093/brain/awf238>.
- [40] J.A. Morgan, G. Singhal, F. Corrigan, E.J. Jaehne, M.C. Jawahar, J. Breen, S. Pederson, B.T. Baune, Ceasing exercise induces depression-like, anxiety-like, and impaired cognitive-like behaviours and altered hippocampal gene expression, *Brain Res. Bull.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.02.014>.
- [41] T. Nishijima, M. Llorens-Martín, G.S. Tejada, K. Inoue, Y. Yamamura, H. Soya, J.L. Trejo, I. Torres-Alemán, Cessation of voluntary wheel running increases anxiety-like behavior and impairs adult hippocampal neurogenesis in mice, *Behav. Brain Res.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.009>.
- [42] P.R.M. Filho, R. Vercelino, S.G. Cioato, L.F. Medeiros, C. de Oliveira, V.L. Scarabelot, A. Souza, J.R. Rozisky, A. da S. Quevedo, L.N.S. Adachi, P.R.S. Sanches, F. Fregni, W. Caumo, I.L.S. Torres, Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect, *Prog. NeuroPsychopharmacology Biol. Psychiatry.* 64 (2016) 44–51.

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016>.

[43] A. Haj-Mirzaian, S. Amiri, H. Amini-Khoei, M.J. Hosseini, A. Haj-Mirzaian, M. Momeny, M. Rahimi-Balaei, A.R. Dehpour, Anxiety- and Depressive-Like Behaviors are Associated with Altered Hippocampal Energy and Inflammatory Status in a Mouse Model of Crohn's Disease, *Neuroscience*. (2017). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.10.023>.

[44] S. Saffarpour, M. Shaabani, N. Naghdi, M. Farahmandfar, A. Janzadeh, F. Nasirinezhad, In vivo evaluation of the hippocampal glutamate, GABA and the BDNF levels associated with spatial memory performance in a rodent model of neuropathic pain, *Physiol. Behav.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.025>.

[45] J. Zheng, Y.Y. Jiang, L.C. Xu, L.Y. Ma, F.Y. Liu, S. Cui, J. Cai, F.F. Liao, Y. Wan, M. Yi, Adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis contributes differentially to environmental enrichment combined with voluntary exercise in alleviating chronic inflammatory pain in mice, *J. Neurosci.* (2017). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3333-16.2017>.

[46] V. Duric, K.E. McCarson, Persistent Pain Produces Stress-like Alterations in Hippocampal Neurogenesis and Gene Expression, *J. Pain.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2006.01.458>.

[47] Z.H. Fang, C.H. Lee, M.K. Seo, H.Y. Cho, J.G. Lee, B.J. Lee, S.W. Park, Y.H. Kim, Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats, *Neurosci. Res.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.04.005>.

[48] G.A. Lovatel, V.R. Elsner, K. Bertoldi, C. Vanzella, F. dos S. Moysés, A. Vizuite, C. Spindler, L.R. Cechinel, C.A. Netto, A.R. Muotri, I.R. Siqueira, Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, Neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus, *Neurobiol. Learn. Mem.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.01.007>.

[49] G. Kronberg, M. Bridi, T. Abel, M. Bikson, L.C. Parra, Direct Current Stimulation Modulates LTP and LTD: Activity Dependence and Dendritic Effects, *Brain Stimul.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.brs.2016.10.001>.

[50] M.V. Podda, S. Cocco, A. Mastrodonato, S. Fusco, L. Leone, S.A. Barbati, C. Colussi, C. Ripoli, C. Grassi, Anodal transcranial direct current stimulation boosts synaptic plasticity and memory in mice via epigenetic regulation of Bdnf

- expression, *Sci. Rep.* 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep22180>.
- [51] B. Fritsch, J. Reis, K. Martinowich, H.M. Schambra, Y. Ji, L.G. Cohen, B. Lu, Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: Potential implications for motor learning, *Neuron.* (2010). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.035>.
- [52] S.F. Da Silva Moreira, L.F. Medeiros, A. De Souza, C. De Oliveira, V.L. Scarabelot, F. Fregni, W. Caumo, I.L.S. Torres, Transcranial direct current stimulation (tDCS) neuromodulatory effects on mechanical hyperalgesia and cortical BDNF levels in ovariectomized rats, *Life Sci.* 145 (2016) 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.011>.
- [53] L.N. Spezia Adachi, A.S. Quevedo, A. de Souza, V.L. Scarabelot, J.R. Rozisky, C. de Oliveira, P.R. Marques Filho, L.F. Medeiros, F. Fregni, W. Caumo, I.L.S. Torres, Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by topdown modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation, *Exp. Brain Res.* 233 (2015) 1377–1389. <https://doi.org/10.1007/s00221-015-4212-1>.
- [54] L.N. Spezia Adachi, W. Caumo, G. Laste, L. Fernandes Medeiros, J. Ripoll Rozisky, A. De Souza, F. Fregni, I.L.S. Torres, Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model, *Brain Res.* 1489 (2012) 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.10.009>.
- [55] S. Munshi, V. Parrilli, J.A. Rosenkranz, Peripheral anti-inflammatory cytokine Interleukin-10 treatment mitigates interleukin-1 $\beta$  - induced anxiety and sickness behaviors in adult male rats, *Behav. Brain Res.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112024>.
- [56] N.T. Fiore, P.J. Austin, Peripheral Nerve Injury Triggers Neuroinflammation in the Medial Prefrontal Cortex and Ventral Hippocampus in a Subgroup of Rats with Coincident Affective Behavioural Changes, *Neuroscience.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.005>.
- [57] A.A. Tyrtysnaia, I. V. Manzhulo, R.M. Sultanov, E. V. Ermolenko, Adult hippocampal neurogenesis in neuropathic pain and alkyl glycerol ethers treatment, *Acta Histochem.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.10.007>.
- [58] A.R. Mesquita, M. Correia-Neves, S. Roque, A.G. Castro, P. Vieira, J. Pedrosa, J.A. Palha, N. Sousa, IL-10 modulates depressive-like behavior, *J. Psychiatr. Res.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.02.004>.

- [59] J. Khan, K. Ramadan, O. Korczeniewska, M.M. Anwer, R. Benoliel, E. Eliav, Interleukin-10 levels in rat models of nerve damage and neuropathic pain, *Neurosci. Lett.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.001>.
- [60] B.S. Mietto, A. Kroner, E.I. Girolami, E. Santos-Nogueira, J. Zhang, S. David, Role of IL-10 in resolution of inflammation and functional recovery after peripheral nerve injury, *J. Neurosci.* (2015). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2119-15.2015>.
- [61] P.C. Huang, K.L. Tsai, Y.W. Chen, H.T. Lin, C.H. Hung, Exercise combined with ultrasound attenuates neuropathic pain in rats associated with downregulation of IL-6 and TNF- $\alpha$ , but with upregulation of IL-10, *Anesth. Analg.* (2017). <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001600>.
- [62] Y.W. Chen, Y.T. Li, Y.C. Chen, Z.Y. Li, C.H. Hung, Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve, *Anesth. Analg.* 114 (2012) 1330–1337. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e31824c4ed4>.
- [63] F. Bobinski, D.F. Martins, T. Bratti, L. Mazzardo-Martins, E.C. WinkelmannDuarte, L.G. a Guglielmo, a. R.S. Santos, Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice, *Neuroscience.* 194 (2011) 337–348. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.075>.
- [64] V.M. López-Álvarez, L. Modol, X. Navarro, S. Cobianchi, Early increasing intensity treadmill exercise reduces neuropathic pain by preventing nociceptor collateral sprouting and disruption of chloride cotransporters homeostasis after peripheral nerve injury, *Pain.* 156 (2015) 1812–1825. <https://doi.org/10.1097/j.pain.000000000000268>.
- [65] L.S. Ro, S.T. Chen, L.M. Tang, J.M. Jacobs, Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve, *Pain.* (1999). [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(98\)00164-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(98)00164-X).
- [66] G. Cirillo, C. Cavaliere, M.R. Bianco, A. De Simone, A.M. Colangelo, S. Sellitti, L. Alberghina, M. Papa, Intrathecal NGF administration reduces reactive astrogliosis and changes neurotrophin receptors expression pattern in a rat model of neuropathic pain, *Cell. Mol. Neurobiol.* (2010). <https://doi.org/10.1007/s10571-009-9430-2>.
- [67] Y.Y. Jing, J.Y. Wang, X.L. Li, Z.H. Wang, L. Pei, M.M. Pan, X.P. Dong, G.X.

Fan, Y.K. Yuan, Nerve growth factor of red nucleus involvement in pain induced by spared nerve injury of the rat sciatic nerve, *Neurochem. Res.* (2009). <https://doi.org/10.1007/s11064-009-9950-7>.

[68] K. Hayashi, S. Shiozawa, N. Ozaki, K. Mizumura, T. Graven-Nielsen, Repeated intramuscular injections of nerve growth factor induced progressive muscle hyperalgesia, facilitated temporal summation, and expanded pain areas, *Pain.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.007>.

[69] G. de Azambuja, U. Hortscht, U. Hoheisel, M.C. Oliveira Fusaro, S. Mense, R.D. Treede, Short-term swimming exercise attenuates the sensitization of dorsal horn neurons in rats with NGF-induced low back pain, *Eur. J. Pain (United Kingdom).* (2018). <https://doi.org/10.1002/ejp.1230>.

[70] C. Almeida, A. Demaman, R. Kusuda, F. Cadetti, M.I. Ravanelli, A.L. Queiroz, T.A. Sousa, S. Zanon, L.R. Silveira, G. Lucas, Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain, *Pain.* (2015). <https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460339.23976.12>.

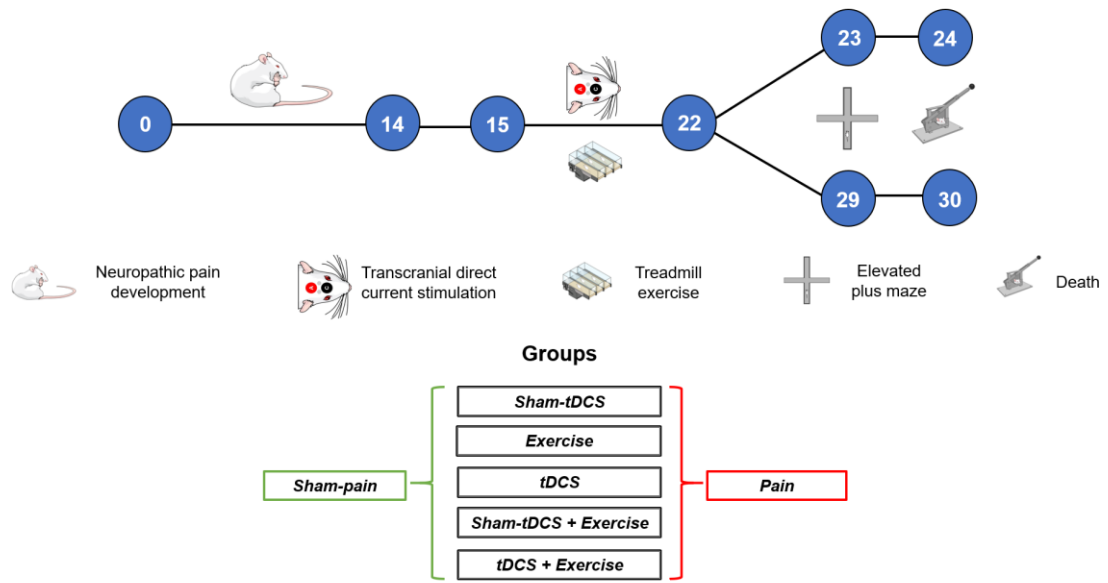
[71] A. Merighi, C. Salio, A. Ghirri, L. Lossi, F. Ferrini, C. Betelli, R. Bardoni, BDNF as a pain modulator, *Prog. Neurobiol.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.04.004>.

[72] L. Ulmann, J.P. Hatcher, J.P. Hughes, S. Chaumont, P.J. Green, F. Conquet, G.N. Buell, A.J. Reeve, I.P. Chessell, F. Rassendren, Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain, *J. Neurosci.* (2008). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2308-08.2008>.

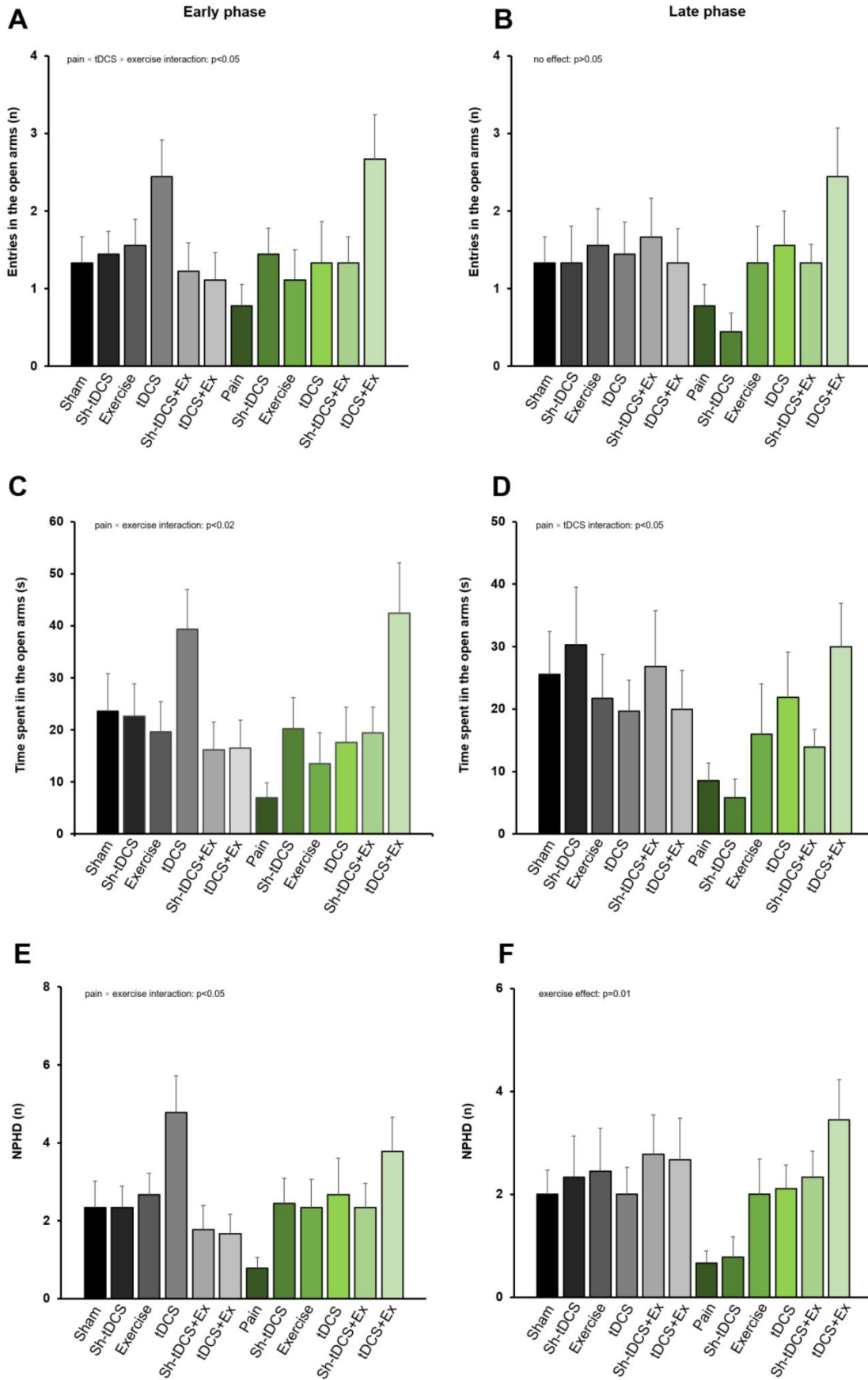
[73] W.F. Su, F. Wu, Z.H. Jin, Y. Gu, Y.T. Chen, Y. Fei, H. Chen, Y.X. Wang, L.Y. Xing, Y.Y. Zhao, Y. Yuan, X. Tang, G. Chen, Overexpression of P2X4 receptor in Schwann cells promotes motor and sensory functional recovery and remyelination via BDNF secretion after nerve injury, *Glia.* (2019). <https://doi.org/10.1002/glia.23527>.

[74] F. Steinberg, N.H. Pixa, F. Fregni, A Review of Acute Aerobic Exercise and Transcranial Direct Current Stimulation Effects on Cognitive Functions and Their Potential Synergies, *Front. Hum. Neurosci.* 12 (2019) 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00534>.





**Figure 1.** Experimental design



**Figure 2.** Anxiety-like behavior assessed in the Elevated Plus Maze (EPM) in the early (48h) and late (7 days) phases after the bimodal tDCS treatment and/or treadmill exercise (n=9 per group). Data presented as mean and standard error of the mean ( $\pm$ SEM). Grey scale represents sham-pain groups and green scale represents pain groups.

**Panel A.** Number of entries in the open arms in the early phase. Significant interaction between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise (3-way ANOVA/Bonferroni,  $p < 0.05$ ) and main effect of tDCS ( $p < 0.04$ ).

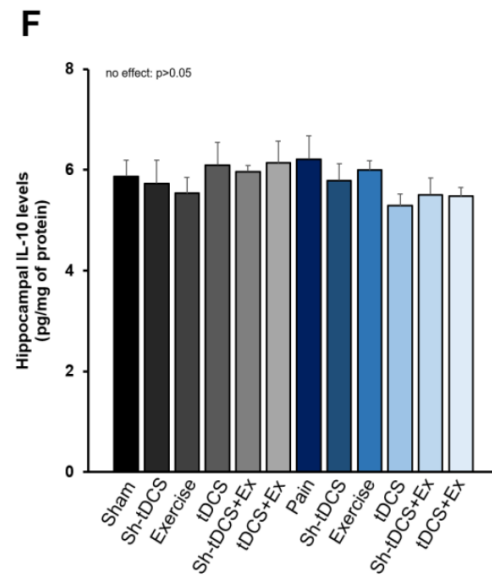
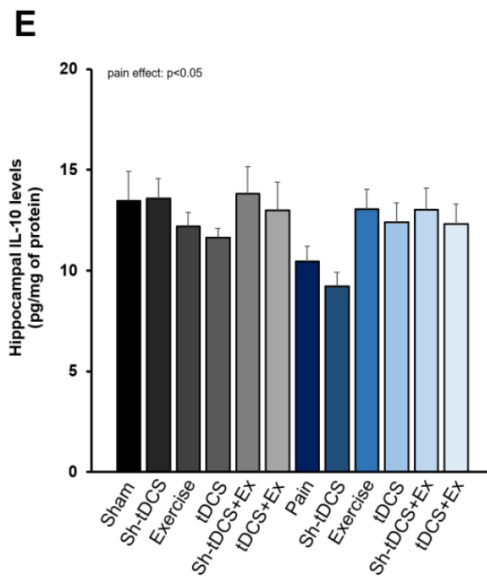
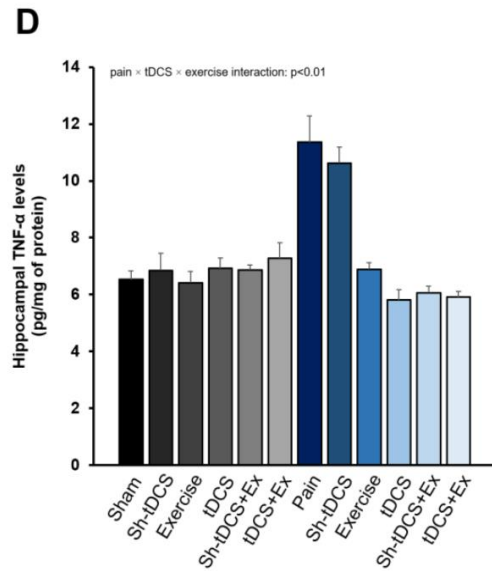
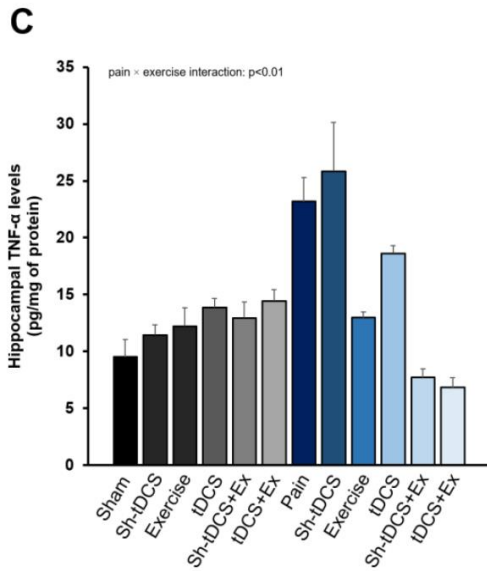
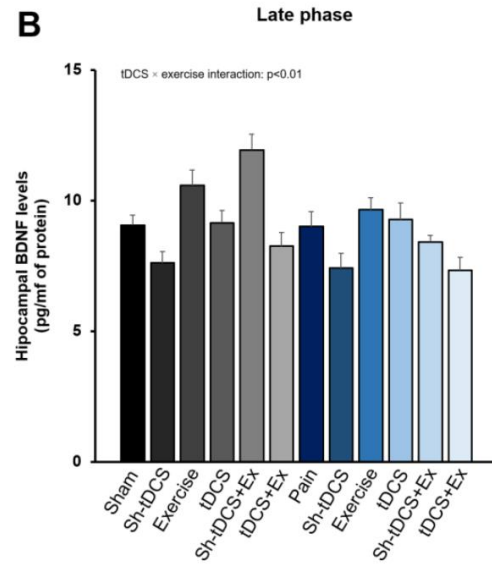
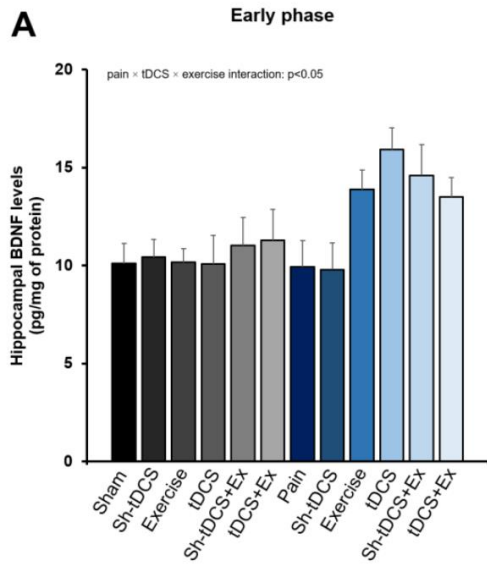
**Panel B.** Number of entries in the open arms in the late phase. No significant statistical difference between groups (3-way ANOVA,  $p > 0.05$ ).

**Panel C.** Time spent in the open arms in the early phase. Significant interaction between pain  $\times$  exercise (3-way ANOVA/Bonferroni,  $p < 0.02$ ), and main effect of tDCS ( $p < 0.01$ ).

**Panel D.** Time spent in the open arms in the late phase. Significant interaction between pain  $\times$  tDCS (3-way ANOVA/Bonferroni,  $p < 0.05$ ), and main effect of pain ( $p < 0.05$ ).

**Panel E.** Number of non-protected head dipping (NPHD) in the early phase. Significant interaction between pain  $\times$  exercise (3-way ANOVA/Bonferroni,  $p < 0.05$ ), and main effect of tDCS ( $p < 0.02$ ).

**Panel F.** Number of non-protected head dipping (NPHD) in the late phase. Significant main effect of exercise (3-way ANOVA/Bonferroni,  $p = 0.01$ ).



**Figure 3.** BDNF, TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels were assessed in the hippocampus at 48h and 7 days after the bimodal tDCS treatment and/or treadmill exercise (n=9 per group). Data presented as mean and standard error of the mean ( $\pm$ SEM) pg/mg of protein.

**Panel A.** BDNF: significant 3-way ANOVA interaction between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise ( $p < 0.05$ ), and main effect of pain ( $p < 0.01$ ) in the early phase.

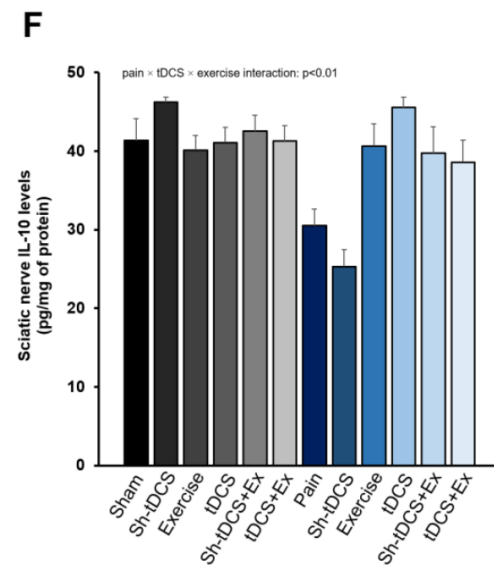
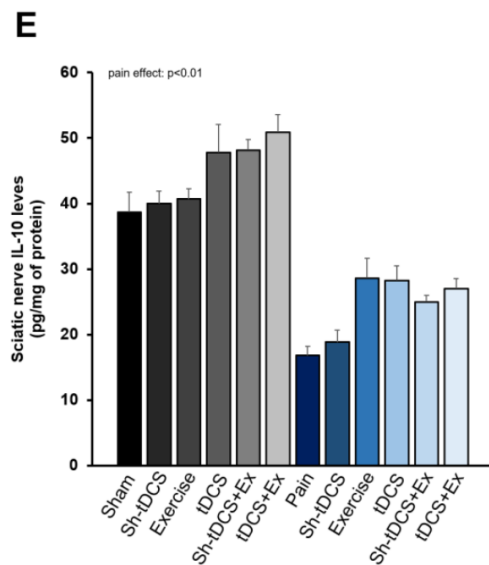
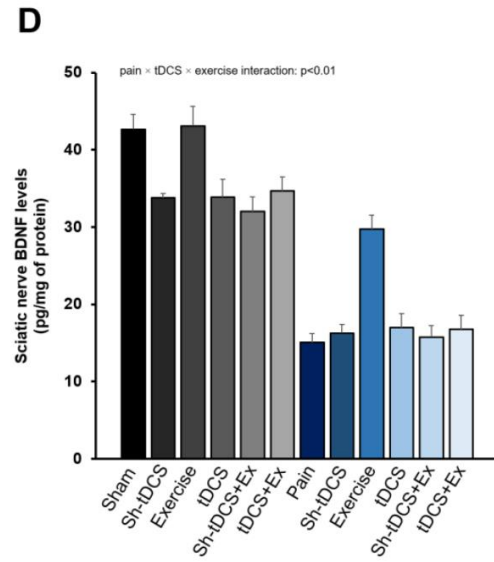
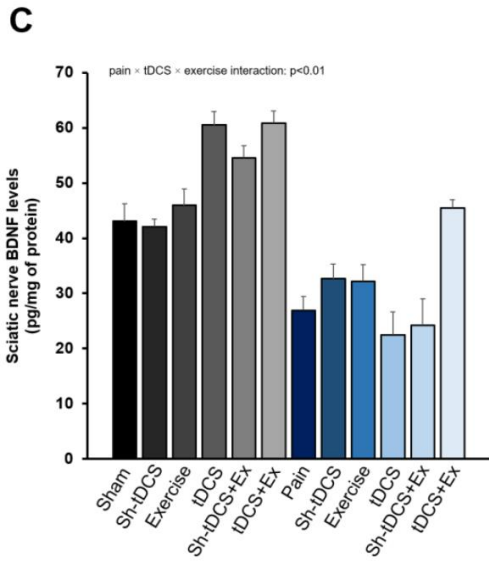
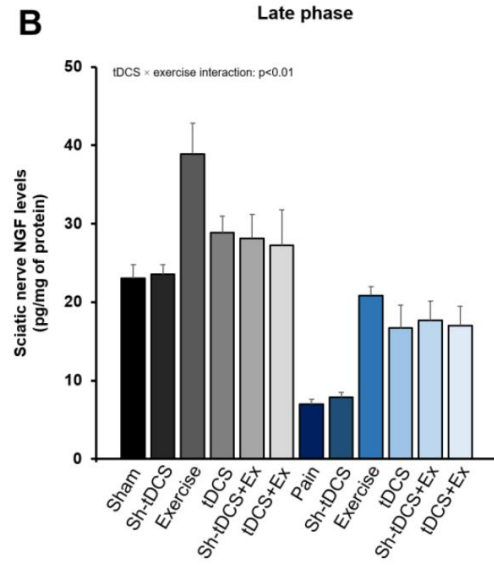
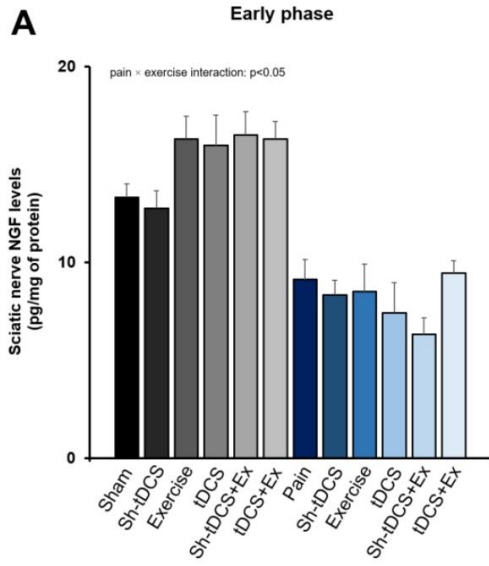
**Panel B.** In the late phase, there was an interaction between tDCS  $\times$  exercise, and pain  $\times$  exercise (3-way ANOVA,  $p < 0.01$ ). Also, main effect of pain ( $p < 0.01$ ), tDCS ( $p < 0.02$ ), and exercise ( $p < 0.02$ ).

**Panel C.** TNF- $\alpha$ : significant 3-way ANOVA interactions between pain  $\times$  exercise ( $p < 0.01$ ), and pain  $\times$  tDCS ( $p < 0.01$ ) in the early phase. Also, main effect of exercise and pain ( $p < 0.01$ ).

**Panel D.** In the late phase, significant 3-way ANOVA interactions between: pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise ( $p < 0.01$ ), tDCS  $\times$  exercise, pain  $\times$  exercise, and pain  $\times$  tDCS ( $p < 0.01$ ). Also, main effect of pain, tDCS and exercise ( $p < 0.01$ ).

**Panel E.** IL-10: main effect of pain (3-way ANOVA,  $p < 0.05$ ) only in the early phase.

**Panel F.** In the late phase there was no effect (3-way ANOVA;  $p > 0.05$ ).



**Figure 4.** NGF, BDNF, and IL-10 levels were assessed in the sciatic nerve at 48h and 7 days after the bimodal tDCS treatment and/or treadmill exercise (n=9 per group). Data presented as mean and standard error of the mean ( $\pm$ SEM) pg/mg of protein.

**Panel A.** NGF: significant 3-way ANOVA interaction between pain  $\times$  exercise ( $p < 0.05$ ), and main effect of pain ( $p < 0.01$ ) in the early phase.

**Panel B.** In the late phase, interaction between tDCS  $\times$  exercise (3-way ANOVA,  $p < 0.01$ ), and main effect of exercise and pain ( $p < 0.01$ ).

**Panel C.** BDNF: significant 3-way ANOVA interaction between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise ( $p < 0.01$ ), and main effect of tDCS, exercise and pain ( $p < 0.001$ ) in the early phase.

**Panel D.** In the late phase, interactions between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise ( $p < 0.01$ ), tDCS  $\times$  exercise ( $p < 0.001$ ), pain  $\times$  exercise ( $p < 0.03$ ), and main effect of tDCS ( $p < 0.001$ ), exercise ( $p < 0.04$ ) and pain ( $p < 0.001$ ).

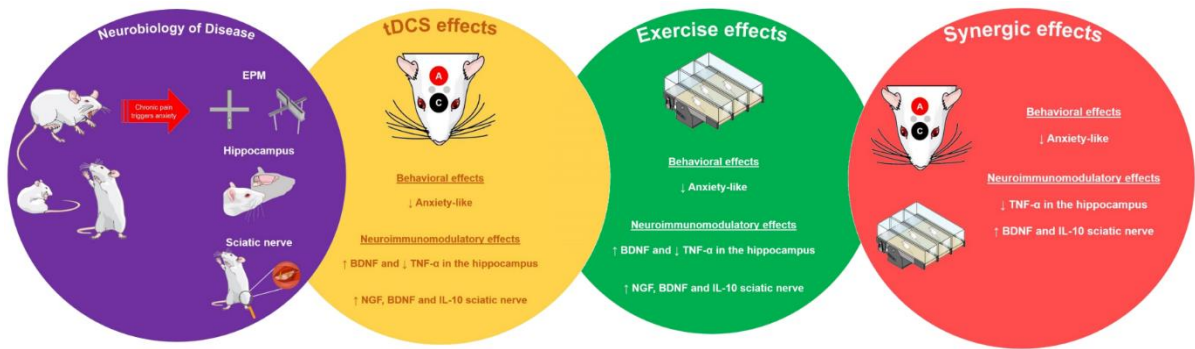
**Panel E.** IL-10: main effect of pain (3-way ANOVA,  $p < 0.01$ ) in the early phase.

**Panel F.** In the late phase, interactions between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise (3-way ANOVA,  $p < 0.01$ ), tDCS  $\times$  exercise ( $p < 0.02$ ), and pain  $\times$  exercise ( $p < 0.01$ ), also main effect of pain ( $p < 0.01$ ).

Elevated Plus Maze (EPM)		Entries in the closed arms (n)		Time spent in the closed arms (s)		Total crossing (n)	
Groups		Early (48h)	Late (7 days)	Early (48h)	Late (7 days)	Early (48h)	Late (7 days)
Sham NP	Sham-Pain	8.89±0.72	8.89±1.17	235.00±7.91	210.67±15.10	10.22±0.81	10.22±1.19
	Sham-tDCS	10.22±0.83	11.11±0.42	208.67±8.87	214.00±12.34	11.67±0.94	12.44±0.75
	Exercise	9.33±1.00	9.44±0.67	230.67±9.11	208.89±10.89	10.89±0.98	11.00±0.94
	tDCS	10.78±0.68	11.56±0.73	211.67±11.89	211.33±14.07	13.22±0.78	13.00±0.93
	Sham-tDCS+Exercise	8.78±0.46	10.11±0.39	228.11±10.87	189.11±13.12	10.00±0.50	11.78±0.64
	tDCS+Exercise	9.56±0.71	10.56±0.80	228.56±12.50	211.89±10.14	10.67±0.67	11.89±0.59
NP	Pain	10.11±1.06	9.22±0.80	223.00±10.57	245.78±8.64	10.89±1.06	10.00±0.88
	Sham-tDCS	10.67±0.94	9.33±0.73	188.33±8.15	245.67±4.26	12.11±1.20	9.78±0.64
	Exercise	9.89±0.84	10.33±0.67	216.56±9.86	211.78±11.92	11.00±1.03	11.67±0.90
	tDCS	8.89±0.54	11.22±0.70	216.33±9.45	216.56±11.01	10.22±0.85	12.78±0.95
	Sham-tDCS+Exercise	10.11±0.26	10.67±0.71	217.78±8.54	210.78±9.63	11.44±0.38	12.00±0.71
	tDCS+Exercise	11.00±1.41	11.11±0.31	184.33±14.77	210.33±6.99	13.67±1.80	13.56±0.90

**Table.** Anxiety-like behavior assessed in the Elevated Plus Maze (EPM) in the early (48h) and late (7 days) phases after the bimodal tDCS treatment and/or treadmill exercise (n=9 per group). Data presented as mean and standard error of the mean ( $\pm$ SEM). NP: neuropathic pain. Entries in the closed arms: significant 3-way ANOVA for main effect of tDCS ( $p<0.01$ ) only in the late phase. Time spent in the closed arms: significant 3-way ANOVA interaction between pain  $\times$  tDCS  $\times$  exercise and main effect of pain and tDCS ( $p<0.05$ ) in the early phase. In the late phase, main effect of exercise (3-way ANOVA,  $p=0.01$ ). Total crossings: main effect of tDCS (3-way ANOVA,  $p<0.01$ ).





**Figure 5.** Schematic representation of the findings



## 6. Discussão

Os principais achados desta tese revelam que a ETCC combinada com o exercício físico promoveu efeitos antinociceptivos e ansiolíticos, revertendo a hiperalgesia térmica, reduzindo a hiperalgesia mecânica e o comportamento do tipo ansioso (número de entradas e no tempo gasto explorando os braços abertos no EPM) (Lopes et al., 2021, 2020). É importante enfatizar que a direção destes efeitos foi dependente do tempo (curto e longo prazo) e da condição analisada (sham vs dor vs tratamento), provavelmente refletindo mecanismos distintos de modulação das vias neurais. Da mesma forma, é importante observar que, o tratamento isolado com ETCC replicou estudos prévios realizados em nosso grupo de pesquisa no mesmo modelo de dor neuropática (Cioato et al., 2016; Marques-Filho et al., 2016). Contudo, embora o exercício tenha promovido efeitos antinociceptivos similares à ETCC, os mecanismos de ação e vias de sinalização pelas quais ambas intervenções possivelmente interagem entre si, ainda permanecem pouco elucidadas.

Em relação ao comportamento nociceptivo, foi demonstrado que 7 dias após a cirurgia, tanto os ratos que receberam a CCI, como também os animais do grupo *sham*-dor, exibiram uma redução no limiar de retirada da pata em resposta ao teste da placa quente, sugerindo que o componente inflamatório ainda estava presente. Por outro lado, aos 14 dias após o procedimento cirúrgico, apenas os ratos que receberam a constrição do nervo, mantiveram esta redução, tanto no limiar térmico quanto mecânico. Estes resultados confirmaram o desenvolvimento de dor neuropática ao longo de 2 semanas e foram acompanhados pela redução no tempo gasto nos braços abertos (TOA) na tarefa do labirinto em cruz elevado na 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> semanas, corroborando estudos prévios que demonstram o desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso neste modelo de CCI (Kremer et al., 2020).

É importante destacar também que, a redução na hiperalgesia mecânica, observada pela associação entre ETCC e exercício foram evidenciados somente no 7<sup>o</sup> dia após o término do tratamento. Portanto, hipotetiza-se que a falta de efeito observado imediatamente e 24 horas após o tratamento possa estar vinculada a possíveis fatores intervenientes, incluindo: o padrão de estimulação adotado em combinação com o exercício (i.e.: *offline vs online*), e até mesmo a imobilização prévia dos animais seguida pelo tipo de exercício empregado (forçado) também pode ter contribuído como um fator estressor para a ausência dos efeitos sinérgicos observados em curto prazo. Em relação a

hiperalgesia térmica, foi observado que ambos os tratamentos, isolados ou combinados, reverteram a hipernocicepção, sem efeito sinérgico observado. Desta forma, postula-se que as diferenças encontradas na resposta analgésica induzida pelos tratamentos podem estar relacionadas a diferentes vias ativadas por estímulos mecânicos ou térmicos; enquanto o primeiro evoca respostas sobre as fibras A $\beta$ , o segundo ativa principalmente fibras A $\delta$  e C resposta à lesão, contribuindo para mudanças comportamentais e eletrofisiológicas nos modelos de dor crônica (Nazemi et al., 2015; Woolf, 2011).

A característica não condicionada do EPM, por exemplo, impõe um conflito entre o fenótipo naturalmente exploratório do rato e a aversão em explorar áreas novas/desprotegidas e, portanto, estar mais suscetível à ação de predadores (Cryan & Holmes, 2005). Desta forma, aventurar-se nas zonas desprotegidas do aparato, denota redução no comportamento do tipo ansioso, enquanto que comportamentos que priorizam a tigmotaxia são geralmente observados em animais mais ansiosos. Estes achados foram corroborados por estudos prévios que demonstraram que a administração de benzodiazepínicos e barbitúricos induziu a aumentos no número de entradas e no tempo gasto explorando os braços abertos, enquanto estímulos ansiogênicos fazem com que ratos despendam maior quantidade de tempo no compartimento protegido do aparato (Walf & Frye, 2007; File, 1993).

Em nosso estudo, ratos com dor neuropática tratados com ETCC e exercício aumentaram o número de EOA em 48h após o tratamento. Contudo, quando o grupo *sham*-dor foi tratado somente com a ETCC também houve um aumento no número de EOA, sugerindo que os efeitos da estimulação são estado-dependente (Nishida et al., 2019; Shahbabaie et al., 2014). Também foi observado que ratos exercitados foram propensos a despendarem maior quantidade de tempo nos braços abertos (TOA) em 24 horas após o tratamento; enquanto que os efeitos da ETCC sobre este parâmetro foram observados somente em 7 dias após o final do tratamento. Esta diferença no padrão temporal pode estar relacionada aos efeitos imediatos do exercício sobre a modulação de mecanismos periféricos e centrais (Dishman et al., 2006), enquanto que na ETCC estão relacionados, principalmente, a efeitos em longo prazo (Jamil et al., 2017; Liebetanz et al., 2002). Corroborando estes achados, estudos prévios demonstraram que o exercício promoveu efeitos ansiolíticos a curto prazo; no entanto, 10 dias após o final do exercício, os ratos exibiram um comportamento do tipo ansiogênico (Morgan et al., 2019; Nishijima et al., 2013). Em resumo, é importante reforçar ainda que, o comportamento do tipo ansioso observado em ratos com dor neuropática (observado aqui pela redução na EOA

e TOA), não pode ser atribuído a *déficits* locomotores, devido ao número de cruzamentos totais; um índice de atividade locomotora, não ter sido modificada pela dor (Skurlova et al., 2011).

Além desses importantes achados comportamentais, é importante salientar que ambas intervenções também modularam o conteúdo de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores neurotróficos no sistema nervoso periférico (nervo isquiático) e central (medula espinhal, tronco encefálico, hipocampo e córtex cerebral). Estudos prévios demonstraram que neuropatias periféricas ocasionadas por lesões no nervo isquiático resultam na redução dos níveis de BDNF no CPF de ratos (Guida et al., 2018); enquanto que a ETCC ou exercício promovem aumento (Ong et al., 2019; Wu et al., 2017). Corroborando tais achados, nosso estudo observou que a ETCC aumentou os níveis de BDNF no córtex cerebral em 48h após o final do tratamento, enquanto que 7 dias após, houve um efeito sinérgico sobre o aumento desta neurotrofina. Embora os níveis de IL-4 tenham sido reduzidos pela associação entre ETCC e exercício, não foram observados efeitos das intervenções em reduzir os níveis de IL-1 $\beta$  em 48hs e 7 dias após o tratamento, semelhante a um estudo prévio (Santos et al., 2020). Em resumo, deve-se salientar que os efeitos observados em nossas análises devem ser interpretados com cautela, já que em nosso estudo foi utilizado o córtex cerebral total e, portanto, estes achados podem ter sido influenciados por estruturas adjacentes como as divisões pré e infralímbicas do CPF, além do córtex cingulado anterior (CCA) que também foram incluídas nas análises.

Estudos têm sugerido uma relação tênue entre ansiedade e sinalização imune no hipocampo (Haj-Mirzaian et al., 2017; Skurlova et al., 2011), uma estrutura cerebral envolvida com aspectos mnemônicos, bem como afetivos e emocionais (Gray & McNaughton, 2003). Neste trabalho, demonstramos que a dor e ambas as intervenções modularam diferentemente o perfil neuroquímico nesta estrutura. Foi demonstrado um aumento induzido pela associação entre ETCC e exercício nos níveis de BDNF em 48h em ratos com neuropatia, em oposto à redução observada 7 dias após. Corroborando estes achados, outros estudos pré-clínicos mostraram que, tanto a dor inflamatória quanto a dor crônica diminuíram os níveis de BDNF no hipocampo, e esses efeitos foram associados com prejuízos sobre a função cognitiva, redução na neurogênese e aumento no comportamento do tipo ansioso (Saffarpour et al., 2017; Zheng et al., 2017). Em nosso trabalho foi demonstrado que a dor aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  em 48h e 7 dias; e reduziu os níveis de IL-10 em 48h apenas. Contudo, a ETCC e/ou exercício reduziram o

conteúdo de TNF- $\alpha$  em 48h e 7 dias, respectivamente, sem alteração nos níveis de IL-10. Em conformidade com nossos achados, um estudo recente demonstrou que, a administração apenas de IL-10 ou IL-1 $\beta$  produziram efeitos ansiogênicos em ratos, efeitos que foram abolidos quando ambas as citocinas foram coadministradas (Munshi et al., 2019). Portanto, é importante destacar que o equilíbrio no perfil neuroquímico exercido por mediadores pró e anti-inflamatórios parece ser um fator determinante nos desfechos de ansiedade. Da mesma forma, estudos também demonstraram níveis diminuídos de IL-10 no hipocampo dorsal ipsilateral de ratos com dor crônica (Fiore et al., 2019), mas não no hipocampo ventral ou na estrutura inteira (Tyrtysnaia et al., 2017). Além disso, não se pode descartar a possibilidade de um efeito local específico de outros mediadores, uma vez que os níveis de BDNF e TNF- $\alpha$  foram alterados em resposta a ETCC e ao exercício nesta estrutura.

No tronco encefálico, foi observado que os grupos dor tratados com ETCC apresentaram uma redução nos níveis de BDNF. Este resultado está em conformidade com um estudo prévio demonstrando que em animais *naïve*, a administração de BDNF em fatias do núcleo magno da rafe promoveu o *downregulation* do KCC2, semelhante ao observado em animais submetidos a um modelo de dor (Zhang et al., 2013). Em relação a IL1 $\beta$ , animais dos grupos dor que receberam a ETCC *sham* ou exercício aumentaram ainda mais os níveis desta citocina; diferentemente de Bobinski et al., (2015) que encontraram níveis reduzidos de IL-1 $\beta$  em camundongos submetidos ao exercício em esteira. Contudo, é importante salientar que nosso protocolo iniciou no 15º dia após a CCI e durou 8 dias consecutivos, enquanto que no referido estudo, o exercício foi empregado a partir do 3º dia após a cirurgia e durou cerca de 2 semanas. Em relação aos níveis de IL-4, a associação entre tratamentos ou o exercício isolado promoveu aumento nos níveis de IL-4 em comparação a seus pares em 7 dias. Estes resultados levantam a possibilidade de que o efeito antinociceptivo sinérgico observado no 7º dia após o tratamento sobre a hiperalgesia mecânica, podem ser mediados pelo *upregulation* e a sensibilização que esta citocina promove sobre vias opioidérgicas (Üçeyler et al., 2011).

Na medula espinhal, foi demonstrado que a dor aumentou o conteúdo de BDNF (48h e 7 dias) e que o exercício reduziu seus níveis. Atualmente sabe-se que o exercício físico é um importante mediador da antinocicepção, por restaurar a mudança do gradiente neuronal responsável por induzir a sensibilização dos neurônios aferentes primários pelo BDNF na medula espinhal (Coull et al., 2005). Em relação aos níveis de IL-1 $\beta$ , a ETCC aplicada nos grupos dor aumentou os níveis desta citocina, enquanto que

para a IL-4 o exercício isolado ou associado a ETCC elevou o conteúdo de IL-4. Corroborando nossos achados, Bobinski et al., (2017) mostraram que o exercício em esteira aumentou os níveis de IL-4 na medula espinhal de camundongos submetidos a lesão de nervo periférico. Acredita-se que as propriedades anti-inflamatórias e protetoras desta citocina também possam estar relacionadas à preservação das vias motoras espinhais por meio do *upregulation* da arginase-1, IL-10 e CD206+, indicadores da presença de macrófagos de fase resolutiva (M2) (Francos-Quijorna et al., 2016).

Lesões em nervos periféricos desencadeiam a perda de um grande número de neurônios sensoriais e motores, efeitos que estão intimamente associados a fatores tróficos, levando a prejuízos na regeneração, aumentos na reinervação por fibras simpáticas e ao subsequente desenvolvimento de hipersensibilidade térmica e mecânica (López-Álvarez et al., 2015). No nervo isquiático de ratos submetidos à cirurgia *sham* e exercitados, o conteúdo de NGF aumentou em 48h, enquanto que 7 dias após, ambas intervenções isoladas também aumentaram o conteúdo de NGF. Corroborando estes achados, estudos demonstraram que a administração sistêmica de anti-NGF (Ro et al., 1999) ou central de NGF (intratecal, mas não no núcleo rubro) promoveu efeitos antinociceptivos (Cirillo et al., 2010; Jing et al., 2009). Em contraste, quando injetado no músculo tibial anterior em humanos, o NGF produziu um aumento progressivo na dor (Hayashi et al., 2013). Em relação aos níveis de BDNF, a associação entre ETCC e exercício elevou o conteúdo desta neurotrofina no nervo isquiático em 48h; contudo aos 7 dias, apenas o exercício preveniu sua redução. Estudos demonstraram que a hipersensibilidade após lesões nervosas é acompanhada pelo *upregulation* do BDNF no DRG e na medula espinhal (Terada et al., 2018; Merighi et al., 2008). Tais efeitos destacam que ambas intervenções podem desencadear efeitos neuromodulatórios independentes, provavelmente interagir ou mesmo competir para manter os mesmos efeitos de longo prazo quando associados (Steinberg et al., 2019). Em relação a IL-10, ambas intervenções de maneira isolada foram eficazes em reverter a redução no conteúdo de IL-10 induzida pela dor. Já no 7º dia, a associação entre terapias bem como o tratamento isolado, promoveu aumentos no conteúdo desta citocina. É importante notar que níveis reduzidos de IL-10 também foram encontrados no DRG e no nervo ciático, 3 ou 8 dias após a CCI (Khan et al., 2015), um efeito que tem implicações importantes, dado seu papel na recuperação motora e função sensorial (Mietto et al., 2015).

Coletivamente, os resultados desta tese (resumidos nas tabelas 1 e 2) sugerem que, terapêuticas complementares com enfoque na redução da resposta pró inflamatória

local e sistêmica podem ser ferramentas adjuvantes não farmacológicas para o alívio da dor. Além disso, os efeitos neuromoduladores da ETCC e/ou exercício sobre o conteúdo de biomarcadores periféricos e centrais são dependentes da condição prévia e da estrutura avaliada.

**Tabela 1.** Síntese dos resultados sobre os parâmetros comportamentais.

Tempo	ETCC	Exercício	ETCC + Exercício
<b>Imediatamente</b>	↑ limiar nociceptivo	↑ limiar nociceptivo	↑ limiar nociceptivo
<b>24h</b>	↑ limiar nociceptivo ↑ EOA	↑ limiar nociceptivo ↑ TOA ↑ NPHD	↑ limiar nociceptivo ↑ EOA ↓ TCA
<b>7 dias</b>	↑ limiar nociceptivo ↑ TOA ↑ NPHD ↑ ECA ↑ TC	↑ limiar nociceptivo ↓ TCA	↑ limiar nociceptivo

EOA: entrada nos braços abertos; TOA: tempo nos braços abertos; NPHD: *non-protected head dippings*; ECA: entrada nos braços fechados; TCA: tempo nos braços fechados; TC: cruzamentos totais.

**Tabela 2.** Síntese dos resultados sobre os parâmetros neuroquímicos.

Estruturas	ETCC	Exercício	ETCC + Exercício
<b>Córtex cerebral</b>	↑ BDNF (48h)	S.E.	↑ BDNF (7 dias)
<b>Hipocampo</b>	↓ TNF- $\alpha$ (48h) ↓ TNF- $\alpha$ (7 dias)	↓ TNF- $\alpha$ (48h) ↓ TNF- $\alpha$ (7 dias)	↑ BDNF (48h) ↓ BDNF (7 dias) ↓ TNF- $\alpha$ (7 dias)
<b>Tronco encefálico</b>	↓ BDNF ↑ IL-1*	↑ IL-4 ↑ IL-1 $\beta$	↑ IL-4
<b>Medula espinhal</b>	↑ IL-1 $\beta$	↓ BDNF ↑ IL-4 (7 dias)	↑ IL-4 (7 dias)
<b>Nervo isquiático</b>	↑ IL-10 (48h e 7 dias)	↑ IL-10 (48h e 7 dias) ↑ NGF#	↑ BDNF (48h) ↑ NGF (7 dias) ↑ IL-10 (7 dias)

S.E.: “sem efeito”; \* *Sham*-ETCC; # *Sham*-dor+exercício





## **7. Considerações finais**

- ❖ O modelo de dor neuropática empregado neste estudo aumentou a sensibilidade aos estímulos térmicos e mecânicos, além de desencadear comportamento do tipo ansioso em ratos;
- ❖ A ETCC e o exercício físico em esteira promoveram efeitos antinociceptivos e ansiolíticos;
- ❖ Quando combinadas, ambas intervenções também promoveram efeitos antinociceptivos; e ansiolíticos;
- ❖ Ambas intervenções modularam o perfil neuroquímico em diversas estruturas do SNP e SNC.



## **8. Limitações e perspectivas**

Embora este trabalho tenha contribuído para compreensão sobre como a associação entre duas intervenções não farmacológicas modulam o comportamento e a neuroquímica no sistema nervoso periférico e central, a elucidação detalhada pelas quais as alterações no conteúdo de citocinas pró e anti-inflamatórias, incluindo o tipo celular e vias de sinalização envolvidas, e alterações fisiológicas como modificações nas propriedades elétricas celulares, permanecem desconhecidas, ao menos em resposta ao tratamento aqui empregado. Além disso, deve-se salientar que no atual estudo foram utilizados apenas ratos, sem levar em consideração a possível resposta fisiológica observada em fêmeas. Em relação ao tratamento, ambas intervenções foram aplicadas apenas em uma única janela temporal (8 dias consecutivos; a contar do 15º após o estabelecimento do modelo de dor neuropática). Logo, é possível que para uma dada intensidade de estimulação, ou volume de exercício, o tratamento tenha promovido adaptações e respostas fisiológicas divergentes, embora todo esforço, incluindo controles adequados, tenha sido empregado para minimizar tais vieses.

Em breve, pretendemos efetuar a imuno-histoquímica no hipocampo ventral destes animais procurando relacionar se a proliferação celular, presença de neurônios imaturos e maduros entre grupos, diferem em relação a condição analisada e/ou tratamento empregado. Estes tecidos provenientes da execução da segunda parte deste projeto, bem como os anticorpos, já foram obtidos, titulados e previamente testados visando a otimização da técnica. A escolha pela porção ventral do hipocampo, pauta-se na literatura existente sugerindo que esta região está mais relacionada com processos afetivos e emocionais, ao contrário do hipocampo dorsal, que está mais envolvido com processos mnemônicos.

Por fim, é importante identificarmos se os efeitos do uso combinado entre ETCC e exercício sobre o comportamento, são semelhantes para outros modelos de dor crônica, dada característica e heterogeneidade entre modelos e indivíduos. Além disso, é sugestivo que se considere de maneira pré-analítica, especificamente na randomização, o controle de possíveis variáveis intervenientes, como a existência de animais propensos a apresentarem comportamento do tipo ansiosos e/ou depressivos e que por conseguinte possam interferir sobre os desfechos mensurados.

## 9. Referências

Abdo, H., Calvo-Enrique, L., Lopez, J. M., Song, J., Zhang, M. D., Usoskin, D., El Manira, A., Adameyko, I., Hjerling-Leffler, J., & Ernfors, P. (2019). Specialized cutaneous Schwann cells initiate pain sensation. *Science (New York, N.Y.)*, 365(6454), 695–699. <https://doi.org/10.1126/science.aax6452>

Accornero, N., Li Voti, P., La Riccia, M., & Gregori, B. (2007). Visual evoked potentials modulation during direct current cortical polarization. *Experimental Brain Research*, 178(2), 261–266. <https://doi.org/10.1007/s00221-006-0733-y>

ACSM's Guidelines for exercise testing and prescription (2014). American College Sports Medicine; 9<sup>th</sup> edition; Baltimore, MD 21201.

Almeida, C., DeMaman, A., Kusuda, R., Cadetti, F., Ravanelli, M. I., Queiroz, A. L., Sousa, T. A., Zanon, S., Silveira, L. R., & Lucas, G. (2015). Exercise therapy normalizes BDNF upregulation and glial hyperactivity in a mouse model of neuropathic pain. *Pain*, 156(3), 504–513. <https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460339.23976.12>

Andrade, E. M., Martinez, R., Pagano, R. L., Lopes, P., Auada, A., Gouveia, F. V., Antunes, G. F., Assis, D. V., Lebrun, I., & Fonoff, E. T. (2019). Neurochemical effects of motor cortex stimulation in the periaqueductal gray during neuropathic pain. *Journal of Neurosurgery*, 132(1), 239–251. <https://doi.org/10.3171/2018.7.JNS173239>

Apkarian, A. V., Sosa, Y., Sonty, S., Levy, R. M., Harden, R. N., Parrish, T. B., & Gitelman, D. R. (2004). Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *The Journal of Neuroscience*, 24(46), 10410–10415. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2541-04.2004>

Arida, R. M., Gomes da Silva, S., de Almeida, A. A., Cavalheiro, E. A., Zavala-Tecuapetla, C., Brand, S., & Rocha, L. (2015). Differential effects of exercise on brain opioid receptor binding and activation in rats. *Journal of Neurochemistry*, 132(2), 206–217. <https://doi.org/10.1111/jnc.12976>

Asensio-Pinilla, E., Udina, E., Jaramillo, J., & Navarro, X. (2009). Electrical stimulation combined with exercise increase axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Experimental Neurology*, 219(1), 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.05.034>

Autry, A. E., & Monteggia, L. M. (2012). Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Reviews*, 64(2), 238–258. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005108>

Azambuja, G., Hortscht, U., Hoheisel, U., Oliveira Fusaro, M. C., Mense, S., & Treede, R. D. (2018). Short-term swimming exercise attenuates the sensitization of dorsal horn neurons in rats with NGF-induced low back pain. *European Journal of Pain* (London, England), 22(8), 1409–1418. <https://doi.org/10.1002/ejp.1230>

Backonja, M. M., Coe, C. L., Muller, D. A., & Schell, K. (2008). Altered cytokine levels in the blood and cerebrospinal fluid of chronic pain patients. *Journal of Neuroimmunology*, 195(1-2), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.01.005>

Balasubramanyan, S., Stemkowski, P. L., Stebbing, M. J., & Smith, P. A. (2006). Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons. *Journal of Neurophysiology*, 96(2), 579–590. <https://doi.org/10.1152/jn.00087.2006>

Baliki, M. N., Geha, P. Y., Apkarian, A. V., & Chialvo, D. R. (2008). Beyond feeling: chronic pain hurts the brain, disrupting the default-mode network dynamics. *The Journal of Neuroscience*, 28(6), 1398–1403. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4123-07.2008>

Bannister, K., Patel, R., Goncalves, L., Townson, L., & Dickenson, A. H. (2015). Diffuse noxious inhibitory controls and nerve injury: restoring an imbalance between descending monoamine inhibitions and facilitations. *Pain*, 156(9), 1803–1811. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000240>

Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>

Bassi, G. S., Dias, D., Franchin, M., Talbot, J., Reis, D. G., Menezes, G. B., Castania, J. A., Garcia-Cairasco, N., Resstel, L., Salgado, H. C., Cunha, F. Q., Cunha, T. M., Ulloa, L., & Kanashiro, A. (2017). Modulation of experimental arthritis by vagal sensory and central brain stimulation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 64, 330–343. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.04.003>

Baumbauer, K. M., DeBerry, J. J., Adelman, P. C., Miller, R. H., Hachisuka, J., Lee, K. H., Ross, S. E., Koerber, H. R., Davis, B. M., & Albers, K. M. (2015). Keratinocytes can modulate and directly initiate nociceptive responses. *eLife*, 4, e09674. <https://doi.org/10.7554/eLife.09674>

Bayod, S., Del Valle, J., Canudas, A. M., Lalanza, J. F., Sanchez-Roige, S., Camins, A., Escorihuela, R. M., & Pallàs, M. (2011). Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 111(5), 1380–1390. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00425.2011>

Beggs, S., Liu, X. J., Kwan, C., & Salter, M. W. (2010). Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier. *Molecular Pain*, 6, 74. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-74>

Berna, C., Leknes, S., Holmes, E. A., Edwards, R. R., Goodwin, G. M., & Tracey, I. (2010). Induction of depressed mood disrupts emotion regulation neurocircuitry and enhances pain unpleasantness. *Biological Psychiatry*, 67(11), 1083–1090. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.01.014>

Bikson, M., Grossman, P., Thomas, C., Zannou, A. L., Jiang, J., Adnan, T., Mourdoukoutas, A. P., Kronberg, G., Truong, D., Boggio, P., Brunoni, A. R., Charvet, L., Fregni, F., Fritsch, B., Gillick, B., Hamilton, R. H., Hampstead, B. M., Jankord, R., Kirton, A., Knotkova, H., ... Woods, A. J. (2016). Safety of Transcranial Direct Current Stimulation: Evidence Based Update 2016. *Brain Stimulation*, 9(5), 641–661. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2016.06.004>

Binda, K. H., Real, C. C., Ferreira, A., Britto, L. R., & Chacur, M. (2020). Antinociceptive effects of treadmill exercise in a rat model of Parkinson's disease: The role of cannabinoid and opioid receptors. *Brain Research*, 1727, 146521. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146521>

Bobinski, F., Ferreira, T., Córdova, M. M., Dombrowski, P. A., da Cunha, C., Santo, C., Poli, A., Pires, R., Martins-Silva, C., Sluka, K. A., & Santos, A. (2015). Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low-intensity exercise on neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice. *Pain*, 156(12), 2595–2606. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000372>

Bobinski, F., Martins, D. F., Bratti, T., Mazzardo-Martins, L., Winkelmann-Duarte, E. C., Guglielmo, L. G., & Santos, A. R. (2011). Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience*, 194, 337–348. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.075>

Bobinski, F., Teixeira, J. M., Sluka, K. A., & Santos, A. (2018). Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain. *Pain*, 159(3), 437–450. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001109>

Boggio, P. S., Zaghi, S., & Fregni, F. (2009). Modulation of emotions associated with images of human pain using anodal transcranial direct current stimulation (tDCS). *Neuropsychologia*, 47(1), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2008.07.022>

Booth, F. W., Roberts, C. K., & Laye, M. J. (2012). Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Comprehensive Physiology*, 2(2), 1143–1211. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110025>

Brandt, J., Evans, J. T., Mildenhall, T., Mulligan, A., Konieczny, A., Rose, S. J., & English, A. W. (2015). Delaying the onset of treadmill exercise following peripheral nerve injury has different effects on axon regeneration and motoneuron synaptic plasticity. *Journal of Neurophysiology*, 113(7), 2390–2399. <https://doi.org/10.1152/jn.00892.2014>

Braun, R., Klein, R., Walter, H. L., Ohren, M., Freudenmacher, L., Getachew, K., Ladwig, A., Luelling, J., Neumaier, B., Endepols, H., Graf, R., Hoehn, M., Fink, G. R., Schroeter, M., & Rueger, M. A. (2016). Transcranial direct current stimulation accelerates recovery of function, induces neurogenesis and recruits oligodendrocyte precursors in a rat model of stroke. *Experimental Neurology*, 279, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.02.018>

Brietzke, A. P., Zortea, M., Carvalho, F., Sanches, P., Silva, D., Torres, I., Fregni, F., & Caumo, W. (2020). Large Treatment Effect With Extended Home-Based Transcranial Direct Current Stimulation Over Dorsolateral Prefrontal Cortex in Fibromyalgia: A Proof of Concept Sham-Randomized Clinical Study. *The Journal of Pain*, 21(1-2), 212–224. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.06.013>

Brown, D. A., Johnson, M. S., Armstrong, C. J., Lynch, J. M., Caruso, N. M., Ehlers, L. B., Fleshner, M., Spencer, R. L., & Moore, R. L. (2007). Short-term treadmill running in the rat: what kind of stressor is it? *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 103(6), 1979–1985. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00706.2007>

Brunoni, A. R., Machado-Vieira, R., Zarate, C. A., Valiengo, L., Vieira, E. L., Benseñor, I. M., Lotufo, P. A., Gattaz, W. F., & Teixeira, A. L. (2014). Cytokines plasma levels during antidepressant treatment with sertraline and transcranial direct



current stimulation (tDCS): results from a factorial, randomized, controlled trial. *Psychopharmacology*, 231(7), 1315–1323. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3322-3>

Brunoni, A. R., Moffa, A. H., Sampaio-Junior, B., Borrión, L., Moreno, M. L., Fernandes, R. A., Veronezi, B. P., Nogueira, B. S., Aparicio, L., Razza, L. B., Chamorro, R., Tort, L. C., Fraguas, R., Lotufo, P. A., Gattaz, W. F., Fregni, F., Benseñor, I. M., & ELECT-TDCS Investigators (2017). Trial of Electrical Direct-Current Therapy versus Escitalopram for Depression. *The New England Journal of Medicine*, 376(26), 2523–2533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1612999>

Brunoni, A. R., Nitsche, M. A., Bolognini, N., Bikson, M., Wagner, T., Merabet, L., Edwards, D. J., Valero-Cabre, A., Rotenberg, A., Pascual-Leone, A., Ferrucci, R., Priori, A., Boggio, P. S., & Fregni, F. (2012). Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges and future directions. *Brain Stimulation*, 5(3), 175–195. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2011.03.002>

Brunoni, A. R., Padberg, F., Vieira, E., Teixeira, A. L., Carvalho, A. F., Lotufo, P. A., Gattaz, W. F., & Benseñor, I. M. (2018). Plasma biomarkers in a placebo-controlled trial comparing tDCS and escitalopram efficacy in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 86, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.06.003>

Cabral, M. E., Baltar, A., Borba, R., Galvão, S., Santos, L., Fregni, F., & Monte-Silva, K. (2015). Transcranial direct current stimulation: before, during, or after motor training? *Neuroreport*, 26(11), 618–622. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000397>

Callai, E., Scarabelot, V. L., Fernandes Medeiros, L., de Oliveira, C., de Souza, A., Macedo, I. C., Cioato, S. G., Finamor, F., Caumo, W., Quevedo, A., & Torres, I. (2019). Transcranial direct current stimulation (tDCS) and trigeminal pain: A preclinical study. *Oral Diseases*, 25(3), 888–897. <https://doi.org/10.1111/odi.13038>

Cardenas-Rojas, A., Pacheco-Barrios, K., Giannoni-Luza, S., Rivera-Torrejon, O., & Fregni, F. (2020). Noninvasive brain stimulation combined with exercise in chronic pain: a systematic review and meta-analysis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 20(4), 401–412. <https://doi.org/10.1080/14737175.2020.1738927>

Cardoso-Cruz, H., Lima, D., & Galhardo, V. (2013). Impaired spatial memory performance in a rat model of neuropathic pain is associated with reduced hippocampus-prefrontal cortex connectivity. *The Journal of Neuroscience*, 33(6), 2465–2480. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5197-12.2013>

Carvalho, Ravena Carolina de, Maglioni, Caio Bustamante, Machado, Gabriel Barbosa, Araújo, João Eduardo de, Silva, Josie Resende Torres da, & Silva, Marcelo Lourenço da. (2018). Prevalence and characteristics of chronic pain in Brazil: a national internet-based survey study. *Brazilian Journal of Pain - BrJP*, 1(4), 331-338. <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20180063>

Celik, M. Ö., Labuz, D., Keye, J., Glauben, R., & Machelska, H. (2020). IL-4 induces M2 macrophages to produce sustained analgesia via opioids. *Journal of Clinical Investigation*, 5(4), e133093. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.133093>

Chang, W. J., Bennell, K. L., Hodges, P. W., Hinman, R. S., Young, C. L., Buscemi, V., Liston, M. B., & Schabrun, S. M. (2017). Addition of transcranial direct current stimulation to quadriceps strengthening exercise in knee osteoarthritis: A pilot randomised controlled trial. *PloS One*, 12(6), e0180328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180328>

Chapman, C. R., & Vierck, C. J. (2017). The Transition of Acute Postoperative Pain to Chronic Pain: An Integrative Overview of Research on Mechanisms. *The Journal of Pain*, 18(4), 359.e1–359.e38. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2016.11.004>

Chen, C., Nakagawa, S., An, Y., Ito, K., Kitaichi, Y., & Kusumi, I. (2017). The exercise-glucocorticoid paradox: How exercise is beneficial to cognition, mood, and the brain while increasing glucocorticoid levels. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 44, 83–102. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.12.001>

Chen, N. F., Huang, S. Y., Chen, W. F., Chen, C. H., Lu, C. H., Chen, C. L., Yang, S. N., Wang, H. M., & Wen, Z. H. (2013). TGF- $\beta$ 1 attenuates spinal neuroinflammation and the excitatory amino acid system in rats with neuropathic pain. *The Journal of Pain*, 14(12), 1671–1685. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.08.010>

Chen, T., Taniguchi, W., Chen, Q. Y., Tozaki-Saitoh, H., Song, Q., Liu, R. H., Koga, K., Matsuda, T., Kaito-Sugimura, Y., Wang, J., Li, Z. H., Lu, Y. C., Inoue, K., Tsuda, M., Li, Y. Q., Nakatsuka, T., & Zhuo, M. (2018). Top-down descending facilitation of spinal sensory excitatory transmission from the anterior cingulate cortex. *Nature Communications*, 9(1), 1886. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04309-2>

Chen, W., Walwyn, W., Ennes, H. S., Kim, H., McRoberts, J. A., & Marvizón, J. C. (2014). BDNF released during neuropathic pain potentiates NMDA receptors in primary afferent terminals. *The European Journal of Neuroscience*, 39(9), 1439–1454. <https://doi.org/10.1111/ejn.12516>

Chen, Y. W., Chiu, C. C., Hsieh, P. L., Hung, C. H., & Wang, J. J. (2015). Treadmill training combined with insulin suppresses diabetic nerve pain and cytokines in rat sciatic nerve. *Anesthesia and Analgesia*, 121(1), 239–246. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000799>

Cheng, J. C., Rogachov, A., Hemington, K. S., Kucyi, A., Bosma, R. L., Lindquist, M. A., Inman, R. D., & Davis, K. D. (2018). Multivariate machine learning distinguishes cross-network dynamic functional connectivity patterns in state and trait neuropathic pain. *Pain*, 159(9), 1764–1776. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001264>

Cheriyian, J., & Sheets, P. L. (2018). Altered Excitability and Local Connectivity of mPFC-PAG Neurons in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *The Journal of Neuroscience*, 38(20), 4829–4839. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2731-17.2018>

Chuganji, S., Nakano, J., Sekino, Y., Hamaue, Y., Sakamoto, J., & Okita, M. (2015). Hyperalgesia in an immobilized rat hindlimb: effect of treadmill exercise using non-immobilized limbs. *Neuroscience Letters*, 584, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.054>

Cioato, S. G., Medeiros, L. F., Marques Filho, P. R., Vercelino, R., de Souza, A., Scarabelot, V. L., de Oliveira, C., Adachi, L. N., Fregni, F., Caumo, W., & Torres, I. L. (2016). Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model. *Brain Stimulation*, 9(2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2015.12.001>

Cirillo, G., Cavaliere, C., Bianco, M. R., De Simone, A., Colangelo, A. M., Sellitti, S., Alberghina, L., & Papa, M. (2010). Intrathecal NGF administration reduces reactive astrogliosis and changes neurotrophin receptors expression pattern in a rat model of neuropathic pain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(1), 51–62. <https://doi.org/10.1007/s10571-009-9430-2>

Cobianchi, S., Marinelli, S., Florenzano, F., Pavone, F., & Luvisetto, S. (2010). Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 168(1), 273–287. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.035>

Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso,

E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H., & Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17002. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>

Costigan, M., Moss, A., Latremoliere, A., Johnston, C., Verma-Gandhu, M., Herbert, T. A., Barrett, L., Brenner, G. J., Vardeh, D., Woolf, C. J., & Fitzgerald, M. (2009). T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. *The Journal of Neuroscience*, 29(46), 14415–14422. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4569-09.2009>

Côté, M. P., Gandhi, S., Zambrotta, M., & Houlé, J. D. (2014). Exercise modulates chloride homeostasis after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, 34(27), 8976–8987. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0678-14.2014>

Coull, J. A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M. W., & De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438(7070), 1017–1021. <https://doi.org/10.1038/nature04223>

Crook, R. J., Dickson, K., Hanlon, R. T., & Walters, E. T. (2014). Nociceptive sensitization reduces predation risk. *Current Biology: CB*, 24(10), 1121–1125. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.043>

Cryan, J. F., & Holmes, A. (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4(9), 775–790. <https://doi.org/10.1038/nrd1825>

Cui, M., Honore, P., Zhong, C., Gauvin, D., Mikusa, J., Hernandez, G., Chandran, P., Gomtsyan, A., Brown, B., Bayburt, E. K., Marsh, K., Bianchi, B., McDonald, H., Niforatos, W., Neelands, T. R., Moreland, R. B., Decker, M. W., Lee, C. H., Sullivan, J. P., & Faltynek, C. R. (2006). TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *The Journal of Neuroscience*, 26(37), 9385–9393. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1246-06.2006>

Dahlhamer J, Lucas J, Zelaya, C, et al. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults — United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018; 67:1001–1006. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6736a2>

Datta, A., Bansal, V., Diaz, J., Patel, J., Reato, D., & Bikson, M. (2009). Gyri-precise head model of transcranial direct current stimulation: improved spatial focality using a ring electrode versus conventional rectangular pad. *Brain Stimulation*, 2(4), 201–207.e1. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2009.03.005>

Davoli-Ferreira, M., de Lima, K. A., Fonseca, M. M., Guimarães, R. M., Gomes, F. I., Cavallini, M. C., Quadros, A. U., Kusuda, R., Cunha, F. Q., Alves-Filho, J. C., & Cunha, T. M. (2020). Regulatory T cells counteract neuropathic pain through inhibition of the Th1 response at the site of peripheral nerve injury. *Pain*, 161(8), 1730–1743. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001879>

de la Puerta, R., Carcelén, M., Francés, R., de la Fuente, R., Hurlé, M. A., & Tramullas, M. (2019). BMP-7 protects male and female rodents against neuropathic pain induced by nerve injury through a mechanism mediated by endogenous opioids. *Pharmacological Research*, 150, 104470. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104470>

de Souza, G. G., Duarte, I. D., & de Castro Perez, A. (2013). Differential involvement of central and peripheral  $\alpha_2$  adrenoreceptors in the antinociception induced by aerobic and resistance exercise. *Anesthesia and Analgesia*, 116(3), 703–711. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e31827ab6e4>

de Souza, J. B., Grossmann, E., Perissinotti, D., de Oliveira Junior, J. O., da Fonseca, P., & Posso, I. P. (2017). Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception, and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey. *Pain Research & Management*, 2017, 4643830. <https://doi.org/10.1155/2017/4643830>

del Rey, A., Yau, H. J., Randolf, A., Centeno, M. V., Wildmann, J., Martina, M., Besedovsky, H. O., & Apkarian, V. A. (2011). Chronic neuropathic pain-like behavior correlates with IL-1 $\beta$  expression and disrupts cytokine interactions in the hippocampus. *Pain*, 152(12), 2827–2835. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.09.013>

Detloff, M. R., Quiros-Molina, D., Javia, A. S., Daggubati, L., Nehlsen, A. D., Naqvi, A., Ninan, V., Vannix, K. N., McMullen, M. K., Amin, S., Ganzer, P. D., & Houlié, J. D. (2016). Delayed Exercise Is Ineffective at Reversing Aberrant Nociceptive Afferent Plasticity or Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury in Rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 30(7), 685–700. <https://doi.org/10.1177/1545968315619698>

Ding, X., Cai, J., Li, S., Liu, X. D., Wan, Y., & Xing, G. G. (2015). BDNF contributes to the development of neuropathic pain by induction of spinal long-term potentiation via SHP2 associated GluN2B-containing NMDA receptors activation in rats with spinal nerve ligation. *Neurobiology of Disease*, 73, 428–451. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.10.025>

Dishman, R. K., Berthoud, H. R., Booth, F. W., Cotman, C. W., Edgerton, V. R., Fleshner, M. R., Gandevia, S. C., Gomez-Pinilla, F., Greenwood, B. N., Hillman, C.

H., Kramer, A. F., Levin, B. E., Moran, T. H., Russo-Neustadt, A. A., Salamone, J. D., Van Hoomissen, J. D., Wade, C. E., York, D. A., & Zigmond, M. J. (2006). Neurobiology of exercise. *Obesity* (Silver Spring, Md.), 14(3), 345–356. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.46>

Djouhri, L., Koutsikou, S., Fang, X., McMullan, S., & Lawson, S. N. (2006). Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *The Journal of Neuroscience*, 26(4), 1281–1292. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3388-05.2006>

Dogrul, A., Ossipov, M. H., & Porreca, F. (2009). Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Research*, 1280, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.001>

Dos Santos, R. S., Sorgi, C. A., Peti, A., Veras, F. P., Faccioli, L. H., & Galdino, G. (2019). Involvement of Spinal Cannabinoid CB2 Receptors in Exercise-Induced Antinociception. *Neuroscience*, 418, 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.041>

DosSantos, M. F., Love, T. M., Martikainen, I. K., Nascimento, T. D., Fregni, F., Cummiford, C., Deboer, M. D., Zubieta, J. K., & Dasilva, A. F. (2012). Immediate effects of tDCS on the  $\mu$ -opioid system of a chronic pain patient. *Frontiers in Psychiatry*, 3, 93. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2012.00093>

Dowell, D., Haegerich, T. M., & Chou, R. (2016). CDC Guideline for Prescribing Opioids for Chronic Pain - United States, 2016. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and Reports*, 65(1), 1–49. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6501e1>

Duman, C. H., Schlesinger, L., Russell, D. S., & Duman, R. S. (2008). Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. *Brain Research*, 1199, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.047>

Duric, V., & McCarron, K. E. (2006). Persistent pain produces stress-like alterations in hippocampal neurogenesis and gene expression. *The Journal of Pain*, 7(8), 544–555. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2006.01.458>

Fang, Z. H., Lee, C. H., Seo, M. K., Cho, H., Lee, J. G., Lee, B. J., Park, S. W., & Kim, Y. H. (2013). Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats. *Neuroscience Research*, 76(4), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.04.005>

Fenn, A. M., Henry, C. J., Huang, Y., Dugan, A., & Godbout, J. P. (2012). Lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-4 receptor- $\alpha$  expression and corresponding sensitivity to the M2 promoting effects of IL-4 are impaired in microglia of aged mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(5), 766–777. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.10.003>

Ferrucci, R., Brunoni, A. R., Parazzini, M., Vergari, M., Rossi, E., Fumagalli, M., Mameli, F., Rosa, M., Giannicola, G., Zago, S., & Priori, A. (2013). Modulating human procedural learning by cerebellar transcranial direct current stimulation. *Cerebellum (London, England)*, 12(4), 485–492. <https://doi.org/10.1007/s12311-012-0436-9>

Fields, H. L., Malick, A., & Burstein, R. (1995). Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. *Journal of Neurophysiology*, 74(4), 1742–1759. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.4.1742>

File S. E. (1993). The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*, 58(1-2), 199–202. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90103-w](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90103-w)

Filho, P. R., Vercelino, R., Cioato, S. G., Medeiros, L. F., de Oliveira, C., Scarabelot, V. L., Souza, A., Rozisky, J. R., Quevedo, A., Adachi, L. N., Sanches, P. R., Fregni, F., Caumo, W., & Torres, I. L. (2016). 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 & Biological Psychiatry*, 64, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016>

Filho, P. R., Vercelino, R., Cioato, S. G., Medeiros, L. F., de Oliveira, C., Scarabelot, V. L., Souza, A., Rozisky, J. R., Quevedo, A., Adachi, L. N., Sanches, P. R., Fregni, F., Caumo, W., & Torres, I. L. (2016). 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 & Biological Psychiatry*, 64, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.016>

Finnerup, N. B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R. H., Gilron, I., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T. S., Kamerman, P. R., Lund, K., Moore, A., Raja, S. N., Rice, A. S., Rowbotham, M., Sena, E., Siddall, P., Smith, B. H., & Wallace, M. (2015). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, 14(2), 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70251-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70251-0)

Fiore, N. T., & Austin, P. J. (2019). Peripheral Nerve Injury Triggers Neuroinflammation in the Medial Prefrontal Cortex and Ventral Hippocampus in a Subgroup of Rats with Coincident Affective Behavioural Changes. *Neuroscience*, 416, 147–167. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.005>

Fishman, S. M., Ballantyne, J. C., Rathmell, J. P. (2010). *Bonica's Management of Pain*; Fourth edition; Wolters Kluwer; Lippincott Williams & Wilkins.

Francos-Quijorna, I., Amo-Aparicio, J., Martinez-Muriana, A., & López-Vales, R. (2016). IL-4 drives microglia and macrophages toward a phenotype conducive for tissue repair and functional recovery after spinal cord injury. *Glia*, 64(12), 2079–2092. <https://doi.org/10.1002/glia.23041>

Fregni, F., Boggio, P. S., Lima, M. C., Ferreira, M. J., Wagner, T., Rigonatti, S. P., Castro, A. W., Souza, D. R., Riberto, M., Freedman, S. D., Nitsche, M. A., & Pascual-Leone, A. (2006). A sham-controlled, phase II trial of transcranial direct current stimulation for the treatment of central pain in traumatic spinal cord injury. *Pain*, 122(1-2), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.02.023>

Fregni, F., Boggio, P. S., Nitsche, M., Berman, F., Antal, A., Feredoes, E., Marcolin, M. A., Rigonatti, S. P., Silva, M. T., Paulus, W., & Pascual-Leone, A. (2005). Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory. *Experimental Brain Research*, 166(1), 23–30. <https://doi.org/10.1007/s00221-005-2334-6>

Fregni, F., Macedo, I. C., Spezia-Adachi, L. N., Scarabelot, V. L., Laste, G., Souza, A., Sanches, P., Caumo, W., & Torres, I. (2018). Transcranial direct current stimulation (tDCS) prevents chronic stress-induced hyperalgesia in rats. *Brain Stimulation*, 11(2), 299–301. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.11.009>

Fritsch, B., Reis, J., Martinowich, K., Schambra, H. M., Ji, Y., Cohen, L. G., & Lu, B. (2010). Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. *Neuron*, 66(2), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.035>

Gadani, S. P., Cronk, J. C., Norris, G. T., & Kipnis, J. (2012). IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(9), 4213–4219. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202246>

Galdino, G., Romero, T. R., Silva, J. F., Aguiar, D. C., de Paula, A. M., Cruz, J. S., Parrella, C., Piscitelli, F., Duarte, I. D., Di Marzo, V., & Perez, A. C. (2014). The



endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. *Neuropharmacology*, 77, 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.022>

Gellner, A. K., Reis, J., & Fritsch, B. (2016). Glia: A Neglected Player in Non-invasive Direct Current Brain Stimulation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 188. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00188>

Gilron, I., Bailey, J. M., Tu, D., Holden, R. R., Weaver, D. F., & Houlden, R. L. (2005). Morphine, gabapentin, or their combination for neuropathic pain. *The New England Journal of Medicine*, 352(13), 1324–1334. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa042580>

Goffer, Y., Xu, D., Eberle, S. E., D'amour, J., Lee, M., Tukey, D., Froemke, R. C., Ziff, E. B., & Wang, J. (2013). Calcium-permeable AMPA receptors in the nucleus accumbens regulate depression-like behaviors in the chronic neuropathic pain state. *The Journal of Neuroscience*, 33(48), 19034–19044. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2454-13.2013>

Gonçalves Dos Santos, G., Delay, L., Yaksh, T. L., & Corr, M. (2020). Neuraxial Cytokines in Pain States. *Frontiers in Immunology*, 10, 3061. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03061>

Gordon, T., & English, A. W. (2016). Strategies to promote peripheral nerve regeneration: electrical stimulation and/or exercise. *The European Journal of Neuroscience*, 43(3), 336–350. <https://doi.org/10.1111/ejn.13005>

Grace, P. M., Fabisiak, T. J., Green-Fulgham, S. M., Anderson, N. D., Strand, K. A., Kwilasz, A. J., Galer, E. L., Walker, F. R., Greenwood, B. N., Maier, S. F., Fleshner, M., & Watkins, L. R. (2016). Prior voluntary wheel running attenuates neuropathic pain. *Pain*, 157(9), 2012–2023. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000607>

Grace, P. M., Strand, K. A., Galer, E. L., Urban, D. J., Wang, X., Baratta, M. V., Fabisiak, T. J., Anderson, N. D., Cheng, K., Greene, L. I., Berkelhammer, D., Zhang, Y., Ellis, A. L., Yin, H. H., Campeau, S., Rice, K. C., Roth, B. L., Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2016). Morphine paradoxically prolongs neuropathic pain in rats by amplifying spinal NLRP3 inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(24), E3441–E3450. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602070113>

Gray J. A., McNaughton, N. (2003). *The Neuropsychology of Anxiety*. 2<sup>nd</sup> edition; Oxford University Press.

Green-Fulgham, S. M., Ball, J. B., Kwilasz, A. J., Fabisiak, T., Maier, S. F., Watkins, L. R., & Grace, P. M. (2019). Oxycodone, fentanyl, and morphine amplify established neuropathic pain in male rats. *Pain*, 160(11), 2634–2640. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001652>

Guida, F., Luongo, L., Marmo, F., Romano, R., Iannotta, M., Napolitano, F., Belardo, C., Marabese, I., D'Aniello, A., De Gregorio, D., Rossi, F., Piscitelli, F., Lattanzi, R., de Bartolomeis, A., Usiello, A., Di Marzo, V., de Novellis, V., & Maione, S. (2015). Palmitoylethanolamide reduces pain-related behaviors and restores glutamatergic synapses homeostasis in the medial prefrontal cortex of neuropathic mice. *Molecular Brain*, 8, 47. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0139-5>

Haj-Mirzaian, A., Amiri, S., Amini-Khoei, H., Hosseini, M. J., Haj-Mirzaian, A., Momeny, M., Rahimi-Balaei, M., & Dehpour, A. R. (2017). Anxiety- and Depressive-Like Behaviors are Associated with Altered Hippocampal Energy and Inflammatory Status in a Mouse Model of Crohn's Disease. *Neuroscience*, 366, 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.10.023>

Hayashi, K., Shiozawa, S., Ozaki, N., Mizumura, K., & Graven-Nielsen, T. (2013). Repeated intramuscular injections of nerve growth factor induced progressive muscle hyperalgesia, facilitated temporal summation, and expanded pain areas. *Pain*, 154(11), 2344–2352. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.007>

He, Z., Guo, Q., Xiao, M., He, C., & Zou, W. (2013). Intrathecal lentivirus-mediated transfer of interleukin-10 attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain through modulation of spinal high-mobility group box 1 in rats. *Pain Physician*, 16(5), E615–E625.

Horvath, G., Kekesi, G., Nagy, E., & Benedek, G. (2008). The role of TRPV1 receptors in the antinociceptive effect of anandamide at spinal level. *Pain*, 134(3), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.04.032>

Hou, R., Garner, M., Holmes, C., Osmond, C., Teeling, J., Lau, L., & Baldwin, D. S. (2017). Peripheral inflammatory cytokines and immune balance in Generalised Anxiety Disorder: Case-controlled study. *Brain, Behavior, and Immunity*, 62, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.021>

Huang, J., Gadotti, V. M., Chen, L., Souza, I. A., Huang, S., Wang, D., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Zhang, Z., & Zamponi, G. W. (2019). A neuronal circuit for activating descending modulation of neuropathic pain. *Nature Neuroscience*, 22(10), 1659–1668. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0481-5>

Huang, P. C., Tsai, K. L., Chen, Y. W., Lin, H. T., & Hung, C. H. (2017). Exercise Combined with Ultrasound Attenuates Neuropathic Pain in Rats Associated with Downregulation of IL-6 and TNF- $\alpha$ , but With Upregulation of IL-10. *Anesthesia and Analgesia*, 124(6), 2038–2044. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001600>

Iyengar, S., Ossipov, M. H., & Johnson, K. W. (2017). The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain*, 158(4), 543–559. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000831>

Jamil, A., Batsikadze, G., Kuo, H. I., Labruna, L., Hasan, A., Paulus, W., & Nitsche, M. A. (2017). Systematic evaluation of the impact of stimulation intensity on neuroplastic after-effects induced by transcranial direct current stimulation. *The Journal of Physiology*, 595(4), 1273–1288. <https://doi.org/10.1113/JP272738>

Ji, R. R., Nackley, A., Huh, Y., Terrando, N., & Maixner, W. (2018). Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. *Anesthesiology*, 129(2), 343–366. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002130>

Jiang, M., Bo, J., Lei, Y., Hu, F., Xia, Z., Liu, Y., Lu, C., Sun, Y., Hou, B., Ni, K., Ma, Z., & Gu, X. (2019). Anxiety-induced hyperalgesia in female rats is mediated by cholecystokinin 2 receptor in rostral ventromedial medulla and spinal 5-hydroxytryptamine 2B receptor. *Journal of Pain Research*, 12, 2009–2026. <https://doi.org/10.2147/JPR.S187715>

Jing, Y. Y., Wang, J. Y., Li, X. L., Wang, Z. H., Pei, L., Pan, M. M., Dong, X. P., Fan, G. X., & Yuan, Y. K. (2009). Nerve growth factor of red nucleus involvement in pain induced by spared nerve injury of the rat sciatic nerve. *Neurochemical Research*, 34(9), 1612–1618. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-9950-7>

Jones, A. F., & Sheets, P. L. (2020). Sex-Specific Disruption of Distinct mPFC Inhibitory Neurons in Spared-Nerve Injury Model of Neuropathic Pain. *Cell Reports*, 31(10), 107729. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107729>

Kami, K., Taguchi Ms, S., Tajima, F., & Senba, E. (2016). Improvements in impaired GABA and GAD65/67 production in the spinal dorsal horn contribute to exercise-induced hypoalgesia in a mouse model of neuropathic pain. *Molecular Pain*, 12, 1744806916629059. <https://doi.org/10.1177/1744806916629059>

Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J. K., & Ji, R. R. (2008). Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in regulating synaptic and neuronal activity

in the superficial spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 28(20), 5189–5194.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3338-07.2008>

Kemp, S. W., Webb, A. A., Dhaliwal, S., Syed, S., Walsh, S. K., & Midha, R. (2011). Dose and duration of nerve growth factor (NGF) administration determine the extent of behavioral recovery following peripheral nerve injury in the rat. *Experimental Neurology*, 229(2), 460–470. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.03.017>

Khan, J., Benavent, V., Korczeniewska, O. A., Benoliel, R., & Eliav, E. (2014). Exercise-induced hypoalgesia profile in rats predicts neuropathic pain intensity induced by sciatic nerve constriction injury. *The Journal of Pain*, 15(11), 1179–1189. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.08.012>

Khan, J., Ramadan, K., Korczeniewska, O., Anwer, M. M., Benoliel, R., & Eliav, E. (2015). Interleukin-10 levels in rat models of nerve damage and neuropathic pain. *Neuroscience Letters*, 592, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.001>

Khan, N., & Smith, M. T. (2015). Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology. *Molecules* (Basel, Switzerland), 20(6), 10657–10688. <https://doi.org/10.3390/molecules200610657>

Khedr, E. M., Omran, E., Ismail, N. M., El-Hammady, D. H., Goma, S. H., Kotb, H., Galal, H., Osman, A. M., Farghaly, H., Karim, A. A., & Ahmed, G. A. (2017). Effects of transcranial direct current stimulation on pain, mood and serum endorphin level in the treatment of fibromyalgia: A double blinded, randomized clinical trial. *Brain Stimulation*, 10(5), 893–901. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.06.006>

Khuong, T. M., Wang, Q. P., Manion, J., Oyston, L. J., Lau, M. T., Towler, H., Lin, Y. Q., & Neely, G. G. (2019). Nerve injury drives a heightened state of vigilance and neuropathic sensitization in *Drosophila*. *Science Advances*, 5(7), eaaw4099. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw4099>

Kiguchi, N., Kobayashi, Y., Saika, F., Sakaguchi, H., Maeda, T., & Kishioka, S. (2015). Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. *Pain*, 156(4), 684–693. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000097>

Kim, Y. J., Byun, J. H., & Choi, I. S. (2015). Effect of Exercise on  $\mu$ -Opioid Receptor Expression in the Rostral Ventromedial Medulla in Neuropathic Pain Rat Model. *Annals of Rehabilitation Medicine*, 39(3), 331–339. <https://doi.org/10.5535/arm.2015.39.3.331>

Kluding, P. M., Pasnoor, M., Singh, R., Jernigan, S., Farmer, K., Rucker, J., Sharma, N. K., & Wright, D. E. (2012). The effect of exercise on neuropathic symptoms, nerve function, and cutaneous innervation in people with diabetic peripheral neuropathy. *Journal of Diabetes and its Complications*, 26(5), 424–429. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2012.05.007>

Koltyn, K. F., Brellenthin, A. G., Cook, D. B., Sehgal, N., & Hillard, C. (2014). Mechanisms of exercise-induced hypoalgesia. *The Journal of Pain*, 15(12), 1294–1304. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.09.006>

Koopman, F. A., Chavan, S. S., Miljko, S., Grazio, S., Sokolovic, S., Schuurman, P. R., Mehta, A. D., Levine, Y. A., Faltys, M., Zitnik, R., Tracey, K. J., & Tak, P. P. (2016). Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 8284–8289. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605635113>

Krause, M. R., Zanos, T. P., Csorba, B. A., Pilly, P. K., Choe, J., Phillips, M. E., Datta, A., & Pack, C. C. (2017). Transcranial Direct Current Stimulation Facilitates Associative Learning and Alters Functional Connectivity in the Primate Brain. *Current Biology: CB*, 27(20), 3086–3096.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.020>

Kremer, M., Becker, L. J., Barrot, M., & Yalcin, I. (2021). How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? *The European Journal of Neuroscience*, 53(1), 236–270. <https://doi.org/10.1111/ejn.14686>

Kronberg, G., Bridi, M., Abel, T., Bikson, M., & Parra, L. C. (2017). Direct Current Stimulation Modulates LTP and LTD: Activity Dependence and Dendritic Effects. *Brain Stimulation*, 10(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2016.10.001>

Kuo, M. F., Paulus, W., & Nitsche, M. A. (2014). Therapeutic effects of non-invasive brain stimulation with direct currents (tDCS) in neuropsychiatric diseases. *NeuroImage*, 85 Pt 3, 948–960. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.117>

Lang, N., Siebner, H. R., Ward, N. S., Lee, L., Nitsche, M. A., Paulus, W., Rothwell, J. C., Lemon, R. N., & Frackowiak, R. S. (2005). How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? *The European Journal of Neuroscience*, 22(2), 495–504. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04233.x>

Laste, G., Caumo, W., Adachi, L. N., Rozisky, J. R., de Macedo, I. C., Filho, P. R., Partata, W. A., Fregni, F., & Torres, I. L. (2012). After-effects of consecutive

sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Experimental Brain Research*, 221(1), 75–83.

<https://doi.org/10.1007/s00221-012-3149-x>

Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain*, 10(9), 895–926.

<https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>

Leffa, D. T., Bellaver, B., Salvi, A. A., de Oliveira, C., Caumo, W., Grevet, E. H., Fregni, F., Quincozes-Santos, A., Rohde, L. A., & Torres, I. (2018). 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*, 11(4), 743–751. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.04.001>

Leibinger, M., Zeitler, C., Gobrecht, P., Andreadaki, A., Gisselmann, G., & Fischer, D. (2021). Transneuronal delivery of hyper-interleukin-6 enables functional recovery after severe spinal cord injury in mice. *Nature Communications*, 12(1), 391.

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20112-4>

Leung, A., Gregory, N. S., Allen, L. H., & Sluka, K. A. (2016). Regular physical activity prevents chronic pain by altering resident muscle macrophage phenotype and increasing interleukin-10 in mice. *Pain*, 157(1), 70–79.

<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000312>

Liebetanz, D., Nitsche, M. A., Tergau, F., & Paulus, W. (2002). Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain*, 125(Pt 10), 2238–2247.

<https://doi.org/10.1093/brain/awf238>

Liebetanz, D., Nitsche, M. A., Tergau, F., & Paulus, W. (2002). Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain: A Journal of Neurology*, 125(Pt 10), 2238–2247.

<https://doi.org/10.1093/brain/awf238>

Lima, L. V., Abner, T., & Sluka, K. A. (2017). Does exercise increase or decrease pain? Central mechanisms underlying these two phenomena. *The Journal of Physiology*, 595(13), 4141–4150. <https://doi.org/10.1113/JP273355>

Lima, L. V., DeSantana, J. M., Rasmussen, L. A., & Sluka, K. A. (2017). Short-duration physical activity prevents the development of activity-induced hyperalgesia through opioid and serotonergic mechanisms. *Pain*, 158(9), 1697–1710.

<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000967>

Lister, K. C., Bouchard, S. M., Markova, T., Aternali, A., Denecli, P., Pimentel, S. D., Majeed, M., Austin, J. S., de C Williams, A. C., & Mogil, J. S. (2020). Chronic pain produces hypervigilance to predator odor in mice. *Current Biology: CB*, 30(15), R866–R867. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.025>

Liu, F., Wang, Z., Qiu, Y., Wei, M., Li, C., Xie, Y., Shen, L., Huang, Y., & Ma, C. (2017). Suppression of MyD88-dependent signaling alleviates neuropathic pain induced by peripheral nerve injury in the rat. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0822-9>

Liu, J., Chen, L., Chen, X., Hu, K., Tu, Y., Lin, M., Huang, J., Liu, W., Wu, J., Qiu, Z., Zhu, J., Li, M., Park, J., Wilson, G., Lang, C., Xie, G., Tao, J., & Kong, J. (2019). Modulatory effects of different exercise modalities on the functional connectivity of the periaqueductal grey and ventral tegmental area in patients with knee osteoarthritis: a randomised multimodal magnetic resonance imaging study. *British Journal of Anaesthesia*, 123(4), 506–518. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.06.017>

Lopes, B. C., Medeiros, L. F., Silva de Souza, V., Cioato, S. G., Medeiros, H. R., Regner, G. G., Lino de Oliveira, C., Fregni, F., Caumo, W., & Torres, I. (2020). Transcranial direct current stimulation combined with exercise modulates the inflammatory profile and hyperalgesic response in rats subjected to a neuropathic pain model: Long-term effects. *Brain Stimulation*, 13(3), 774–782. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2020.02.025>

Lopes, B. C., Medeiros, L. F., Stein, D. J., Cioato, S. G., de Souza, V. S., Medeiros, H. R., Sanches, P., Fregni, F., Caumo, W., & Torres, I. (2021). tDCS and exercise improve anxiety-like behavior and locomotion in chronic pain rats via modulation of neurotrophins and inflammatory mediators. *Behavioural Brain Research*, 404, 113173. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113173>

López-Álvarez, V. M., Modol, L., Navarro, X., & Cobianchi, S. (2015). Early increasing-intensity treadmill exercise reduces neuropathic pain by preventing nociceptor collateral sprouting and disruption of chloride cotransporters homeostasis after peripheral nerve injury. *Pain*, 156(9), 1812–1825. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000268>

López-Álvarez, V. M., Puigdomenech, M., Navarro, X., & Cobianchi, S. (2018). Monoaminergic descending pathways contribute to modulation of neuropathic pain by increasing-intensity treadmill exercise after peripheral nerve injury. *Experimental Neurology*, 299(Pt A), 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.007>

Lovick T. A. (2008). Pro-nociceptive action of cholecystokinin in the periaqueductal grey: a role in neuropathic and anxiety-induced hyperalgesic states. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(4), 852–862. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.01.003>

Maldonado-Bouchard, S., Peters, K., Woller, S. A., Madahian, B., Faghihi, U., Patel, S., Bake, S., & Hook, M. A. (2016). Inflammation is increased with anxiety- and depression-like signs in a rat model of spinal cord injury. *Brain, Behavior, and Immunity*, 51, 176–195. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.08.009>

Márquez-Ruiz, J., Leal-Campanario, R., Sánchez-Campusano, R., Molaee-Ardekani, B., Wendling, F., Miranda, P. C., Ruffini, G., Gruart, A., & Delgado-García, J. M. (2012). Transcranial direct-current stimulation modulates synaptic mechanisms involved in associative learning in behaving rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), 6710–6715. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121147109>

Martins, D. F., Martins, T. C., Batisti, A. P., Dos Santos Leonel, L., Bobinski, F., Belmonte, L., Mazzardo-Martins, L., Cargnin-Ferreira, E., & Santos, A. (2018). Long-Term Regular Eccentric Exercise Decreases Neuropathic Pain-like Behavior and Improves Motor Functional Recovery in an Axotomy Mouse Model: the Role of Insulin-like Growth Factor-1. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 6155–6168. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0829-3>

Martins, D. F., Siteneski, A., Ludtke, D. D., Dal-Secco, D., & Santos, A. (2017). High-Intensity Swimming Exercise Decreases Glutamate-Induced Nociception by Activation of G-Protein-Coupled Receptors Inhibiting Phosphorylated Protein Kinase A. *Molecular Neurobiology*, 54(7), 5620–5631. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0095-9>

Mazzardo-Martins, L., Martins, D. F., Marcon, R., Dos Santos, U. D., Speckhann, B., Gadotti, V. M., Sigwalt, A. R., Guglielmo, L. G., & Santos, A. R. (2010). High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. *The Journal of Pain*, 11(12), 1384–1393. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2010.03.015>

Medeiros, L. F., de Souza, I. C., Vidor, L. P., de Souza, A., Deitos, A., Volz, M. S., Fregni, F., Caumo, W., & Torres, I. L. (2012). Neurobiological effects of transcranial direct current stimulation: a review. *Frontiers in Psychiatry*, 3, 110. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2012.00110>



Meeusen, R., & De Meirleir, K. (1995). Exercise and brain neurotransmission. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 20(3), 160–188. <https://doi.org/10.2165/00007256-199520030-00004>

Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science (New York, N.Y.)*, 150(3699), 971–979. <https://doi.org/10.1126/science.150.3699.971>

Mendonca, M. E., Simis, M., Grecco, L. C., Battistella, L. R., Baptista, A. F., & Fregni, F. (2016). Transcranial Direct Current Stimulation Combined with Aerobic Exercise to Optimize Analgesic Responses in Fibromyalgia: A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10, 68. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00068>

Merighi, A., Salio, C., Ghirri, A., Lossi, L., Ferrini, F., Betelli, C., & Bardoni, R. (2008). BDNF as a pain modulator. *Progress in Neurobiology*, 85(3), 297–317. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.04.004>

Metz, A. E., Yau, H. J., Centeno, M. V., Apkarian, A. V., & Martina, M. (2009). Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2423–2428. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809897106>

Mietto, B., Kroner, A., Girolami, E. I., Santos-Nogueira, E., Zhang, J., & David, S. (2015). Role of IL-10 in Resolution of Inflammation and Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury. *The Journal of Neuroscience*, 35(50), 16431–16442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2119-15.2015>

Mills, E. P., Di Pietro, F., Alshelh, Z., Peck, C. C., Murray, G. M., Vickers, E. R., & Henderson, L. A. (2018). Brainstem Pain-Control Circuitry Connectivity in Chronic Neuropathic Pain. *The Journal of Neuroscience*, 38(2), 465–473. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1647-17.2017>

Mishima, T., Nagai, T., Yahagi, K., Akther, S., Oe, Y., Monai, H., Kohsaka, S., & Hirase, H. (2019). Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Induces Adrenergic Receptor-Dependent Microglial Morphological Changes in Mice. *eNeuro*, 6(5), ENEURO.0204-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0204-19.2019>

Mòdol, L., Cobianchi, S., & Navarro, X. (2014). Prevention of NKCC1 phosphorylation avoids downregulation of KCC2 in central sensory pathways and reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain*, 155(8), 1577–1590. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.05.004>

Mogil J. S. (2012). Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(12), 859–866. <https://doi.org/10.1038/nrn3360>

Monai, H., Ohkura, M., Tanaka, M., Oe, Y., Konno, A., Hirai, H., Mikoshiba, K., Itohara, S., Nakai, J., Iwai, Y., & Hirase, H. (2016). Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. *Nature Communications*, 7, 11100. <https://doi.org/10.1038/ncomms11100>

Monte-Silva, K., Kuo, M. F., Hessenthaler, S., Fresnoza, S., Liebetanz, D., Paulus, W., & Nitsche, M. A. (2013). Induction of late LTP-like plasticity in the human motor cortex by repeated non-invasive brain stimulation. *Brain Stimulation*, 6(3), 424–432. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2012.04.011>

Moreira, S. F., Medeiros, L. F., de Souza, A., de Oliveira, C., Scarabelot, V. L., Fregni, F., Caumo, W., & Torres, I. L. (2016). Transcranial direct current stimulation (tDCS) neuromodulatory effects on mechanical hyperalgesia and cortical BDNF levels in ovariectomized rats. *Life Sciences*, 145, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.011>

Morgan, J. A., Singhal, G., Corrigan, F., Jaehne, E. J., Jawahar, M. C., Breen, J., Pederson, S., & Baune, B. T. (2019). Ceasing exercise induces depression-like, anxiety-like, and impaired cognitive-like behaviours and altered hippocampal gene expression. *Brain Research Bulletin*, 148, 118–130. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.02.014>

Mori, F., Codecà, C., Kusayanagi, H., Monteleone, F., Buttari, F., Fiore, S., Bernardi, G., Koch, G., & Centonze, D. (2010). Effects of anodal transcranial direct current stimulation on chronic neuropathic pain in patients with multiple sclerosis. *The Journal of Pain*, 11(5), 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.08.011>

Morya, E., Monte-Silva, K., Bikson, M., Esmaeilpour, Z., Biazoli, C. E., Jr, Fonseca, A., Bocci, T., Farzan, F., Chatterjee, R., Hausdorff, J. M., da Silva Machado, D. G., Brunoni, A. R., Mezger, E., Moscaleski, L. A., Pegado, R., Sato, J. R., Caetano, M. S., Sá, K. N., Tanaka, C., Li, L. M., ... Okano, A. H. (2019). Beyond the target area: an integrative view of tDCS-induced motor cortex modulation in patients and athletes. *Journal of Neuroengineering and Rehabilitation*, 16(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s12984-019-0581-1>

Munshi, S., Parrilli, V., & Rosenkranz, J. A. (2019). Peripheral anti-inflammatory cytokine Interleukin-10 treatment mitigates interleukin-1 $\beta$  - induced

anxiety and sickness behaviors in adult male rats. *Behavioural Brain Research*, 372, 112024. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112024>

Mutso, A. A., Radzicki, D., Baliki, M. N., Huang, L., Banisadr, G., Centeno, M. V., Radulovic, J., Martina, M., Miller, R. J., & Apkarian, A. V. (2012). Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. *The Journal of Neuroscience*, 32(17), 5747–5756. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0587-12.2012>

Nadeau, S., Filali, M., Zhang, J., Kerr, B. J., Rivest, S., Soulet, D., Iwakura, Y., de Rivero Vaccari, J. P., Keane, R. W., & Lacroix, S. (2011). Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF: implications for neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience*, 31(35), 12533–12542. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2840-11.2011>

Nakamura, M., Nishiwaki, Y., Sumitani, M., Ushida, T., Yamashita, T., Konno, S., Taguchi, T., & Toyama, Y. (2014). Investigation of chronic musculoskeletal pain (third report): with special reference to the importance of neuropathic pain and psychogenic pain. *Journal of Orthopaedic Science*, 19(4), 667–675. <https://doi.org/10.1007/s00776-014-0567-6>

Nam, Y., Kim, J. H., Kim, J. H., Jha, M. K., Jung, J. Y., Lee, M. G., Choi, I. S., Jang, I. S., Lim, D. G., Hwang, S. H., Cho, H. J., & Suk, K. (2016). Reversible Induction of Pain Hypersensitivity following Optogenetic Stimulation of Spinal Astrocytes. *Cell Reports*, 17(11), 3049–3061. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.043>

Naugle, K. M., Naugle, K. E., Fillingim, R. B., Samuels, B., & Riley, J. L., 3rd (2014). Intensity thresholds for aerobic exercise-induced hypoalgesia. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 46(4), 817–825. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000143>

Navratilova, E., Xie, J. Y., Meske, D., Qu, C., Morimura, K., Okun, A., Arakawa, N., Ossipov, M., Fields, H. L., & Porreca, F. (2015). Endogenous opioid activity in the anterior cingulate cortex is required for relief of pain. *The Journal of Neuroscience*, 35(18), 7264–7271. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3862-14.2015>

Nazemi, S., Manaheji, H., Noorbakhsh, S. M., Zaringhalam, J., Sadeghi, M., Mohammad-Zadeh, M., & Haghparast, A. (2015). Inhibition of microglial activity alters spinal wide dynamic range neuron discharge and reduces microglial Toll-like receptor 4 expression in neuropathic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 42(7), 772–779. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12414>

Nijs, J., Kosek, E., Van Oosterwijck, J., & Meeus, M. (2012). Dysfunctional endogenous analgesia during exercise in patients with chronic pain: to exercise or not to exercise? *Pain Physician*, 15(3 Suppl), ES205–ES213.

Nishida, K., Koshikawa, Y., Morishima, Y., Yoshimura, M., Katsura, K., Ueda, S., Ikeda, S., Ishii, R., Pascual-Marqui, R., & Kinoshita, T. (2019). Pre-stimulus Brain Activity Is Associated With State-Anxiety Changes During Single-Session Transcranial Direct Current Stimulation. *Frontiers in Human Neuroscience*, 13, 266. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2019.00266>

Nishihara, T., Tanaka, J., Sekiya, K., Nishikawa, Y., Abe, N., Hamada, T., Kitamura, S., Ikemune, K., Ochi, S., Choudhury, M. E., Yano, H., & Yorozyua, T. (2020). Chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats causes different activation modes of microglia between the anterior and posterior horns of the spinal cord. *Neurochemistry International*, 134, 104672. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104672>

Nishijima, T., Llorens-Martín, M., Tejada, G. S., Inoue, K., Yamamura, Y., Soya, H., Trejo, J. L., & Torres-Alemán, I. (2013). Cessation of voluntary wheel running increases anxiety-like behavior and impairs adult hippocampal neurogenesis in mice. *Behavioural Brain Research*, 245, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.02.009>

Nitsche, M. A., Cohen, L. G., Wassermann, E. M., Priori, A., Lang, N., Antal, A., Paulus, W., Hummel, F., Boggio, P. S., Fregni, F., & Pascual-Leone, A. (2008). Transcranial direct current stimulation: State of the art 2008. *Brain Stimulation*, 1(3), 206–223. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2008.06.004>

Nitsche, M. A., Doemkes, S., Karaköse, T., Antal, A., Liebetanz, D., Lang, N., Tergau, F., & Paulus, W. (2007). Shaping the effects of transcranial direct current stimulation of the human motor cortex. *Journal of Neurophysiology*, 97(4), 3109–3117. <https://doi.org/10.1152/jn.01312.2006>

Nitsche, M. A., Fricke, K., Henschke, U., Schlitterlau, A., Liebetanz, D., Lang, N., Henning, S., Tergau, F., & Paulus, W. (2003). Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *The Journal of Physiology*, 553(Pt 1), 293–301. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049916>

Nitsche, M. A., Grundev, J., Liebetanz, D., Lang, N., Tergau, F., & Paulus, W. (2004). Catecholaminergic consolidation of motor cortical neuroplasticity in humans. *Cerebral Cortex* (New York, N.Y.: 1991), 14(11), 1240–1245. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh085>

Nitsche, M. A., Jaussi, W., Liebetanz, D., Lang, N., Tergau, F., & Paulus, W. (2004). Consolidation of human motor cortical neuroplasticity by D-cycloserine. *Neuropsychopharmacology: Official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 29(8), 1573–1578. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300517>

Nitsche, M. A., Kuo, M. F., Karrasch, R., Wächter, B., Liebetanz, D., & Paulus, W. (2009). Serotonin affects transcranial direct current-induced neuroplasticity in humans. *Biological Psychiatry*, 66(5), 503–508. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.03.022>

Nitsche, M. A., Lampe, C., Antal, A., Liebetanz, D., Lang, N., Tergau, F., & Paulus, W. (2006). Dopaminergic modulation of long-lasting direct current-induced cortical excitability changes in the human motor cortex. *The European Journal of Neuroscience*, 23(6), 1651–1657. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04676.x>

Okano, A. H., Fontes, E. B., Montenegro, R. A., Farinatti, P., Cyrino, E. S., Li, L. M., Bikson, M., & Noakes, T. D. (2015). Brain stimulation modulates the autonomic nervous system, rating of perceived exertion and performance during maximal exercise. *British Journal of Sports Medicine*, 49(18), 1213–1218. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2012-091658>

Oliveira, L. B., Lopes, T. S., Soares, C., Maluf, R., Goes, B. T., Sá, K. N., & Baptista, A. F. (2015). Transcranial direct current stimulation and exercises for treatment of chronic temporomandibular disorders: a blind randomised-controlled trial. *Journal of Oral Rehabilitation*, 42(10), 723–732. <https://doi.org/10.1111/joor.12300>

Ong, W. Y., Stohler, C. S., & Herr, D. R. (2019). Role of the Prefrontal Cortex in Pain Processing. *Molecular Neurobiology*, 56(2), 1137–1166. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1130-9>

Park, J. S., & Höke, A. (2014). Treadmill exercise induced functional recovery after peripheral nerve repair is associated with increased levels of neurotrophic factors. *PloS One*, 9(3), e90245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090245>

Pedersen, B. K., Akerström, T. C., Nielsen, A. R., & Fischer, C. P. (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 103(3), 1093–1098. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00080.2007>

Perrot-Minnott, M. J., Banchetry, L., & Cézilly, F. (2017). Anxiety-like behaviour increases safety from fish predation in an amphipod crustacea. *Royal Society Open Science*, 4(12), 171558. <https://doi.org/10.1098/rsos.171558>

Pitcher, M. H., Tarum, F., Rauf, I. Z., Low, L. A., & Bushnell, C. (2017). Modest Amounts of Voluntary Exercise Reduce Pain- and Stress-Related Outcomes in a Rat Model of Persistent Hind Limb Inflammation. *The Journal of Pain*, 18(6), 687–701. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2017.01.006>

Ploghaus, A., Narain, C., Beckmann, C. F., Clare, S., Bantick, S., Wise, R., Matthews, P. M., Rawlins, J. N., & Tracey, I. (2001). Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *The Journal of Neuroscience*, 21(24), 9896–9903. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09896.2001>

Podda, M. V., Cocco, S., Mastrodonato, A., Fusco, S., Leone, L., Barbatì, S. A., Colussi, C., Ripoli, C., & Grassi, C. (2016). Anodal transcranial direct current stimulation boosts synaptic plasticity and memory in mice via epigenetic regulation of Bdnf expression. *Scientific Reports*, 6, 22180. <https://doi.org/10.1038/srep22180>

Polanía, R., Paulus, W., & Nitsche, M. A. (2012). Modulating cortico-striatal and thalamo-cortical functional connectivity with transcranial direct current stimulation. *Human Brain Mapping*, 33(10), 2499–2508. <https://doi.org/10.1002/hbm.21380>

Priori A. (2003). Brain polarization in humans: a reappraisal of an old tool for prolonged non-invasive modulation of brain excitability. *Clinical Neurophysiology*, 114(4), 589–595. [https://doi.org/10.1016/s1388-2457\(02\)00437-6](https://doi.org/10.1016/s1388-2457(02)00437-6)

Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X. J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>

Reidler, J. S., Mendonca, M. E., Santana, M. B., Wang, X., Lenkinski, R., Motta, A. F., Marchand, S., Latif, L., & Fregni, F. (2012). Effects of motor cortex modulation and descending inhibitory systems on pain thresholds in healthy subjects. *The Journal of Pain*, 13(5), 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.01.005>

Ribeiro, H., Sesterhenn, R. B., Souza, A., Souza, A. C., Alves, M., Machado, J. C., Burger, N. B., Torres, I., Stefani, L. C., Fregni, F., & Caumo, W. (2017). 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*, 12(11), e0187013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187013>

Rice, D., Nijs, J., Kosek, E., Wideman, T., Hasenbring, M. I., Koltyn, K., Graven-Nielsen, T., & Polli, A. (2019). Exercise-Induced Hypoalgesia in Pain-Free and Chronic Pain Populations: State of the Art and Future Directions. *The Journal of Pain*, 20(11), 1249–1266. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2019.03.005>

Richner, M., Ulrichsen, M., Elmegaard, S. L., Dieu, R., Pallesen, L. T., & Vaegter, C. B. (2014). Peripheral nerve injury modulates neurotrophin signaling in the peripheral and central nervous system. *Molecular Neurobiology*, 50(3), 945–970. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8706-9>

Ro, L. S., Chen, S. T., Tang, L. M., & Jacobs, J. M. (1999). Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain*, 79(2-3), 265–274. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(98\)00164-x](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(98)00164-x)

Rocha, S., Silva, E., Foerster, Á., Wiesiolek, C., Chagas, A. P., Machado, G., Baltar, A., & Monte-Silva, K. (2016). The impact of transcranial direct current stimulation (tDCS) combined with modified constraint-induced movement therapy (mCIMT) on upper limb function in chronic stroke: a double-blind randomized controlled trial. *Disability and Rehabilitation*, 38(7), 653–660. <https://doi.org/10.3109/09638288.2015.1055382>

Roeska, K., Ceci, A., Treede, R. D., & Doods, H. (2009). Effect of high trait anxiety on mechanical hypersensitivity in male rats. *Neuroscience Letters*, 464(3), 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.08.031>

Romero-Grimaldi, C., Berrocoso, E., Alba-Delgado, C., Madrigal, J. L., Perez-Nievas, B. G., Leza, J. C., & Mico, J. A. (2015). Stress Increases the Negative Effects of Chronic Pain on Hippocampal Neurogenesis. *Anesthesia and Analgesia*, 121(4), 1078–1088. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000838>

Ross, J. L., Queme, L. F., Lamb, J. E., Green, K. J., Ford, Z. K., & Jankowski, M. P. (2018). Interleukin 1 $\beta$  inhibition contributes to the antinociceptive effects of voluntary exercise on ischemia/reperfusion-induced hypersensitivity. *Pain*, 159(2), 380–392. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001094>

Rusanescu, G., & Mao, J. (2017). Peripheral nerve injury induces adult brain neurogenesis and remodelling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(2), 299–314. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12965>

Sabharwal, R., Rasmussen, L., Sluka, K. A., & Chapleau, M. W. (2016). Exercise prevents development of autonomic dysregulation and hyperalgesia in a mouse

model of chronic muscle pain. *Pain*, 157(2), 387–398.  
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000330>

Saffarpour, S., Shaabani, M., Naghdi, N., Farahmandfar, M., Janzadeh, A., & Nasirinezhad, F. (2017). In vivo evaluation of the hippocampal glutamate, GABA and the BDNF levels associated with spatial memory performance in a rodent model of neuropathic pain. *Physiology & Behavior*, 175, 97–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.025>

Santos, D. S., Lopes, B. C., Medeiros, L. F., Assumpção, J., de Souza, A., Salvi, A. A., da Silva, L. S., Fregni, F., Caumo, W., & Torres, I. (2020). Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Induces Analgesia in Rats with Neuropathic Pain and Alcohol Abstinence. *Neurochemical Research*, 45(11), 2653–2663.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03116-w>

Sasaki, M., Obata, H., Kawahara, K., Saito, S., & Goto, F. (2006). Peripheral 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats. *Pain*, 122(1-2), 130–136.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.01.021>

Scarabelot, V. L., de Oliveira, C., Medeiros, L. F., de Macedo, I. C., Cioato, S. G., Adachi, L., Paz, A. H., de Souza, A., Caumo, W., & Torres, I. (2019). Transcranial direct-current stimulation reduces nociceptive behaviour in an orofacial pain model. *Journal of Oral Rehabilitation*, 46(1), 40–50. <https://doi.org/10.1111/joor.12726>

Scholz, J., & Woolf, C. J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1361–1368.  
<https://doi.org/10.1038/nn1992>

Sellmeijer, J., Mathis, V., Hugel, S., Li, X. H., Song, Q., Chen, Q. Y., Barthas, F., Lutz, P. E., Karatas, M., Luthi, A., Veinante, P., Aertsen, A., Barrot, M., Zhuo, M., & Yalcin, I. (2018). Hyperactivity of Anterior Cingulate Cortex Areas 24a/24b Drives Chronic Pain-Induced Anxiodepressive-like Consequences. *The Journal of Neuroscience*, 38(12), 3102–3115. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3195-17.2018>

Seretny, M., Currie, G. L., Sena, E. S., Ramnarine, S., Grant, R., MacLeod, M. R., Colvin, L. A., & Fallon, M. (2014). Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain*, 155(12), 2461–2470. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.09.020>

Shahbabaie, A., Golesorkhi, M., Zamanian, B., Ebrahimipoor, M., Keshvari, F., Nejati, V., Fregni, F., & Ekhtiari, H. (2014). State dependent effect of transcranial



direct current stimulation (tDCS) on methamphetamine craving. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(10), 1591–1598.

<https://doi.org/10.1017/S1461145714000686>

Shankarappa, S. A., Piedras-Rentería, E. S., & Stubbs, E. B., Jr (2011). Forced-exercise delays neuropathic pain in experimental diabetes: effects on voltage-activated calcium channels. *Journal of Neurochemistry*, 118(2), 224–236.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07302.x>

Shiers, S., Pradhan, G., Mwirigi, J., Mejia, G., Ahmad, A., Kroener, S., & Price, T. (2018). Neuropathic Pain Creates an Enduring Prefrontal Cortex Dysfunction Corrected by the Type II Diabetic Drug Metformin But Not by Gabapentin. *The Journal of Neuroscience*, 38(33), 7337–7350. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0713-18.2018>

Skurlova, M., Stofkova, A., & Jurcovicova, J. (2011). Anxiety-like behavior in the elevated-plus maze tests and enhanced IL-1 $\beta$ , IL-6, NADPH oxidase-1, and iNOS mRNAs in the hippocampus during early stage of adjuvant arthritis in rats. *Neuroscience Letters*, 487(2), 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.10.032>

Sluka, K. A., O'Donnell, J. M., Danielson, J., & Rasmussen, L. A. (2013). Regular physical activity prevents development of chronic pain and activation of central neurons. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 114(6), 725–733.

<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01317.2012>

Soler, M. D., Kumru, H., Pelayo, R., Vidal, J., Tormos, J. M., Fregni, F., Navarro, X., & Pascual-Leone, A. (2010). Effectiveness of transcranial direct current stimulation and visual illusion on neuropathic pain in spinal cord injury. *Brain*, 133(9), 2565–2577. <https://doi.org/10.1093/brain/awq184>

Sorge, R. E., Mapplebeck, J. C., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J. K., Martin, L. J., Austin, J. S., Sotocinal, S. G., Chen, D., Yang, M., Shi, X. Q., Huang, H., Pilon, N. J., Bilan, P. J., Tu, Y., Klip, A., Ji, R. R., Zhang, J., Salter, M. W., ... Mogil, J. S. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature Neuroscience*, 18(8), 1081–1083.

<https://doi.org/10.1038/nn.4053>

Souza, A., Martins, D. F., Medeiros, L. F., Nucci-Martins, C., Martins, T. C., Siteneski, A., Caumo, W., Dos Santos, A., & Torres, I. (2018). Neurobiological mechanisms of antiallodynic effect of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a

mice model of neuropathic pain. *Brain Research*, 1682, 14–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.005>

Spezia-Adachi, L. N., Caumo, W., Laste, G., Fernandes Medeiros, L., Ripoll Rozisky, J., de Souza, A., Fregni, F., & Torres, I. L. (2012). Reversal of chronic stress-induced pain by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model. *Brain Research*, 1489, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.10.009>

Spezia-Adachi, L. N., Quevedo, A. S., de Souza, A., Scarabelot, V. L., Rozisky, J. R., de Oliveira, C., Marques Filho, P. R., Medeiros, L. F., Fregni, F., Caumo, W., & Torres, I. L. (2015). Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Experimental Brain Research*, 233(5), 1377–1389. <https://doi.org/10.1007/s00221-015-4212-1>

Stagg, N. J., Mata, H. P., Ibrahim, M. M., Henriksen, E. J., Porreca, F., Vanderah, T. W., & Philip Malan, T., Jr (2011). Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. *Anesthesiology*, 114(4), 940–948. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318210f880>

Starowicz, K., Makuch, W., Osikowicz, M., Piscitelli, F., Petrosino, S., Di Marzo, V., & Przewlocka, B. (2012). Spinal anandamide produces analgesia in neuropathic rats: possible CB (1)- and TRPV1-mediated mechanisms. *Neuropharmacology*, 62(4), 1746–1755. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.11.021>

Stein, D. J., Fernandes Medeiros, L., Caumo, W., & Torres, I. L. (2020). Transcranial Direct Current Stimulation in Patients with Anxiety: Current Perspectives. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 16, 161–169. <https://doi.org/10.2147/NDT.S195840>

Steinberg, F., Pixa, N. H., & Fregni, F. (2019). A Review of Acute Aerobic Exercise and Transcranial Direct Current Stimulation Effects on Cognitive Functions and Their Potential Synergies. *Frontiers in Human Neuroscience*, 12, 534. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00534>

Straudi, S., Buja, S., Baroni, A., Pavarelli, C., Pranovi, G., Fregni, F., & Basaglia, N. (2018). The effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) combined with group exercise treatment in subjects with chronic low back pain: a pilot randomized control trial. *Clinical Rehabilitation*, 32(10), 1348–1356. <https://doi.org/10.1177/0269215518777881>

Su, W. F., Wu, F., Jin, Z. H., Gu, Y., Chen, Y. T., Fei, Y., Chen, H., Wang, Y. X., Xing, L. Y., Zhao, Y. Y., Yuan, Y., Tang, X., & Chen, G. (2019). Overexpression of P2X4 receptor in Schwann cells promotes motor and sensory functional recovery and remyelination via BDNF secretion after nerve injury. *Glia*, 67(1), 78–90. <https://doi.org/10.1002/glia.23527>

Suchting, R., Colpo, G. D., Rocha, N. P., & Ahn, H. (2020). The Effect of Transcranial Direct Current Stimulation on Inflammation in Older Adults With Knee Osteoarthritis: A Bayesian Residual Change Analysis. *Biological Research for Nursing*, 22(1), 57–63. <https://doi.org/10.1177/1099800419869845>

Sweitzer, S., Martin, D., & DeLeo, J. A. (2001). Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*, 103(2), 529–539. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00574-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00574-1)

Tao, W., Chen, C., Wang, Y., Zhou, W., Jin, Y., Mao, Y., Wang, H., Wang, L., Xie, W., Zhang, X., Li, J., Li, J., Li, X., Tang, Z. Q., Zhou, C., Pan, Z. Z., & Zhang, Z. (2020). MeCP2 mediates transgenerational transmission of chronic pain. *Progress in Neurobiology*, 189, 101790. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101790>

Terada, Y., Morita-Takemura, S., Isonishi, A., Tanaka, T., Okuda, H., Tatsumi, K., Shinjo, T., Kawaguchi, M., & Wanaka, A. (2018). NGF and BDNF expression in mouse DRG after spared nerve injury. *Neuroscience Letters*, 686, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.051>

Tian, J., Yu, T., Xu, Y., Pu, S., Lv, Y., Zhang, X., & DU, D. (2018). Swimming Training Reduces Neuroma Pain by Regulating Neurotrophins. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 50(1), 54–61. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001411>

Treede, R. D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B. H., Svensson, P., ... Wang, S. J. (2015). A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*, 156(6), 1003–1007. <https://doi.org/10.1097/j.pain.000000000000160>

Tsai, K. L., Huang, P. C., Wang, L. K., Hung, C. H., & Chen, Y. W. (2017). Incline treadmill exercise suppresses pain hypersensitivity associated with the modulation of pro-inflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokine in rats with peripheral

nerve injury. *Neuroscience Letters*, 643, 27–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.02.021>

Tyrtysnaia, A. A., Manzhulo, I. V., Sultanov, R. M., & Ermolenko, E. V. (2017). Adult hippocampal neurogenesis in neuropathic pain and alkyl glycerol ethers treatment. *Acta Histochemica*, 119(8), 812–821.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.10.007>

Üçeyler, N., Topuzoğlu, T., Schiesser, P., Hahnenkamp, S., & Sommer, C. (2011). IL-4 deficiency is associated with mechanical hypersensitivity in mice. *PloS One*, 6(12), e28205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028205>

Ulmann, L., Hatcher, J. P., Hughes, J. P., Chaumont, S., Green, P. J., Conquet, F., Buell, G. N., Reeve, A. J., Chessell, I. P., & Rassendren, F. (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience*, 28(44), 11263–11268.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2308-08.2008>

Valero-Cabré, A., Amengual, J. L., Stengel, C., Pascual-Leone, A., & Coubard, O. A. (2017). Transcranial magnetic stimulation in basic and clinical neuroscience: A comprehensive review of fundamental principles and novel insights. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 83, 381–404.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.10.006>

Vanderhorst, V. G., Gustafsson, J. A., & Ulfhake, B. (2005). Estrogen receptor-alpha and -beta immunoreactive neurons in the brainstem and spinal cord of male and female mice: relationships to monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. *The Journal of Comparative Neurology*, 488(2), 152–179.  
<https://doi.org/10.1002/cne.20569>

Viisanen, H., & Pertovaara, A. (2010). Roles of the rostroventromedial medulla and the spinal 5-HT(1A) receptor in descending antinociception induced by motor cortex stimulation in the neuropathic rat. *Neuroscience Letters*, 476(3), 133–137.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.04.014>

Vöröslakos, M., Takeuchi, Y., Brinyiczki, K., Zombori, T., Oliva, A., Fernández-Ruiz, A., Kozák, G., Kincses, Z. T., Iványi, B., Buzsáki, G., & Berényi, A. (2018). Direct effects of transcranial electric stimulation on brain circuits in rats and humans. *Nature Communications*, 9(1), 483. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02928-3>

Wakaizumi, K., Kondo, T., Hamada, Y., Narita, M., Kawabe, R., Narita, H., Watanabe, M., Kato, S., Senba, E., Kobayashi, K., Kuzumaki, N., Yamanaka, A., Morisaki, H., & Narita, M. (2016). Involvement of mesolimbic dopaminergic network in neuropathic pain relief by treadmill exercise: A study for specific neural control with Gi-DREADD in mice. *Molecular Pain*, 12, 1744806916681567. <https://doi.org/10.1177/1744806916681567>

Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322–328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>

Wen, H. Z., Gao, S. H., Zhao, Y. D., He, W. J., Tian, X. L., & Ruan, H. Z. (2017). Parameter Optimization Analysis of Prolonged Analgesia Effect of tDCS on Neuropathic Pain Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11, 115. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00115>

Westwood, S. J., Olson, A., Miall, R. C., Nappo, R., & Romani, C. (2017). Limits to tDCS effects in language: Failures to modulate word production in healthy participants with frontal or temporal tDCS. *Cortex*, <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2016.10.016>

Wilhelm, J. C., Xu, M., Cucoranu, D., Chmielewski, S., Holmes, T., Lau, K. S., Bassell, G. J., & English, A. W. (2012). Cooperative roles of BDNF expression in neurons and Schwann cells are modulated by exercise to facilitate nerve regeneration. *The Journal of Neuroscience*, 32(14), 5002–5009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1411-11.2012>

Wirth, M., Rahman, R. A., Kuenecke, J., Koenig, T., Horn, H., Sommer, W., & Dierks, T. (2011). Effects of transcranial direct current stimulation (tDCS) on behaviour and electrophysiology of language production. *Neuropsychologia*, 49(14), 3989–3998. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2011.10.015>

Wolfe, F., Smythe, H. A., Yunus, M. B., Bennett, R. M., Bombardier, C., Goldenberg, D. L., Tugwell, P., Campbell, S. M., Abeles, M., & Clark, P. (1990). The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis and Rheumatism*, 33(2), 160–172. <https://doi.org/10.1002/art.1780330203>

Woolf C. J. (2011). Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 152(3 Suppl), S2–S15. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.09.030>

Wu, Y. J., Lin, C. C., Yeh, C. M., Chien, M. E., Tsao, M. C., Tseng, P., Huang, C. W., & Hsu, K. S. (2017). Repeated transcranial direct current stimulation improves cognitive dysfunction and synaptic plasticity deficit in the prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Stimulation*, 10(6), 1079–1087. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2017.08.007>

Xu, N., Tang, X. H., Pan, W., Xie, Z. M., Zhang, G. F., Ji, M. H., Yang, J. J., Zhou, M. T., & Zhou, Z. Q. (2017). Spared Nerve Injury Increases the Expression of Microglia M1 Markers in the Prefrontal Cortex of Rats and Provokes Depression-Like Behaviors. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 209. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00209>

Yalcin, I., Barthas, F., & Barrot, M. (2014). Emotional consequences of neuropathic pain: insight from preclinical studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 47, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.08.002>

Zhang, H., Qian, Y. L., Li, C., Liu, D., Wang, L., Wang, X. Y., Liu, M. J., Liu, H., Zhang, S., Guo, X. Y., Yang, J. X., Ding, H. L., Koo, J. W., Mouzon, E., Deisseroth, K., Nestler, E. J., Zachariou, V., Han, M. H., & Cao, J. L. (2017). Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Mesolimbic Reward Circuitry Mediates Nociception in Chronic Neuropathic Pain. *Biological Psychiatry*, 82(8), 608–618. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.02.1180>

Zhang, X., Huang, J., & McNaughton, P. A. (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *The EMBO Journal*, 24(24), 4211–4223. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600893>

Zhang, Z., Wang, X., Wang, W., Lu, Y. G., & Pan, Z. Z. (2013). Brain-derived neurotrophic factor-mediated downregulation of brainstem K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter and cell-type-specific GABA impairment for activation of descending pain facilitation. *Molecular Pharmacology*, 84(4), 511–520. <https://doi.org/10.1124/mol.113.086496>

Zheng, J., Jiang, Y. Y., Xu, L. C., Ma, L. Y., Liu, F. Y., Cui, S., Cai, J., Liao, F. F., Wan, Y., & Yi, M. (2017). Adult Hippocampal Neurogenesis along the Dorsoventral Axis Contributes Differentially to Environmental Enrichment Combined with Voluntary Exercise in Alleviating Chronic Inflammatory Pain in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 37(15), 4145–4157. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3333-16.2017>

Zhu, C. B., Blakely, R. D., & Hewlett, W. A. (2006). The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin

transporters. *Neuropsychopharmacology*, 31(10), 2121–2131.  
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301029>

Zong, J., Liao, X., Ren, B., & Wang, Z. (2018). The antidepressant effects of rosiglitazone on rats with depression induced by neuropathic pain. *Life Sciences*, 203, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.057>





**ANEXO Ia. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**



**GRUPO DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 170061 **Data de Aprovação do Projeto:** 15/03/2017

**Título:** EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA RESPOSTA ANTINOCICEPTIVA INDUZIDA POR ESTIMULAÇÃO TRANSCRANIANA POR CORRENTE CONTÍNUA (ETCC) EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA **Data de Término:** 01/10/2020

**Pesquisador Responsável:** IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Equipe de pesquisa:	Documento	Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Qtd.	Data Reunião	Situação
BETTEGA COSTA LOPES	APROVAÇÃO	RATO - WISTAR	M/2meses	156	14/03/2017	APROVADO

**Total de Animais:** 156

*Michelle...*

**Coordenador  
Comissão de Ética no Uso de Animais**

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

## ANEXO Ib. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



**GRUPO DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 180034 **Data de Aprovação do Projeto:** 05/03/2018  
**Título:** EFEITO DA ETCC E/OU EXERCÍCIO SOBRE PARÂMETROS NEUROGÊNICOS E COMPORTAMENTAIS EM RATOS **Data de Término:** 30/12/2019  
**Submetidos a um modelo de dor crônica**

**Pesquisador Responsável:** IRACLIUCENA DA SILVA TORRES

**Equipe de pesquisa:**

BETTEGA COSTA LOPES CARLA DE OLIVEIRA

Submissão	Documento	Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Qtd.	Data Reunião	Situação
21/02/2018	APROVAÇÃO	RATO - WISTAR	M/2meses	104	27/02/2018	APROVADO

**Total de Animais:** 104

MICHAEL EVERTON ANDRADES

Vice-Coordenador

**Comissão de Ética no Uso de Animais**

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.

- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

## **Anexo II. Produção acadêmica durante o doutorado**

### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. LASTE, GABRIELA; LOPES, BETTEGA COSTA; MEDEIROS, LICIANE FERNANDES; FREGNI, FELIPE; CAUMO, WOLNEI; TORRES, IRACI L S. The profile of dexamethasone combined with transcranial direct current stimulation in rats submitted to an arthritis model. *Brazilian Journal Of Pain*, v. 4, p. 1-7, 2021.

2. LOPES, BETTEGA COSTA; MEDEIROS, LICIANE FERNANDES; STEIN, DIRSON JOÃO; CIOATO, STEFANIA GIOTTI; DE SOUZA, VANESSA SILVA; MEDEIROS, HELOUISE RICHARDT; SANCHES, PAULO ROBERTO STEFANI; FREGNI, FELIPE; CAUMO, WOLNEI; TORRES, IRACI L.S. tDCS and exercise improve anxiety-like behavior and locomotion in chronic pain rats via modulation of neurotrophins and inflammatory mediators. *BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH*, v. 1, p. 113173, 2021.

3. CIOATO, STEFANIA GIOTTI; MEDEIROS, LICIANE FERNANDES; LOPES, BETTEGA COSTA; DE SOUZA, ANDRESSA; MEDEIROS, HELOUISE RICHARDT; ASSUMPCÃO, JOSÉ ANTÔNIO FAGUNDES; CAUMO, WOLNEI; ROESLER, RAFAEL; TORRES, IRACI L. S. Antinociceptive and neurochemical effects of a single dose of IB-MECA in chronic pain rat models. *Purinergic Signalling*, v. xx, p. xx, 2020.

4. SANTOS, DANIELA SILVA; LOPES, BETTEGA COSTA; MEDEIROS, LICIANE FERNANDES; ASSUMPCÃO, JOSÉ ANTÔNIO FAGUNDES; DE SOUZA, ANDRESSA; SALVI, ARTUR ALBAN; DA SILVA, LISIANE SANTOS; FREGNI, FELIPE; CAUMO, WOLNEI; TORRES, IRACI L. S. Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Induces Analgesia in Rats with Neuropathic Pain and Alcohol Abstinence. *NEUROCHEMICAL RESEARCH*, v. 45, p. 2653-2663, 2020.

5. DE OLIVEIRA, CAMILA LINO; MEDEIROS, LICIANE FERNANDES; DE SOUZA, VANESSA SILVA; LOPES, BETTEGA COSTA; DE OLIVEIRA, FABRICIO FINAMOR; MARQUES, LUANA XAVIER; DA SILVA TORRES, IRACI LUCENA;

DE SOUZA, ANDRESSA. LOW-DOSE NALTREXONE REVERSES FACIAL MECHANICAL ALLODYNIA IN A RAT MODEL OF TRIGEMINAL NEURALGIA. *NEUROSCIENCE LETTERS*, v. 736, p. 135248, 2020.

6. LOPES, BETTEGA COSTA; MEDEIROS, LICIANE FERNANDES; SILVA DE SOUZA, VANESSA; CIOATO, STEFANIA GIOTTI; MEDEIROS, HELOUISE RICHARDT; REGNER, GABRIELA GREGORY; LINO DE OLIVEIRA, CAMILA; FREGNI, FELIPE; CAUMO, WOLNEI; TORRES, IRACI L.S. Transcranial direct current stimulation combined with exercise modulates the inflammatory profile and hyperalgesic response in rats subjected to a neuropathic pain model: Long-term effects. *Brain Stimulation*, v. 13, p. 774-782, 2020.

7. MEDEIROS, LICIANE FERNANDES; NUNES, ÉLLEN ALMEIDA; LOPES, BETTEGA COSTA; SOUZA, ANDRESSA; CAPPELLARI, ANGÉLICA REGINA; FREITAS, JOICE SOARES; MACEDO, ISABEL CRISTINA; KUO, JONNSIN; CIOATO, STEFANIA GIOTTI; BATTASTINI, ANA MARIA DE OLIVEIRA; CAUMO, WOLNEI; TORRES, IRACI L. S. Single exercise stress reduces central neurotrophins levels and adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptors expression, but does not revert opioid-induced hyperalgesia in rats. *INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE*, v. 80, p. 636-647, 2020.

8. STRÖHER, ROBERTA; DE OLIVEIRA, CARLA; COSTA LOPES, BETTEGA; DA SILVA, LISIANE SANTOS; REGNER, GABRIELA GREGORY; RICHARDT MEDEIROS, HELOUISE; DE MACEDO, ISABEL CRISTINA; CAUMO, WOLNEI; TORRES, IRACI L.S. Maternal deprivation alters nociceptive response in a gender-dependent manner in rats. *INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE*, v. 76, p. 25-33, 2019.

9. DE OLIVEIRA, CLEVERSON MORAES; DE OLIVEIRA, CARLA; SCARABELOT, VANESSA LEAL; STRÖHER, ROBERTA; MACEDO, ISABEL CRISTINA; SOUZA, ANDRESSA; LOPES, BETTEGA COSTA; CAUMO, WOLNEI; TORRES, IRACI LUCENA SILVA. Hypercaloric diet and chronic stress desynchronizes the temporal pattern of rats' insulin release. *BIOLOGICAL RHYTHM RESEARCH*, v. 48, p. 1-11, 2017.

## Capítulo de Livro

1. LOPES, B.C. The Neuroscience of Pain: Features and Assessments of Pain, Anesthesia, and Analgesia. Cap. Maternal deprivation and nociception. Elsevier; University of Oxford.

### Resumos publicados em anais de congressos

1. STEIN, D.; ZANCANARO, M.; ASSUMPCAO, J. A. F.; LOPES, B.C.; FREGNI, F.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Analgesia induced by preemptive tDCS in a rat model of incisional pain: peripheral and central mechanisms. In: XII Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2020, São Paulo-SP. XII Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2020.

2. VICENZI, C. B.; ZANCANARO, M.; ASSUMPCAO, J. A. F.; LOPES, BETTEGA COSTA; SOUZA, A.; STROHER, R.; MACEDO, I. C.; FREGNI, FELIPE; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Uso preventivo da Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua reduz inflamação central em ratos Wistar. In: 40ª Semana Científica do HCPA, 2020, Porto Alegre-RS. 40ª Semana Científica do HCPA, 2020.

3. LOPES, BETTEGA COSTA; SILVA DE SOUZA, VANESSA; STEIN, D.; MEDEIROS, L. F.; CIOATO, S. G.; MEDEIROS, H.; SANCHES, P. R. S.; FREGNI, FELIPE; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Estimulação transcraniana por corrente contínua mas não o exercício promove aumento na atividade locomotora em ratos com dor neuropática. In: 40ª Semana Científica do HCPA, 2020, Porto Alegre-RS. 40ª Semana Científica do HCPA, 2020.

4. LOPES, BETTEGA COSTA; CIOATO, S. G.; SOUZA, V.; MEDEIROS, H.; STEIN, D.; SANCHES, P. R. S.; FREGNI, FELIPE; CAUMO, W.; MEDEIROS, L. F.; TORRES, I. L. S. Anxiety-like behavior is modulated by transcranial direct current stimulation and exercise in a neuropathic pain model: Role of neurotrophic factors. In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurosciência e Comportamento-SBNeC, 2020, Virtual. XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurosciência e Comportamento-SBNeC, 2020.

5. MENEZES, A. G.; CIOATO, S. G.; ASSUMPCAO, J. A. F.; MEDEIROS, H.; MEDEIROS, L. F.; LOPES, B.C.; SALVI, A. A.; ROESLER, R.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Tratamento agudo com IB-MECA alivia a dor em um modelo inflamatório crônico induzido por CFA em ratos. In: 39ª Semana Científica do HCPA, 2019, Porto Alegre-RS. 39ª Semana Científica do HCPA, 2019.

6. LOPES, B.C.; SOUZA, V.; MEDEIROS, H.; CIOATO, S. G.; OLIVEIRA, C. L.; MARQUES, L. X.; STEIN, D.; ASSUMPCAO, J. A. F.; MEDEIROS, L. F.; TORRES, I. L. S. Exercício físico e estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) modulam os níveis de interleucina-4 no córtex cerebral de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática. In: 39ª Semana Científica do HCPA, 2019, Porto Alegre-RS. 39ª Semana Científica do HCPA, 2019.

7. SOUZA, V.; OLIVEIRA, C. L.; LOPES, B.C.; CASTRO, J. M.; MEDEIROS, H.; MARQUES, L. X.; DUSSAN-SARRIA, J. A.; MEDEIROS, L. F.; TORRES, I. L. S.; SOUZA, A. Avaliação dos efeitos da combinação de pregabalina e eletroestimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) em um modelo animal de fibromialgia: resultados preliminares. In: 39ª Semana Científica do HCPA, 2019, Porto Alegre-RS. 39ª Semana Científica do HCPA, 2019.

8. OLIVEIRA, C. L.; SOUZA, V.; LOPES, B.C.; OLIVEIRA, F. F.; MEDEIROS, L. F.; TORRES, I. L. S.; SOUZA, A. Caracterização de modelo animal de dor crônica neuropática orofacial: constrição do nervo infraorbitário. In: 39ª Semana Científica do HCPA, 2019, Porto Alegre-RS. 39ª Semana Científica do HCPA, 2019.

9. CIOATO, S. G.; MEDEIROS, L. F.; LOPES, B.C.; SALVI, A. A.; SOUZA, A.; ROESLER, R.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. IB-MECA acute treatment relieves pain in CFA chronic inflammatory model in rats. In: Neuroscience, 2019, Chicago-IL. Neuroscience, 2019.

10. LOPES, B.C.; CIOATO, S. G.; MEDEIROS, H.; SOUZA, V.; OLIVEIRA, C. L.; MEDEIROS, L. F.; TORRES, I. L. S. Forced-exercise and transcranial direct current stimulation (tDCS) provide antinociceptive effects and modulate inflammatory and

neurotrophic parameters in the spinal cord in a chronic pain model: Long-term effects. In: XLII Reunião Anual da SBNeC, 2019, Campos do Jordão-SP. XLII Reunião Anual da SBNeC, 2019.

11. ROCHA, R. A. P. L.; ROCHA, E. M.; SOUZA, V.; LOPES, B.C. Avaliação dos efeitos da combinação de naltrexona e exercício físico em um modelo animal de fibromialgia. In: Semana Científica da Unilasalle-SEFIC, 2019, Canoas-RS. Semana Científica da Unilasalle-SEFIC, 2019.

12. PALUDO, R. H.; ROCHA, R. A. P. L.; ROCHA, E. M.; SOUZA, V.; LOPES, B.C.; CASTRO, M. S.; MEDEIROS, L. F.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S.; SOUZA, A. Low-dose naltrexone effects in pain modulation in fibromyalgia rats. In: XI International Symposium of Neuromodulation: past, present and future of neuromodulation, 2019, São Paulo-SP. XI International Symposium of Neuromodulation: past, present and future of neuromodulation, 2019.

13. CIOATO, S. G.; LOPES, B.C.; MEDEIROS, L. F.; MEDEIROS, H.; SOUZA, V.; OLIVEIRA, C. L.; FREGNI, F.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Forced-exercise and transcranial direct current stimulation (tDCS) provide antinociceptive effects and modulate inflammatory and neurotrophic parameters in the spinal cord in a chronic pain model: long-term effects. In: XI International Symposium of Neuromodulation: past, present and future of neuromodulation, 2019, São Paulo-SP. XI International Symposium of Neuromodulation: past, present and future of neuromodulation, 2019.

14. CESARO, M. C.; OLIVEIRA, C. L.; MEDEIROS, L. F.; SOUZA, V.; LOPES, B.C.; OLIVEIRA, F. F.; MARQUES, L. X.; TORRES, I. L. S.; SOUZA, A. Trigeminal neuralgia modulated by low-dose naltrexone in rats (LDN). In: XI International Symposium of Neuromodulation: past, present and future of neuromodulation, 2019, São Paulo-SP. XI International Symposium of Neuromodulation: past, present and future of neuromodulation, 2019.

15. LOPES, B.C.; SANTOS, D.; MEDEIROS, L. F.; SOUZA, A.; FREGNI, F.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Transcranial direct current stimulation (tDCS) alters the nociceptive behavior and cytokines in rats submitted to neuropathic pain model and

alcohol exposure. In: XI International Symposium of Neuromodulation: past, present and future of neuromodulation, 2019, São Paulo-SP. XI International Symposium of Neuromodulation: past, present and future of neuromodulation, 2019.

16. TAROUCO, M. L.; DE SOUZA, VANESSA SILVA; OLIVEIRA, C. L.; LOPES, B.C.; TORRES, I. L. S.; MEDEIROS, L. F.; SOUZA, A. Avaliação dos efeitos da combinação de pregabalina e eletroestimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) em um modelo animal de fibromialgia: resultados preliminares. In: Semana Científica da Unilasalle-SEFIC, 2019, Canoas-RS. Semana Científica da Unilasalle-SEFIC, 2019.

17. OLIVEIRA, C. L.; MEDEIROS, L. F.; SOUZA, V.; LOPES, B.C. Tratamento com baixas doses de naltrexona altera parâmetros comportamental e bioquímicos em modelo de neuralgia trigeminal em ratos. In: Semana Científica da Unilasalle-SEFIC, 2019, Canoas-RS. Semana Científica da Unilasalle-SEFIC, 2019.

18. LOPES, B.C.; MEDEIROS, L. F.; MARQUES, L. X.; DE OLIVEIRA, CARLA; TORRES, I. L. S. Combined treatment of exercise and transcranial direct current stimulation (tDCS) attenuates mechanical hyperalgesia and increases cortical BDNF levels. In: II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018, Porto Alegre-RS. II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018.

19. MEDEIROS, H.; ZANCANARO, M.; DE OLIVEIRA, CARLA; SCARABELLOT, V. L.; STRÖHER, ROBERTA; MACEDO, I. C.; LOPES, B.C.; SILVA, L. S.; ABREU, J. P.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Analgesia preemptiva induzida em modelo animal cirúrgico por estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC). In: II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018, Porto Alegre-RS. II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018.

20. CERESA, J.; SANTOS, D.; LOPES, B.C.; STROHER, R.; TORRES, I. L. S. Efeito da ETCC na dor neuropática e na exposição/abstinência alcoólica em ratos wistar sobre o consumo e parâmetros bioquímicos. In: II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018, Porto Alegre-RS. II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018.



21. CIOATO, S. G.; MEDEIROS, L. F.; LOPES, B.C.; SALVI, A. A.; SOUZA, A.; ROESLER, R.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. IB-MECA acute treatment relieves pain in CFA chronic inflammatory model in rats. In: II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018, Porto Alegre-RS. II Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2018.
22. LOPES, B.C.; CIOATO, S. G.; SOUZA, V.; OLIVEIRA, C. L.; MARQUES, L. X.; MEDEIROS, L. F.; FREGNI, F.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Long-term effects of combined treatment of physical exercise and transcranial direct current stimulation (tDCS) upon mechanical hyperalgesia in rats. In: X Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2018, São Paulo-SP. X Simpósio Internacional em Neuromodulação, 2018.
23. LOPES, B.C.; OLIVEIRA, C.; CIOATO, S. G.; REGNER, G. G.; STROHER, R.; SILVA, L. S.; CASTRO, J. M.; MEDEIROS, H.; SCARABELOT, V. L.; MEDEIROS, L. F.; TORRES, I. L. S. Exercise and transcranial direct current stimulation (tDCS) change the nociceptive response and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in the cerebral cortex and spinal cord in a model of chronic pain: Short-term effects. In: XXXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2018, Campos do Jordão-SP. XXXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2018.
24. LOPES, B.C.; MARQUES, L. X.; REGNER, G. G.; STROHER, R.; SILVA, L. S.; CIOATO, S. G.; ABREU, J. P.; SALVI, A. A.; OLIVEIRA, C.; TORRES, I. L. S. Exercício físico e estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) induz analgesia e altera os níveis de BDNF na medula de ratos submetidos a um modelo de dor neuropática. In: 38ª Semana Científica do HCPA, 2018, Porto Alegre-RS. 38ª Semana Científica do HCPA, 2018.
25. MARQUES, L. X.; LOPES, B.C.; REGNER, G. G.; STROHER, R.; CIOATO, S. G.; SILVA, L. S.; RIOS, D. E. S.; CASTRO, J. M.; OLIVEIRA, C.; TORRES, I. L. S. Exercício físico associado a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) induz analgesia em ratos submetidos a um modelo de dor neuropática. In: 38ª Semana Científica do HCPA, 2018, Porto Alegre-RS. 38ª Semana Científica do HCPA, 2018.

26. SALVI, A. A.; STROHER, R.; OLIVEIRA, C.; LOPES, B.C.; REGNER, G. G.; MACEDO, I. C.; TORRES, I. L. S. Deprivação materna neonatal aumenta limiares nociceptivos em ratos wistar. In: 38ª Semana Científica do HCPA, 2018, Porto Alegre-RS. 38ª Semana Científica do HCPA, 2018.

27. ZANCANARO, M.; SCARABELOT, V. L.; AGUIAR, R. P.; MACEDO, I. C.; ADACHI, L. N. S.; STROHER, R.; LOPES, B.C.; OLIVEIRA, C.; SOUZA, A. H.; MARCHESAN, S.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Preemptive transcranial direct current stimulation (tDCS) changes myeloperoxidase activity (MPO) and N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAGase) levels of rats submitted to an experimental surgical model. In: IX Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2017, São Paulo-SP. IX Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2017.

28. LOPES, B.C.; OLIVEIRA, C.; VERCELINO, R.; TORRES, I. L. S. Exposição à morfina e deprivação materna no período pós-natal altera resposta nociceptiva e níveis de BDNF em ratos. In: 13º Congresso Brasileiro de Dor, 2017, Natal-RN. 13º Congresso Brasileiro de Dor, 2017.

29. STROHER, R.; OLIVEIRA, C.; SCARABELOT, V. L.; LOPES, B.C.; ZANCANARO, M.; MACEDO, I. C.; TORRES, I. L. S. The effects of hypercaloric diet ingestion and/or postnatal maternal deprivation on thermal tests response in young adult rats. In: 37ª Semana Científica do HCPA, 2017, Porto Alegre-RS. 37ª Semana Científica do HCPA, 2017.

30. LOPES, B.C.; CIOATO, S. G.; SALVI, A. A.; MEDEIROS, L. F.; TORRES, I. L. S. Efeito do tratamento agudo com agonista de receptor A<sub>3</sub> de adenosina na hiperalgesia mecânica induzida por modelo animal de dor crônica inflamatória. In: 37ª Semana Científica do HCPA, 2017, Porto Alegre-RS. 37ª Semana Científica do HCPA, 2017.

31. SALVI, A. A.; CIOATO, S. G.; LOPES, B.C.; MEDEIROS, L. F.; TORRES, I. L. S. Tratamento agudo com agonista de receptor A<sub>3</sub> de adenosina altera resposta hiperalgésica térmica induzida por modelo animal de dor crônica inflamatória. In: 37ª Semana Científica do HCPA, 2017, Porto Alegre-RS. 37ª Semana Científica do HCPA, 2017.

32. ZANCANARO, M.; SCARABELOT, V. L.; MACEDO, I. C.; ADACHI, L. N. S.; STROHER, R.; LOPES, B.C.; OLIVEIRA, C.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Preemptive analgesia induced by transcranial direct current stimulation (tDCS) in an animal model of postoperative pain. In: IX Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2017, São Paulo-SP. IX Simpósio Internacional de Neuromodulação, 2017.
33. ZANCANARO, M.; SCARABELOT, V. L.; MACEDO, I. C.; ADACHI, L. N. S.; STROHER, R.; LOPES, B.C.; OLIVEIRA, C.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S. Estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) induz analgesia preemptiva em modelo animal cirúrgico. In: 37ª Semana Científica do HCPA, 2017, Porto Alegre-RS. 37ª Semana Científica do HCPA, 2017.
34. LOPES, B.C.; CIOATO, S. G.; SALVI, A. A.; TORRES, I. L. S. Tratamento agudo com agonista de receptor A3 de adenosina altera resposta hiperalgésica térmica induzida por modelo animal de dor crônica inflamatória. In: 13º Congresso Brasileiro de Dor, 2017, Natal-RN. 13º Congresso Brasileiro de Dor, 2017.
35. CIOATO, S. G.; LOPES, B.C.; SALVI, A. A.; MEDEIROS, L. F.; TORRES, I. L. S. Acute treatment with adenosine receptor A3 agonist alters hyperalgesic response in rats with chronic inflammatory pain. In: 49º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica, 2017, Ribeirão Preto-SP. 49º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica, 2017.
36. ZANCANARO, M.; MACEDO, I. C.; SCARABELOT, V. L.; SOUZA, A.; MUNERETTO, C. S.; MULLER, D. K.; LOPES, B.C.; SILVA, L. S.; RIZZO, T. L.; TORRES, I. L. S. Dieta de cafeteria altera níveis pancreáticos de citocinas inflamatórias associado à intolerância glicose. In: 36ª Semana Científica do HCPA, 2016, Porto Alegre-RS. Anais da 36ª Semana Científica do HCPA, 2016.
37. SILVA, L. S.; RIZZO, T. L.; MACEDO, I. C.; SCARABELOT, V. L.; MUNERETTO, C. S.; ZANCANARO, M.; MULLER, D. K.; LOPES, B.C.; RIOS, D. E. S.; TORRES, I. L. S. Increase of sodium intake upon blood pressure and biochemical parameters in male wistar rats. In: 36ª Semana Científica do HCPA, 2016, Porto Alegre-RS. Anais da 36ª Semana Científica do HCPA, 2016.

38. LOPES, B.C.; MACEDO, I. C.; CALETTI, G.; OLIVEIRA, C.; BELLAVER, B.; SILVA, J.; RIOS, D. E. S.; QUINCOZES-SANTOS, A.; GOMEZ, R.; TORRES, I. L. S. Taurina apresenta efeito antinociceptivo e antioxidante em ratos diabéticos. In: 36ª Semana Científica do HCPA, 2016, Porto Alegre-RS. Anais da 36ª Semana Científica do HCPA, 2016.

39. STROHER, R.; MACEDO, I. C.; CALETTI, G.; BELLAVER, B.; SILVA, J.; LOPES, B.C.; ZANCANARO, M.; QUINCOZES-SANTOS, A.; GOMEZ, R.; TORRES, I. L. S. Efeito antinociceptivo e antioxidante do aminoácido taurina em ratos diabéticos por streptozotocina. In: V Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2016, Porto Alegre-RS. V Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2016.

40. AGUIAR, R. P.; MACEDO, I. C.; SCARABELOT, V. L.; BELLAVER, B.; STROHER, R.; ZANCANARO, M.; LOPES, B.C.; QUINCOZES-SANTOS, A.; TORRES, I. L. S. Alteração de parâmetros de estresse oxidativo e de citocinas inflamatórias em ratos obesos. In: V Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2016, Porto Alegre-RS. V Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2016.



## Compreendendo a tua dor: divulgação científica além da academia para a sociedade

Alguma vez tu já te questionaste como seria bom se não sentíssemos dor? Certamente já, não é mesmo? Principalmente depois de bater com o dedinho mínimo do pé no cantinho de um móvel! Deu até para “sentir” a dor ao ler isso, não é mesmo? Isso ocorre porque experiências de dor, são armazenadas em partes específicas da nossa cabeça que vão alertar você para que quando você passar próximo a uma superfície rasa de novo, tome cuidado para não “topar” com ela novamente!

Essa experiência de estímulos dolorosos e que, podem nos causar algum dano, nós chamamos de nocicepção e muitas vezes precede a dor. É por causa dela que você evita pôr a mão na chapa do fogão sem antes ter certeza de que ela está fria e não irá te queimar (pois alguma vez você já se queimou e “criou” uma memória de dor relacionada a situação previamente experimentada)! Mas voltando ao assunto do dedinho no canto do móvel: você realmente acredita que seria possível vivermos por muitos anos se não sentíssemos dor? A resposta é não, e sabem por quê? Porque pessoas que não sentem dor, não conseguem perceber quando sofrem alguma lesão como queimadura, traumas/batidas e até mesmo alertas endógenos, ou seja do organismo sinalizando que algo não está bem, por exemplo, a ocorrência de uma infecção ou de um infarto agudo do miocárdio. Neste último caso, por exemplo, pessoas que estão prestes a infartar, geralmente se queixam de dor no lado esquerdo do corpo e por não sentirem este alerta estariam impossibilitadas de tomar alguma providência para evitar isso. Pois bem, então quer dizer que nos machucarmos é algo normal? Também não! Mas o processo regenerativo é! Aquela inflamação vista no seu dedo do pé após “chutar” o canto do sofá, fez o dedo inchar e ficar até mesmo com aspecto arroxeadado, não é mesmo? Aquilo nada mais é do que as células de defesa do nosso corpo, consertando o dano. Em outras palavras, é como um carro, que periodicamente necessita de manutenção, mas...e se a manutenção do carro for mal feita, ou usarmos sempre uma ferramenta que sabidamente resolve apenas provisoriamente o problema, mas pode piorar no futuro, não iremos usar, não é mesmo? Mas e se nós tivéssemos ferramentas mais acessíveis e que podem ser usadas com chances mínimas de estragar o carro? Usaríamos essa(s), não é mesmo? Pois bem, foi isso que tentamos fazer neste estudo. Em outras palavras, existem ferramentas que resolvem o problema em curto prazo, mas podem apresentar efeitos inversos como piorar ainda mais a tua dor. No entanto, existem outras que são mais acessíveis e que se usadas de maneira adequada, podem trazer benefícios como o exercício e a estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC).

E foi isso que fizemos em nosso estudo. Aqui, nós observamos que ratos de laboratório que receberam somente o ETCC, exercício, ou a associação dos 2 tratamentos, apresentaram uma redução na dor e também nos sintomas de ansiedade, quando comparamos com aqueles que não receberam nenhum tratamento. É isso mesmo, nos sintomas de ansiedade também! Afinal, quando seu carro quebra, mais de uma peça é danificada, não é mesmo? E é isto que acontece. Pessoas com dor, também podem apresentar sintomas de ansiedade, depressão, problemas para dormir, prejuízo de memória, e por aí vai.

Ainda ficou com dúvidas? Contate nosso grupo de pesquisa em dor para mais informações pelo e-mail: [labdorufgs@gmail.com](mailto:labdorufgs@gmail.com)

