

O perfil da dexametasona combinada com estimulação transcraniana por corrente contínua em ratos submetidos a um modelo de artrite

The profile of dexamethasone combined with transcranial direct current stimulation in rats submitted to an arthritis model

Gabriela Laste¹, Bettega Costa Lopes^{2,3}, Liciane Fernandes Medeiros^{2,4}, Felipe Fregni⁵, Wolnei Caumo⁶, Iraci L S Torres^{2,3,6}

DOI 10.5935/2595-0118.20210003

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Para investigar métodos mais seguros e eficazes para o manejo da artrite reumatoide, avaliou-se o efeito do tratamento com dexametasona (DEX, 0,25mg/kg) combinado com estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC) sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos de ratos submetidos a um modelo de artrite reumatoide.

MÉTODOS: Trinta e seis ratos Wistar foram alocados em 4 grupos: controle+DEX (CTRL+DEX), artrite+DEX (AR+DEX), artrite+DEX+sham-ETCC (AR+DEX+sham-ETCC) e artrite+DEX+ETCC (AR+DEX+ETCC). O modelo de artrite foi induzido pela administração de *complete Freund's adjuvant* (CFA) na pata. Edema na pata e a alodínia mecânica foram avaliadas por pletismômetro e teste de von Frey, respectivamente. 14 dias após injeção de CFA, ratos foram tratados por 8 dias (DEX e/ou

ETCC). Atividade locomotora foi avaliada pelo teste do campo aberto. TNF-alfa (hipocampo e medula espinal) e BDNF (córtex e tronco) foram mensurados por ELISA.

RESULTADOS: Nas medições pré-tratamento, ratos com artrite exibiram aumento de o inchaço articular e alodínia mecânica comparados ao grupo controle, confirmando o estabelecimento de modelo de dor crônica. Também se observou discreto efeito antinociceptivo da dexametasona combinada com ETCC no modelo de artrite. O modelo de dor induziu um aumento no comportamento de *grooming* e reduziu os níveis de TNF-alfa no hipocampo; estes efeitos foram revertidos nos grupos *sham-* e ETCC ativo. Entretanto, não foram observados efeitos da DEX ou ETCC nos níveis de BDNF no córtex cerebral ou no tronco encefálico.

CONCLUSÃO: Apesar dos discretos efeitos observados, não se pode descartar a ETCC como uma abordagem terapêutica não farmacológica para o manejo da dor crônica inflamatória na artrite reumatoide.

Descritores: Alodínia, Córtex cerebral, Hipocampo, Medula espinal.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVES: To pursue safer and more effective treatments for rheumatoid arthritis, the effect of dexamethasone treatment (DEX, 0.25mg/kg) combined with transcranial direct current stimulation (tDCS) in the behavior and neurochemical parameters of arthritic rats was evaluated.

METHODS: Thirty-six Wistar rats were divided into four groups: control+DEX (CTRL+DEX), arthritis+DEX (RA+DEX), arthritis+DEX+sham tDCS (RA+DEX+sham-tDCS) and arthritis+DEX+tDCS (RA+DEX+tDCS). The arthritic model (RA) was induced by complete Freund's adjuvant (CFA) paw administration. Paw edema and mechanical allodynia were assessed by plethysmometer and von Frey apparatus, respectively. Fourteen days after the CFA injection, rats received the treatment for eight days (DEX and/or tDCS). Behavioral parameters were measured with the Open-Field test. ELISA was used to evaluate hippocampal and spinal cord tumor necrosis factor (TNF- α) levels, cerebral cortex and brainstem BDNF levels.

RESULTS: In pre-treatment measurements, arthritic rats presented an increase in joint swelling and mechanical allodynia when compared to the control group, confirming chronic pain establishment. A slight antinociceptive effect of dexamethasone combined with tDCS in the pain model was observed. The pain model significantly induced an increase in the grooming behavior and a reduction in the spinal cord and hippocampal TNF- α .

Gabriela Laste – <https://orcid.org/0000-0003-1554-6658>;

Bettega Costa Lopes – <https://orcid.org/0000-0002-8090-0273>;

Liciane Fernandes Medeiros – <https://orcid.org/0000-0002-6842-7241>;

Felipe Fregni – <https://orcid.org/0000-0001-9359-8643>;

Wolnei Caumo – <https://orcid.org/0000-0002-5083-4658>;

Iraci L S Torres – <https://orcid.org/0000-0002-3081-115X>.

1. Universidade do Vale do Taquari - Univates, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Lajeado, RS, Brasil.

2. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-Clínicas. Porto Alegre, RS, Brasil.

3. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

4. Universidade La Salle, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano. Canoas, RS, Brasil.

5. Escola de Medicina de Harvard, Departamento de Reabilitação e Medicina Física, Hospital de Reabilitação de Spaulding & Hospital Geral de Massachusetts, Escola de Medicina de Harvard – Boston - Massachusetts – USA.

6. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Porto Alegre, RS, Brasil.

Apresentado em 17 de setembro de 2020.

Aceito para publicação em 16 de dezembro de 2020.

Conflito de interesses: não há – Fontes de fomento: Pesquisa apoiada pelas seguintes agências brasileiras de financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Dr. I.L.S. Torres e Dr. W. Caumo); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (B.C. Lopes, H.R. Medeiros); Grupo de Pesquisa de Pós-Graduação - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - GPPG-HCPA (Dr. I.L.S. Torres, concessão FIPE/HCPA nº 20120220); FAPERGS/PRONEM (Dr. I.L.S. Torres, concessão nº 11/2050); MCT/FINEP - COENG/2013.

Endereço para correspondência:

Iraci LS Torres
Rua Attilio Bilibio, 120, casa 21 - Bairro Jardim Carvalho
91530-008 Porto Alegre, RS, Brazil.
E-mail: iltorres@hcpa.edu.br

© Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor

levels; these effects were reverted in the sham- and active-tDCS-treated rats. However, no effects of DEX or tDCS were observed in the BDNF levels in the cerebral cortex and brainstem.

CONCLUSION: Despite the small effect observed, tDCS treatment cannot be discarded as a non-pharmacological adjuvant technique for inflammatory chronic pain treatment.

Keywords: Cerebral cortex, Hippocampus, Mechanical allodynia, Spinal cord.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) está relacionada com dor crônica caracterizada por plasticidade mal adaptativa regulada por numerosos mecanismos modulatórios. Estes incluem efeitos ao nível nociceptor, dor simpaticamente mediada, o fenômeno “wind-up”, a sensibilização central e as alterações nos mecanismos modulatórios centrais descendentes e ascendentes para a percepção da dor¹. Na AR há um aumento das citocinas pró-inflamatórias, como o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina (IL)-1 e IL-6, na membrana e fluido sinovial, além disso desempenham um papel central na patologia da AR^{2,3}. O tratamento antiartrítico convencional conta com o uso de drogas anti-inflamatórias esteroides e não esteroides (AINES), fármacos antirreumáticos modificadoras de doenças (DMARD) e fármacos anti-citocinas⁴. A eficácia dos anti-inflamatórios esteroides (AIE) no alívio de problemas inflamatórios é resultado dos efeitos pleiotrópicos do receptor glicocorticoide em múltiplas vias de sinalização que inibem a síntese de citocinas e mediadores inflamatórios⁵. Apesar da eficácia dos AIES, os efeitos adversos, como retardo de crescimento em crianças, imunossupressão, hipertensão, inibição da reparação de feridas, osteoporose e distúrbios metabólicos contraindicam um tratamento prolongado.

Os tratamentos de AR que podem modular células imunes inatas e adaptativas são cruciais para evitar dor e processos inflamatórios crônicos⁶. Estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que tanto a estimulação não invasiva⁷⁻¹⁰ como as técnicas invasivas, por exemplo, a estimulação do nervo vago (ENV), estão associadas a alívio da dor e a um perfil de modificação inflamatória na AR^{11,12}. A ETCC é uma técnica não invasiva que altera a fisiologia cerebral, bem como processos psicológicos, motores e comportamentais, além dos sintomas clínicos em doenças neurológicas e psiquiátricas¹³. Acredita-se que o córtex motor, o qual é modulado pela ETCC, influencia indiretamente a percepção da dor por meio de redes neurais em áreas que modulam a dor, provavelmente aumentando a excitabilidade cortical¹⁴. Além disso, a ETCC não só altera a atividade neuronal nas áreas corticais desejadas, mas também nas distantes, muito além da mudança de excitabilidade neuronal¹⁵. Os efeitos da ETCC são baseados em interações córtico-corticais com alguns componentes subcorticais (por exemplo, núcleos talâmicos) nestes circuitos¹⁶. Em humanos, a ETCC tem mostrado efeitos significativos em diferentes tipos de dor crônica^{17,18}.

Um estudo anterior⁸ demonstrou efeitos neuroplásticos e antinociceptivos duradouros da ETCC em um modelo de inflamação periférica⁸, corroborando o uso desta técnica em condições envolvendo dor crônica e inflamação periférica, como a AR. Outro estudo também mostrou que a ETCC em ratos anestesiados modulou a neuro-inflamação¹⁹. Além disso, foi demonstrado que a ETCC tem sido eficaz em outros modelos pré-clínicos de dor, como na dor neuropática^{9,10},

hiperalgesia induzida por estresse de contenção crônica e alodinia^{7,20}. A ETCC modula a resposta hiperalgésica e o perfil inflamatório em ratos sujeitos à dor neuropática, alterando os níveis de BDNF, IL-1 β , IL-4 e TNF- α nas estruturas do sistema nervoso central dos ratos^{9,10}.

O uso de fármacos, como os AIES, no tratamento de AR está frequentemente associado a diversos efeitos adversos que limitam sua utilidade. Assim, o uso de nenhuma ferramenta farmacológica, como a ETCC associada aos AIES, para reduzir a dose e consequentemente causar menos efeitos adversos, em sinergia com os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, pode ser uma estratégia interessante no tratamento da AR. Considerando que o uso desta combinação ainda não foi investigado, o estudo atual, buscando tratamentos de AR mais seguros e eficazes, visa avaliar o comportamento e os parâmetros neuroquímicos da dexametasona (DEX, 0,25mg/kg) combinada com a ETCC em ratos artríticos.

MÉTODOS

Ratos Wistar machos (n=36; 60 dias/idade; pesando 280-300g) foram alocados em gaiolas domésticas (49x34x16cm) com o piso coberto com serragem e mantidos em ambiente controlado (22 \pm 2°C; ciclo claro-escuro 12h/12h), com água e comida *ad libitum* (Nuvital, Porto Alegre/ Brasil). Todos os experimentos e procedimentos haviam sido previamente aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso Animal (protocolo GPPG-HCPA #20120220) e cumpriram as diretrizes ARRIVE²¹.

Desenho do experimento

Os ratos foram designados em quatro grupos: controle+dexametasona (CTRL+DEX, n=9) (0,25mg/kg); artrite+dexametasona (AR+DEX, n=9) (0,25mg/kg); artrite+dexametasona (0,25mg/kg) + sham-ETCC (AR+DEX+sham-ETCC, n=9); e artrite + dexametasona (0,25mg/kg) + ETCC (AR+DEX+ETCC, n=9). Os tratamentos com ETCC ou sham e/ou dexametasona foram realizados 14 dias após a injeção de CFA.

O teste eletrônico de Von Frey foi realizado imediatamente no pré-tratamento (14 dias após a injeção de CFA) e 24h após o final do tratamento (última sessão de ETCC e/ou administração de dexametasona). O teste de campo aberto foi conduzido 24h após a sessão de ETCC e/ou administração de dexametasona. As medições de edema foram realizadas no pré-tratamento, 2, 4, 6 e 8 dias após o início dos tratamentos. Os ratos foram decapitados no dia 23 após a injeção de CFA (Figura 1).

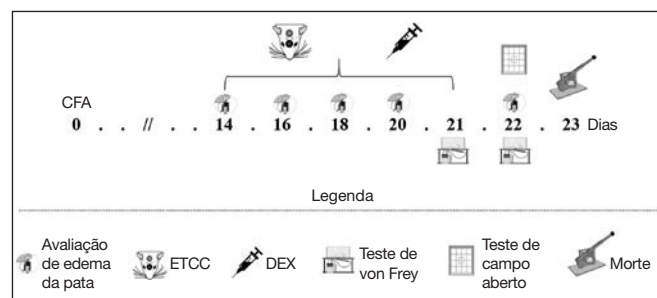


Figura 1. Desenho do experimento

CFA = complete Freund's adjuvant; DEX = tratamento com dexametasona; ETCC = estimulação transcraniana por corrente contínua

Artrite induzida por *Complete Freund's adjuvant* (CFA)

Os animais anestesiados com isoflurano receberam uma injeção intradérmica de CFA na pata traseira direita (1 mg-mL⁻¹; 100 µL; *Mycobacterium tuberculosis* seco e termicamente morto, cada mililitro do veículo contendo 0,85 mL de óleo de parafina e 0,15 mL de monooleato de maneto), que foi suspenso em uma emulsão 1:1 óleo/salina (em um volume total de 200 µL). Este modelo de artrite precisa de aproximadamente 14 dias para ser estabelecido²².

Tratamento com dexametasona

A DEX (Nova Farma, Anápolis, [Goiás], [Brasil]) foi dissolvida em soro fisiológico imediatamente antes do uso e injetada por via intraperitoneal (i.p., 0,25mg/kg) a 1mL/kg uma vez por dia durante oito dias²³.

Estimulação transcraniana por corrente contínua (ETCC)

Após o estabelecimento da artrite, 14 dias após a exposição ao CFA, os animais dos grupos de tratamento ativo foram submetidos a uma sessão de 20 minutos de ETCC bicefálica todas as tardes durante oito dias, como já descrito^{9,10}. Uma corrente direta constante de 0,5 mA foi enviada por um estimulador alimentado por bateria usando eletrodos de eletrocardiograma com hidrogel adesivo condutivo. Para melhorar a aderência, as cabeças dos ratos foram raspadas. Eletrodos foram aparados em 1,5cm² para melhor ajuste e uma intensidade de corrente constante de 0,5mA foi aplicada no couro cabeludo dos ratos. Os eletrodos foram fixados à cabeça com fita adesiva (Micro-pore™) e cobertos com malha de proteção para evitar a remoção. O cátodo foi posicionado no ponto médio entre os ângulos laterais de ambos os olhos (área supraorbital). O ânodo foi colocado na cabeça usando marcas no pescoço e linhas dos ombros como orientação (as regiões anterior e posterior na linha média entre os dois hemisférios do córtex parietal). Para a estimulação sham, os eletrodos foram colocados e fixados na mesma posição da estimulação propriamente dita. Entretanto, o estimulador estava desligado durante todo o procedimento. Os animais foram cuidadosamente imobilizados com uma toalha de algodão para evitar seus movimentos sem causar desconforto tanto no tratamento ativo quanto na simulação.

Medição do volume da pata

O edema foi medido usando um pletismômetro (UGO Basile, Itália) e expresso em mililitros (mL).

Teste eletrônico de von Frey

A alodínia mecânica foi avaliada por um anestesímetro automático de von Frey (Insight, São Paulo, Brasil). 24h antes do teste, os ratos foram habituados ao ambiente durante 15 minutos para evitar a analgesia induzida pela novidade²⁴. O teste consistia em cutucar a pata traseira para provocar um reflexo de flexão seguido por uma clara resposta de recuo. A intensidade da pressão foi registrada automaticamente após a retirada da pata. A seguir, foi calculada a média de três leituras de von Frey sucessivas, e o intervalo entre as medidas foi de pelo menos 5 segundos. As médias foram usadas como medidas finais, e o limiar de retirada da pata foram expressos em gramas (g).

Teste de campo aberto

As avaliações comportamentais foram realizadas em uma gaiola de madeira envernizada forrada interiormente com vidro. Quatro

medições foram realizadas durante as sessões de teste de 5 minutos no campo aberto: (1) latência para sair do primeiro quadrante (em segundos); (2) número total de cruzamentos (ou número de cruzamentos totais) (isto é, atividade horizontal nos quadrantes interna e externa); (3) comportamento de *grooming* (em segundos); (4) número de comportamentos de *rearings* (isto é, atividade vertical); e (5) número de *bolus* fecais. O número de cruzamentos de linha (todas as patas cruzaram o limite para uma área demarcada diferente) foi usado como medida da atividade locomotora. A latência para sair do primeiro quadrante avaliou os comportamentos do tipo ansioso.

Coleta de tecido

Os ratos foram decapitados 48h após a última sessão de ETCC e/ou administração de dexametasona e as estruturas cerebrais (hipocampo, medula espinhal, córtex cerebral e tronco encefálico) foram coletadas. As estruturas foram mantidas congeladas a -80°C até que as análises fossem realizadas.

Níveis de TNF-α e BDNF

Os níveis de TNF-α do hipocampo e medula espinhal foram determinados via ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) utilizando anticorpos monoclonais específicos para TNF-α (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos). O ELISA foi feito 48h após a última sessão de ETCC e/ou administração de dexametasona. As análises de BDNF foram realizadas no tronco encefálico e no córtex cerebral usando um kit comercialmente disponível de ensaio de imunoabsorção enzimática para ratos (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todas as estruturas foram homogeneizadas com um homogeneizador portátil usando Coquetel Inibidor de Protease (Sigma® # P8340) na proporção de 1:100 em tampão fosfato salino (PBS) em pH 7,2. Cada um dos homogenatos foi centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm. A densidade óptica - comprimento de onda de 450 nm - foi medida usando um leitor ELISA. Os valores foram expressos em picogramas por mililitro de homogenato de tecido (pg/mL).

Análise estatística

Para a análise dos efeitos de grupo para inchaço articular e alodínia mecânica em diferentes momentos de avaliação foram usadas equações de estimativas generalizadas (EEG). Foi realizado um ANOVA unilateral seguido de um teste *post-hoc* Student-Newman-Keuls (SNK) para comparar as diferenças de grupo em relação aos biomarcadores e parâmetros comportamentais. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o SPSS, versão 26.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA). O nível de significância foi fixado em p<0,05 para todos os testes estatísticos.

RESULTADOS

Na linha de base, as medidas de inchaço articular (EEG, p<0,001) (Figura 2) e da latência de retirada da pata traseira no teste de von Frey (EEG, p<0,05) (Figura 3) foram significativamente diferentes entre o grupo CTRL+DEX e os três grupos de artrite, confirmando a eficácia do modelo de dor utilizado (EEG, p=0,001).

Inchaço articular

Todos os ratos imunizados desenvolveram monoartrite inflamatória. O pico de incidência ocorreu no 14º dia após a imunização (pré-tratamento), quando começaram os tratamentos com ETCC bicefálica e DEX. A análise EEG mostrou efeito de grupo ($p=0,001$), efeito de tempo ($p=0,001$), e interação grupo x tempo ($p=0,001$) significativos (Figura 2). Comparado com os valores de linha de base, o inchaço nas articulações diminuiu em todos os três grupos de artrite e 24 horas depois do fim do tratamento (última sessão de ETCC e/ou administração de DEX). Por outro lado, não houve diferença de inchaço articular entre os grupos de artrite em nenhum dos momentos de avaliação ($p>0,05$).

Alodínia mecânica

A alodínia mecânica foi avaliada pelo teste de von Frey. A análise EEG mostrou um efeito de grupo ($p=0,001$), efeito de tempo ($p=0,001$) e interação grupo x tempo ($p=0,002$) (Figura 3) significativos. Foi possível observar imediatamente e 24 horas após a última sessão de tratamento com ETCC bicefálica que ratos com dor submetidos a DEX e ETCC aumentaram ligeiramente o limiar da pata. m=Alodínia mecânica também foi parcialmente revertida por tratamentos combinados ($p>0,05$).

Parâmetros comportamentais do teste de campo aberto

Um aumento significativo no comportamento de *grooming* foi observado nos grupos de artrite, o qual foi revertido pelo tra-

tamento de sham-ETCC (ANOVA-SNK unilateral, $p=0,002$). Todos os grupos de artrite mostraram uma redução no número de cruzamentos no quadrante interno quando comparados ao grupo CTRL+DEX (ANOVA-SNK unilateral, $p=0,01$). Não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto à latência para sair do primeiro quadrante, comportamento de retaguarda, cruzamentos no quadrante externo, total de quadrantes e o número de *bolus* fecais (ANOVA-SNK unilateral, $p>0,05$ para todos) (Tabela 1).

Níveis de biomarcadores

Com relação aos níveis de TNF- α , os ratos AR tratados com DEX mostraram uma diminuição nos níveis de TNF- α da medula espinhal ($p=0,02$) quando comparados com os ratos sem dor. A imobilização (grupo AR+DEX+sham-ETCC) intensificou a redução e foi revertida pela ETCC ativa em ratos AR até os níveis AR+DEX (ANOVA-SNK unilateral, $p=0,02$, Figura 4, painel A). Os ratos AR tratados com DEX mostraram uma redução nos níveis de TNF- α do hipocampo ($p=0,02$) quando comparados com outros grupos (ANOVA-SNK unilateral, $p=0,02$, Figura 4, painel B).

Quanto aos níveis de BDNF, não houve diferença entre os grupos nos níveis de BDNF no córtex cerebral ou tronco encefálico (ANOVA-SNK unilateral, $p>0,05$ para ambos; Figura 4, painel C e D, respectivamente).

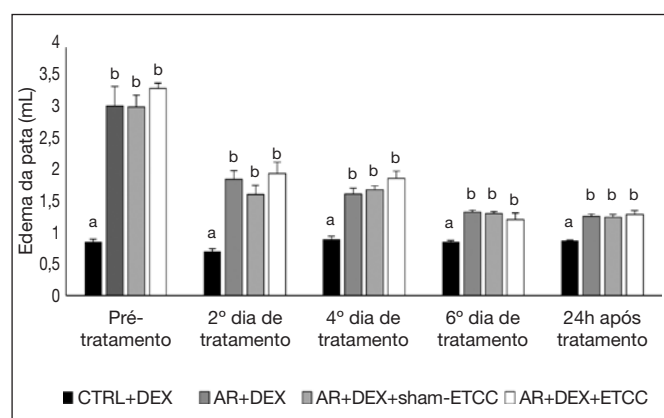


Figura 2. Edema de pata medido no pré-tratamento (14 dias após a injeção de CFA), 2, 4 e 6 dias de tratamento, e 24h após o final do tratamento (CTRL+DEX) = controle+DEX; (AR+DEX) = artrite+DEX; (AR+DEX+sham-ETCC) = artrite+DEX+sham-ETCC; (AR+DEX+ETCC) = artrite+DEX+ETCC. Dados expressos como média \pm erro padrão da média (EEG/Bonferroni; $p<0,05$). Letras diferentes indicam significância estatística.

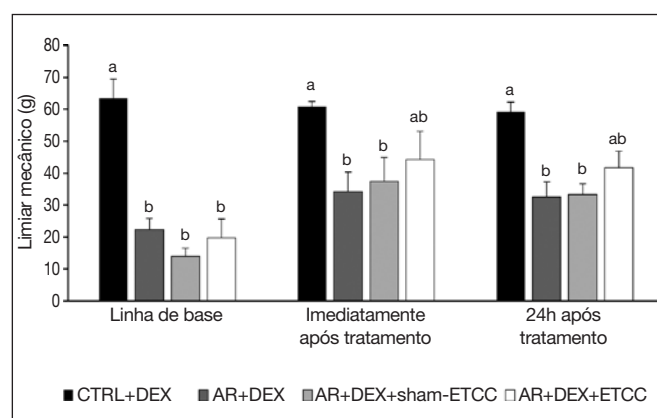


Figura 3. Limiar mecânico avaliado pelo teste de von Frey (CTRL+DEX) = controle+DEX; (AR+DEX) = artrite+DEX; (AR+DEX+sham-ETCC) = artrite+DEX+sham-ETCC; (AR+DEX+ETCC) = artrite+DEX+ETCC. Dados expressos como média \pm erro padrão da média (EEG/Bonferroni; $p<0,05$). Letras diferentes indicam significância estatística.

Tabela 1. Um teste de campo aberto foi realizado 24 horas após a última sessão de ETCC e/ou administração de dexametasona

Teste de campo aberto	CTRL+DEX	AR+DEX	AR+DEX+sham-ETCC	AR+DEX+ETCC
Latência (s)	3,71 \pm 1,12	2,83 \pm 0,47	4,66 \pm 1,30	6,71 \pm 1,49
<i>Grooming</i> (s)	2,33 \pm 1,56 ^a	35,80 \pm 15,04 ^b	1,83 \pm 1,22 ^a	53,60 \pm 13,77 ^b
Retaguarda (n)	32,42 \pm 4,60	22,57 \pm 7,59	35,00 \pm 5,53	23,14 \pm 6,06
Quad ext (n)	96,75 \pm 8,74	79,00 \pm 7,93	93,85 \pm 8,00	77,71 \pm 7,82
Quad int (n)	11,71 \pm 2,13 ^a	4,83 \pm 0,87 ^b	4,33 \pm 0,80 ^b	5,28 \pm 2,00 ^b
Total quad (n)	108,57 \pm 7,68	85,14 \pm 7,42	97,57 \pm 8,00	83,00 \pm 7,46
Bolus fecais (n)	2,00 \pm 0,87	3,42 \pm 1,13	4,00 \pm 0,44	2,83 \pm 0,60

Grupos: CTRL+DEX, AR+DEX, AR+DEX+sham-ETCC, e AR+DEX+ETCC. Dados expressos como média \pm erro padrão da média do número (n) ou segundos (s). Letras diferentes indicam significância estatística (ANOVA/SNK unilateral; $p<0,05$).

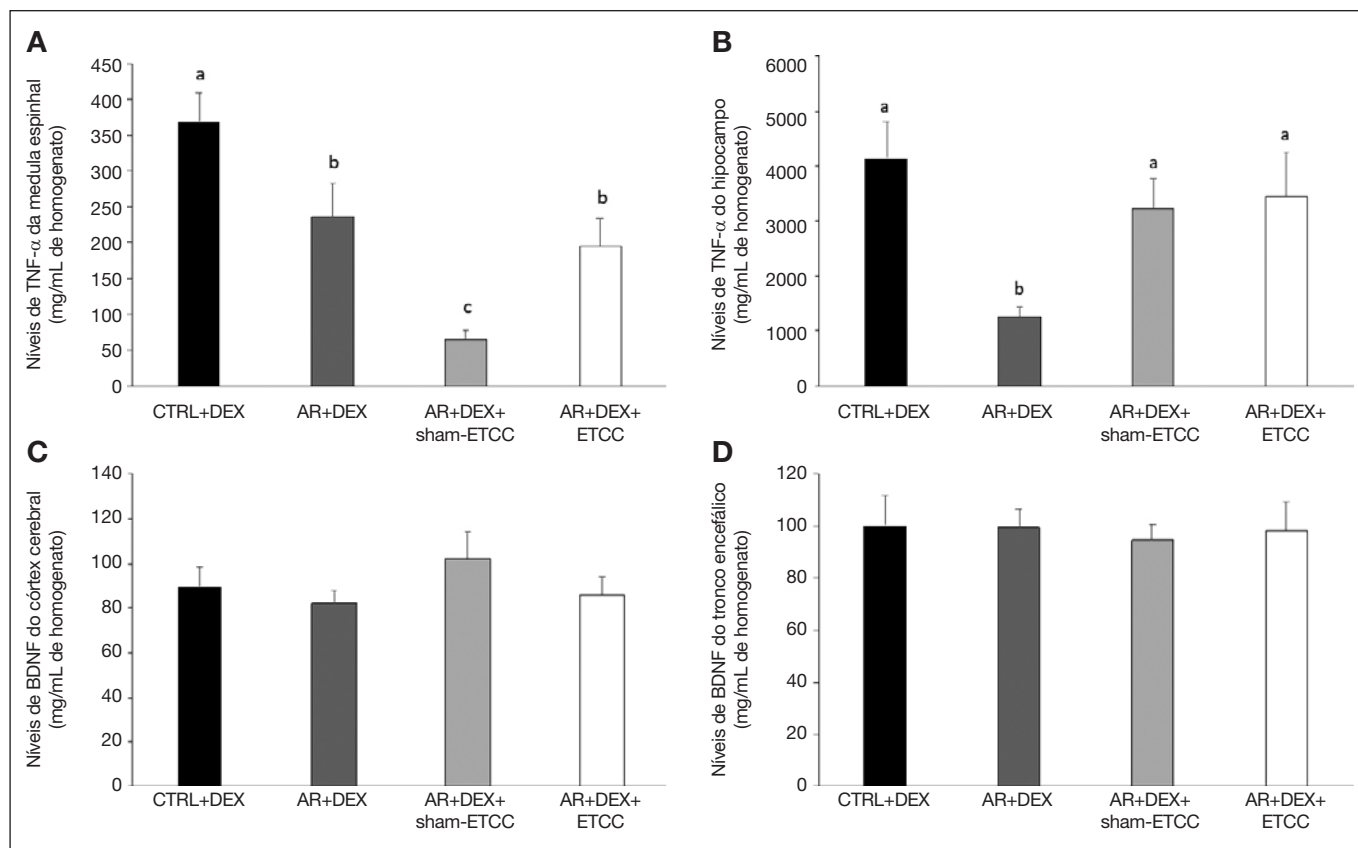


Figura 4. Níveis de biomarcadores medidos nas estruturas nervosas centrais dos ratos

(CTRL+DEX) = controle+DEX; (AR+DEX) = artrite+DEX; (AR+DEX+sham-ETCC) = artrite+DEX+sham-ETCC; (AR+DEX+ETCC) = artrite+DEX+ETCC

Painel A. Níveis de TNF-α da medula espinhal. **Painel B.** Níveis de TNF-α do hipocampo. **Painel C.** Níveis de BDNF do córtex cerebral. **Painel D.** Níveis de BDNF do tronco encefálico. Dados expressos como média ± erro padrão da média (ANOVA/SNK unilateral; p<0,05). Letras diferentes indicam significância estatística.

DISCUSSÃO

O estudo demonstrou um efeito imediato, duradouro e levemente antinociceptivo da DEX combinada com tratamentos de ETCC bicefálica em um modelo de artrite para ratos. Estes efeitos não foram observados após a administração de somente DEX, sugerindo um efeito específico de DEX combinada com ETCC. Os níveis de TNF-α da medula espinhal foram reduzidos em ratos artríticos, um resultado intensificado pela imobilização. A ETCC reverteu o efeito de imobilização. A DEX associada ao modelo de rato artrítico mostrou uma diminuição dos níveis de TNF-α do hipocampo. Tanto a ETCC ativa quanto a sham-ETCC foram capazes de reverter este efeito. Houve um aumento no comportamento de *grooming* no modelo de rato artrítico, o qual foi revertido pela sham-ETCC. Além disso, nenhum dos efeitos da DEX ou ETCC foi encontrado nos níveis de BDNF do córtex cerebral ou do tronco encefálico. Para a avaliação da dor e inflamação, os ratos foram injetados com o CFA para desenvolver o modelo artrítico. O CFA ativa a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e espécies ativas de oxigênio²⁵. Ele também causa hiperalgesia e alodínia^{25,26}, as quais podem persistir por até 28 dias. O presente estudo concentrou-se na fase tardia da inflamação que induz os eventos imunológicos. As fibras periféricas aferentes sintetizam uma gama de moléculas que podem potencialmente contribuir para a hiperalgesia em pacientes com doenças inflamatórias crônicas, tais como a

AR. Estas incluem glutamato e outros aminoácidos excitatórios, neuropeptídeos, como a substância P, adenosina trifosfato, óxido nítrico e prostaglandinas²⁷. Os AIES são os fármacos mais utilizados para diversas doenças. Ainda assim, há vários efeitos adversos associados ao uso em longo prazo ou de alta dose de DEX²⁸. Com base em um estudo anterior utilizando um modelo inflamatório crônico de rato (paniculite), no qual a dor foi completamente revertida pela DEX²³, agora a dexametasona (0,25mg/kg) foi testada. No presente estudo, um efeito analgésico discreto foi observado somente quando combinado com a ETCC bimodal no modelo de rato artrítico com a alodínia mecânica. Como a artrite é um modelo mais agressivo que a paniculite, é interessante notar como os perfis inflamatórios ligados a ambas as disfunções é diferente daqueles previamente demonstrados em paniculite²⁹ e atrite³⁰. No presente estudo, o efeito analgésico foi observado somente em alodínia mecânica quando a DEX foi combinada com a ETCC. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que a paniculite é um processo inflamatório menos intenso do que a artrite em ratos. É importante notar que, em um estudo anterior, um modelo de artrite³⁰ usado, além de alterações histológicas, incluindo a paniculite periarticular na articulação tibiotársica, também exibiu infiltração inflamatória contendo células gigantes, plasmócitos, linfócitos e principalmente macrófagos e neutrófilos. Além disso, os ratos mostraram progressão dos danos articulares, revascularização e proliferação sinovial no 14º dia após a injeção de CFA.

Estudos pré-clínicos anteriores realizados pelo presente grupo de autores demonstrou efeitos imediatos e duradouros das sessões repetidas de tratamento com ETCC bicefálica na inflamação crônica⁸, hiperalgesia em contenção crônica induzida por estresse⁷, modelo de dor neuropática⁹ e modelo de dor neuropática associada a exercícios físicos repetidos¹⁰. No entanto, no presente estudo, um leve efeito analgésico da ETCC bimodal só foi encontrado quando combinado com a DEX. Foi demonstrado o papel dos níveis centrais e periféricos de citocinas e neurotrofinas associadas ao efeito antinociceptivo da ETCC em diferentes modelos de dor crônica. Ainda assim, no presente estudo, foi encontrado efeito da dor sobre os níveis de TNF- α sem efeitos de ETCC e/ou DEX.

Além disso, um estudo³¹ utilizando camundongos injetados com CFA na planta da pata e com TNF- α administrado por via subaracnóidea mostrou o papel central do TNF- α na regulação da plasticidade sináptica (sensibilização central), e que a dor inflamatória era mediada pelo receptor TNF- α 1 assim como pelo receptor TNF- α 2³¹. Em neurônios ganglionares dorsais, o TNF- α aumenta o potencial receptor transiente subtipo V1 e induz descarga espontânea³². É importante notar que os receptores glicocorticoides são expressos em icróglia *in vitro* e a icróglia tratada com fármacos esteroides mostrou diminuição na produção de TNF- α e IFN- γ em resposta à injeção de lipopolissacarídeos. Além disso, a administração de metilprednisolona reduz a expressão de TNF- α após lesão medular em ratos³³, corroborando os dados do presente estudo que mostraram diminuição nos níveis centrais de TNF- α em ratos artríticos.

O presente estudo também observou nos ratos artríticos um comportamento de *grooming* associado à diminuição do tempo gasto na parte central do campo aberto. Ambos podem ser interpretados como efeitos do tipo ansiogênico. Outro estudo³⁴ mostrou que o modelo de CFA promoveu um aumento de comportamentos do tipo ansioso, como diminuição do tempo gasto e do número de entradas em braços abertos do labirinto positivo elevado e uma redução no número de visitas nos quadrantes centrais do campo aberto. O teste de campo aberto é um método para medir atividades locomotoras e exploratórias, mas também pode indicar alguns parâmetros de comportamento de ansiedade³⁵. Dessa maneira, é possível sugerir que a dor induzida pela artrite aumentou o comportamento de ansiedade e que não foi revertida por tratamentos com DEX e/ou ETCC bicefálica repetida. É importante observar que um estudo anterior deste grupo de pesquisadores demonstrou que a ETCC reverteu alterações de comportamento induzidas por dor neuropática crônica, indexadas por mudanças em atividades locomotoras e exploratórias e comportamentos do tipo ansioso³⁶. Entretanto, no presente estudo, a ETCC não foi capaz de reverter este comportamento em um modelo de dor crônica inflamatória.

Este estudo foi limitado pelos fatores a seguir: 1) A ETCC não invasiva não é focalizada em modelos animais. Dado que em humanos ambos os eletrodos são colocados na cabeça, a tentativa foi de imitar posições similares de eletrodos nos ratos, entretanto, foi impossível evitar a estimulação bicefálica por causa do seu tamanho relativamente pequeno da cabeça. 2) O desenho do experimento não incluiu um grupo controle-salina, artrite-salina e artrite-salina-ETCC. Dessa maneira, os efeitos específicos da DEX não foram avaliados comparando-os com os potenciais efeitos salinos. Não obstante, os efeitos da DEX em artrite induzida por CFA são

bem descritos^{23,37}. Similarmente, apesar da presença de um grupo sham-ETCC para comparar os efeitos nele observados com os efeitos da ETCC, um grupo de ETCC-artrite-salina não foi incluído. 3) Foi necessário conter os ratos durante a ETCC porque o procedimento foi realizado sem anestesia, portanto, estresse induzido por contenção não pode ser evitado. 4) A opção pela eutanásia dos ratos 48 horas após a última sessão de ETCC foi feita porque todos os testes comportamentais foram realizados à tarde 24 horas após a última sessão de ETCC, o que tornou pouco prática a eutanásia no mesmo dia após os testes. 5) Os resultados indicam a necessidade de um novo estudo utilizando uma dose baixa de DEX combinada com ETCC. 6) Com base no estudo anterior deste grupo de pesquisa, a dose de DEX (0,25mg/kg) foi considerada baixa, no entanto, os dados da literatura divergem sobre a faixa de dosagem baixa e alta para ratos^{38,39}.

CONCLUSÃO

Os ratos artríticos demonstraram aumento em comportamentos de *grooming* e do tipo ansioso indexado por diminuição no número de cruzamentos interiores, assim como menor nível de TNF- α central. A DEX combinada com ETCC bimodal mostrou um leve efeito analgésico sobre a alodínia mecânica, sugerindo um possível uso da ETCC como técnica adjuvante para reduzir a dose de corticoides no manejo da AR. Entretanto, novos estudos devem ser encorajados a investigar combinações de ETCC e fármacos com o objetivo de reduzir a dose efetiva e aumentar a eficácia.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Gabriela Laste

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

Bettega Costa Lopes

Análise estatística, Coleta de Dados, Metodologia, Redação - Revisão e Edição, Visualização

Liciane Fernandes Medeiros

Análise estatística, Coleta de Dados, Metodologia, Redação - Revisão e Edição, Supervisão, Visualização

Felipe Fregni

Conceitualização, Metodologia, Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição, Visualização

Wolnei Caumo

Análise estatística, Metodologia, Redação - Revisão e Edição, Visualização

Iraci LS Torres

Análise estatística, Aquisição de financiamento, Conceitualização, Gerenciamento de Recursos, Gerenciamento do Projeto, Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição, Supervisão, Visualização

REFERÊNCIAS

1. May A. Chronic pain may change the structure of the brain. *Pain*. 2008;137(1):7-15.
2. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review. *JAMA*. 2018;320(13):1369-72.

3. Wright HL, Mewar D, Bucknall RC, Edwards SW, Moots RJ. Synovial fluid IL-6 concentrations associated with positive response to tocilizumab in an RA patient with failed response to anti-TNF and rituximab. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(4):743-4.
4. Majithia V, Geraci SA. Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am J Med*. 2007;120(11):936-9.
5. Trombetta AC, Meroni M, Cutolo M. Steroids and autoimmunity. *Front Horm Res*. 2017;48:121-32.
6. Rana AK, Li Y, Dang Q, Yang F. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *Int Immunopharmacol*. 2018;65:348-59.
7. 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.
8. Laste G, Caumo W, Adachi LN, Rozisky JR, de Macedo IC, Filho PR, et al. After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. *Exp Brain Res*. 2012;221(1):75-83.
9. 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(2):209-17.
10. Lopes BC, Medeiros LF, Silva de Souza V, Cioato SG, Medeiros HR, Regner GG, et al. Transcranial direct current stimulation combined with exercise modulates the inflammatory profile and hyperalgesic response in rats subjected to a neuropathic pain model: long-term effects. *Brain Stimul*. 2020;13(3):774-82.
11. Rossato MF, Hoffmeister C, Trevisan G, Bezerra F, Cunha TM, Ferreira J, et al. Monosodium urate crystal interleukin-1 β release is dependent on Toll-like receptor 4 and transient receptor potential V1 activation. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(1):233-42.
12. Koopman FA, Chavan SS, Miljko S, Grazio S, Sokolovic S, Schuurman PR, et al. Vagus nerve stimulation inhibits cytokine production and attenuates disease severity in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(29):8284-9.
13. Stagg CJ, Antal A, Nitsche MA. Physiology of transcranial direct current stimulation. *J ECT*. 2018;34(3):144-52.
14. Kubis N. Non-invasive brain stimulation to enhance post-stroke recovery. *Front Neural Circuits*. 2016;10:56.
15. Lefaucheur J-P, Antal A, Ayache SS, Benninger DH, Brunelin J, Cogiamanian F, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of transcranial direct current stimulation (tDCS). *Clin Neurophysiol*. 2017;128(1):56-92.
16. Schoellmann A, Scholten M, Wasserkla B, Govindan RB, Krüger R, Gharabaghi A, et al. Anodal tDCS modulates cortical activity and synchronization in Parkinson's disease depending on motor processing. *NeuroImage Clin*. 2019;22:101689.
17. Fregni F, Gimenes R, Valle AC, Ferreira MJ, Rocha RR, Natalle L, et al. A randomized, sham-controlled, proof of principle study of transcranial direct current stimulation for the treatment of pain in fibromyalgia. *Arthritis Rheumatol*. 2006;54(12):3988-98.
18. Zortea M, Ramalho L, Alves RL, Alves CFDS, Braulio G, Torres ILDS, et al. Transcranial direct current stimulation to improve the dysfunction of descending pain modulatory system related to opioids in chronic non-cancer pain: an integrative review of neurobiology and meta-analysis. *Front Neurosci*. 2019;13:1218.
19. Rueger MA, Keuters MH, Walberer M, Braun R, Klein R, Sparing R, et al. Multi-session transcranial direct current stimulation (tDCS) Elicits inflammatory and regenerative processes in the rat brain. *PLoS One*. 2012;7(8):e43776.
20. Spezia Adachi LN, Quevedo AS, de Souza A, Scarabelot VL, Rozisky JR, de Oliveira C, et al. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Exp Brain Res*. 2015;233(5):1377-89.
21. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. *Animals*. 2013;4(1):35-44.
22. Koch DA, Silva RB, de Souza AH, Leite CE, Nicoletti NF, Campos MM, et al. Efficacy and gastrointestinal tolerability of ML3403, a selective inhibitor of p38 MAP kinase and CBS-3595, a dual inhibitor of p38 MAP kinase and phosphodiesterase 4 in CFA-induced arthritis in rats. *Rheumatology*. 2014;53(3):425-32.
23. Laste G, Ripoll Rozisky J, de Macedo IC, Souza Dos Santos V, Custódio De Souza IC, Caumo W, et al. Spinal cord brain-derived neurotrophic factor levels increase after dexamethasone treatment in male rats with chronic inflammation. *Neuroimmunomodulation*. 2013;20(2):119-25.
24. Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM, Schivo IR, Parada CA, Cunha FQ, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(3):391-9.
25. Chen Y, Boettger MK, Reif A, Schmitt A, Üçeyler N, Sommer C. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. *Mol Pain*. 2010;6:13.
26. Helyes Z, Szabó A, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi A, et al. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum*. 2004;50(5):1677-85.
27. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Progr Neurobiol*. 1999;57(1):1-164.
28. Wang Y, Zhao R, Gu Z, Dong C, Guo G, Li L. Effects of glucocorticoids on osteoporosis in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2020;31(8):1401-9.
29. Oliveira PG, Brenol C V, Edelweiss MI, Meurer L, Brenol JCT, Xavier RM. Subcutaneous inflammation (panniculitis) in tibio-tarsal joint of rats inoculated with complete Freund's adjuvant. *Clin Exp Med*. 2007;7(4):184-7.
30. Laste G, Souza ICC, Santos VSD, Caumo W, Torres ILS. Histopathological changes in three variations of wistar rat adjuvant-induced arthritis model. *Int J Pharmaceutical Res Schol*. 2014;3(2):780-90.
31. Zhang L, Berta T, Xu Z-Z, Liu T, Park JY, Ji RR. TNF- α contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain*. 2011;152(2):419-27.
32. Park CK, Lü N, Xu ZZ, Liu T, Serhan CN, Ji RR. Resolving TRPV1- and TNF- α -mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *J Neurosci*. 2011;31(42):15072-85.
33. Can M, Gul S, Bektas S, Hanci V, Acikgoz S. Effects of dexmedetomidine or methylprednisolone on inflammatory responses in spinal cord injury. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009;53(8):1068-72.
34. Parent AJ, Beaudet N, Beaudry H, Bergeron J, Bérubé P, Drolet G, et al. Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behav Brain Res*. 2012;229(1):160-7.
35. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*. 2015;(96):e2434.
36. Filho PR, Vercelino R, Cioato SG, Medeiros LF, de Oliveira C, Scarabelot VL, et al. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts behavioral alterations and brainstem BDNF level increase induced by neuropathic pain model: long-lasting effect. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;64:44-51.
37. Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Kelmer-Bracht AM, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL. The metabolic changes caused by dexamethasone in the adjuvant-induced arthritic rat. *Mol Cell Biochem*. 2007;302(1-2):87-98.
38. Lurie S, Kuhn C, Bartolome J, Schanberg S. Differential sensitivity to dexamethasone suppression in an animal model of the DST. *Biol Psychiatry*. 1989;26(1):26-34.
39. Earp JC, Pyszczynski NA, Molano DS, Jusko WJ. Pharmacokinetics of dexamethasone in a rat model of rheumatoid arthritis. *Biopharm Drug Dispos*. 2008;29(6):366-72.