

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS

DANIEL TASSINARI FELBER

**PADRONIZAÇÃO DE UM NOVO MODELO DE FIBROMIALGIA ASSOCIANDO  
SALINA ÁCIDA INTRAMUSCULAR COM UMA SUBDOSE DE RESERPINA EM  
RATOS.**

URUGUAIANA/RS

2023

**DANIEL TASSINARI FELBER**

**PADRONIZAÇÃO DE UM NOVO MODELO DE FIBROMIALGIA ASSOCIANDO  
SALINA ÁCIDA INTRAMUSCULAR COM UMA SUBDOSE DE RESERPINA EM  
RATOS.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Morgana Duarte da Silva

URUGUAIANA/RS

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

F311p Felber, Daniel Tassinari

Padronização de um novo modelo de fibromialgia associando salina ácida intramuscular com uma subdose de reserpina em ratos. / Daniel Tassinari Felber.  
99 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 2023.

"Orientação: Morgana Duarte da Silva".

1. Fibromialgia. 2. Reserpina. 3. Salina ácida. 4. Modelo experimental. I. Título.

**DANIEL TASSINARI FELBER**

**PADRONIZAÇÃO DE UM NOVO MODELO DE FIBROMIALGIA ASSOCIANDO SALINA ÁCIDA INTRAMUSCULAR COM UMA SUBDOSE DE RESERPINA EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Tese defendida e aprovada em: 10/08/2023.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Morgana Duarte da Silva  
Orientadora  
UFSC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liane da Silva de Vargas  
UNIPAMPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Franciane Bobinski UNISUL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nara Lins Meira Quintão  
UNIVALI



Assinado eletronicamente por **Morgana Duarte Silva, Usuário Externo**, em 04/10/2023, às 13:31, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normavas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **LIANE DA SILVA DE VARGAS, PROFESSOR MAGISTÉRIO SUPERIOR**, em 04/10/2023, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as norma vas legais aplicáveis.

---



Assinado eletronicamente por **Franciane Bobinski, Usuário Externo**, em 05/10/2023, às 14:27, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as norma vas legais aplicáveis.

---



Assinado eletronicamente por **NARA LINS MEIRA QUINTÃO, Usuário Externo**, em 09/10/2023, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as norma vas legais aplicáveis.

---



A auten cidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1262025** e o código CRC **64146ABF**.

---

Dedico este trabalho à minha família, à minha parceira e companheira de vida Luísa que foi incansável no apoio, sendo essa uma conquista também dela.

## AGRADECIMENTOS

À professora, conselheira e amiga **Dr<sup>a</sup>. Morgana Duarte da Silva**, agradeço profundamente pela orientação, opiniões, dicas, conselhos, incentivo e puxões de orelha nos vários momentos em que as turbulências balançaram a vida pessoal, profissional e acadêmica ao longo desses anos. Mesmo com as mudanças e a distância fortalecemos nosso elo e tenho certeza de que esta tese será fruto de muitas ideias futuras para continuarmos juntos na caminhada. Muito obrigado pela força, pelo exemplo, pelo coração de mãe e pela inspiração, e mil desculpas pelos cabelos brancos.

Aos membros que compõem o Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da UNIPAMPA, professores, secretariado e colegas que estiveram juntos ao longo destes anos, obrigado pelos ensinamentos, pelo compartilhamento de ideias e pelos momentos que estivemos juntos. As professoras que compuseram a banca desta tese Dra. Franciane Bobinski, Dra. Nara Quintão e Dra. Liane Vargas, obrigado pela apreciação e pelas sugestões propostas.

Aos colegas que estiveram ao meu lado durante todo este processo, **Rafael Tamborena Malheiros** e **Caroline Cadore Ramires**, obrigado por ouvirem minhas angústias e dificuldades compartilhadas, pelo companheirismo, pelas horas dividindo laboratório em experimentos e pela amizade que fortalecemos. Aos demais colegas de pós-graduação, em especial aos primeiros ingressantes no curso, Cláudio, Caroline, Franciele, Marcos, Letícia, Janaína, Letícia, Marcos, Niége e Rui, obrigado por encararem essa árdua missão e estarem presentes na minha trajetória.

Ao pessoal do **LANDI/UFSC**, que na fase de maior incerteza abriu as suas portas para desenvolvimento deste trabalho, ao Dr. Marcos, Sheila, Jeane, Anna e a todos que de alguma maneira auxiliaram na execução dos meus experimentos, obrigado por abdicarem de preciosas horas para estarem ao meu lado. Ah, e obrigado por me resgatarem no laboratório quando fiquei trancado.

Aos colegas de trabalho, tanto na Santa Casa de Porto Alegre quanto do Divina Providência, obrigado pelas trocas de escalas, por cobrirem minhas folgas e pelo incentivo diário. Às minhas supervisoras **Alexandra, Fernanda e Bruna**, obrigado por apoiarem os estudos, aceitarem as minhas bagunças de escala e permitirem a conciliação da pesada rotina de trabalho com o desenvolvimento desta tese.

À **minha família**, Luísa e Brutus, aos meus pais Danilo Luiz Felber e Nara Judite Tassinari Felber, aos meus avós maternos Ênio Tassinari e Maria Mercedes da Jornada Tassinari, aos amigos que estão distantes Carlos Vinícius e Lucien, além de todos os **familiares e amigos de Uruguaiana e Porto Alegre**, que me incentivaram muito ao longo de minha caminhada acadêmica.

Um gigantesco Obrigado!

## RESUMO

A fibromialgia (FM) é uma síndrome em que os indivíduos apresentam dores generalizadas, acompanhadas de fadiga, alterações cognitivas, do humor e do sono. A complexidade de sintomas apresentados promove um debate contínuo sobre seus mecanismos fisiopatológicos, critérios diagnósticos e tratamentos. Pode-se classificar as alterações encontradas na FM como tipo “Top Down” (sem lesão periférica capaz de explicar os sintomas dolorosos) e “Bottom up” (mecanismo periférico de ativação dolorosa capaz de gerar alterações no sistema nervoso central). Estudos com FM são possíveis a partir de modelos experimentais capazes de permitir melhor compreensão sobre a neurobiologia e os mecanismos fisiopatológicos da doença, além de possível tratamentos para o problema. Modelos de FM utilizando reserpina e salina ácida (SA) tem sido amplamente utilizados, porém apresentam limitações quanto a expressão completa da complexidade da doença em humanos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da entrada sensorial periférica com SA injetada no músculo em ratos submetidos a um modelo de FM utilizando uma subdose de reserpina. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, aprovado previamente no comitê de ética (nº 6504200122). Os modelos de reserpina (3 doses a 1 mg/kg, subcutânea) e SA (duas injeções no músculo gastrocnêmio) já descritos na literatura foram caracterizados. Os animais, nos dois modelos, apresentaram nocicepção espontânea, redução da força e funcionalidade e redução da atividade antioxidante no músculo. Contudo, apenas os animais que receberam reserpina apresentaram hiperalgesia mecânica e térmica, redução da capacidade locomotora, aspecto tipo-depressivo, e aumento de citocinas inflamatórias no córtex pré-frontal, mostrando ser o mais aplicável para mimetizar características semelhantes à FM comparado ao modelo de SA. Ainda, verificou-se que tanto o efeito da reserpina, quanto da SA apresentaram respostas distintas em animais machos e fêmeas. Os ratos que receberam SA apresentaram nocicepção e redução de força. Os ratos dos dois grupos apresentaram alteração na memória de curta duração, tal comportamento não foi observado nas fêmeas. Já as fêmeas que receberam reserpina apresentaram comportamento do tipo depressivo, característica não observada nos machos deste grupo. Neste estudo, demonstrou-se alguns resultados positivos na caracterização de um modelo de FM induzido por injeção de uma subdose de reserpina associado à SA (incluindo um aumento na frequência de despertar). Contudo, eles não foram significativamente diferentes dos modelos de reserpina (1 mg/kg) ou de SA (duas injeções), clássicos modelos de FM. O conjunto de resultados apresentados em nosso trabalho confirma a eficácia do modelo experimentais de FM, dando ênfase ao modelo de reserpina, sendo capaz de mimetizar com maior precisão os sintomas da doença. Novos estudos devem ser conduzidos para melhorar a compreensão das diferenças entre os sexos, especialmente trabalhos com avaliações em nível molecular e neuroquímico.

**Palavras-chave:** Fibromialgia; reserpina; salina ácida; modelos animais.

## ABSTRACT

Fibromyalgia (FM) is a syndrome in which individuals experience widespread pain accompanied by fatigue, cognitive changes, mood alterations, and sleep disturbances. The complexity of the symptoms involved promotes an ongoing debate regarding its pathophysiological mechanisms, diagnostic criteria, and treatments. The alterations found in FM can be classified as "Top Down" (without peripheral injury capable of explaining the painful symptoms) and "Bottom Up" (peripheral mechanism of painful activation capable of generating changes in the central nervous system). Studies on FM are made possible through experimental models that allow for a better understanding of the neurobiology and pathophysiological mechanisms of the disease, as well as potential treatments for the problem. FM models using reserpine and acid saline (AS) have been widely used, but they have limitations in fully expressing the complexity of the disease in humans. In this context, the objective of the present study was to verify the effect of peripheral sensory input with AS injected into the muscle in rats subjected to an FM model using a subdose of reserpine. For this purpose, male and female Wistar rats were used, previously approved by the ethics committee (no. 6504200122). The reserpine models (3 doses at 1 mg/kg, subcutaneous) and AS (two injections into the gastrocnemius muscle), previously described in the literature, were characterized. The animals in both models showed spontaneous nociception, reduced strength and functionality, and reduced antioxidant activity in the muscle. However, only the animals that received reserpine showed mechanical and thermal hyperalgesia, reduced locomotor capacity, depressive-like behavior, and increased inflammatory cytokines in the prefrontal cortex, demonstrating it to be more applicable in mimicking FM-like characteristics compared to the AS model. Furthermore, it was found that both the effect of reserpine and AS produced distinct responses in male and female animals. Rats that received AS showed nociception and reduced strength. Rats from both groups showed impaired short-term memory, a behavior not observed in females. On the other hand, females that received reserpine exhibited depressive-like behavior, a characteristic not observed in males of this group. In this study, some positive results were demonstrated in characterizing an FM model induced by injection of a subdose of reserpine associated with AS (including an increase in waking frequency). However, they were not significantly different from the classic FM models of reserpine (1 mg/kg) or AS (two injections). The set of results presented in our work confirms the effectiveness of experimental FM models, with an emphasis on the reserpine model, as it is able to more accurately mimic the disease symptoms. Further studies should be conducted to improve understanding of the differences between sexes, particularly studies involving molecular and neurochemical evaluations.

**Keywords:** Fibromyalgia; reserpine; acid saline; animal models.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resumo esquemático da fisiopatologia da Fibromialgia. ....	22
Figura 2: Estrutura e função dos transportadores de monoaminas. ....	31
Figura 3: Desenho experimental da fase de caracterização dos modelos experimentais de fibromialgia. ....	41
Figura 4: Desenho experimental de um estudo com diferentes propostas de modelos experimentais de fibromialgia utilizando reserpina e salina ácida. ....	43
Figura 5: Avaliação de hiperalgesia mecânica e hiperalgesia térmica ao frio. ....	46
Figura 6: Teste de escavação. ....	49
Figura 7: Demonstração da análise comportamental do sono. ....	51
Figura 8: Avaliação de hiperalgesia mecânica e térmica de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida, demonstração da resposta de machos e fêmeas. ....	56
Figura 9: Avaliação da força e funcionalidade e de nocicepção espontânea de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida, demonstração da resposta de machos e fêmeas. ....	57
Figura 10: Avaliação de aspectos tipo-depressivo e de alterações de memória de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida, demonstração da resposta de machos e fêmeas. ....	58
Figura 11: Avaliação dos aspectos de ansiedade e mobilidade de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida, demonstração da resposta de machos e fêmeas. ....	60
Figura 12: Dosagem da expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em fêmeas submetidas aos modelos de Reserpina e Salina ácida. ....	61
Figura 13: Avaliação de hiperalgesia e nocicepção espontânea em animais de grupos experimentais que receberam Reserpina e Salina ácida em diferentes doses, isoladamente ou somados. ....	63
Figura 14: Avaliação da força de preensão plantar e funcionalidade em animais de grupos experimentais que receberam Reserpina e Salina ácida em diferentes doses, isoladamente ou somados. ....	64
Figura 15: Avaliação de aspectos tipo-depressivo e de alterações de memória de ratos submetidos aos diferentes modelos de fibromialgia induzidos por Reserpina e Salina ácida. ....	66
Figura 16: Avaliação dos aspectos de ansiedade e mobilidade de ratos submetidos aos diferentes modelos de fibromialgia induzidos por Reserpina e Salina ácida. ....	67
Figura 17: Avaliação dos aspectos de ansiedade e mobilidade de ratos submetidos aos diferentes modelos de fibromialgia induzidos por Reserpina e Salina ácida utilizando o Any-maze. ....	69
Figura 18: Ocupação do aparato de campo aberto pelos animais submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. ....	70
Figura 19: Capacidade de escavação dos animais submetidos aos modelos de indução de fibromialgia. ....	71
Figura 20: Análise de distúrbios do sono em animais submetidos aos modelos de indução de fibromialgia. ....	72

Figura 21: Concentração de citocinas inflamatórias no córtex de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida. ....	73
Figura 22: Concentração de citocinas inflamatórias no hipocampo de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida. ....	74
Figura 23: Dosagem dos níveis de estresse oxidativo e substâncias antioxidantes em animais submetidos a modelos de Reserpina e Salina ácida. ....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo da caracterização dos modelos de indução de fibromialgia estudado na presente pesquisa. ....	79
Tabela 2: Resumo da caracterização dos modelos de fibromialgia induzida por Reserpina e Salina ácida estudados na presente pesquisa. ....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – serotonina

5-HT<sub>1A</sub> – receptor de serotonina do tipo 1A

5-HT<sub>2A</sub> – receptor de serotonina do tipo 2A

ACh – acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

ASIC – canais iônicos sensíveis ao cálcio

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro

Ca<sup>2+</sup> – íons de cálcio

CAT – catalase

CEUA – Comissão de Ética do Uso de Animais

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CID – Classificação Internacional de Doenças

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COPC – condições de dor crônica sobrepostas

CRF – fator de liberação de corticotrofina

CRFr – receptor de fator de liberação de corticotrofina

DA - dopamina

dB – decibéis

DRG – gânglios da raiz dorsal

DTM – distúrbio temporomandibular

EEG – eletroencefalograma

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EMG – eletromiografia

ERK2 – quinase regulada por sinal extracelular

EROs – espécies reativas de oxigênio

FM – Fibromialgia

GDNF – fator neurotrófico derivado da glia

GPCR – receptores acoplados à proteína G

GSH – glutathiona

GSH-Px – glutationa peroxidase

IASP – International Association for the Study of Pain

IDG – índice de dor generalizada

IL-1 $\beta$  – interleucina 1-beta

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

LANDI – Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação

MCP1 – proteína quimioatraente de monócitos 1

MeSH – Medical Subject Headings

mg/kg – miligramas por quilograma

mg/mL – miligramas por mililitro

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

N/OFQ – nociceptina/Orfanina FQ

NaCl – Cloreto de Sódio

Nav – canais de sódio voltagem dependente

NGF – fator de crescimento nervoso

NLM – National Library of Medicine

NMDA - N-metil D-Aspartato

NOPr – receptor do peptídeo Nociceptina/Orfanina

NOR – noradrenalina

NOS – óxido nítrico-sintase

PG – pontos-gatilho

PGE2 – prostaglandina E2

PKC $\epsilon$  – proteína quinase C do tipo épsilon

RISS – estresse sonoro repetido e intermitente

RVM – bulbo rostral ventromedial da medula

SA – salina ácida

s.c. – subcutânea

SDM – Síndrome de dor miofascial

SFC – Síndrome de fadiga crônica

SII – Síndrome do intestino irritável

SNC – Sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

SS – estresse sonoro

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral

TrkB – receptor quinase B de tropomiosina

TRPM – potencial receptor transitório subfamília M

TRPV – potencial receptor transitório vaniloide

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

$\alpha$ CaMKII – proteína quinase II dependente de  $\alpha$ -calmodulina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA E INCLUSÃO DE ARTIGOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 FIBROMIALGIA</b> .....	<b>20</b>
3.2.1 INCIDÊNCIA .....	22
3.2.2 FISIOPATOLOGIA .....	23
<b>3.3 MODELOS DE FIBROMIALGIA</b> .....	<b>26</b>
3.3.1 MODELO INDUZIDO POR RESERPINA .....	26
3.3.2 MODELO DE FIBROMIALGIA INDUZIDO POR SALINA ÁCIDA .....	32
3.3.3 OUTROS MODELOS EXPERIMENTAIS DE FIBROMIALGIA .....	35
<b>4 MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2 TAMANHO DA AMOSTRA</b> .....	<b>39</b>
<b>4.3. CEGAMENTO DA PESQUISA E RANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>4.5. DELINEAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>40</b>
<b>4.6 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE FIBROMIALGIA</b> .....	<b>44</b>
4.6.1 INDUÇÃO DE FIBROMIALGIA POR RESERPINA .....	44
4.6.2 INDUÇÃO DE FIBROMIALGIA POR SALINA ÁCIDA .....	44
4.6.3 INDUÇÃO DE FIBROMIALGIA POR SALINA ÁCIDA ASSOCIADA À UMA SUBDOSE DE RESERPINA .....	44
<b>4.7 AVALIAÇÕES NOCICEPTIVAS</b> .....	<b>45</b>
4.7.1 HIPERALGESIA MECÂNICA .....	45
4.7.2 HIPERALGESIA TÉRMICA AO FRIO .....	45
4.7.3 ESCALA <i>GRIMACE</i> PARA RATOS .....	46
<b>4.8 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO MOTOR E COGNITIVO</b> .....	<b>47</b>
4.8.1 AVALIAÇÃO DA FORÇA DE PREENSÃO PLANTAR .....	47
4.8.2 TESTE DE CAMPO ABERTO .....	47
4.8.3 TESTE DE ESCAVAÇÃO .....	48
4.8.4 TESTE DO NADO FORÇADO .....	49
4.8.5 MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS .....	50
4.8.6 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DO SONO .....	50
<b>4.9 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS</b> .....	<b>52</b>
<b>4.10 RETIRADA DAS ESTRUTURAS</b> .....	<b>52</b>
<b>4.11 ANÁLISES BIOQUÍMICAS</b> .....	<b>52</b>
4.11.1 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA ANTIOXIDANTE ...	52
4.11.2 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FATORES DE CRESCIMENTO E CITOCINAS .....	53
<b>4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>54</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MODELOS DE FIBROMIALGIA</b> .....	<b>54</b>
<b>5.2 CARACTERIZAÇÃO DO MODELOS DE FIBROMIALGIA INDUZIDO POR INJEÇÃO DE UMA SUBDOSE DE RESERPINA ASSOCIADO À SALINA ÁCIDA</b>	<b>61</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>

<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>81</b>
<b>9 AGÊNCIA DE FOMENTO .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO I - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA NO USO DE ANIMAIS. ....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO II – DIRETRIZES ARRIVE 2.0.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO III – ESCALA GRIMACE PARA RATOS. ....</b>	<b>99</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

A Fibromialgia (FM) é uma síndrome de dor crônica de etiologia desconhecida, caracterizada principalmente por dor musculoesquelética generalizada. Além das dores, os indivíduos com FM também apresentam fadiga, alterações do humor, do sono e da cognição (YILMAZ; TAMAM, 2018). Estima-se que 5% da população mundial seja diagnosticada com FM ao longo da vida, números muito próximos da prevalência para o Brasil, onde 2,5% das pessoas apresentam FM, sendo a maior parte delas mulheres adultas entre 35 e 50 anos (CAVALCANTE; SAUER; CHALOT; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2006; HEYMANN; PAIVA; HELFENSTEIN JUNIOR; POLLAK *et al.*, 2010)

A etiologia da FM ainda não foi completamente elucidada. No entanto, evidências sugerem sensibilização do sistema nervoso central (SNC) levando ao quadro de hiperalgesia, alodínia e distúrbios autonômicos. Neste caso, a relação entre nocicepção e o seu processamento cognitivo parece resultar em uma percepção exagerada de dor (GALVEZ-SÁNCHEZ; REYES DEL PASO; DUSCHEK, 2018). Acredita-se que seu aparecimento seja resultante do desequilíbrio entre os mecanismos de transmissão de estímulos dolorosos periféricos e estímulos de inibição da dor. Casos de FM primária parecem ser um processo originário a nível central com repercussões periféricas, ou seja, indivíduos sem entrada nociceptiva contínua identificável; enquanto casos que envolvem um processamento central ocorrem como uma comorbidade em indivíduos com uma doença que tem entrada nociceptiva contínua identificável, um processo oriundo nas periferias levando alterações a nível central. Assim, a sensibilidade das respostas neurais pode ser modulada para cima ou para baixo, dependendo do objetivo (GALVEZ-SÁNCHEZ; REYES DEL PASO; DUSCHEK, 2018).

Modelos experimentais de FM em animais estão sendo grandemente utilizados. O modelo mais utilizado na atualidade utiliza reserpina para mimetizar a FM porque a droga compete com as monoaminas e bloqueia seus transportadores impossibilitando, assim, a estocagem dos neurotransmissores nas vesículas sinápticas e impedindo a sua liberação na fenda sináptica (NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009; SÜDHOF; STARKE, 2008). Como resultado deste processo, as monoaminas acabam

ficando no citosol onde são degradadas, portanto, um dos efeitos adversos do uso da reserpina é a depressão, resultado da depleção das monoaminas no organismo (GOLAN; SCHREIBER; AVISSAR, 2009). O sistema monoaminérgico, especialmente a serotonina, está intimamente relacionado a fatores neurotróficos. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é a neurotrofina principal e mais abundante no encéfalo e está criticamente envolvido na manutenção da neurogênese neuronal, sobrevivência e plasticidade. Além disso, a sinalização do BDNF é crucial para o funcionamento normal dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, que estão envolvidos nas atividades antidepressivas. Nesse sentido, alterações na conversão de proBDNF em BDNF, juntamente com a redução da imunorreatividade do receptor quinase B de tropomiosina (TrkB), conforme observado em animais tratados com reserpina, poderia explicar os comportamentos semelhante à depressão encontrados nos animais (ROVERSI; DE DAVID ANTONIAZZI; MILANESI; ROSA *et al.*, 2019; TSYBKO; IL'CHIBAEVA; KONDAUROVA; BAZOVKINA *et al.*, 2014).

A FM frequentemente coexiste com outras condições de dor crônica com características clínicas sobrepostas. O termo 'síndromes de sensibilidade central' foi cunhado para descrever este grupo de condições, que clinicamente se apresentam como uma "resposta de amplificação a vários estímulos nociceptivos, não nociceptivos e ambientais", dentre eles incluindo-se a Síndrome de Dor Miofascial (SDM) (YUNUS, 2008). Recentemente, o termo 'condições de dor crônica sobrepostas' (COPC) também foi usado e descreve um conjunto semelhante de distúrbios, como síndrome da fadiga crônica (SFC), síndrome do intestino irritável (SII) e distúrbio temporomandibular (DTM). Grandes estudos populacionais mostraram que estas condições frequentemente coexistem, sugerindo uma via patológica comum impulsionada pelo SNC. A apresentação clínica é diversa e provavelmente influenciada por um conjunto de fatores de risco de um indivíduo, embora como isso leva ao desenvolvimento dessas condições sobrepostas ainda não esteja claro. No entanto, é importante reconhecer quando uma combinação de sintomas é provavelmente mediada centralmente para evitar testes desnecessários e iniciar um tratamento eficaz para o paciente (MAIXNER; FILLINGIM; WILLIAMS; SMITH *et al.*, 2016; MEZHOV; GUYMER; LITTLEJOHN, 2021).

A FM aparece como paradigma de dor difusa crônica e a SDM como representante de dor localizada, no entanto, não é incomum a coexistência de ambos os problemas em um mesmo indivíduo. A SDM é frequentemente subdiagnosticada e

consequentemente subtratada, tornando-se uma das principais causas de dor muscular referida pela população mundial. Estima-se que esta queixa atinja até 80% da população em algum período da vida tanto de forma aguda quanto crônica (BENNETT; GOLDENBERG, 2011; BORG-STEIN; SIMONS, 2002; FLECKENSTEIN; ZAPS; RÜGER; LEHMEYER *et al.*, 2010).

Nas condições crônicas, a SDM surge como uma forma de mialgia, acometendo músculos, tecido conectivo e fáscia muscular, gerando espasmos musculares, hiperalgesia local e irradiada, redução de força e de mobilidade (BORG-STEIN; SIMONS, 2002). Os sintomas da SDM estão relacionados à presença de nódulos dolorosos hipersensíveis e palpáveis presentes em bandas musculares tensas conhecidos como pontos-gatilho (PG) miofasciais (SIMONS; MENSE, 2003). A tensão muscular gerada pelos PGs desencadeia o desalinhamento estrutural da fáscia, alterando a biomecânica muscular e consequentemente diminuindo a capacidade de geração de força e a coordenação motora (MYERS; HILLMAN, 2004). Estes PGs miofasciais são a principal característica da SDM, pois não apresentam caráter inflamatório (SIMONS; TRAVELL; SIMONS, 1999). Sua etiologia pode ser resultado de posturas incorretas, sobrecarga de treinamentos, tensão muscular ou de condições clínicas pré-existentes (SHAH; THAKER; HEIMUR; AREDO *et al.*, 2015).

A formação dos PGs parece estar relacionada a razão temporal da atividade muscular, ou seja, o tempo de repouso das unidades motoras pode levar à crise energética e consequentemente aos sintomas de dor e limitação funcional. Sendo assim, situações de fraqueza muscular ou sobrecarga, como induzidas por síndromes generalizadas – como a FM, podem favorecer o abreviamento do tempo de repouso das unidades motoras e induzir uma contração prolongada destas estruturas (MINERBI; VULFSONS, 2018). Estudos observaram deficiência de substâncias antioxidantes em pacientes que apresentavam PG, sugerindo um estado oxidativo constante. A dor pode ser mantida e/ou iniciada indiretamente pelo aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial e uma diminuição na atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) no músculo ou na fáscia. De forma importante, essas alterações são conhecidas por estarem implicadas na etiologia da dor na FM (AKKUŞ; NAZIROĞLU; ERIŞ; YALMAN *et al.*, 2009; FISCHER; HORVATH; KRISMER; GNAIGER *et al.*, 2018; SÁNCHEZ-DOMÍNGUEZ; BULLÓN; ROMÁN-MALO; MARÍN-AGUILAR *et al.*, 2015).

Portanto, indivíduos que apresentam dor muscular ocasionada pela formação de PGs estão constantemente sob estresse oxidativo, resultando em um equilíbrio delicado entre os níveis de EROs e as capacidades antioxidantes da célula, podendo o desequilíbrio deste sistema levar à apoptose induzido por EROs (AKKUŞ; NAZIROĞLU; ERIŞ; YALMAN *et al.*, 2009; NAZIROĞLU; KILINÇ; UĞUZ; ÇELIK *et al.*, 2010; SÁNCHEZ-DOMÍNGUEZ; BULLÓN; ROMÁN-MALO; MARÍN-AGUILAR *et al.*, 2015). Outro mecanismo que promove o desenvolvimento da dor muscular tem relação com a ativação de canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), especialmente o subtipo 3 (ASIC3), indicado em estudos prévios por desempenhar um papel crítico no desenvolvimento de hiperalgesia (DESANTANA; SLUKA, 2008).

Desta forma, embora a literatura tenha nos apresentado vários estudos vinculados ao tema, acreditamos que um modelo de dor associando reserpina em uma menor dose – comparado a utilizada nas pesquisas de Nagakura e colaboradores (2009) - a uma dor muscular induzida por salina ácida – estabelecido pelo grupo de Sluka *et al.* (2001) - sejam capazes de mimetizar um modelo de Fibromialgia mais fidedigno. Pretendemos através deste projeto observar as alterações comportamentais, funcionais e bioquímicas apresentadas após a indução de dor pelo modelo proposto.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Os modelos de FM com administração de reserpina e/ou salina ácida são uma ferramenta útil para estudar os mecanismos subjacentes à FM em animais e para avaliar a eficácia de diferentes intervenções terapêuticas. No entanto, é importante lembrar que esses modelos apresentam limitações a ponto de não refletirem completamente a complexidade da doença em humanos.

Diante desse contexto, seria possível um modelo experimental de fibromialgia utilizando-se uma dose de reserpina menor que a proposta por Nagakura e colaboradores (2009), associado a um modelo de entrada nociceptiva periférica, como a injeção de salina ácida intramuscular proposta por Sluka e colaboradores (2001), mimetizar as vias da fibromialgia primária e secundária, respectivamente? Portanto, no presente trabalho buscou-se verificar o efeito da entrada sensorial periférica com salina ácida injetada no músculo em ratos submetidos a um modelo de fibromialgia

utilizando reserpina com dose “submáxima”, possibilitando a observação da intensidade da resposta nociceptiva.

Desta maneira, partimos da hipótese de que a combinação de salina ácida intramuscular com a injeção de uma subdose de reserpina em ratos machos e fêmeas é capaz de mimetizar o comportamento “top down” e “botton up” proposto na fisiopatologia da fibromialgia, resultando em sintomas semelhantes aos observados em pacientes. Além disso, espera-se que a combinação possa ser utilizada como um modelo experimental para o estudo dos mecanismos subjacentes à fibromialgia e para o desenvolvimento de novas terapias para a doença.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da combinação de salina ácida intramuscular com uma subdose de reserpina em ratos machos e fêmeas em relação à fibromialgia.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar os modelos de fibromialgia induzidos por salina ácida intramuscular e por reserpina em ratos machos e fêmeas;
2. Avaliar a hiperalgesia mecânica e ao frio, a nocicepção espontânea, a funcionalidade e força de preensão em ratos machos e fêmeas submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia por salina ácida e por reserpina;
3. Averiguar o comportamento tipo depressivo, ansiedade e memória de ratos machos e fêmeas submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia por salina ácida e por reserpina;
4. Avaliar o montante de BDNF no (i) hipocampo e no (ii) córtex pré-frontal de fêmeas submetidas aos modelos experimentais de fibromialgia por salina ácida e por reserpina;
5. Padronizar um modelo animal experimental de fibromialgia através da combinação de salina ácida intramuscular com uma subdose de reserpina em ratos machos e fêmeas.

6. Avaliar o efeito sobre a hiperalgesia mecânica e ao frio, nocicepção espontânea, funcionalidade, força de preensão, atividade motora exploratória em animais submetidos ao modelo de FM proposto neste estudo;
7. Avaliar o efeito sobre o comportamento tipo depressivo, tipo ansioso, alterações de memória e distúrbios do sono em animais submetidos aos modelos de FM propostos neste estudo;
8. Avaliar a eficácia do modelo experimental proposto comparando com modelos experimentais de FM com salina ácida intramuscular e reserpina;
9. Analisar parâmetros bioquímicos no (i) músculo (parâmetros de dano oxidativo) e (ii) encéfalo (citocinas no hipocampo e córtex pré-frontal) de ratos submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia e do modelo proposto com subdose de reserpina associado à indução de dor muscular por salina ácida.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ESTRATÉGIA DE BUSCA E INCLUSÃO DE ARTIGOS

A revisão de literatura para desenvolvimento desta tese foi realizada através da base de dados da MEDLINE. Sua escolha se deu pela interface de consulta amplamente conhecida, sendo a mais utilizada no mundo, e pelo grande acervo na área biomédica. A plataforma de pesquisa utilizada foi o PubMed, da National Library of Medicine – NLM, que proporciona livre acesso aos usuários (VOLPATO, 2013).

O idioma utilizado para a pesquisa foi o Inglês, sendo os descritores do Medical Subject Headings – MeSH utilizados para indexação dos artigos na plataforma. As palavras chaves utilizadas foram: “*Fibromyalgia*”, “*models, animal*” combinadas respectivamente com “*hyperalgesia*”, “*nociception*”, “*depression*”, “*anhedonia*”, “*anxiety*”, “*locomotion*” e “*motor activity*”.

Foram incluídos no estudo artigos originais com experimentos realizados em ratos ou camundongos e que tenham sido publicados nos últimos 20 anos. Ainda assim, foram utilizados ao longo do texto artigos que estivessem fora do período proposto, mas que apresentam referências fundamentais para o tema. Após a busca realizada na base de dados, os artigos foram selecionados primeiramente pela leitura do título, seguido da leitura do resumo e posterior leitura do estudo na íntegra. Artigos que não se adequavam à proposta desta tese foram desprezados.

O objetivo desta revisão de literatura foi formular uma explanação descrevendo de forma científica a fibromialgia, o que se sabe sobre a sua fisiopatologia e as alterações sistêmicas promovidas por ela. Também foram expostos os modelos animais de fibromialgia mais utilizados na pesquisa básica, além de seus efeitos sobre a nocicepção, a atividade locomotora e comportamentos do tipo ansiedade/depressivo. Desta maneira, buscou-se contemplar o que sabemos até o momento sobre a temática desta tese.

### 3.2 FIBROMIALGIA

A FM é uma síndrome complexa descrita como um problema musculoesquelético ligado a transtornos de sintomas somáticos. A etiologia indefinida da FM promove um debate contínuo sobre seus mecanismos fisiopatológicos, critérios diagnósticos e tratamentos (CAVALCANTE; SAUER; CHALOT; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2006; YILMAZ; TAMAM, 2018).

Embora apresente uma sintomatologia complexa, a FM é considerada uma dor crônica generalizada, classificada como dor crônica primária ou síndrome fibromiálgica, de acordo com a Classificação Internacional de Doenças 11 (CID-11) (TREEDE; RIEF; BARKE; AZIZ *et al.*, 2019). Segundo a Associação Internacional do Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*), a dor é uma sensação ou experiência emocional desagradável associada à lesão tecidual, real ou potencial, ou descrita em termos desta lesão (RAJA; CARR; COHEN; FINNERUP *et al.*, 2020). Nos últimos anos, a IASP passou a utilizar o termo dor nociplástica para classificar condições dolorosas como a FM, por se tratar de uma condição clínica onde não há dano tecidual aparente, nem doença ou lesão que promovam a ativação dos nociceptores (KOSEK; COHEN; BARON; GEBHART *et al.*, 2016). O Colégio Americano de Reumatologia utiliza como critérios diagnósticos no para FM o indivíduo que apresentar: (1) dor generalizada (dor em pelo menos 4 de 5 regiões do corpo); (2) os sintomas devem estar presentes por pelo menos três meses; (3) Índice de Dor Generalizada (IDG)  $\geq 7$  e Escala de Intensidade dos Sintomas (EIS)  $\geq 5$  ou IDG 4-6 com escore da EIS  $\geq 9$ ; (4) o diagnóstico de FM não necessita excluir a presença de outras doenças clinicamente importantes (WOLFE; CLAUW; FITZCHARLES; GOLDENBERG *et al.*, 2016).

Indivíduos com FM apresentam dor crônica e espontânea em músculos ou articulações, sensibilidade aumentada ao toque ou dígito-pressão e aos estímulos nocivos, hipersensibilidade térmica ao calor e ao frio e, em alguns casos, hipersensibilidade a estímulos externos gerados por produtos químicos, sons, luzes e odores (CLAUW, 2014; CLAUW, 2015a; GALVEZ-SÁNCHEZ et al., 2018; LARSON et al., 2014; LITTLEJOHN E GUYMER, 2018; NAPADOW et al., 2010; SARZI-PUTTINI et al., 2020; SILVA, 2018). Embora menos frequente, alguns pacientes apresentam percepção subjetiva de edema em extremidades similares à artrite, com sensação de rigidez matinal, e sintomas similares à dor neuropática, com dor em queimação e fíncadas (HÄUSER et al., 2017; LITTLEJOHN E GUYMER, 2018; LITTLEJOHN, 2015).

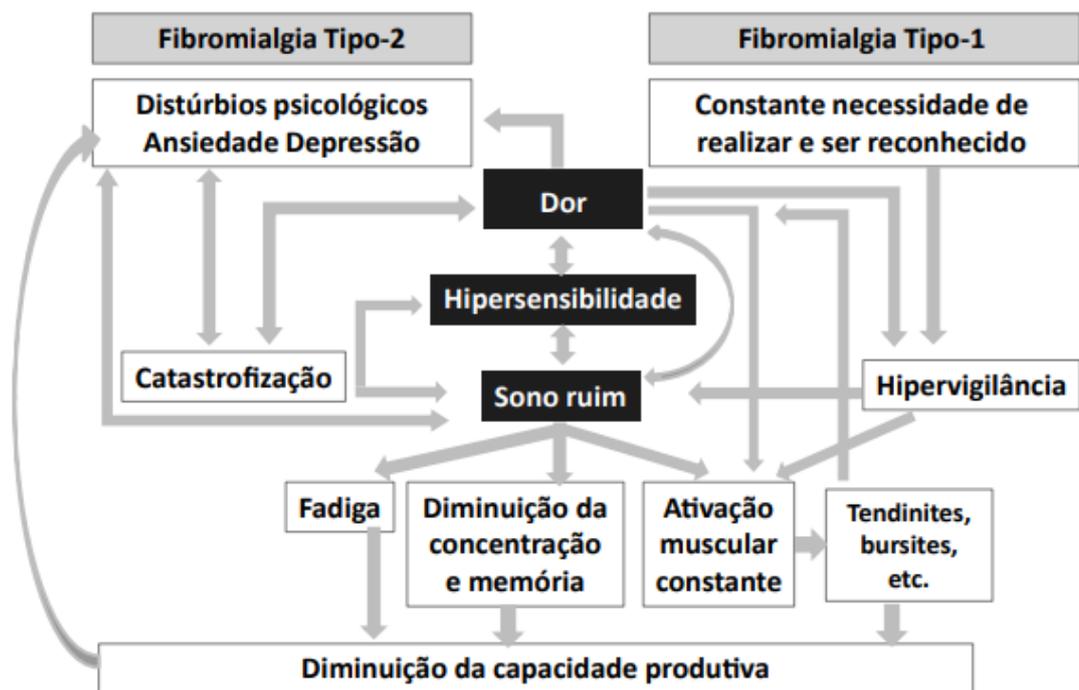
Dentre os sintomas não dolorosos, cabe destacar os distúrbios do sono e a fadiga, sendo ambos frequentemente referidos pelos pacientes, considerados critério diagnóstico para a FM. Os distúrbios do sono são relatados por cerca de 90% dos pacientes e podem ser caracterizados por insônia, despertares frequentes e sono não restaurador ou insuficiente (SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020). O sono anormal pode vir acompanhado de comorbidades como déficit de concentração e memória, distúrbios de humor e disfunções temporomandibulares, cefaleia e enxaqueca, além da exacerbação de sintomas dolorosos, gerando um ciclo onde os distúrbios do sono possuem uma relação de causalidade e consequência com a dor (CHOY, 2015; LITTLEJOHN; GUYMER, 2018; SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020).

A sensação de fadiga relatada pelos pacientes pode ser física ou mental, afetando aproximadamente 70% destes. O cansaço referido varia de uma intensidade leve a grave e frequentemente as queixas estão associadas à dor muscular, fraqueza, restrições de mobilidade e em alguns casos, dificuldade para realizar respirações profundas (CHOY, 2015; LITTLEJOHN; GUYMER, 2018; PARK; NIERMANN; OLSEN, 2000; SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020). Outras comorbidades apresentadas com menor frequência são alterações no sistema gastrointestinais, cardiovasculares e distúrbios geniturinários (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; CLAUW, 2015; SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020).

Diante desta complexa sintomatologia, cabe ressaltar que os paciente não apresentam os sintomas em sua totalidade, possuindo características clínicas distintas que podem ser potencializadas por mudanças climáticas, tensão e estresse

físico ou mental (HÄUSER; PERROT; SOMMER; SHIR *et al.*, 2017; SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020). A pluralidade de sintomas e características apresentada pela fibromialgia, que está expressa na Figura 1, faz com que o reconhecimento da síndrome seja falho em ambientes clínicos. Mesmo com a definição de critérios clínicos para diagnóstico através de variáveis biológicas e psicossociais, a falta de biomarcadores, os diversos critérios de classificação e de reconhecimento e as inúmeras condições clínicas adicionais com aspectos semelhantes fazem com que a elaboração do diagnóstico de fibromialgia seja prejudicada (AKINTAYO; ADELOWO; AHMED; OLAFIMIHAN *et al.*, 2020; AZEVEDO, 2019; HÄUSER; ABLIN; FITZCHARLES; LITTLEJOHN *et al.*, 2015; HÄUSER; PERROT; SOMMER; SHIR *et al.*, 2017; SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020).

Figura 1: Resumo esquemático da fisiopatologia da Fibromialgia.



Fonte: (AZEVEDO, 2019).

### 3.2.1 INCIDÊNCIA

Apesar das dificuldades encontradas na elaboração do diagnóstico, a FM é a terceira condição musculoesquelética mais frequente a nível mundial, afetando

aproximadamente 3% da população, apresentando predominância entre as mulheres, com uma proporção de 3:1 comparado aos homens (SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020). O desenvolvimento da FM pode ocorrer em qualquer idade, inclusive na infância, sendo a faixa etária entre os 50 e 60 anos a mais acometida a nível global (CLAUW, 2014; SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020).

No Brasil, a parcela da população diagnosticada com FM até 2005 variava entre 0,7 e 4,4% e, mesmo que estudos recentes apontem para o crescimento dos casos, a prevalência mais recente encontrada foi estimada em 2% da população (MARQUES; SANTO; BERSSANETI; MATSUTANI *et al.*, 2017; SOUZA; PERISSINOTTI, 2018). Existem indicativos de que a incidência esteja relacionada com fatores socioeconômicos e culturais onde o ambiente pode ter influência sobre seu diagnóstico e tratamento e, sendo o Brasil um país com desigualdade de acesso à saúde, os números da fibromialgia podem ser mascarados nos últimos anos pela associação destas características sociais à dificuldade de tratamento adequado imposta pela pandemia do corona vírus (DE ALBUQUERQUE; BERARDINELLI; LOPES; DE ALBUQUERQUE SANTOS *et al.*, 2022).

Portanto, a incidência de FM pode ser substancialmente enganosa, subestimando o número de paciente que sofrem com a doença e, conseqüentemente, diminuindo o investimento em políticas públicas, acesso aos serviços de diagnóstico e estratégias de tratamento (HÄUSER; PERROT; SOMMER; SHIR *et al.*, 2017).

### 3.2.2 FISIOPATOLOGIA

Por se tratar de uma síndrome complexa que apresenta sinais e sintomas variados, acredita-se que a fisiopatologia da FM envolva uma extensa cadeia de alterações nos sistemas orgânicos. O SNC é apontado como um dos principais envolvidos no desenvolvimento dos sintomas e comorbidades, sendo considerado um ponto chave para a compreensão da FM. Pacientes com FM apresentam um processamento sensorial específico para dor aperfeiçoado no SNC, e maior ativação das células da glia, indicando que as alterações patológicas não estão confinadas à área do corpo em que o paciente refere dor no momento. Além disso, ocorre um aumento de neurotransmissores excitatórios como glutamato e substância P, e redução de neurotransmissores inibitórios como aminas biogênicas e ácido  $\gamma$ -

aminobutírico (GABA). A neuro inflamação promovida por essas alterações gera mudanças na conectividade do sistema nervoso, remodelando vias convencionais de neurotransmissores como a dopamina, serotonina e noradrenalina, promovendo uma série de outros sintomas fisiológicos e alterações comportamentais (ALBRECHT; FORSBERG; SANDSTRÖM; BERGAN *et al.*, 2019; CLAUW, 2015; HÄUSER; ABLIN; FITZCHARLES; LITTLEJOHN *et al.*, 2015; LÓPEZ-SOLÀ; WOO; PUJOL; DEUS *et al.*, 2017; SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020).

Existem duas grandes hipóteses relacionadas à FM: a fibromialgia do tipo 1, que acomete pessoas que não apresentam lesão periférica com dano nociceptivo periférico que explicam os sintomas dolorosos e, a fibromialgia tipo 2, cujo princípio é insidioso e associada as alterações periféricas da dor nomeadas de mecanismo de ativação doloroso, com alterações centrais subsequentes desencadeando a cronicidade da dor. De qualquer forma, é possível que, no primeiro caso, o processo possa ser classificado como mudanças do tipo “Top Down” e no segundo como mudanças do tipo “Botton Up” (RYABKOVA; CHURILOV; SHOENFELD, 2019).

A fibromialgia tipo 1 ocorre devido a alterações reversíveis no sistema nervoso conhecidas como "dor nociplástica". Ocorrem modificações que amplificam a reatividade do sistema de controle nociceptivo e antinociceptivo, que infere quais estímulos devem ser interpretados como dolorosos e quais não devem. Um desequilíbrio entre esses sistemas pode ocorrer como resultado do aumento dos níveis de substância P (um neurotransmissor que medeia a facilitação da dor particularmente somação temporal); disponibilidade diminuída de receptores  $\mu$ -opióides em regiões cerebrais envolvidas na modulação da dor (incluindo o núcleo accumbens, amígdala e cíngulo dorsal); níveis mais baixos de neurotransmissores noradrenérgicos e serotoninérgicos e GABAérgicos; diminuição da atividade dopaminérgica; além do aumento substancial de neurotransmissores excitatórios em áreas cerebrais importantes para a modulação da dor (SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020).

Diversos mediadores algogênicos são envolvidos no processo de sensibilização periférica. Na SDM, a contração muscular prolongada pela formação do PG promove a formação de um ambiente ácido por meio da isquemia local e redução do pH. A acidez local reduz a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e aumenta a ação da acetilcolina (ACh), permitindo a contração prolongada e a formação de um ciclo vicioso para manutenção deste ambiente alterado. O peptídeo

relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) tem sua liberação facilitada, aumentando o número de receptores ACh, implementando assim a formação do PG (BRON; DOMMERHOLT, 2012). A formação do PG impede a atividade da enzima ATPase, impossibilitando a retirada do cálcio presente nas fibras musculares, ocorrendo um acúmulo de cálcio local e consequente manutenção da contração muscular. Estas condições tornam o citoplasma um ambiente citotóxico, estimulando possivelmente uma resposta inflamatória com aumento da bradicinina, CGRP, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), substância P, glutamato, interleucinas inflamatórias, noradrenalina e serotonina (SIMONS, 2002). Este processo promove redução do limiar de excitabilidade dos nociceptores, fazendo com que estímulos menos intensos sejam capazes de ativá-los e enviar informações nociceptivas ao SNC (CAVALCANTI; MADDALENA, 2003).

De outra maneira, a fibromialgia tipo 2 ou “Botton Up” é causada por alterações reais no sistema nervoso, apresentadas na forma de “dor neuropática”. Estas mudanças podem ser oriundas da periferia e podem iniciar ou potencializar o processo de dor nociplástica, em virtude a hiperexcitabilidade das fibras nociceptoras do tipo C e pela disfunção e neuropatia observada nas pequenas fibras, podendo através destas alterações explicar os relatos de disestesia apresentados pelos pacientes com FM (BORCHERS; GERSHWIN, 2015; FASOLINO; DI STEFANO; LEONE; GALOSI *et al.*, 2020; SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020; SERRA; COLLADO; SOLA; ANTONELLI *et al.*, 2014).

Ainda que ambas as modificações contribuam de simultaneamente ou de forma isolada para o surgimento e o curso da FM, ainda não é possível afirmar a ordem dos fenômenos, pois existe ainda a presença de fatores imunológicos e inflamatórios associados as células gliais capazes de promover e manter a sensibilização central. Este mecanismo promove a neuro inflamação do córtex cerebral através da produção de quimiocinas e citocinas como interleucina-6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e TNF- $\alpha$ , promovendo redução do limiar nociceptivo aumentando a sensibilidade à dor quando expostos à estímulos álgico, térmicos e até mesmo sonoros (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; LITTLEJOHN; GUYMER, 2018; UCEYLER; HAUSER; SOMMER, 2011).

As vias que explicam a fibromialgia ainda podem apresentar mecanismos adicionais. A disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo são características comuns em análises de estruturas de pacientes com fibromialgia, impactando diretamente na

sensibilização periférica e central através do aumento das EROs e redução das enzimas antioxidantes (CORDERO; ALCOGER-GOMEZ; CANO-GARCIA; DE MIGUEL *et al.*, 2011; CORDERO; DE MIGUEL; MORENO FERNANDEZ; CARMONA LOPEZ *et al.*, 2010; MEEUS; NIJS; HERMANS; GOUBERT *et al.*, 2013; SÁNCHEZ-DOMÍNGUEZ; BULLÓN; ROMÁN-MALO; MARÍN-AGUILAR *et al.*, 2015). Outra proposta para a FM tem relação com questões endócrinas e nutricionais, o desequilíbrio nos níveis de minerais essenciais e vitaminas podem apresentar relação com a patologia e, juntamente com alterações em níveis hormonais, podem apresentar correlação inversa a intensidade da dor e sinais de fadiga (BJORKLUND; DADAR; CHIRUMBOLO; AASETH, 2018; SCHERTZINGER; WESSON-SIDES; PARKITNY; YOUNGER, 2018).

A fisiopatologia da FM ainda é um desafio para os pesquisadores e profissionais da saúde, uma melhor compreensão destes mecanismos e a compreensão sobre a sintomatologia podem resultar em tratamentos direcionados e terapias eficaz. Uma maneira de explorarmos esta área se dá por meio dos modelos experimentais de FM, que exploraremos no capítulo a seguir.

### 3.3 MODELOS DE FIBROMIALGIA

A diversidade de sintomas e sinais clínicos apresentados por doenças como a FM, fez com que, ao longo dos anos, pesquisadores desenvolvessem modelos animais experimentais capazes de permitir melhor compreensão sobre a neurobiologia e os mecanismos fisiopatológicos destas doenças. Os estudos desenvolvidos a partir do século XXI permitiram identificar vias, receptores, enzimas e testar fármacos para o tratamento da FM (WOOLF, 2020). Neste capítulo, descreveremos os principais modelos utilizados e suas principais similaridades com as alterações promovidas pela fibromialgia a nível central e periférico.

#### 3.3.1 MODELO INDUZIDO POR RESERPINA

O modelo experimental de FM induzido por reserpina foi descrito pela primeira vez por Nagakura e colaboradores (2009), sendo capaz de apresentar sintomas dolorosos e comorbidades da doença (NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009).

### 3.3.1.1 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE FIBROMIALGIA POR RESERPINA

O protocolo consiste na administração de três doses subcutâneas de reserpina, uma vez ao dia por três dias consecutivos, utilizando ratos e camundongos. O veículo da reserpina é geralmente preparado com água destilada ou solução salina 0,9% adicionada de ácido acético (0,1 – 0,5%) para aumentar a solubilidade, sendo utilizadas doses de 0,25 a 1 mg/kg pra camundongos e ratos. A via intraperitoneal foi descrita em experimentos prévios, porém acredita-se que a via subcutânea apresente melhor resposta aos efeitos promovidos pela reserpina (NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009; SOUSA; BIRMANN; BALDINOTTI; FRONZA *et al.*, 2018; XU; ZHANG; SHAO; RUAN *et al.*, 2013).

### 3.3.1.2 SINAIS CLÍNICO E COMORBIDADES

O modelo experimental de FM induzida por reserpina tem como diferencial a capacidade de desenvolver os principais sintomas relatados por pacientes na prática clínica, sendo considerado um modelo útil para desenvolvimento de estudos sobre o tema, sendo capaz de mimetizar as alterações sensoriais e nociceptivas, e as comorbidades da doença (NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009).

Dentre os sintomas sensoriais, o modelo utilizando reserpina é capaz de promover a redução do limiar de resposta tátil em ratos, sendo identificada como alodínia mecânica. Este mesmo modelo é capaz de desencadear a hiperalgesia mecânica muscular (hiperalgesia primária) e cutânea (hiperalgesia secundária), caracterizadas respectivamente pela diminuição do limiar de pressão do músculo gastrocnêmio e pela redução do limiar de pressão da pata (ARORA; KUHAD; TIWARI; CHOPRA, 2011; DE LA LUZ-CUELLAR; RODRIGUEZ-PALMA; FRANCO-ENZASTIGA; SALINAS-ABARCA *et al.*, 2019; FERREIRA; TECHERA ANTUNES; REBELO; DA SILVA *et al.*, 2020; NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009). Os ratos tratados com reserpina também apresentaram hiperalgesia térmica ao calor e ao frio (HERNANDEZ-LEON; FERNANDEZ-GUASTI; MARTINEZ; PELLICER *et al.*, 2019; NAGAKURA; TAKAHASHI; NOTO; SEKIZAWA *et al.*, 2012; OLIVEIRA; MARCONDES SARI; ZBOROWSKI; PRADO *et al.*, 2016; SOUSA; BIRMANN; BALDINOTTI; FRONZA *et al.*, 2018). A nocicepção espontânea também pode ser observada em ratos tratados com reserpina, tanto através da expressão facial como

do comportamento social dos animais (BRUSCO; JUSTINO; SILVA; FISCHER *et al.*, 2019; NAGAKURA; MIWA; YOSHIDA; MIURA *et al.*, 2019; TANEI; MIWA; YOSHIDA; MIURA *et al.*, 2020).

Um dos pontos observados para o uso do modelo de FM induzido pela reserpina está relacionado à duração dos sintomas, apresentando variação de durabilidade e intensidade de acordo com a cepa e o sexo dos animais. Nagakura e colaboradores (2009) em estudo com ratos Sprague–Dawley tratados com reserpina 1mg/Kg demonstraram que o limiar de retirada da pata no teste de preensão se manteve menor em ratos machos e fêmeas por até 10 ou 7 dias, respectivamente. Neste mesmo estudo, o limiar de sensibilidade tátil avaliado com filamentos de Von Frey se manteve reduzido por 21 dias em machos e 14 em fêmeas, resultado semelhante ao observado por Brusco e colaboradores (2019) em estudo com camundongos Swiss, onde o limiar de sensibilidade tátil manteve-se reduzido por 14 dias. Quando avaliados animais da espécie Wistar tratados com reserpina 1mg/Kg, os sintomas algícos realizando o teste de preensão da pata e limiar de retirada da pata não obtiveram diferenças entre os sexos, perdurando por 14 dias em ambos (BRUSCO; JUSTINO; SILVA; FISCHER *et al.*, 2019; DE LA LUZ-CUELLAR; RODRIGUEZ-PALMA; FRANCO-ENZASTIGA; SALINAS-ABARCA *et al.*, 2019; NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009).

Para reforçar o modelo proposto por Nagakura e colaboradores (2009), vários estudos têm apresentado outros sintomas referidos na prática clínica e considerados comorbidades relacionada à FM (SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020). Dentre as principais comorbidades, são observados fadiga, redução da força muscular, comportamento do tipo depressivo e tipo ansiolítico, além de alterações no sono, sugerindo comprometimento de consolidação da memória e déficits cognitivos após o tratamento com reserpina (ARORA; KUHAD; TIWARI; CHOPRA, 2011; BRUM, E. D. S.; FIALHO, M. F. P.; FISCHER, S. P. M.; HARTMANN, D. D. *et al.*, 2020; NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009; OLIVEIRA; MARCONDES SARI; ZBOROWSKI; PRADO *et al.*, 2016; SOUSA; BIRMANN; BALDINOTTI; FRONZA *et al.*, 2018; XU; ZHANG; SHAO; RUAN *et al.*, 2013).

### 3.3.1.3 ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

O modelo de FM induzido pela reserpina é capaz de promover alterações fisiopatológicas contundentes a ponto de assemelhar-se aos mecanismos periféricos e centrais observados em pacientes. Dentre as alterações esperadas, a inflamação promovida pelo modelo pode ser alicerçada no aumento de citocinas como a interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) TNF- $\alpha$  em animais tratados com reserpina (KAUR; SINGH; SINGH; BHATTI *et al.*, 2019; SINGH; KAUR; GARG; SINGH *et al.*, 2020). Outros fatores observados em estudos prévios são o aumento de peptídeos relacionados à bradicinina e ativação das fibras C peptidérgicas, dando base aos sinais de inflamação neurogênica (BRUSCO; JUSTINO; SILVA; FISCHER *et al.*, 2019; SINGH; KAUR; GARG; SINGH *et al.*, 2020; TAGUCHI; KATANOSAKA; YASUI; HAYASHI *et al.*, 2015).

A neuro inflamação é reforçada pela ativação de células imunes em tecidos do SNC, como mastócitos e células gliais. Estas células são responsáveis pela liberação de mediadores pró-inflamatórios como o fator de crescimento nervoso (NGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), sendo observado ainda aumento de citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), bradicinina e níveis de substância P no córtex e hipocampo dos animais. Sendo assim, esses achados reforçam a presença de processo neuro inflamatório no modelo de FM induzido por reserpina (ARORA; KUHAD; TIWARI; CHOPRA, 2011; DE LA LUZ-CUELLAR; RODRIGUEZ-PALMA; FRANCO-ENZASTIGA; SALINAS-ABARCA *et al.*, 2019; TAGUCHI; KATANOSAKA; YASUI; HAYASHI *et al.*, 2015; XU; ZHANG; SHAO; RUAN *et al.*, 2013).

Sensibilização periférica pode ser observada no modelo da reserpina, ocorrendo a redução da densidade de fibras do tipo C concomitante a redução do limiar de ativação das fibras remanescentes. O tratamento com reserpina também demonstrou aumento da expressão de mRNA de ASIC3 e aumento do receptor N/OFQ (NOPr) acoplado à proteína G nos gânglios da raiz dorsal (DRG) em roedores (BRUSCO; JUSTINO; SILVA; FISCHER *et al.*, 2019; DAGNINO; DA SILVA; CHAGASTELLES; PEREIRA *et al.*, 2019; TAGUCHI; KATANOSAKA; YASUI; HAYASHI *et al.*, 2015).

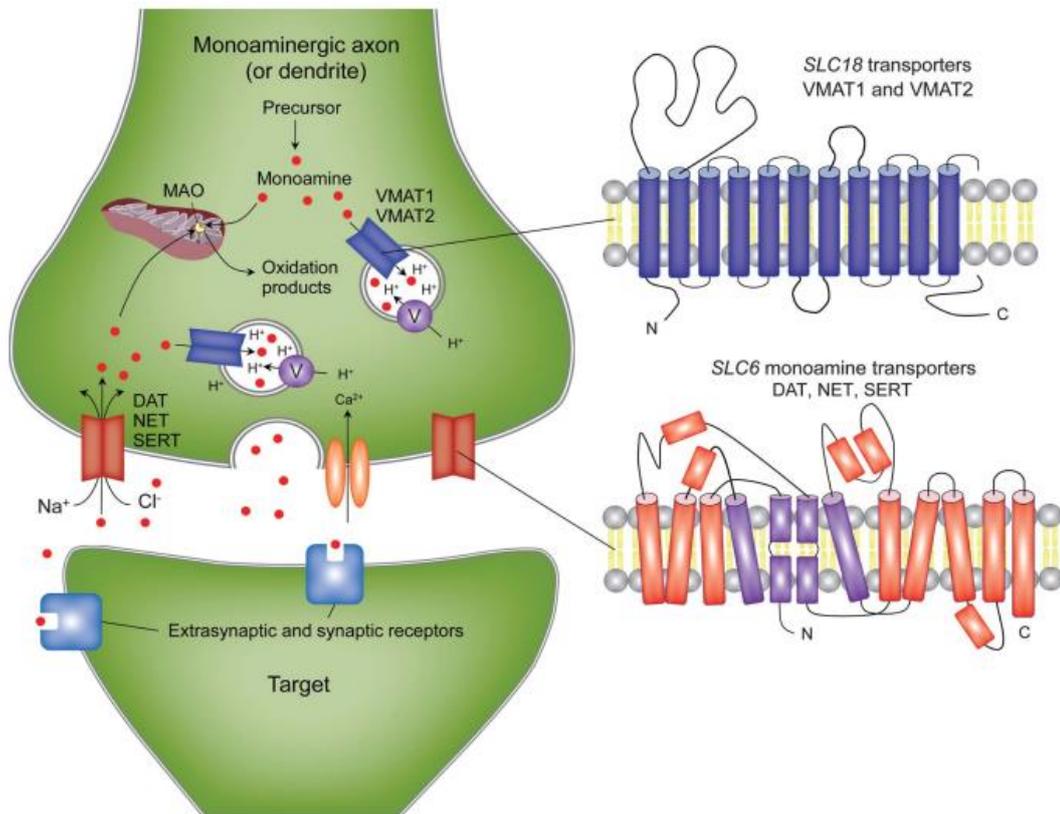
Já a sensibilização central observada no modelo experimental está ligada a ativação de células gliais, como micróglia e astrócitos, que promovem o aumento da expressão de citocinas, fatores de crescimento e liberação de BDNF, desencadeando no aumento de neurotransmissores excitatórios como glutamato e substância P, contribuindo para alterações nas vias inibitórias descendentes da dor (ARORA;

KUHAD; TIWARI; CHOPRA, 2011; NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009; SINGH; KAUR; GARG; SINGH *et al.*, 2020; XU; ZHANG; SHAO; RUAN *et al.*, 2013; YAO; LI; KANDHARE; MUKHERJEE-KANDHARE *et al.*, 2020).

O BDNF desempenha um papel crucial no processamento de sinais nociceptivos, sendo um fator de crescimento envolvido no desenvolvimento e sobrevivência de neurônios, além de modular a atividade de neurotransmissores, como serotonina e dopamina. Alguns autores buscam relacionar o BDNF como um dos principais mediadores em estados sensibilizados como no caso de pacientes com FM (NUGRAHA; KARST; ENGELI; GUTENBRUNNER, 2012) e em modelos animais de FM (BRUM; BECKER; FIALHO; OLIVEIRA, 2022).

A depleção de monoaminas como noradrenalina, serotonina e dopamina e a redução de serotonina (5-HT) é observada em animais tratados com reserpina. Além disso, os níveis do receptor antinociceptivo 5-HT<sub>1A</sub> reduziram e os níveis do receptor pronociceptivo 5-HT<sub>2A</sub> aumentaram, em tecidos do SNC, em roedores, adicionando interesse ao modelo experimental de FM induzida por reserpina (LI; HAN; WANG; FENG *et al.*, 2016; NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009; YAO; LI; KANDHARE; MUKHERJEE-KANDHARE *et al.*, 2020).

Figura 2: Estrutura e função dos transportadores de monoaminas.



**Legenda:** Os transportadores de monoaminas da membrana plasmática e os transportadores de monoaminas vesiculares (VMATs) são membros da superfamília de transportadores solúveis (SLC) e têm um papel importante na regulação da homeostase sináptica e nos efeitos da dopamina (DA), norepinefrina (NOR) e serotonina (5-HT). A reserpina esgota as aminas biogênicas (DA, NOR e 5-HT) do sistema nervoso ao se ligar irreversivelmente aos transportadores de monoaminas da vesícula sináptica (VMAT1 e 2), e induz sintomas complexos em ratos, incluindo depressão, que é um sintoma frequente de comorbidade em pacientes com FM. Fonte: (BENARROCH, 2013).

Estudos destacam o dano oxidativo presente no experimento induzido por reserpina. A reserpina foi capaz de aumentar a peroxidação lipídica, indiretamente avaliada pelos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a expressão da enzima óxido nítrico-sintase (NOS). Em contraposição, promove a diminuição da atividade antioxidante, reduzindo níveis de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona (GSH). Essas alterações são observadas tanto em tecidos do SNC como em tecido muscular de ratos e camundongos (ARORA; KUHAD; TIWARI; CHOPRA, 2011; KAUR; SINGH; SINGH; BHATTI *et al.*, 2019; OLIVEIRA; MARCONDES SARI; ZBOROWSKI; PRADO *et al.*, 2016; SINGH; KAUR; GARG;

SINGH *et al.*, 2020; SOUSA; BIRMAN; BALDINOTTI; FRONZA *et al.*, 2018; YAO; LI; KANDHARE; MUKHERJEE-KANDHARE *et al.*, 2020).

Analisando os achados na literatura, o modelo de FM induzido por reserpina é uma ferramenta importante para o estudo da patogênese da doença pois é capaz de induzir os principais sintomas, os mecanismos fisiopatológicos. De fato, o modelo parece apresentar uma boa validade de face, de construto e preditiva e já vem sendo utilizado para confirmar o efeito de fármacos amplamente utilizados no tratamento clínico da FM (BRUM; BECKER; FIALHO; OLIVEIRA, 2022).

### 3.3.2 MODELO DE FIBROMIALGIA INDUZIDO POR SALINA ÁCIDA

O modelo experimental de FM induzida por salina ácida foi descrito e caracterizado por Sluka e colaboradores (2001). Este modelo foi desenvolvido para avaliar os mecanismos de nocicepção muscular, sendo considerado um modelo de dor não inflamatória capaz de gerar alterações no sistema musculoesquelético (SLUKA; KALRA; MOORE, 2001).

#### 3.3.2.1 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE FIBROMIALGIA POR SALINA ÁCIDA

O protocolo pode ser aplicado em ratos e camundongos e consiste na administração, em duas etapas, de injeções de solução salina ácida (pH 4,0) unilateralmente no músculo gastrocnêmio. As injeções são administradas com um intervalo de dois ou, mais comumente, cinco dias. Os ratos recebem um volume de 100 µL de solução salina ácida, enquanto os camundongos recebem 20 µL. Os animais do grupo controle recebem duas injeções intramusculares de solução salina padrão (pH 7,0 - 7,4), que não induzem hiperalgesia em roedores (SLUKA; KALRA; MOORE, 2001).

#### 3.3.2.2 SINAIS CLÍNICOS E COMORBIDADES

Os pontos fortes deste modelo estão relacionados à capacidade de produzir os principais sintomas relatados pelos pacientes na prática clínica. O modelo experimental de FM induzida por salina ácida causa alterações já nas primeiras vinte

e quatro horas, podendo persistir por um período de até quatro semanas (SLUKA; KALRA; MOORE, 2001).

Dentre os sintomas nociceptivos e sensoriais, este modelo é capaz de desenvolver hiperalgesia primária e secundária, além de alodínia mecânica (CHANG; FONG; LEE; CHUANG *et al.*, 2019; DA SILVA; DESANTANA; SLUKA, 2010; NIELSEN; MATHIESEN; BLACKBURN-MUNRO, 2004; SLUKA; KALRA; MOORE, 2001; YOKOYAMA; MAEDA; AUDETTE; SLUKA, 2007). Modificações na temperatura podem influenciar no comportamento de pacientes com FM, contudo, estudos sobre hiperalgesia térmica ao calor e ao frio ainda são inconclusivos neste modelo (CHANG; FONG; LEE; CHUANG *et al.*, 2019; LARSON; PARDO; PASLEY, 2014; NIELSEN; MATHIESEN; BLACKBURN-MUNRO, 2004; SLUKA; KALRA; MOORE, 2001; YUKSEL; NAZIROGLU; SAHIN; CIG, 2017).

Na busca por validar as principais comorbidades da FM no modelo de salina ácida, existem relatos de que o tratamento promove fadiga, porém a redução da força ainda é controversa neste modelo (FELBER; MALHEIROS; TENTARDINI; SALGUEIRO *et al.*, 2022; TILLU; GEBHART; SLUKA, 2008). O comportamento do tipo depressivo e do tipo ansioso são observados após a injeção de salina ácida intramuscular, assim como alterações comportamentais no sono capazes de potencializar os efeitos nociceptivos promovidos pelo modelo (LIU; SHAO; YEN; SHAW, 2014; REZENDE; GOUVEIA PELUZIO; DE JESUS SILVA; DELLA LUCIA *et al.*, 2019; SUTTON; OPP, 2014a; b).

### 3.3.2.3 ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

A salina ácida é capaz de promover alterações fisiopatológicas similares as apresentadas por pacientes com FM, porém, alguns mecanismos fisiopatológicos associados ao problema, como a redução dos níveis de monoaminas, estresse oxidativo e alterações musculares não foram bem detalhadas na literatura recente (HÄUSER; PERROT; SOMMER; SHIR *et al.*, 2017; MEEUS; NIJS; HERMANS; GOUBERT *et al.*, 2013).

Dentre os mecanismos observados, a inflamação é identificada a partir da liberação de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  a nível periférico e central. Mesmo com sinais de neuro inflamação, ainda são inconclusivos o envolvimento das células gliais nesse modelo (ABD-ELLATIEF; MOHAMED; KOTB,

2018; REZENDE; GOUVEIA PELUZIO; DE JESUS SILVA; DELLA LUCIA *et al.*, 2019; SUTTON; OPP, 2015) SUTTON & OP, 2015; TIAN *et al.*, 2018). A acidose ativa os receptores acoplados à proteína G sensíveis a prótons (GPCRs) e desencadeia ativação de íons de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e proteína Gi - proteína quinase C  $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ). Ambos os sinais de PKC $\epsilon$  e Ca<sup>2+</sup> ativam a proteína quinase II dependente de  $\alpha$ -calmodulina ( $\alpha$ CaMKII), resultando em ativação hiperalgésica (CHEN; LEE; LIN; WONG *et al.*, 2014; SLUKA; KALRA; MOORE, 2001). Ainda, do mesmo modo que a sensibilização periférica é um achado fisiopatológico na clínica, as injeções de solução salina agem diretamente nos canais ASICs e potencial receptor transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1), aumentando a expressão destes no DRG, provocando a ativação do processamento nociceptivo. É importante observar que outras vias estão relacionadas ao modelo, estas vias incluem o canal de potencial receptor transitório subfamília M tipo 2 (TRPM2) e canais de sódio voltagem dependente (Nav) 1.8 e 1.7., sendo os últimos expressos nos neurônios do DRG (CHEN; CHEN, 2014; CHEN; LEE; LIN; WONG *et al.*, 2014; LIN; HSIEH; LIN, 2015; SLUKA; PRICE; BREESE; STUCKY *et al.*, 2003; YEN; HSIEH; HSU; LIN, 2017; YUKSEL; NAZIROGLU; SAHIN; CIG, 2017).

Semelhante aos efeitos periféricos, as injeções de solução salina ácida também aumentaram a expressão de canais iônicos em estruturas do SNC, sendo observada ainda a expressão de TRPV4 a nível medular. Além disso, é observado o aumento da liberação de neurotransmissores excitatórios como glutamato e aspartato, gerando alterações nas vias inibitórias descendentes. Enquanto isso, os receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) expressos no bulbo rostral ventromedial da medula (RVM), especificamente a subunidade NR1, desempenham um papel essencial na modulação e manutenção da hipersensibilidade induzida por salina ácida (RADHAKRISHNAN; SLUKA, 2009; SKYBA; LISI; SLUKA, 2005; SLUKA; O'DONNELL; DANIELSON; RASMUSSEN, 2013; YEN; HSIEH; HSU; LIN, 2017; 2020; YEN; HSU; LIN; HSIEH *et al.*, 2018).

O dano oxidativo ainda é limitado de evidências, não podendo se afirmar que estes mecanismos sejam ativados no modelo de salina ácida. Dentre os estudos prévios, sabe-se que a injeção de salina ácida promove aumento da peroxidação lipídica, aumento dos níveis de ROS e reduz níveis de glutatona tanto em estruturas periféricas quanto centrais (FELBER; MALHEIROS; TENTARDINI; SALGUEIRO *et al.*, 2022; YUKSEL; NAZIROGLU; SAHIN; CIG, 2017).

Portanto, o modelo de FM induzida por salina ácida apresenta uma abordagem eficaz e preenche alguns requisitos para mimetizar a patogênese da FM, com uma boa validade de face e alguns aspectos de validade de construto e preditiva (BRUM; BECKER; FIALHO; OLIVEIRA, 2022). A sua capacidade de produzir os principais sintomas e possuir uma descrição detalhada de seus mecanismos o tornam válido para a compreensão e para estudos futuros sobre a FM.

### 3.3.3 OUTROS MODELOS EXPERIMENTAIS DE FIBROMIALGIA

Na prática clínica, a exposição dos pacientes com FM a situações estressantes pode desencadear ou até mesmo potencializar sintomas da doença. Neste sentido, alguns achados na literatura trazem a aplicação de situações extremas, como exposição ao frio, a ruídos, e estresse físico ou mental como condições experimentais para desenvolvimento de modelos de fibromialgia (CLAUW, 2014, 2015a).

#### 3.3.3.1 MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDA POR EXPOSIÇÃO AO FRIO INTERMITENTE

O modelo de FM induzida por estresse frio intermitente foi desenvolvido primeiramente por Kita e colaboradores (1979), onde sugeriram que a exposição dos animais a alternâncias de temperatura seria capaz de desenvolver parâmetros nociceptivos, sendo denominado primeiramente como um estado de estresse específico causado por ritmo alternado na temperatura (KITA; HATA; IIDA; YONEDA *et al.*, 1979). Mais recentemente, os autores Nishiyori e Ueda (2008) aprimoraram e validaram o modelo primeiramente para camundongos e Nazu e colaboradores (2010) adaptaram para ratos, utilizando o mesmo para síndromes de dor generalizada, principalmente a fibromialgia (NASU; TAGUCHI; MIZUMURA, 2010; NISHIYORI; UEDA, 2008) .

Para indução de FM através do estresse ao frio intermitente os animais são expostos a um resfriamento da temperatura ambiente (-4 a -3 °C) durante o período entre as 16:30 e as 10:00 do dia seguinte, seguido de um período de temperatura ambiente (22 a 24°C) por 30 minutos. Durante o período das 10:00 e 16:30 os animais são submetidos a alternância de temperatura entre frio e calor a cada 30 minutos,

repetindo o procedimento por 3 dias consecutivos. No quarto dia, os animais são mantidos em temperatura ambiente por 1 hora e posteriormente são realizados os testes de comportamento (NASU; TAGUCHI; MIZUMURA, 2010).

O modelo experimental de estresse ao frio intermitente é capaz de apresentar os principais mecanismos da FM, como inflamação, sensibilização periférica e central, além de lesões e alterações musculares e celulares, sendo similar aos mecanismos clínicos observados. Algumas alterações decorrentes da fibromialgia ainda não foram observadas neste modelo, como a dor espontânea e a hipersensibilidade a variações térmicas e mesmo as alterações relacionadas ao processo inflamatório e ao dano oxidativo não estão bem estabelecidas (BONATERRA; THEN; OEZEL; SCHWARZBACH *et al.*, 2016; HSU; LEE; CHAO; KUO *et al.*, 2019; SARZI-PUTTINI; GIORGI; MAROTTO; ATZENI, 2020; WAKATSUKI; Y; MATSUBARA; NASU *et al.*, 2021).

### 3.3.3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDA PELO ESTRESSE SONORO

O modelo de FM induzido por estresse sonoro (SS) foi apresentado primeiramente por Khasar e colaboradores (2005), passando por algumas adaptações por Hung e colaboradores (2020) utilizando o estresse sonoro repetido e intermitente (RISS), sendo considerada mesmo assim uma metodologia limitada para mimetizar os principais mecanismos da FM. O protocolo consiste na exposição dos animais à uma câmara com um autofalante que emite frequências 5 a 19 kHz com variação de amplitude entre 20 e 110 decibéis (dB) No SS, os animais são expostos ao estímulo sonoro durante 30 minutos ao longo do dia, já no RISS o estímulo sonoro é realizado durante em uma frequência diária de 6 vezes, por um período de 30 minutos a cada 3 horas, sendo aplicado em dias alternados (HUNG; LEE; TSAI; CHEN *et al.*, 2020; KHASAR; GREEN; LEVINE, 2005).

Embora alguns mecanismos como sensibilização periférica e central, dano oxidativo e alterações celulares tenham sido observados no modelo, poucas alterações fisiopatológicas semelhantes as apresentadas pelos pacientes com FM foram observadas no modelo, como as alterações nos níveis de neurotransmissores e monoaminas, uma das alterações cardinais da patologia (HUNG; LEE; TSAI; CHEN

*et al.*, 2020; KHASAR; GREEN; LEVINE, 2005)(HUNG *et al.*, 2020; KHASAR *et al.*, 2005).

### 3.3.3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDA POR ESTRESE DE NATAÇÃO REPETIDO

O modelo de fibromialgia induzida por estresse de natação repetido foi sugerido por Quintero e colaboradores (2000) como um modelo capaz de desenvolver hipersensibilidade duradoura em animais e assim ser capaz de simular os efeitos sistêmicos da fibromialgia. O protocolo de elaboração do modelo consiste em exposição dos animais a natação e ao medo de afogamento, sendo colocados em um cilindro com água para realização do nado forçado por 10 minutos no primeiro dia, nos dias subsequentes os animais realizam o nado por 20 minutos e, no quarto dia, são aclimatados em temperatura ambiente por uma hora após o nado para avaliação comportamental (QUINTERO; MORENO; AVILA; ARCAYA *et al.*, 2000).

O modelo tem limitações quanto a reprodução de sintomas nociceptivos e comorbidades da doença, sendo capaz de promover fadiga, sensibilização periférica, alteração nos níveis de neurotransmissores e monoaminas (SUAREZ-ROCA; QUINTERO; ARCAYA; MAIXNER *et al.*, 2006).

Outros modelos experimentais de fibromialgia despontam nos últimos anos na literatura. Modelos baseados em insultos inflamatórios agudos utilizando mediadores inflamatórios como carragenina, IL-6, fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), prostaglandina-E2 (PGE2) e proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP1) tem sido apresentado como sendo capazes de promover dor muscular crônica. (ALEY; MESSING; MOCHLY-ROSEN; LEVINE, 2000; ALVAREZ; CHEN; BOGEN; GREEN *et al.*, 2012; ALVAREZ; GREEN; LEVINE, 2014; DINA; GREEN; LEVINE, 2008; JOSEPH; LEVINE, 2010; PARADA; REICHLING; LEVINE, 2005). Podemos encontrar ainda modelos induzidos por fadiga muscular associada insulto muscular, induzido por estresse de restrição crônica, induzido pela vocalização ultrassônica e induzido por estresse psicológico intermitente (BARDIN; MALFETES; NEWMAN-TANCREDI; DEPOORTERE, 2009; GREGORY; GIBSON-CORLEY; FREY-LAW; SLUKA, 2013; SÁNCHEZ, 2003; UEDA; NEYAMA, 2017).

A complexidade da FM demanda estudos avançados para desvendar a sua etiologia e fisiopatologia. O amplo espectro de sintomas relatados pelos pacientes tem

levado a um aumento expressivo de estudos pré-clínicos gerando um desafio aos pesquisadores para desvendar os sinais e características completas dos pacientes com fibromialgia. A literatura atual nos mostra que os modelos experimentais em animais possuem algumas limitações, principalmente voltados a necessidade de medir a dor espontânea, o sintoma cardinal em pacientes com fibromialgia. Estudos indicam que o modelo com uso de reserpina seria a mais completo, com o viés de causar alterações locomotoras e catalepsia.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos e fêmeas (10 a 12 semanas) (180 – 300g), provenientes do biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram alojados no Biotério do LANDI em caixas-moradia, confeccionadas em polipropileno, medindo 49x34x16cm (CxLxA), com assoalho recoberto de serragem e com número máximo de quatro animais por caixa. Ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e livre acesso à água e ração.

Foram realizados todos os procedimentos necessários para minimizar dor e desconforto. A manutenção dos animais seguiu a Lei 11.794, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais (BRASIL, 2008). Os trabalhos foram conduzidos de acordo com as “Diretrizes de Integridade e Boas Práticas para a Produção, Manutenção ou Uso de Animais” da resolução do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), publicação nº 32, 09/2016. A intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos. Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UFSC (protocolo nº 6504200122) (ANEXO I). Os processos para execução deste estudo seguiram as recomendações estabelecidas nas diretrizes ARRIVE 2.0 (ANEXO 2) (PERCIE DU SERT; AHLUWALIA; ALAM; AVEY *et al.*, 2020; PERCIE DU SERT; HURST; AHLUWALIA; ALAM *et al.*, 2020).

## 4.2 TAMANHO DA AMOSTRA

O cálculo amostral utilizou a fórmula:  $n = \{(z \text{ alfa} + z \text{ beta}) * s\}^2 / \text{sigma}$ . O teste considera n igual ao tamanho da amostra; o desvio-padrão da probabilidade (alfa) é o risco aceitável de se encontrar uma diferença; a probabilidade beta se refere ao risco aceitável de não observar uma diferença, quando ela realmente existe (erro do tipo II; falso negativo); s indica o desvio padrão; e sigma é igual a diferença (s) adotada (s) entre as médias para detecção significativa. Ainda, quando a diferença não existe (erro do tipo I; falso positivo), indica que quanto menor for o alfa escolhido, maior é a amostra necessária (DANIEL; CROSS, 2018).

Portanto, ao aplicarmos os dados na fórmula, obtém-se:  $n = \{(1,96 + 1,28) * 35\}^2 / 40 = 8.0$ . Desta forma, foram necessários no mínimo 8 animais em cada grupo experimental. O projeto contabilizou com um total de 110 animais, sendo 40 machos e 70 fêmeas.

## 4.3. CEGAMENTO DA PESQUISA E RANDOMIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Para a manutenção do cegamento dos pesquisadores nos testes comportamentais, um dos pesquisadores realizou o tratamento e outro pesquisador realizou os testes comportamentais. Ainda, houve a participação de um terceiro pesquisador, que realizou a numeração das caixas anteriormente aos testes, sem a participação dos pesquisadores responsáveis pela avaliação comportamental e tratamento. Portanto, não puderam ser identificados entre si os animais dos grupos que receberam o tratamento. Os animais foram randomizados entre os grupos, sendo que a distribuição será realizada de forma aleatória, com o auxílio da ferramenta “função aleatória” do software Microsoft Excel [= ALEATÓRIOENTRE (0; X)].

## 4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo animais que na avaliação basal apresentaram aspectos nociceptivos presentes como hiperalgesia mecânica e térmica e score na escala grimace > 0,67 de uma média máxima de 2 pontos.

#### 4.5. DELINEAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

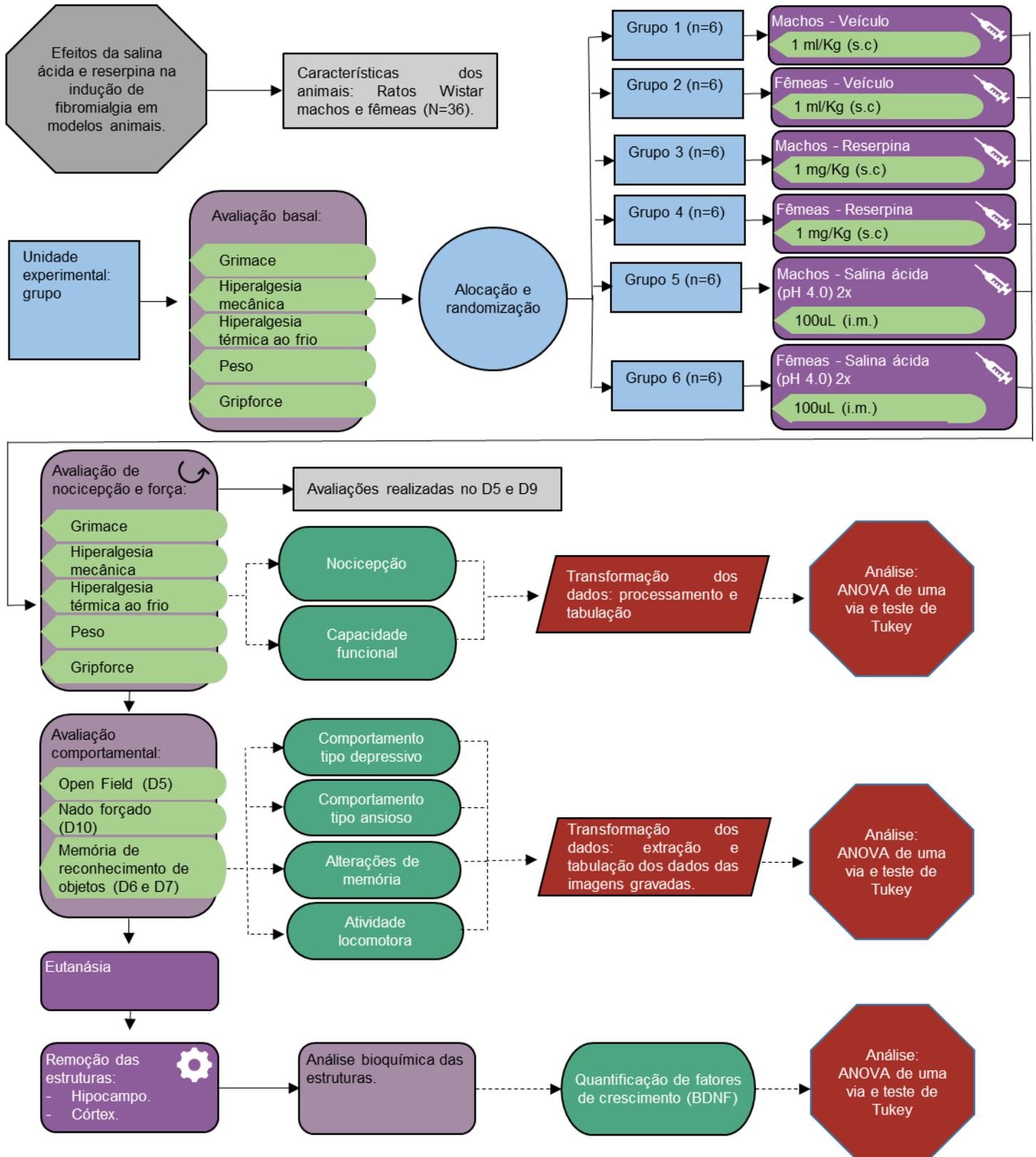
No presente estudo foram utilizados dois modelos de FM distintos em ratos, (i) induzido por reserpina (1 mg/Kg), que causa uma diminuição significativa no limiar de pressão muscular e alodínia tátil, sustentadas por mais de uma semana (NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009); (ii) induzido por salina ácida intramuscular, capaz de promover hiperalgesia por até quatro semanas (SLUKA; KALRA; MOORE, 2001).

Por outro lado, um outro grupo de animais recebeu a administração de reserpina 0,1 mg/Kg s.c. A dose de reserpina foi considerada “submáxima” porque é passível de ser potencializada pela salina ácida injetada intramuscular (uma ou duas injeções), possibilitando a observação de um possível aumento da resposta nociceptiva (NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009).

Inicialmente, nos propusemos a analisar os efeitos da salina ácida e da reserpina em animais machos e fêmeas (Figura 3), dividindo-os em 6 grupos experimentais (n=6), a fim de caracterizar os modelos já existentes na literatura e verificar possíveis interações relacionadas ao sexo. A disposição dos grupos ficou estabelecida como apresentamos abaixo:

1. Ratos machos controle: os animais receberam injeção de 1 ml/kg de veículo (NaCl 0,9%; pH 7.0) subcutaneamente (s.c.) por três dias;
2. Ratos fêmeas – controle: os animais receberam injeção 1 ml/kg de veículo (NaCl 0,9%; pH 7.0) subcutaneamente (s.c.) por três dias;
3. Ratos machos – Reserpina: os animais receberam injeção de reserpina 1 mg/Kg, subcutaneamente (s.c.), por três dias consecutivos;
4. Ratos fêmeas – Reserpina: os animais receberam injeção de reserpina 1 mg/Kg, subcutaneamente (s.c.), por três dias consecutivos;
5. Ratos machos - Salina ácida: os animais receberam duas injeções de 100 µL de solução salina ácida (NaCl 0,9%; pH 4.0) no ventre do músculo gastrocnêmio direito;
6. Ratos fêmeas - Salina ácida: os animais receberam duas injeções de 100 µL de solução salina ácida (NaCl 0,9%; pH 4.0) no ventre muscular do músculo gastrocnêmio direito.

Figura 3: Desenho experimental da fase de caracterização dos modelos experimentais de fibromialgia.



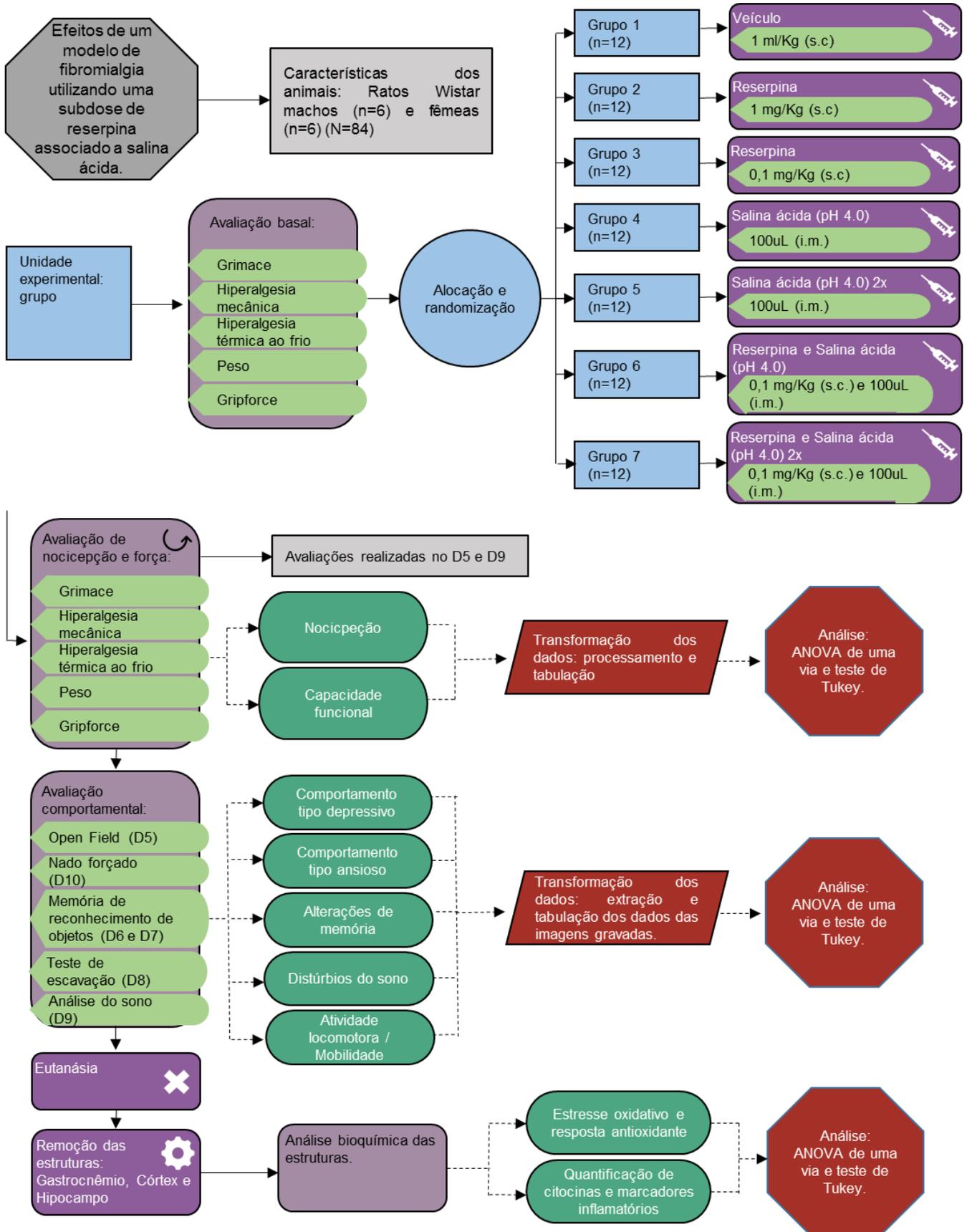
Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Após caracterizarmos os efeitos dos modelos experimentais de FM em ratos machos e fêmeas, realizamos uma segunda etapa de intervenções utilizando animais de ambos os sexos (Figura 4), divididos os animais em 7 grupos experimentais (n=6 machos e n=6 fêmeas). Esta etapa foi realizada para analisar as interações entre o uso da reserpina em uma subdose associada à salina ácida. A disposição dos grupos ficou estabelecida como apresentamos abaixo:

1. Controle (C): os animais receberam 1 ml/Kg de veículo (NaCl 0,9%; pH 7.0) subcutaneamente (s.c.) por três dias;
2. Grupo Reserpina 1: os animais receberam injeção de reserpina 1 mg/Kg, s.c., por três dias consecutivos;
3. Grupo Reserpina 0,1: os animais receberam uma injeção de reserpina 0,1 mg/Kg, s.c., por três dias consecutivos;
4. Grupo salina ácida 1x: os animais receberam uma injeção de 100 µL de solução salina ácida (NaCl 0,9%; pH 4.0) no ventre muscular do músculo gastrocnêmio direito;
5. Grupo salina ácida 2x: os animais receberam duas injeções de 100 µL de solução salina ácida (NaCl 0,9%; pH 4.0) no ventre muscular do músculo gastrocnêmio direito;
6. Grupo Reserpina 0,1 + salina ácida 1x: os animais receberam uma injeção de reserpina 0,1 mg/Kg, s.c., por três dias consecutivos + uma injeção de 100 µL de solução salina ácida (NaCl 0,9%; pH 4.0) no ventre muscular do músculo gastrocnêmio direito.
7. Grupo Reserpina 0,1 + salina ácida 2x: os animais receberam uma injeção de reserpina 0,3 mg/Kg, s.c., por três dias consecutivos + duas injeções de 100 µL de solução salina ácida (NaCl 0,9%; pH 4.0) no ventre muscular do músculo gastrocnêmio direito.

Para melhor identificação dos efeitos causados pelos tratamentos, os grupos 1, 2, 5 e 7 tiveram suas performances nos testes de comportamento tipo-ansioso e de mobilidade avaliadas através do software Any-maze.

Figura 4: Desenho experimental de um estudo com diferentes propostas de modelos experimentais de fibromialgia utilizando reserpina e salina ácida.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

## 4.6 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE FIBROMIALGIA

### 4.6.1 INDUÇÃO DE FIBROMIALGIA POR RESERPINA

Para o modelo de FM induzida por Reserpina (SigmaAldrich, USA), padronizado por Nagakura e colaboradores (2009), a substância foi diluída em salina e 5% de Tween 80. A reserpina foi administrada nos animais na dose de 1 mg/kg (volume de 1 ml/kg), por via subcutânea (s.c.), aplicada no dorso, uma vez ao dia, por três dias consecutivos. Nos animais que receberam a subdose de reserpina, foi administrado 0,1 mg/kg da substância, por via s.c., uma vez ao dia, por três dias consecutivos (NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009).

### 4.6.2 INDUÇÃO DE FIBROMIALGIA POR SALINA ÁCIDA

Para o modelo induzido por salina ácida, padronizado por Sluka et. al. (2001). O protocolo consiste na injeção de 100 µL de solução salina ácida (NaCl 0,9%; pH 4.0) no ventre muscular do músculo gastrocnêmio direito, com os animais anestesiados com isoflurano 1%. Neste modelo, a injeção de salina é realizada em dois momentos durante o protocolo experimental, no primeiro e no quinto dia (SLUKA; KALRA; MOORE, 2001). Na presente pesquisa alguns grupos experimentais receberam apenas uma injeção de salina ácida, descrito em maiores detalhes no delineamento experimental.

### 4.6.3 INDUÇÃO DE FIBROMIALGIA POR SALINA ÁCIDA ASSOCIADA À UMA SUBDOSE DE RESERPINA

Um grupo de animais recebeu a administração de 0,1 mg/kg de reserpina, por via s.c., uma vez ao dia, por três dias consecutivos associado a injeção de salina ácida intramuscular. Os grupos que receberam a subdose de reserpina e salina ácida tiveram a seguinte padronização: animais do grupo salina ácida 1x receberam uma única injeção ao término do protocolo de reserpina; e os grupos salina ácida 2x receberam sua primeira dose no mesmo dia dos grupos anteriores e a segunda dose 5 dias após.

## 4.7 AVALIAÇÕES NOCICEPTIVAS

Após a indução do modelo, os animais foram submetidos à avaliação nociceptiva a fim de identificar hiperalgesia mecânica por meio dos filamentos de von Frey na pata, hiperalgesia térmica ao frio (acetona) e a análise da expressão de dor.

### 4.7.1 HIPERALGESIA MECÂNICA

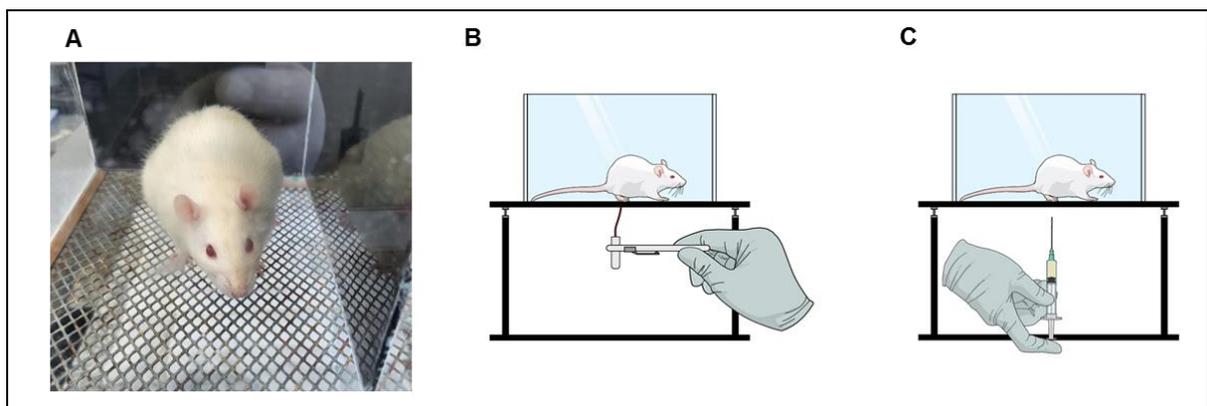
O teste de filamentos de von Frey é um método comum para avaliar a hiperalgesia mecânica em animais durante experimentos pré-clínicos. Ele é usado para medir a sensibilidade à dor em resposta a estímulos mecânicos leves, como pressão ou toque. Para tanto, foi utilizado o método “up-and-down” (DIXON, 1991). Desta forma, os ratos foram aclimatados por no mínimo 1 hora antes dos experimentos, permanecendo em compartimentos individuais feitos de acrílico (7 x 9 x 11 cm), sobre uma plataforma de fundo gradeado, para facilitar o acesso à superfície ventral das patas traseiras dos animais (Figura 5A). O estímulo mecânico foi direcionado perpendicularmente à superfície plantar dos animais. Então, foram analisadas as respostas (retirada ou não da pata) em relação à tensão aplicada por vários filamentos de von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, EUA) calibrados para produzir forças diferentes (0,16; 0,4; 1,4; 2,0; 4,0; 8,0 gramas), causando graus distintos de estimulação mecânica (inócuas ou nocivas). As avaliações foram iniciadas com o filamento de 0,4 g, e no caso de estímulo nocivo – indicado pela retirada da pata – sendo utilizado um filamento com menor valor em gramas. Nos casos de estimulação inócua – indicada pela permanência da pata – foi testado o filamento com maior valor seguinte em gramas (Figura 5B). Foi realizado um total de no máximo seis aplicações não consecutivas em cada animal. A avaliação foi realizada em ambas as patas, no entanto os dados apresentados correspondem apenas aos obtidos nas medidas da pata direita.

### 4.7.2 HIPERALGESIA TÉRMICA AO FRIO

Para avaliar a hiperalgesia térmica ao frio, os animais foram posicionados em caixas individuais de acrílico transparente, sobre plataformas elevadas. Foi instilado

0,05 ml de acetona por meio de uma seringa na região ventral da pata traseira do animal, realizando a contagem de tempo com um cronômetro (VL-1809, Vollo, EUA). Durante 20 segundos após a aplicação da acetona, a resposta do rato foi monitorada, observando retirada ou agitação da pata direita (Figura 5C). Os animais que não apresentaram resposta tiveram o monitoramento encerrado. Porém, nos casos em que houve reação ao efeito de resfriamento no período de 20 segundos, estes animais continuaram a ser observados por mais 20 segundos, totalizando assim, 40 segundos. A respostas classificam-se em escore de 0 a 3, sendo 0 nenhuma resposta, 1 quando apresentar retirada da pata, 2 quando realizar flinches (sacudidas) e 3 quando retirar a pata e levar o membro à boca. As medidas são realizadas 3 vezes e a média de escore obtida foi utilizada como parâmetro de avaliação (FLATTERS; BENNETT, 2004).

*Figura 5: Avaliação de hiperalgesia mecânica e hiperalgesia térmica ao frio.*



**Legenda:** A primeira imagem (A) apresenta o animal aclimatando em compartimento individual com fundo gradeado. A imagem ao centro (B) e à direita (C) trazem uma representação gráfica dos testes de von Frey e de acetona, respectivamente. Fonte: Elaborada pelo autor, em B e C foi utilizado a plataforma *Mind the Graph*®, 2023.

#### 4.7.3 ESCALA GRIMACE PARA RATOS

A escala *Grimace* é um método científico não invasivo para avaliar a dor em ratos. A escala baseia-se na expressão facial dos animais, onde foram observadas quatro unidades de avaliação, ou parâmetros faciais, sendo elas o cerramento palpebral, o achatamento da ponta do nariz e das bochechas, a posição das orelhas e a posição das vibrissas. Cada unidade foi avaliada com escore de 0 a 2, onde 0 corresponde a nenhuma expressão de dor, 1 indica uma alta confiança em que a

unidade avaliada apresenta dor e 2 a presença óbvia de dor (ANEXO 3) (SOTOCINAL; SORGE; ZALOUM; TUTTLE *et al.*, 2011). Após a atribuição de valores para cada unidade, foi feita uma média simples e o valor resultante foi utilizado como um indicativo da presença de dor. Nesse sentido, os valores abaixo de 1 representaram a presença de dor leve, e os valores entre 1 e 2, presença de dor moderada à severa (MILLER; LEACH, 2016).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO MOTOR E COGNITIVO

##### 4.8.1 AVALIAÇÃO DA FORÇA DE PREENSÃO PLANTAR

O teste de força de preensão plantar em ratos é um método para avaliar a função muscular e funcionalidade dos animais. O teste consiste em colocar o rato em uma grade metálica, onde ele é mantido em posição vertical enquanto é encorajado a agarrar com as patas em um aparelho específico. A avaliação de força de preensão da pata foi realizada por meio do equipamento *GripForce* (Insight®). Nos dias que antecederam os testes, cada animal foi submetido ao manuseio similar para se acostumar com a manipulação (três dias de ambientação). O animal foi colocado sobre a grade do equipamento e cuidadosamente puxado pela cauda, realizado sempre pelo mesmo avaliador. O valor registrado foi o valor da média de três análises obtidas em ensaios consecutivos com um intervalo mínimo de 5 minutos. Nesse caso, foi obtida a medida em gramas da preensão plantar exercidas pelas quatro patas no animal sobre a grade do equipamento (KEHL; TREMPER; HARGREAVES, 2000).

##### 4.8.2 TESTE DE CAMPO ABERTO

O teste de campo aberto (*Open Field*) é uma técnica comumente usada para avaliar a atividade locomotora e comportamento do tipo ansiolítico em roedores. Consiste em um aparato com base retangular medindo 60x40x50 cm com 12 divisões marcadas no chão do aparato medindo 15x13,3 cm cada uma. O experimento foi realizado por um período de 5 minutos onde um sistema de gravação de vídeo foi instalado acima da arena para registrar o comportamento dos ratos. Após cada análise experimental, o aparato foi totalmente limpo com álcool 70% (PRUT; BELZUNG,

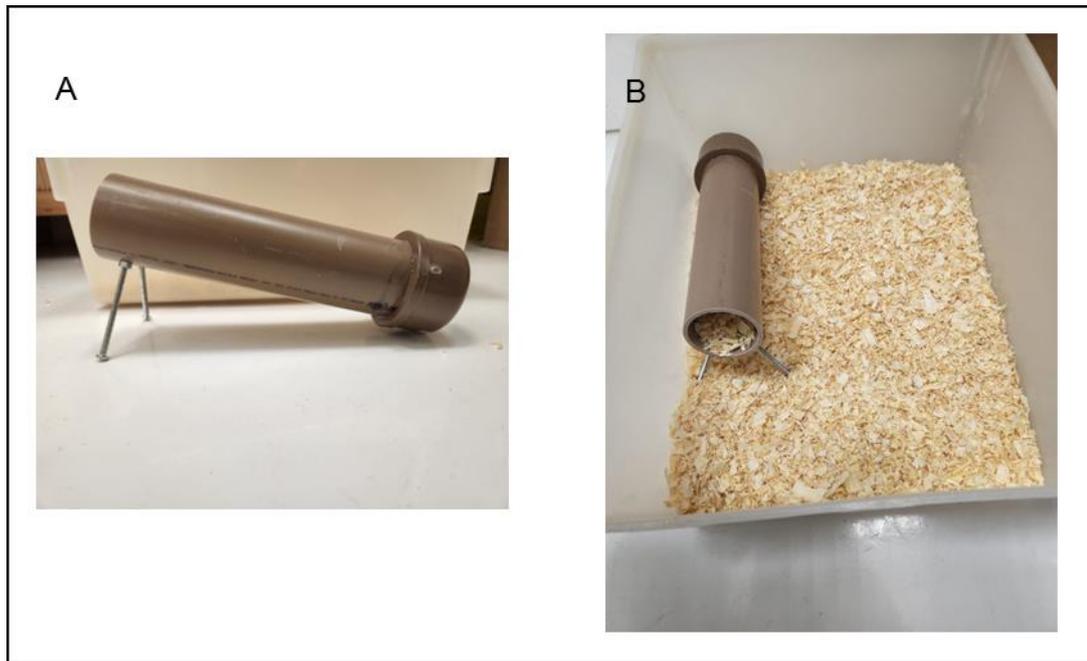
2003). O número de cruzamentos dos quadrantes (com as quatro patas); tempo de permanência no centro (segundos); número de elevações (animal apoiado apenas com as duas patas traseiras).

Nos grupos 1, 2, 5 e 7, a distância percorrida pelos animais, o número de cruzamentos entre os quadrantes da arena, o tempo de permanência no centro foram obtidas através da análise dos vídeos por meio do software ANY-Maze (Stoelting Co., 2019) (TORT; NETO; AMARAL; KAZLAUCKAS *et al.*, 2006).

#### 4.8.3 TESTE DE ESCAVAÇÃO

A escavação de túneis pode ser utilizada como marcador da funcionalidade geral e da capacidade de trabalho dos animais, e pode estar afetada quando o animal apresenta problemas de mobilidade (ANDREWS; LEGG; LISAK; ISSOP *et al.*, 2012). Para tanto foram utilizadas tocas feitas com tubos ocos de plástico (32 cm de comprimento x 10 cm de diâmetro) selados em uma extremidade e abertos na outra. A entrada aberta ficou elevada aproximadamente 6 cm acima do solo para evitar a perda de maravalha/serragem quando a toca fosse colocada no chão da gaiola de teste (Figura 6). O protocolo seguiu os procedimentos de Deacon (2006) com algumas modificações. Para o teste os animais foram ambientados com a toca por 48h, que ficou dentro de sua gaiola moradia. No dia do teste, os animais foram separados em caixas moradias individuais, com uma fina camada de maravalha no solo (250 g). Dentro da caixa foi colocada a toca com a extremidade fechada contra a parede da gaiola e preenchida com 35 gramas de maravalha. A água e comida foram fornecidas normalmente. O teste iniciou às 16 horas, sendo a capacidade de escavação observada a partir da mensuração do peso de serragem que permaneceu no cilindro após 2 horas, terminado o primeiro período, o montante de substrato restante foi colocado novamente no aparato e então realizada a pesagem após 12 horas. Quando finalizado o teste, se o animal estivesse dentro da toca, ele não foi puxado manualmente para fora e sim suavemente, inclinado para o prato da balança junto com o material, para então ser removido e levado para a gaiola de origem (DEACON, 2006).

Figura 6: Teste de escavação.



**Legenda:** A primeira imagem (A) apresenta o dispositivo para avaliação confeccionado em PVC medindo 38 cm x Ø 10 cm. Já na segunda imagem (B) podemos ver a disposição do dispositivo na caixa moradia. Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

#### 4.8.4 TESTE DO NADO FORÇADO

Neste teste, os animais são expostos a uma situação supostamente aversiva, sendo colocados dentro de um tanque com água sem condições de escapar, assim eles apresentam um comportamento de imobilidade que pode ser associado a desesperança, que é um sintoma presente em humanos com depressão (PORSOLT; ANTON; BLAVET; JALFRE, 1978).

Os animais foram submetidos a uma sessão de nado forçado de 5 minutos. Para a realização do nado os animais foram colocados individualmente em um cilindro. O cilindro com água apresenta diâmetro de 28 cm, altura de 60 cm e o volume de água utilizado foi de aproximadamente 18 litros, mantendo uma coluna de água de 30 cm, com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$  de onde não conseguiam escapar e nem se apoiar no fundo do cilindro. Foi avaliado o tempo em que o animal permanecia inerte. Esse teste foi filmado com uma câmera webcam (Logitech®) posicionada 50 cm acima do recipiente com água. As imagens foram gravadas e posteriormente avaliado o tempo de imobilidade de cada animal, considerando a permanência do animal flutuando, movimentos necessários para manter a cabeça acima da água foram considerados.

#### 4.8.5 MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

O teste de memória de reconhecimento de objeto é uma técnica comportamental amplamente utilizada para avaliar a memória de reconhecimento em animais, como camundongos e ratos. Ele é baseado na tendência natural desses animais de explorar objetos desconhecidos em seu ambiente (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Na tarefa de avaliação da capacidade de reconhecimento de objetos, os animais são colocados em uma caixa de madeira medindo 60x40x50 cm onde em um primeiro momento são habituados ao ambiente vazio podendo circular livremente pela caixa e nas avaliações posteriores são introduzidos objetos para exploração por parte do animal. No dia das avaliações, os ratos foram colocados na caixa com dois objetos idênticos para livre exploração durante 5 minutos (sessão de treino). As sessões de teste foram realizadas 2h após o treino para memória de curta duração e 24h após a sessão de teste 1, para memória de longa duração. Para cada sessão de teste um dos objetos da caixa era alterado. O tempo gasto explorando cada objeto foi anotado e os resultados foram expressos em termos de índice de discriminação, que é a diferença entre o tempo de exploração do objeto novo e o tempo de exploração do objeto familiar, dividido pelo tempo total de exploração.

#### 4.8.6 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DO SONO

Para a avaliação do sono optamos por uma análise comportamental, ao invés de registros eletrofisiológicos como eletroencefalograma (EEG) e eletromiografia (EMG). No ciclo claro os ratos tendem a dormir na postura de bola, com os olhos fechados e em contato com um dos cantos da caixa (VAN BETTERAY; VOSSEN; COENEN, 1991).

Seguindo este critério, os registros do sono dos animais foram realizados em uma sala com luz (branca, 1.200 lumens) e temperatura controlada em 22 °C, isolada de ruídos e de presença humana. Os animais foram ambientados nesta sala por três dias consecutivos, durante 2 horas. Foram usadas caixas idênticas a do biotério, medindo 49 x 34 x 45 cm (CxLxA), contendo apenas dois animais por caixa, separados por uma divisória de acrílico transparente, criando dois ambientes de 49 x 17 x 45 cm.

A divisória apresentava dois orifícios de ~2 cm de diâmetro para facilitar a visualização e o contato entre os animais. As caixas continham um fundo com adesivo preto, que foi recoberto com areia para gatos na cor preta, para propiciar maior contraste com os animais e facilitar os registros.

Na gravação foi utilizada uma Webcam Logitech C270, conectada a um computador, com uma distância de 50 cm acima da caixa. O tempo de gravação foi de 4 horas em dois blocos de 2 horas, sendo que o primeiro bloco contou como ambientação. Apenas o segundo bloco de gravações foi usado para análise, considerando que os animais mantiveram um comportamento predominantemente exploratório no primeiro bloco. As análises das gravações foram feitas por um avaliador que considerou que o animal estivesse dormindo quando o seu comportamento de imobilidade era combinado com uma postura encolhida (bola) em um dos cantos da caixa, colocando a cabeça junto e sob o corpo (Figura 7), sendo contabilizado o tempo de latência para dormir, a frequência de despertar e a proporção de tempo em que o animal permaneceu dormindo.

*Figura 7: Demonstração da análise comportamental do sono.*



**Legenda:** A duas imagens mostram os animais em imobilidade, porém, na primeira imagem (A) o animal está numa postura encolhida (bola) e na segunda imagem (B) ele permanece com a cabeça erguida, uma postura que constantemente era alternada com movimentos e não foi considerada dormindo. \* Imagem da postura de bola (VAN BETTERAY; VOSSSEN; COENEN, 1991). Fonte: Marcos Lisboa Neves, dados ainda não publicados.

#### 4.9 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Para a eutanásia dos ratos foi utilizada associação de anestésicos dissociativos (cetamina) com agonistas de adrenorreceptores alfa-2 (xilazina) (BRASIL, 2018), aplicando-se no mínimo três vezes uma dose anestésica da associação dos fármacos. Portanto, imediatamente após os últimos testes comportamentais, os ratos foram anestesiados com uma mistura de xilazina (30mg/kg) e cetamina (180mg/kg), por via intraperitoneal. Quando o animal não respondia mais aos estímulos de pinçamento forte da prega digital e do rabo (não se movimentou de qualquer forma) e a respiração cessou, foi realizada a eutanásia com guilhotina por profissional experiente. Para este procedimento foram obedecidas as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, contidas na Resolução Normativa nº 37 de 15 de fevereiro de 2018 que versa sobre as diretrizes da prática de eutanásia atribuídas pelo conselho (BRASIL, 2018).

#### 4.10 RETIRADA DAS ESTRUTURAS

Um dia após o término dos testes comportamentais, após eutanásia dos animais, o músculo gastrocnêmio direito, o córtex pré-frontal e o hipocampo foram retirados e acondicionados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C até a realização das análises bioquímicas.

#### 4.11 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para os testes bioquímicos, um terceiro pesquisador realizou previamente a marcação aleatória das amostras, com o auxílio da ferramenta “função aleatória” do software Microsoft Excel [= ALEATORIOENTRE (0; X)], de modo que os pesquisadores que realizaram as dosagens desconheciam o grupo ao qual pertencia cada amostra. Deste modo, acredita-se que foram eliminadas as possibilidades de influência nos resultados, tanto comportamentais, quanto bioquímicos.

##### 4.11.1 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA ANTIOXIDANTE

Parte do material do músculo gastrocnêmio foi utilizado para análise dos conteúdos de peroxidação lipídica avaliando o ácido tiobarbitúrico (TBARS), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH) (YAMADA; SALGUEIRO; GOULART; MENDES *et al.*, 2019). Nesta análise, os tecidos foram homogeneizados em TrisHCl 50 mM, pH 7,4, (1/10, p/v). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2400 rpm, 4°C, por 10 min e os sobrenadantes utilizados para os ensaios bioquímicos. Para a análise dos níveis de substâncias reativas ao TBARS, os sobrenadantes foram incubados com ácido acético ou ácido fosfórico 1% e ácido 2-tiobarbitúrico a 100°C por 1h. Após esse tempo, foi adicionada uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1% e a absorbância das amostras foi determinada em 545nm (NIRMAL; KOPPIKAR; BHONDAVE; NARKHEDE *et al.*, 2013). Para análise da SOD foi utilizado uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) (0,02M/ácido etilenodiamina tetraacético - EDTA 0,1mM, pH 7,4), N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED) e adicionado 0,15% de quercetina dissolvida em dimetil sulfóxido (DMSO) (DA ROSA; COELHO; DA SILVA; FERNANDES *et al.*, 2019). O tempo de leitura das amostras após a adição da quercetina foi em 0 (zero) e 20min, com a absorbância medida em 405nm. Por fim, para análise de GSH, as amostras foram precipitadas com 10% de TCA (ácido tricloroacético) na proporção de 1:4. A mistura foi centrifugada a 2000 rpm por dez minutos, e o sobrenadante foi incubado com uma solução de 1M TFK e 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (10 mM DTNB). A absorbância foi verificada em 412 nm, e os resultados foram expressos em nanomoles de GSH por miligrama de tecido (ELLMAN, 1959).

#### 4.11.2 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FATORES DE CRESCIMENTO E CITOCINAS

As concentrações de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) dos tecidos do hipocampo e córtex pré-frontal foram quantificadas através da técnica Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). Os tecidos encefálicos foram homogeneizados num Ultra-Turrax Homogenizer (IKA™, T18 basic, Wilmington, NC, USA)) com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo Tween 20 (0,05%), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, 0,1 mM), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de benzetônio (0,1 mM). Os homegenatos foram transferidos para microtubos de 1.5 ml

e, posteriormente, centrifugados a 3000g (10 min, 4°C). O sobrenadante obtido foi armazenado a -80 °C até a análise. As proteínas totais foram avaliadas conforme o método de Bradford, e os níveis de citocinas inflamatórias foram verificados de acordo com as recomendações dos fabricantes dos kits de ELISA para rato (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA; ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA). As leituras de absorvância das proteínas e citocinas foram realizadas em um leitor de placas ELISA (Multileitora Infinite M200 TECAN) a 690 e 450 nm, respectivamente.

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos por meio da avaliação comportamental, de desempenho motor e através das análises bioquímicas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey. Foi utilizado *Software GraphPad* (San Diego, CA, USA), sendo os dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e o nível de significância em todos os casos será considerado  $p < 0,05$ .

### 5 RESULTADOS

#### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MODELOS DE FIBROMIALGIA

No presente estudo, foram comparados modelos de indução de FM em animais, abordando primeiramente o modelo com uso de reserpina na dose de 1 mg/kg e o modelo com administração de salina ácida intramuscular. Para padronizar os modelos experimentais no laboratório, foram realizadas diversas análises, incluindo avaliação da hiperalgesia, aspectos motores, tipo-depressivo e ansioso, memória e alterações bioquímicas no encéfalo.

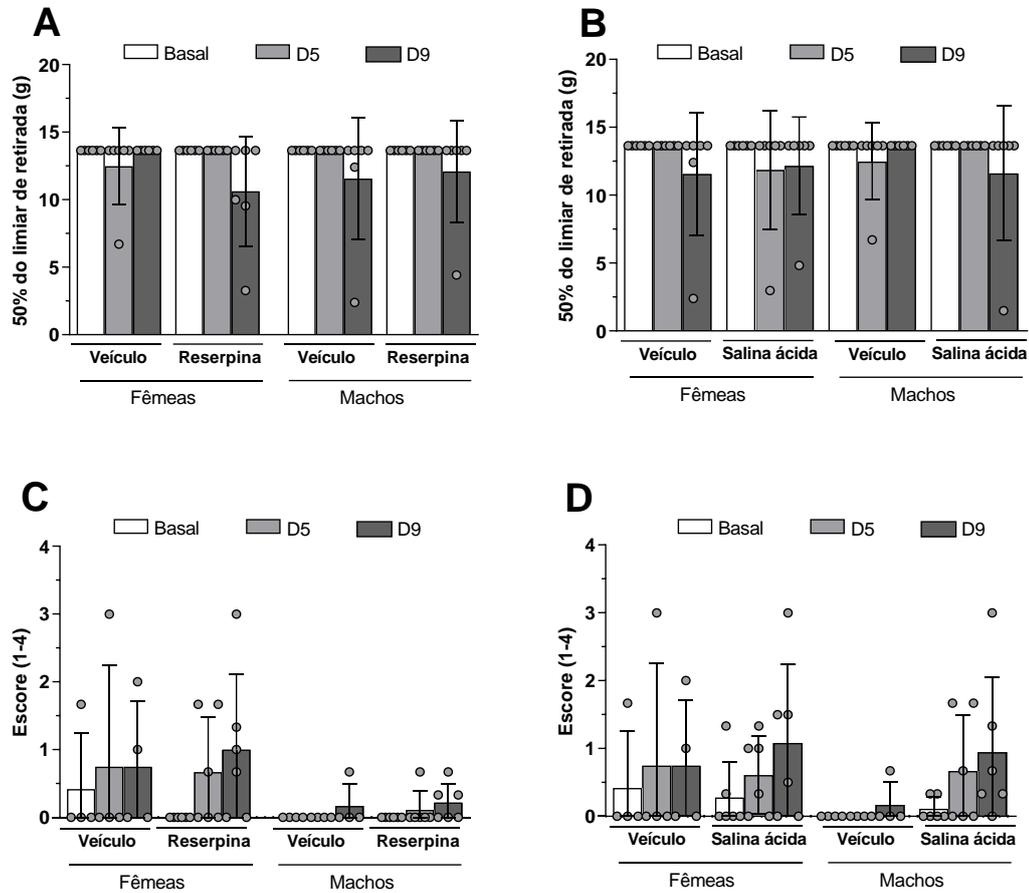
Inicialmente esta pesquisa buscou caracterizar os modelos já conhecidos e amplamente utilizados na literatura verificando seus efeitos em ratos machos e fêmeas. Neste sentido, primeiramente avaliamos o limiar de hiperalgesia mecânica e térmica ao frio nos animais, no entanto, não observamos diferença estatísticas entre os animais do mesmo grupo nos diferentes tempos avaliados, assim como não observamos alterações relacionadas ao sexo dos animais (Figura 8).

Investigamos a força de preensão plantar ou funcionalidade nos ratos e a comparação dos resultados de animais machos e fêmeas. No grupo controle (veículo), tanto fêmeas como machos, não apresentaram diferença estatística entre os pontos avaliados. As fêmeas que receberam reserpina apresentaram uma redução significativa da força no momento D9 ( $p=0,0068$ ) em relação ao basal. Quanto aos machos, no grupo que recebeu reserpina, observamos uma redução significativa da força no momento D5 ( $p=0,0207$ ) e no momento D9 ( $p=0,0061$ ). No grupo que recebeu salina ácida (duas aplicações), os machos também apresentaram uma redução significativa da força no momento D9 ( $p=0,0323$ ) (Figura 9A-B).

Realizamos ainda a comparação entre os sexos em relação à nocicepção espontânea utilizando a escala Grimace. No grupo que recebeu salina ácida, observamos que os machos apresentaram uma diferença estatisticamente significativa na avaliação da nocicepção tanto no momento D5 ( $p=0,0004$ ) quanto no momento D9 ( $p=0,0067$ ) (Figura 9D). Quanto ao grupo que recebeu Reserpina 1 mg/Kg, tanto os machos quanto as fêmeas demonstraram um aumento no escore de nocicepção no momento D5 ( $p=0,0002$  e  $p=0,0343$ , respectivamente). No momento D9, os resultados também revelaram um aumento significativo na nocicepção espontânea para ambos os sexos, com valores de  $p=0,0010$  e  $p<0,0001$ , respectivamente (Figura 9C), comparado aos valores basais do próprio grupo experimental.

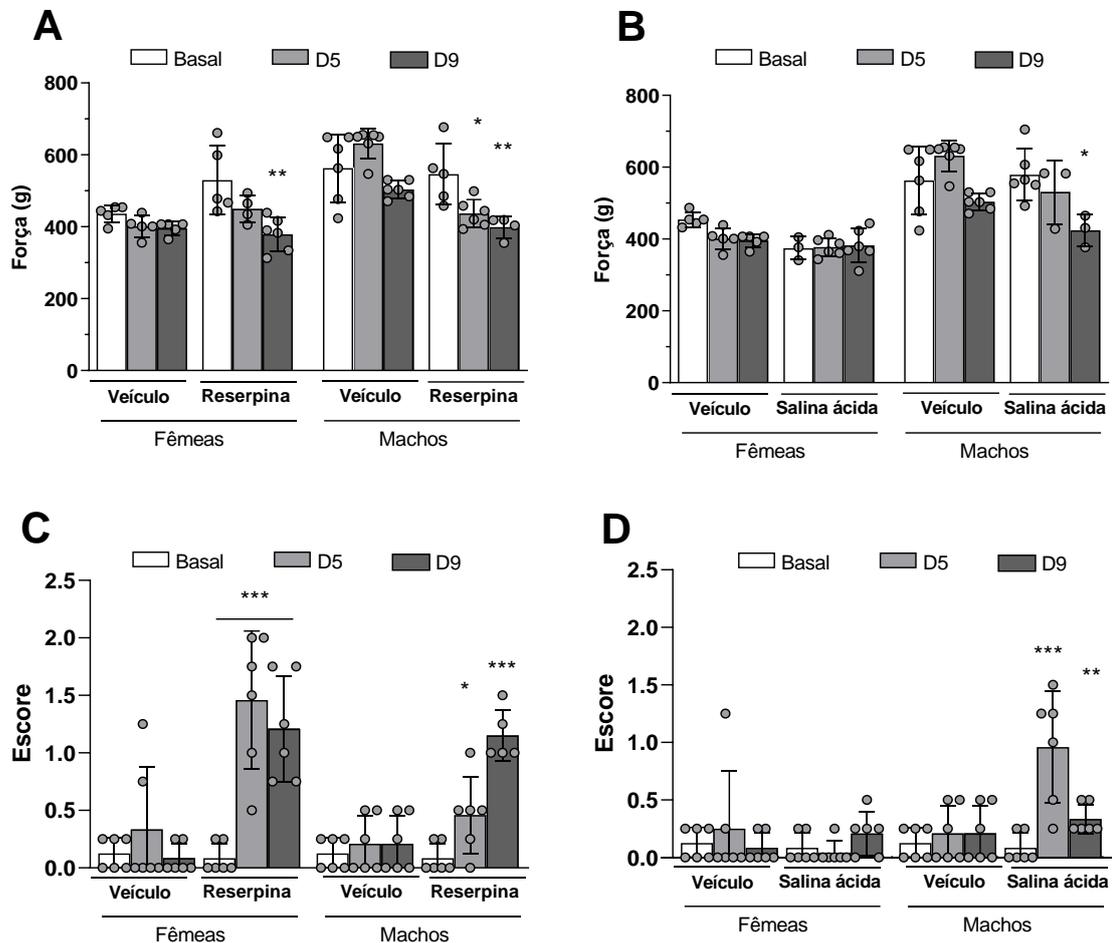
Concomitante as avaliações de nocicepção e força foi mensurado o peso corporal dos animais não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (dados não demonstrados).

**Figura 8: Avaliação de hiperalgesia mecânica e térmica de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida, demonstração da resposta de machos e fêmeas.**



**Legenda:** Basal – avaliação antes de iniciar as injeções do veículo, reserpina ou salina. D5 – 24h após a administração da terceira dose de reserpina ou da segunda dose de salina ácida. D9 – 5 dias após o protocolo de indução de fibromialgia por salina ácida ou reserpina. A - B: Hiperálgesia mecânica avaliada através dos filamentos de von Frey nos animais do grupo Reserpina (1 mg/Kg) e do grupo Salina ácida (duas aplicações), respectivamente. C - D: Hiperálgesia térmica ao frio avaliada com uso de acetona nos animais do grupo Reserpina (1 mg/Kg) e do grupo Salina ácida (duas aplicações), respectivamente. As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM.

Figura 9: Avaliação da força e funcionalidade e de nocicepção espontânea de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida, demonstração da resposta de machos e fêmeas.

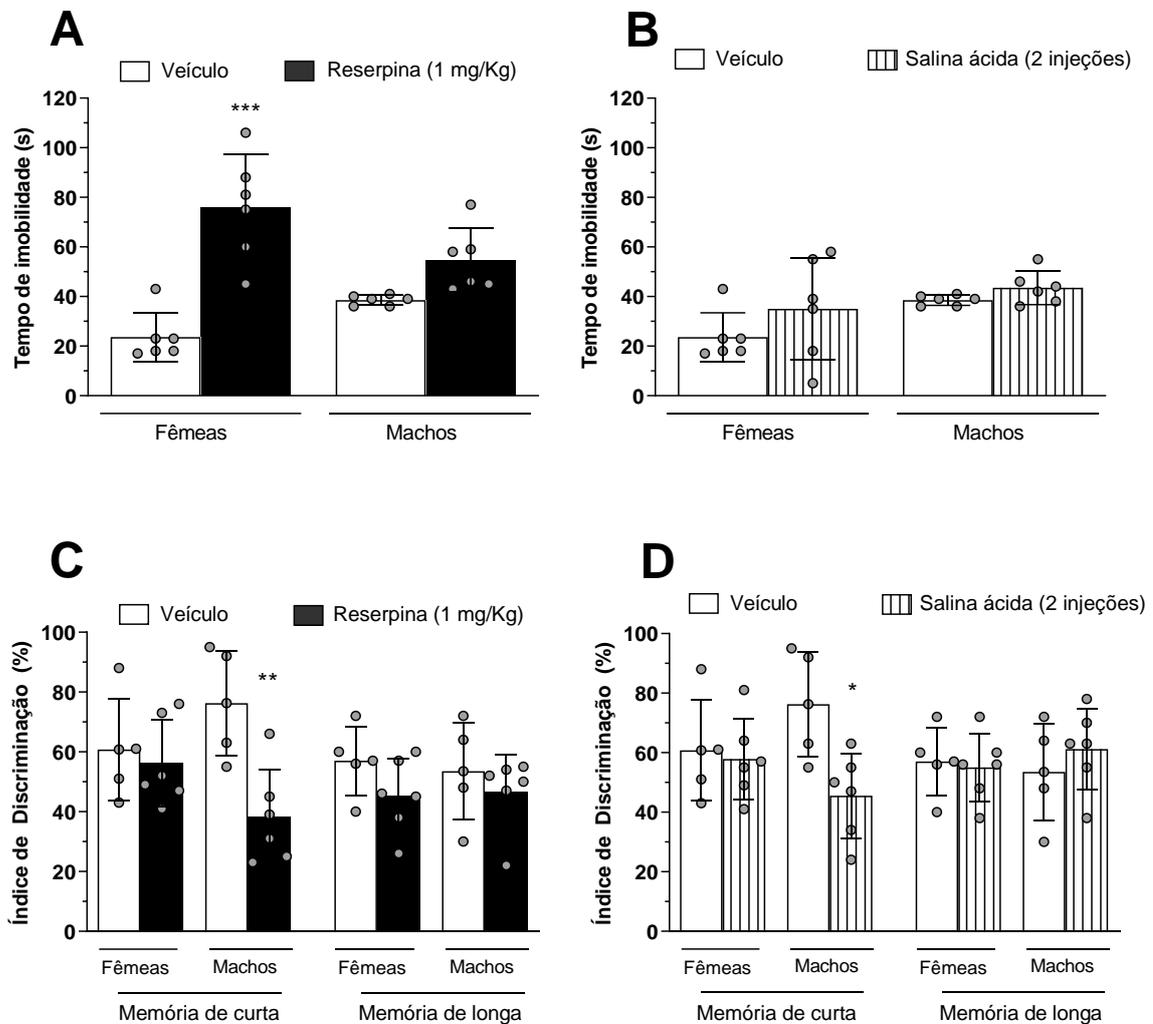


**Legenda:** Basal – avaliação antes de iniciar as injeções do veículo, reserpina ou salina. D5 – 24h após a administração da terceira dose de reserpina ou da segunda dose de salina ácida. D9 – 5 dias após o protocolo de indução de fibromialgia por salina ácida ou reserpina. A - B: Prensão plantar avaliada com GripForce nos animais do grupo Reserpina (1 mg/Kg) e do grupo Salina ácida (duas aplicações), respectivamente. C - D: Nocicepção espontânea avaliada através da escala Grimace nos animais do grupo Reserpina (1 mg/Kg) e do grupo Salina ácida (duas aplicações), respectivamente. As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao Basal do grupo.

No sexto dia (D10) após a aplicação da última injeção de reserpina e a aplicação da segunda injeção de salina ácida, foi realizada a avaliação do comportamento tipo-depressivo, onde observamos que as fêmeas do grupo Reserpina apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em comparação aos valores do grupo controle (veículo), com um valor de  $p < 0,0001$  (Figura 10A). No

segundo dia (D6) após a aplicação da última injeção de reserpina e a aplicação da segunda dose de salina ácida, foram realizadas as avaliações de memória de curta duração e, 24 horas após (D7), a análise da memória de longa duração. Em relação à memória de curta duração, observamos que os machos tratados com Reserpina apresentaram uma diferença significativa, com um valor de  $p=0,0054$  (Figura 10C), comparado aos animais do grupo controle (veículo). Da mesma forma, os machos tratados com salina ácida também mostraram uma diferença significativa, com um valor de  $p=0,0201$  (Figura 10D).

*Figura 10: Avaliação de aspectos tipo-depressivo e de alterações de memória de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida, demonstração da resposta de machos e fêmeas.*



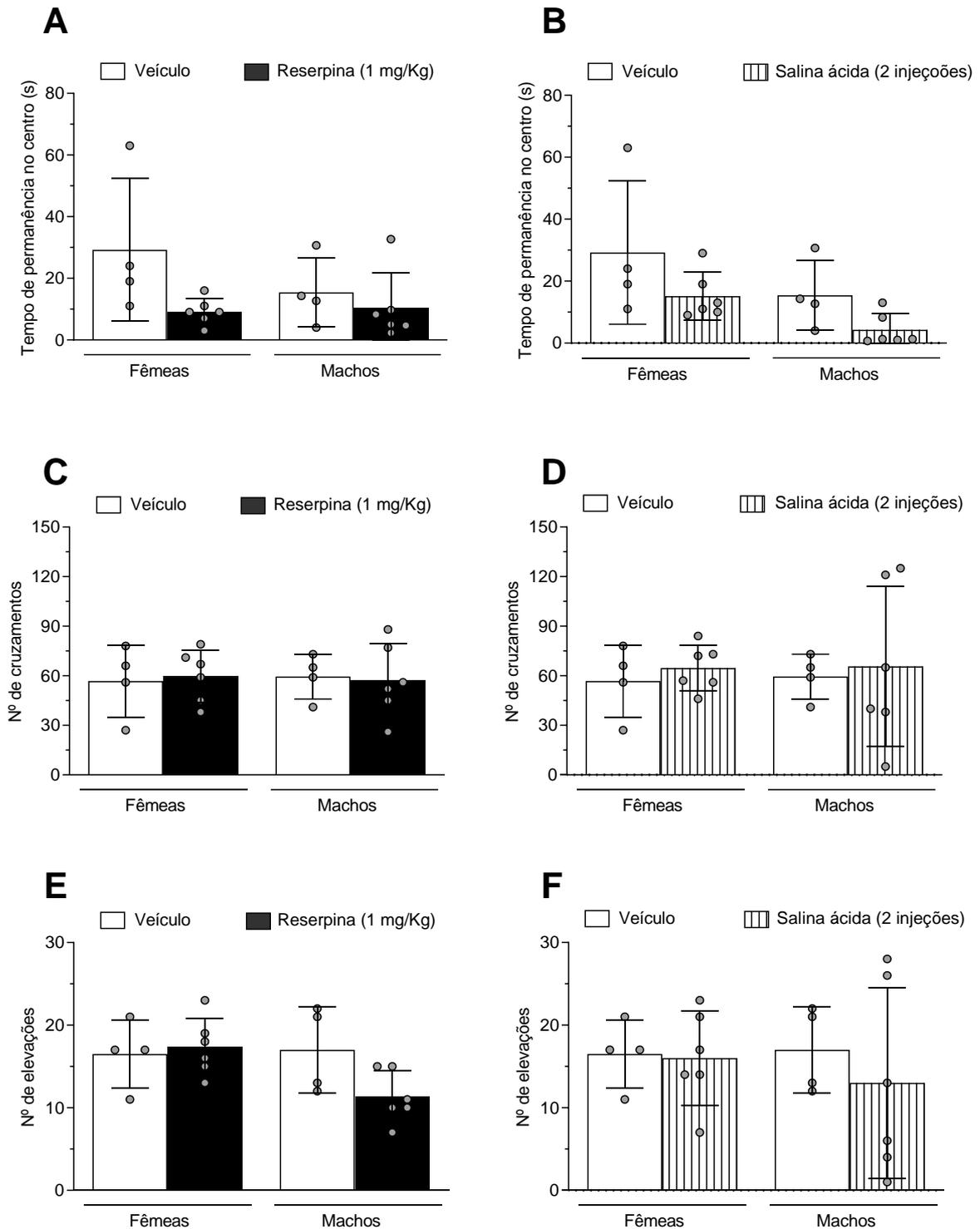
**Legenda:** **A:** Tempo de imobilidade avaliado no teste de nado forçado em animais que receberam Reserpina 1 mg/Kg. **B:** Tempo de imobilidade avaliado no teste de nado forçado em ratos que receberam Salina ácida (duas injeções intramusculares). **C:** Índice de discriminação de objetos avaliado

no teste de memória de reconhecimento de curta e longa duração em ratos que receberam Reserpina 1 mg/Kg. **D**: Índice de discriminação de objetos avaliado no teste de memória de reconhecimento de curta e longa duração em animais que receberam Salina ácida (duas injeções intramusculares). As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  comparado aos animais do grupo controle (veículo).

No primeiro dia após a aplicação da última injeção de reserpina e a aplicação da segunda injeção de salina ácida (D5) foi realizada a avaliação de aspectos locomotores e ansiedade. entre machos e fêmeas nos grupos que receberam reserpina (dose de 1 mg/Kg) e salina ácida (duas injeções intramusculares). Não foi possível observar nenhuma alteração significativa nessas características comportamentais dos grupos em relação ao controle (veículo). Isso indica que, tanto no comportamento tipo ansiogênico quanto para a mobilidade (observados no teste do campo aberto), não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (Figura 11).

O BDNF desempenha um importante papel no processamento de dados nociceptivos. Desta forma, escolhemos as fêmeas para verificar o montante de BDNF observados no hipocampo e no córtex pré-frontal. Na figura 12 pode-se observar a concentração do BDNF nas fêmeas submetidas aos modelos de Reserpina (dose de 1 mg/Kg) e salina ácida (duas injeções intramusculares). Contudo, não foi possível identificar impacto mensurável na expressão desse fator neurotrófico no hipocampo e no córtex cerebral, comparado ao conteúdo de BDNF nos animais do grupo veículo (controle).

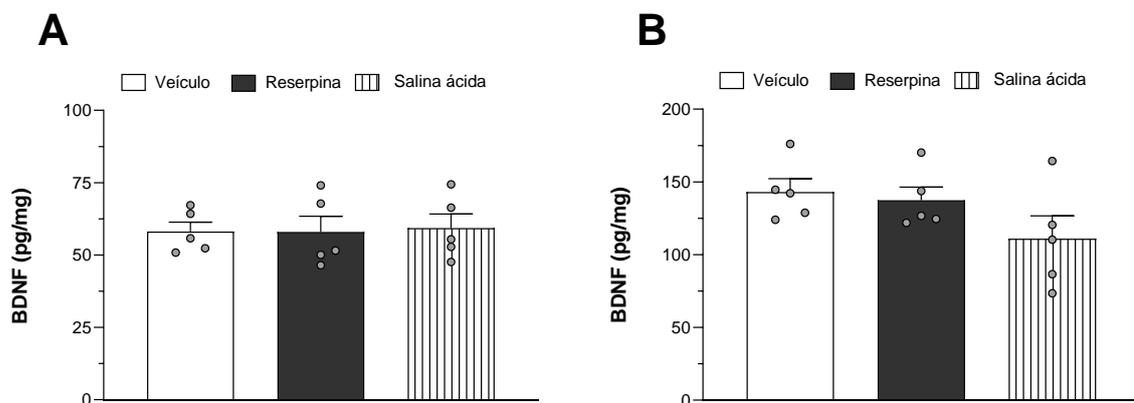
**Figura 11:** Avaliação dos aspectos de ansiedade e mobilidade de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida, demonstração da resposta de machos e fêmeas.



**Legenda:** A: Tempo de permanência no centro do aparato avaliado durante o teste de campo aberto em animais que receberam Reserpina 1 mg/Kg. B: Tempo de permanência no centro do aparato avaliado durante o teste de campo aberto em animais que receberam Salina ácida (duas injeções intramusculares). C: Frequência de cruzamentos realizados durante o teste de campo aberto em ratos

que receberam Reserpina 1 mg/Kg. D: Frequência de cruzamentos realizados durante o teste de campo aberto em ratos que receberam Salina ácida (duas injeções intramusculares). E: Frequência de elevações realizadas durante o teste de campo aberto em animais que receberam Reserpina 1 mg/Kg. F: Frequência de elevações realizadas durante o teste de campo aberto em animais que receberam Salina ácida (duas injeções intramusculares). As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM.

**Figura 12: Dosagem da expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em fêmeas submetidas aos modelos de Reserpina e Salina ácida.**



**Legenda:** Concentração de BDNF no córtex (**A**) e no hipocampo (**B**) dos animais dos grupos controle (veículo), Reserpina (1 mg/Kg) e Salina ácida (2 injeções), respectivamente. As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO MODELOS DE FIBROMIALGIA INDUZIDO POR INJEÇÃO DE UMA SUBDOSE DE RESERPINA ASSOCIADO À SALINA ÁCIDA

Visto que a resposta dos animais foi distinta entre machos e fêmeas, nesta etapa foram incluídos ambos os sexos nos grupos experimentais. Portanto, os animais machos e fêmeas foram somados para formar um grupo experimental, que foi constituído de metade de cada sexo. Desta forma, observou-se que a hiperalgesia mecânica variou ao longo do tempo em dois modelos específicos. No grupo que recebeu Reserpina na dose de 1 mg/Kg, foi constatada uma redução significativa do limiar sensorial aos estímulos mecânicos na primeira avaliação pós-intervenção (D5) em comparação aos níveis basais do próprio grupo experimental ( $p=0,045$ ). Além disso, esse mesmo padrão de comportamento foi observado novamente 5 dias após a intervenção (D9) em comparação ao D5 ( $p=0,037$ ). No grupo que recebeu Reserpina na dose de 0,1 mg/Kg s.c. associada à duas administrações de salina ácida, os

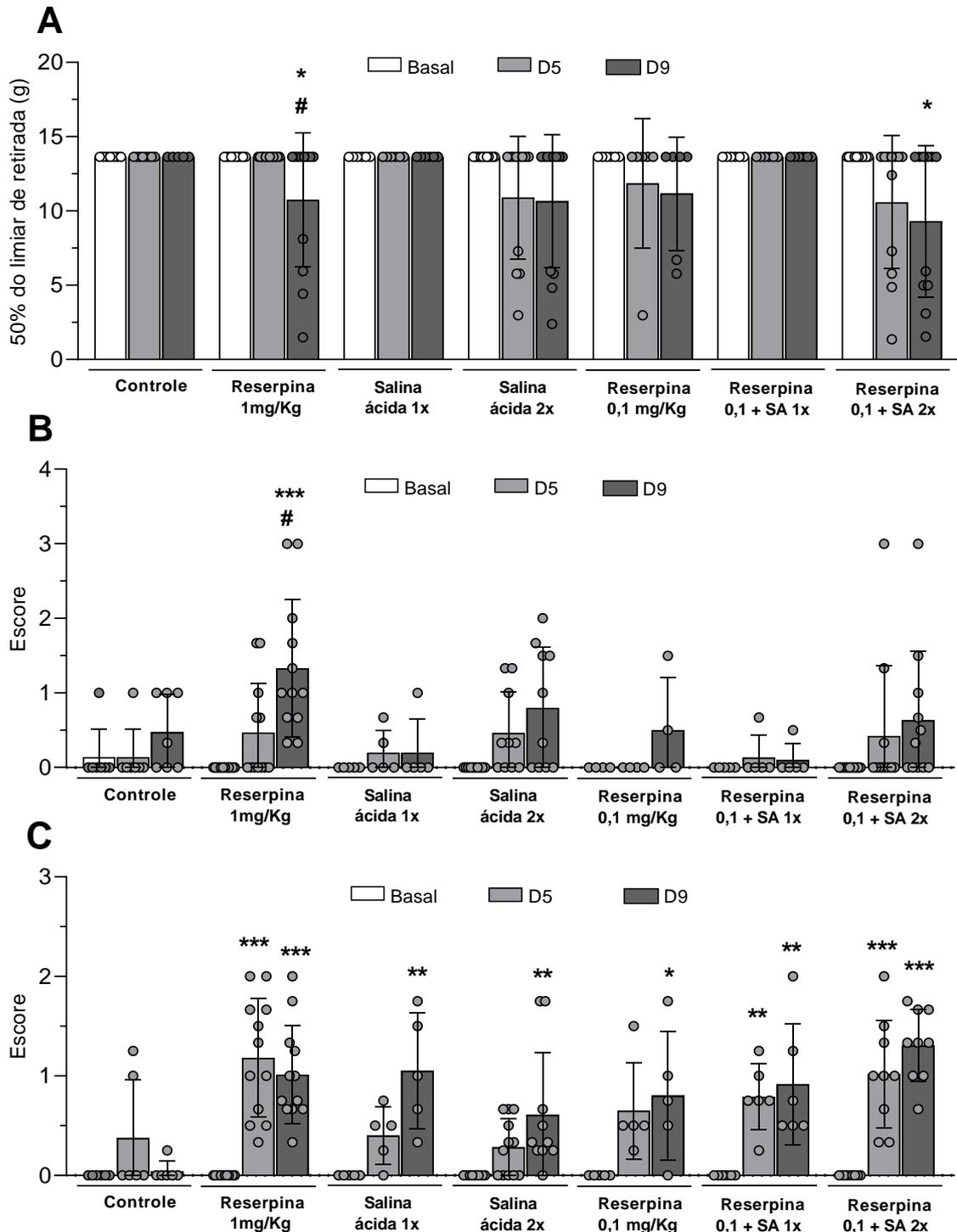
animais apresentaram resposta nociva aos estímulos quando comparados à avaliação basal ( $p=0,038$ ) no D9 (Figura 13A).

Ao analisar a hiperalgesia térmica ao frio nos mesmos grupos de intervenção, foram observados resultados estatisticamente significativos no grupo Reserpina 1 mg/Kg. Na avaliação D9, em comparação com a avaliação basal, foi encontrado um valor de  $p=0,0002$ , indicando uma diferença altamente significativa. Além disso, quando comparados os resultados obtidos em D5, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa com um valor de  $p=0,0161$  (Figura 13B).

Ao analisar a nocicepção espontânea nos diferentes grupos de intervenção, foram observados nos grupos Reserpina na dose 1mg/Kg e Reserpina 0,1 mg/Kg associado a administração de duas doses de salina ácida uma diferença altamente significativa ( $p<0,0001$ ) nas avaliações realizadas nos dias D5 e D9, indicando que houve uma resposta nociva aos estímulos mecânicos nestes grupos, tanto imediatamente após a intervenção quanto 5 dias depois. Tal resposta nociva pode ser observada no grupo que recebeu Reserpina 0,1 mg/Kg associado à salina ácida em uma administração, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas tanto no D5 ( $p=0,0096$ ) quanto no D9 ( $p=0,0032$ ).

Nos demais grupos observados houve diferença estatisticamente significativa em D9 quando comparado ao basal. Os animais que receberam uma dose de salina ácida como intervenção apresentaram  $p=0,0022$ . No grupo que recebeu salina ácida em duas administrações, foi observado  $p=0,0029$ . Nos grupos que receberam Reserpina na dose de 0,1 mg/Kg, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,046$ ) na avaliação do dia D9, indicando que os animais de ambos os grupos também demonstraram uma resposta nociva aos estímulos mecânicos no período avaliado (Figura 13C).

Figura 13: Avaliação de hiperalgesia e nociceção espontânea em animais de grupos experimentais que receberam Reserpina e Salina ácida em diferentes doses, isoladamente ou somados.

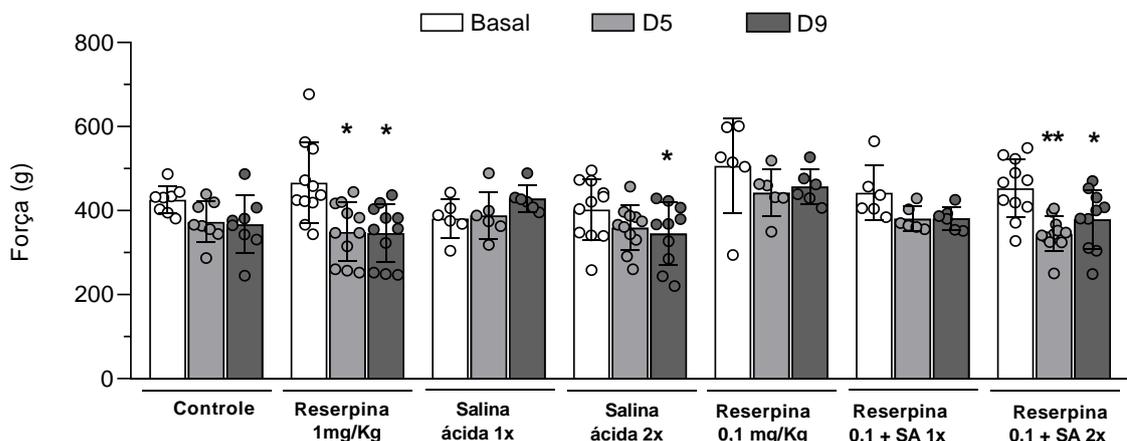


**Legenda:** Basal – avaliação antes de iniciar as injeções do veículo, reserpina ou salina. D5 – 24h após a administração da terceira dose de reserpina ou da segunda dose de salina ácida. D9 – 5 dias após o protocolo de indução de fibromialgia por salina ácida ou reserpina. A: Hiperálgesia mecânica avaliada pelo método de von Frey. B: Hiperálgesia térmica ao frio avaliada com uso de acetona. C: Avaliação da nociceção espontânea através da escala *Grimace* para ratos. As colunas representam os grupos

experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao basal do grupo. #  $p < 0,05$  comparado ao D5.

Foi analisada a força de preensão plantar em ratos, onde o grupo que recebeu Reserpina na dose de 1mg/Kg apresentou uma diferença estatisticamente significativa na força de preensão plantar, com um valor de  $p=0,0160$  no D5. Isso indica que a reserpina, nessa dose, teve um efeito significativo nesse parâmetro. No D9, a diferença também foi estatisticamente significativa, com um valor de  $p=0,0141$ . No grupo que recebeu salina ácida em 2 doses, foi verificado que no D9 houve uma diferença estatisticamente significativa na força de preensão plantar ( $p=0,0301$ ) sugerindo que a administração da salina ácida teve um impacto nesse parâmetro específico. Já no grupo que recebeu a combinação de Reserpina em dose de 0,1 mg/Kg e salina ácida em 2 doses, foi observado que no D5 houve uma diferença altamente significativa na força de preensão plantar ( $p=0,00008$ ), indicando que a combinação dessas substâncias teve um efeito extremamente relevante nesse parâmetro. No D9, a diferença também foi estatisticamente significativa, com um valor de  $p=0,0411$ . Esses resultados evidenciam que os diferentes grupos de tratamento tiveram impacto na força de preensão plantar dos ratos em momentos específicos. A reserpina, a salina ácida e a combinação dessas substâncias mostraram-se estatisticamente significativas na alteração desse parâmetro, os demais grupos avaliados não apresentaram diferença significante estatística, como apresentado na Figura 14.

*Figura 14: Avaliação da força de preensão plantar e funcionalidade em animais de grupos experimentais que receberam Reserpina e Salina ácida em diferentes doses, isoladamente ou somados.*

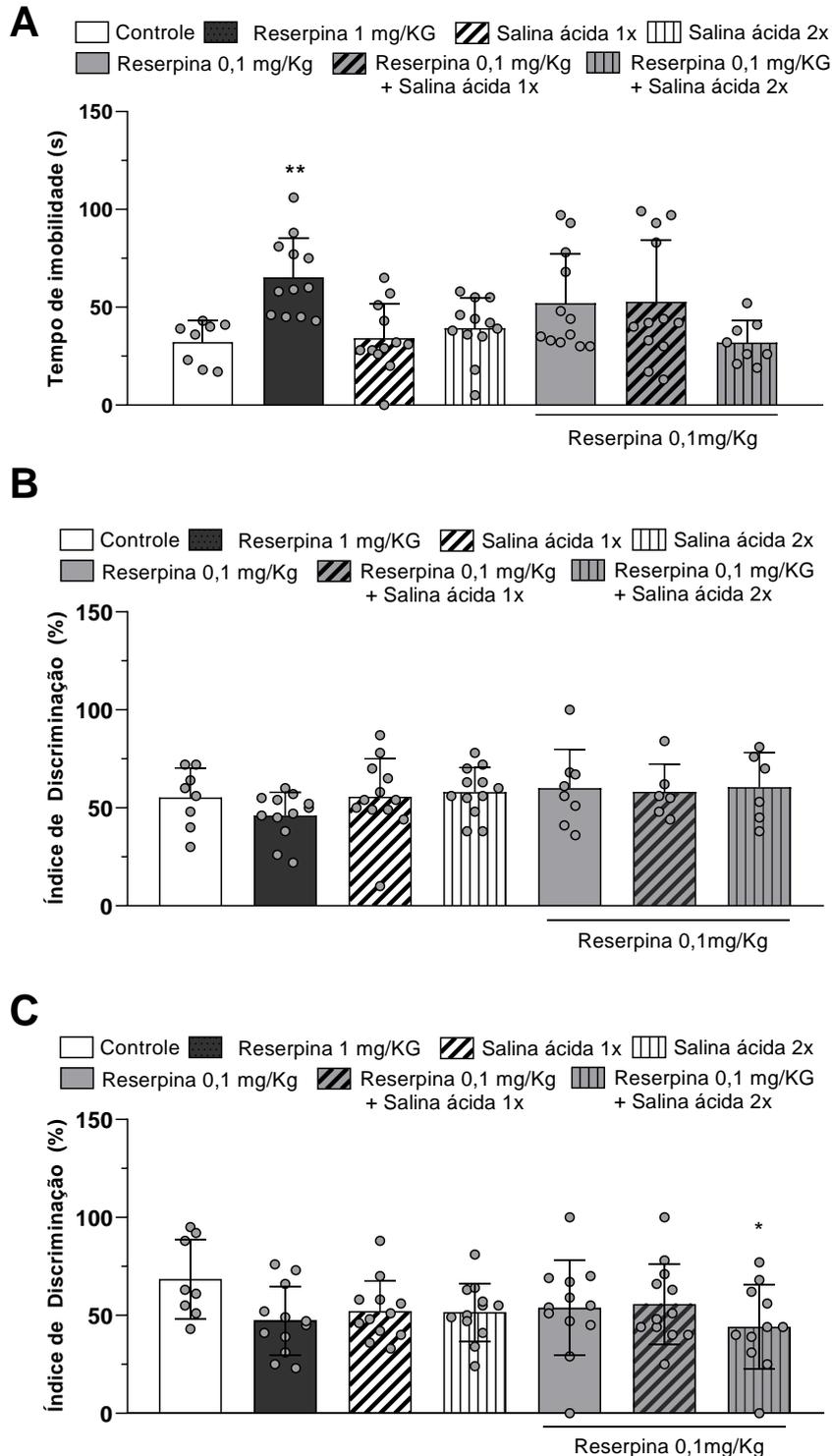


**Legenda:** Basal – avaliação antes de iniciar as injeções do veículo, reserpina ou salina. D5 – 24h após a administração da terceira dose de reserpina ou da segunda dose de salina ácida. D9 – 5 dias após o protocolo de indução de fibromialgia por salina ácida ou reserpina. Força de preensão plantar dos animais apresentando os resultados obtidos no teste de Grip Force. As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao basal do grupo. #  $p < 0,05$  comparado ao D5.

No D10, ao analisarmos o comportamento tipo-depressivo observamos que os animais tratados com reserpina apresentaram um comportamento compatível com sintomas depressivos, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Figura 15A). Os valores obtidos através do teste de nado forçado, demonstram que os animais do grupo Reserpina 1 mg/Kg apresentaram tempo de imobilidade significativamente superior ao grupo controle ( $p = 0,0044$ ). O índice de discriminação de objetos apresentou diferença significativa no grupo Reserpina 0,1 mg/Kg + Salina ácida 2x ( $p = 0,0233$ ) quando analisada a memória de curta duração (Figura 15B), sem diferença significativamente estatística entre os grupos quando analisada a memória de longa duração.

Quando observamos as variáveis obtidas nos testes realizados no aparato de campo aberto, foi possível observar diferença significativamente estatística na comparação dos animais dos grupos Salina ácida 2x ( $p = 0,0275$ ), Reserpina 0,1 mg/Kg ( $p = 0,0438$ ), Reserpina 0,1 mg/Kg + Salina ácida 1x ( $p = 0,0284$ ) ou 2x (0,0104) observando o tempo que permaneceram no centro do aparato quando comparados ao grupo controle (veículo) (Figura 16A). Na comparação entre o número de elevações e cruzamentos realizadas durante o teste, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

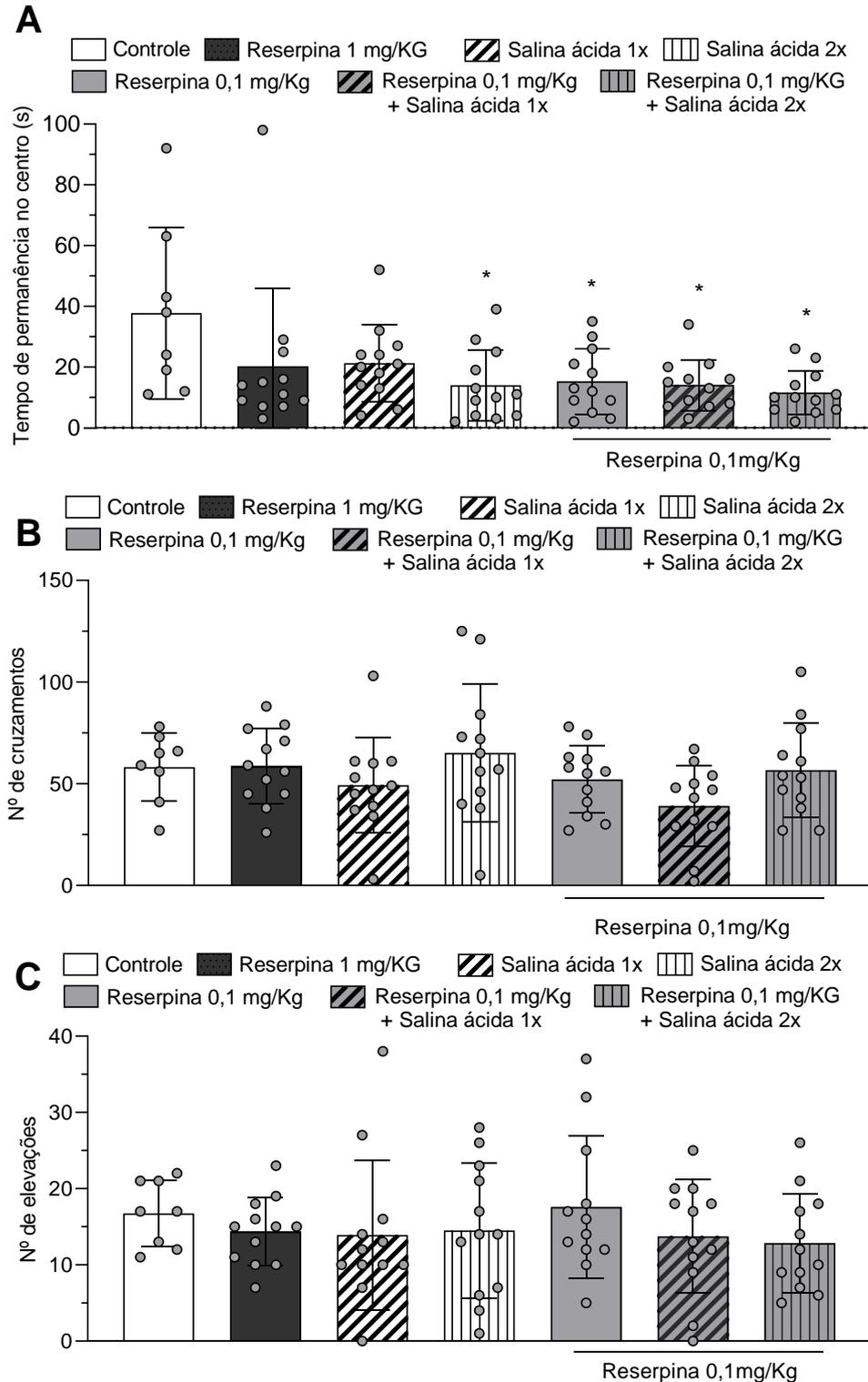
**Figura 15: Avaliação de aspectos tipo-depressivo e de alterações de memória de ratos submetidos aos diferentes modelos de fibromialgia induzidos por Reserpina e Salina ácida.**



**Legenda:** A: Tempo de imobilidade avaliado no teste de nado forçado em ratos que submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. B: Índice de discriminação de objetos avaliado no teste de memória de reconhecimento de longa duração em ratos que submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. C: Índice de discriminação de objetos avaliado no teste de memória de reconhecimento de curta duração em ratos que submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. As colunas

representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM.  
 \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , comparado aos animais do grupo controle (veículo).

**Figura 16: Avaliação dos aspectos de ansiedade e mobilidade de ratos submetidos aos diferentes modelos de fibromialgia induzidos por Reserpina e Salina ácida.**



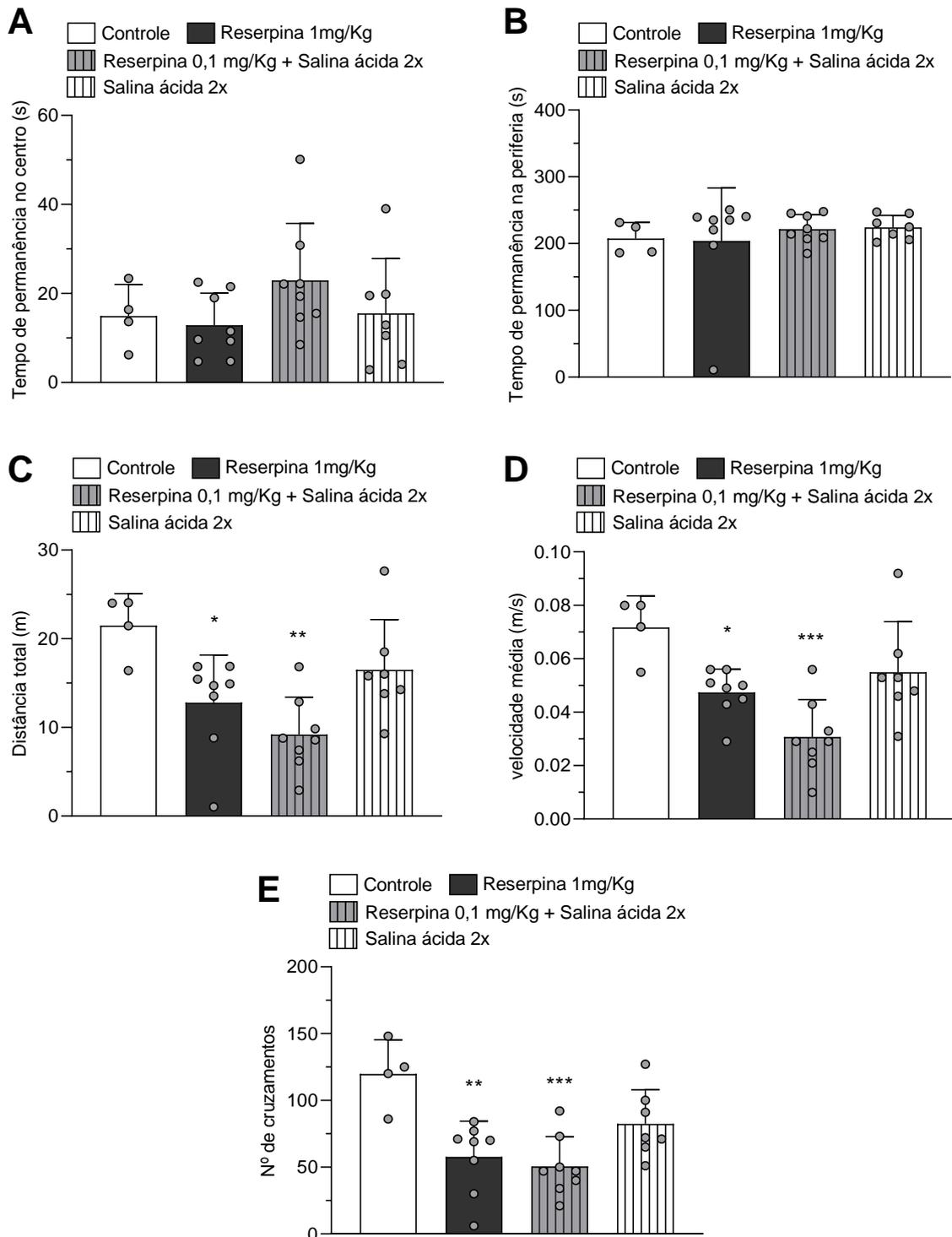
**Legenda: A:** Tempo de permanência no centro do aparato avaliado durante o teste de campo aberto em ratos submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. **B:** Frequência de cruzamentos

realizados durante o teste de campo aberto em ratos submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. **C:** Frequência de elevações realizadas durante o teste de campo aberto em ratos submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , comparado aos animais do grupo controle (veículo).

Na avaliação comportamental realizada no aparato de campo aberto e, através da análise dos vídeos com o uso do software Any-Maze, observou-se que o grupo tratado com reserpina na dose de 1 mg/Kg apresentou uma redução significativa na distância percorrida em um intervalo de cinco minutos quando comparado ao grupo controle ( $p = 0,0204$ ). Da mesma forma, o grupo tratado com reserpina na dose de 0,1 mg/Kg + salina ácida 2x também demonstrou uma diminuição significativa nesse parâmetro ( $p = 0,0012$ ) (Figura 17C). Essa redução na distância percorrida reflete a diminuição da velocidade exercida pelos animais desses grupos, sendo que o grupo reserpina 1 mg apresentou diferença significativa ( $p = 0,0213$ ), assim como o grupo reserpina 0,1 mg/Kg + salina ácida 2x ( $p = 0,0002$ ) (Figura 17D). Essas alterações no desempenho motor também foram evidenciadas pelos resultados dos cruzamentos realizados durante o teste, nos quais os animais do grupo reserpina 1 mg apresentaram diferença significativa ( $p = 0,0013$ ) em relação ao grupo controle, assim como os animais do grupo reserpina 0,1 mg/Kg + salina ácida 2x ( $p = 0,0004$ ) (Figura 17E). Esses achados indicam que ambos os grupos tratados com reserpina apresentaram um desempenho motor e funcionalidade inferiores aos demais grupos.

O Any-Maze foi utilizado para avaliar o desempenho locomotor dos animais tratados com reserpina e/ou salina, em comparação com o grupo controle. Com base nos dados coletados pelo sistema, o software gerou mapas de calor que indicam as áreas mais frequentemente percorridas pelos animais ao longo do teste. A geração dos mapas de calor permitiu uma representação visual da movimentação dos animais durante o teste, fornecendo informações adicionais sobre o comportamento locomotor e auxiliando na interpretação dos resultados obtidos (Figura 18).

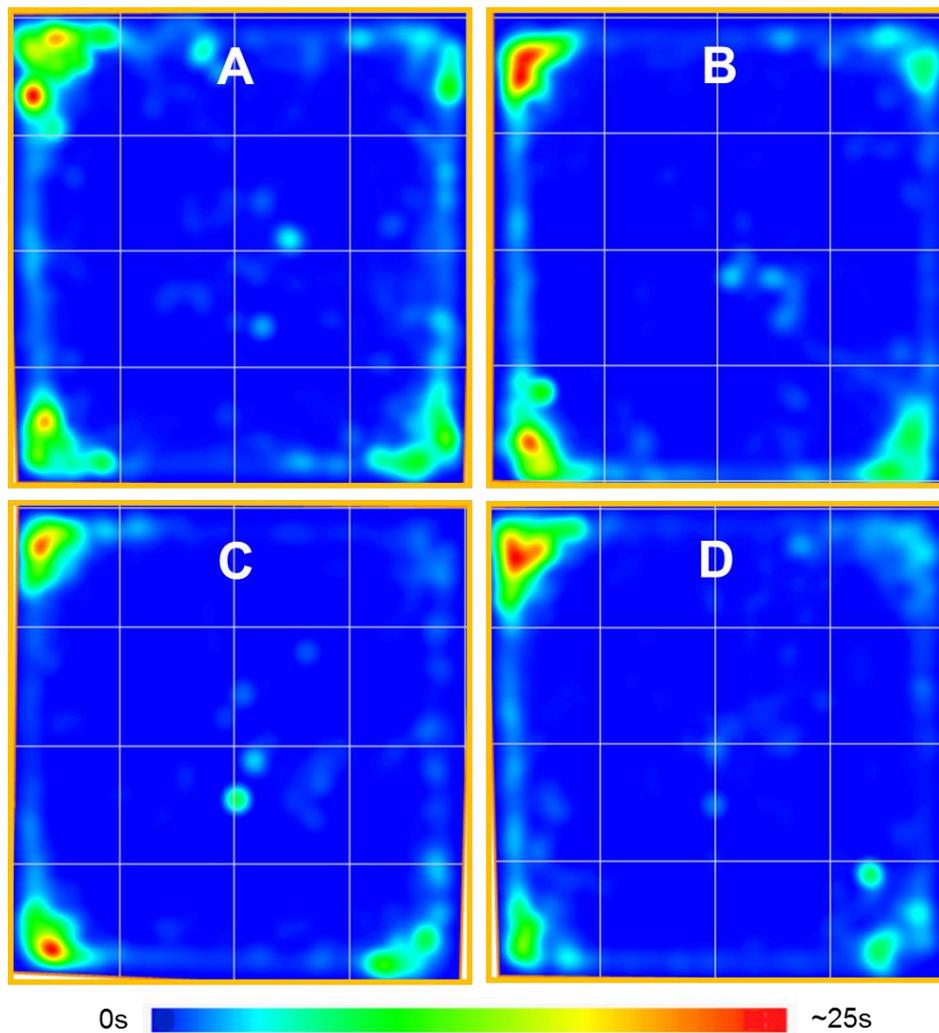
**Figura 17: Avaliação dos aspectos de ansiedade e mobilidade de ratos submetidos aos diferentes modelos de fibromialgia induzidos por Reserpina e Salina ácida utilizando o Any-maze.**



**Legenda:** A: Tempo de permanência no centro do aparato avaliado durante o teste de campo aberto em ratos submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. B: Tempo de permanência nas periferias do aparato avaliado durante o teste de campo aberto em ratos em ratos submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. C: Distância total percorrida pelos animais durante o teste de

campo aberto em ratos submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. **D**: Velocidade média exercida pelos animais durante o teste de campo aberto em ratos submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. **E**: Frequência de cruzamentos realizados durante o teste de campo aberto em ratos submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , comparado aos animais do grupo controle (veículo).

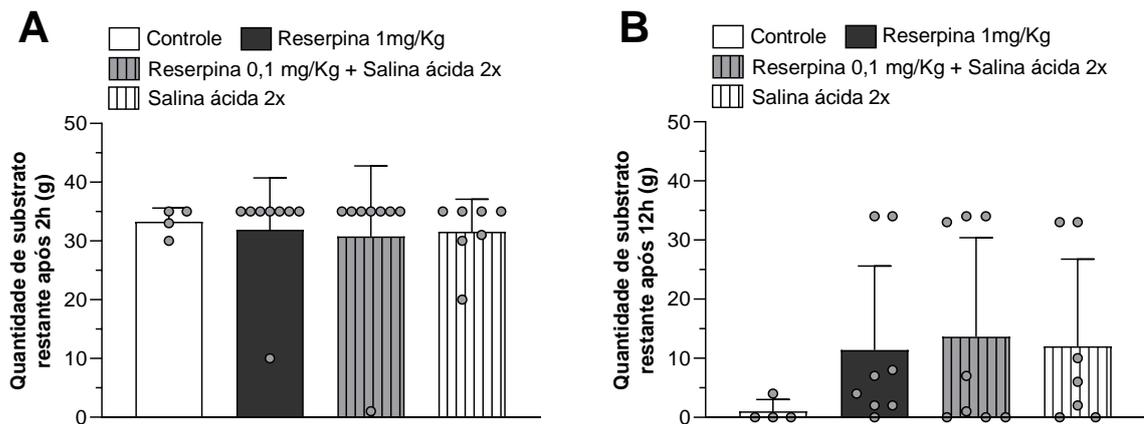
*Figura 18: Ocupação do aparato de campo aberto pelos animais submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia.*



**Legenda:** Mapas de calor gerados a partir dos dados obtidos na análise realizada no software Any-Maze. As áreas em azul representam locais pouco explorados pelos animais e as áreas em vermelho representam locais onde os animais permaneceram por um período maior. A figura representa os grupos controle (veículo) (A), Reserpina 1 mg/Kg (B), Reserpina 0,1 mg/Kg + salina ácida 2x (C) e salina ácida 2x (D). A escala visual analógica representa o período de tempo aproximado que os animais permanecerem nas áreas.

No quarto dia após a última injeção de reserpina e a segunda injeção de salina (D8) foi verificada a capacidade de escavação dos animais. Tanto na avaliação de duas horas quanto na avaliação noturna de doze horas os animais não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 19).

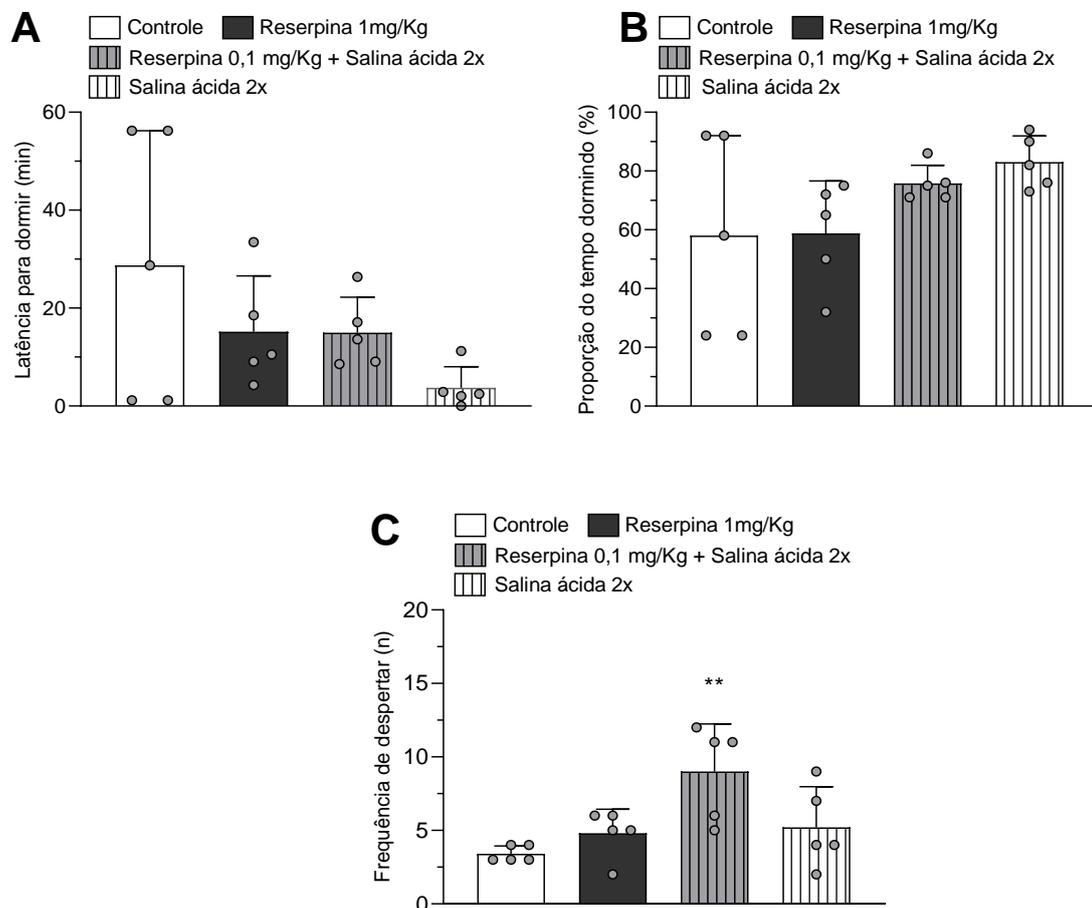
*Figura 19: Capacidade de escavação dos animais submetidos aos modelos de indução de fibromialgia.*



**Legenda:** A figura representa os dados referente ao quantitativo de substrato que permaneceu no aparato após o término do período de análise de 2h (A) e 12h (B). As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM.

Os distúrbios do sono são frequentemente observados em pacientes com FM. Neste contexto, analisamos o comportamento do sono nos animais e não encontramos diferença significativa entre os grupos na latência do sono e na proporção de tempo em que os animais permaneceram dormindo. No entanto, observamos uma maior frequência de despertares nos animais tratados com reserpina 0,1 mg/Kg e salina ácida 2x em comparação ao grupo controle ( $p=0,0039$ ) (Figura 20). Esses resultados sugerem que essa combinação de tratamentos pode ter um impacto negativo na continuidade do sono, sem afetar a latência ou a quantidade total de tempo dormindo.

**Figura 20: Análise de distúrbios do sono em animais submetidos aos modelos de indução de fibromialgia.**

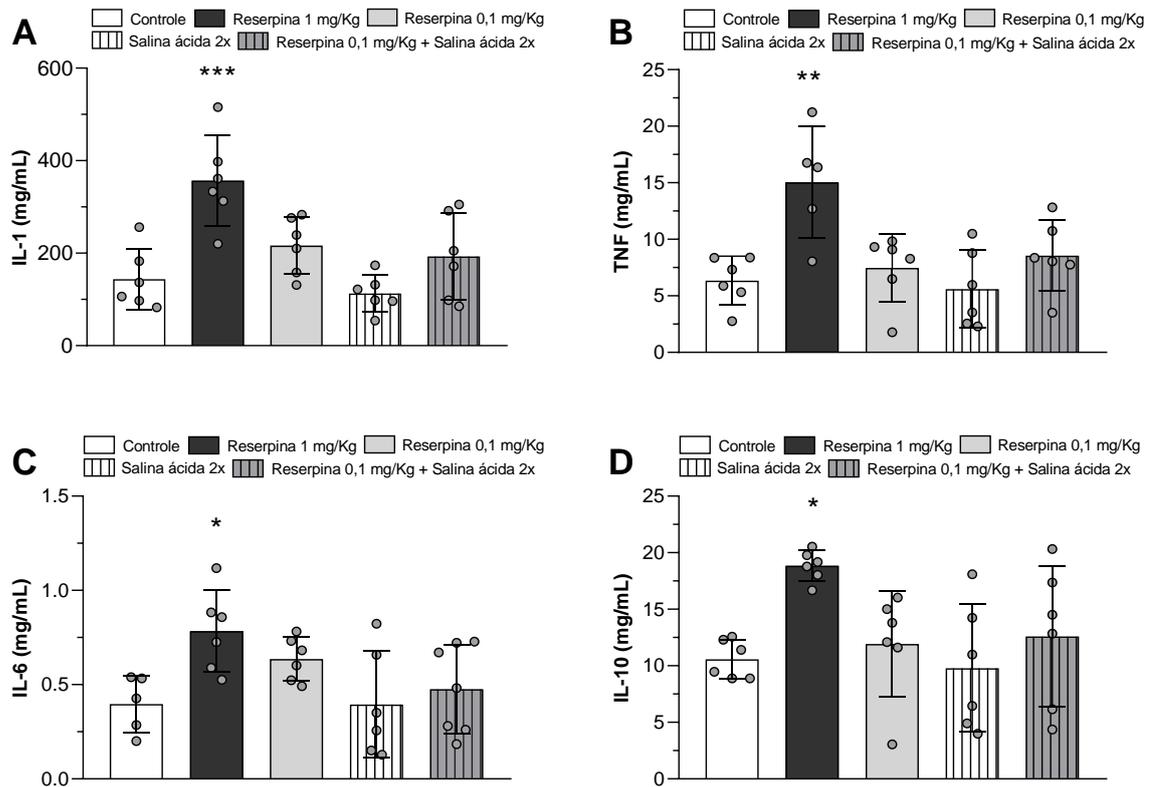


**Legenda:** A figura apresenta a análise comportamental do sono dos animais submetidos aos modelos experimentais de fibromialgia. São apresentados os dados referentes ao tempo que o animal demorou para adotar a postura de bola (A), proporção de tempo que permaneceu na postura (B) e quantidade de vezes que o animal saiu da postura ao longo do período de observação (C). As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM. \*\*  $p < 0,01$ , comparado aos animais do grupo controle (veículo).

Após a retirada das estruturas do córtex e hipocampo nos animais, foram realizadas análises das concentrações de citocinas inflamatórias a nível cerebral. Observou-se que no grupo que recebeu Reserpina 1 mg/Kg, houve diferenças significativas em relação ao grupo controle nas concentrações de IL-1 ( $p=0,0004$ ), IL-6 ( $p=0,0434$ ), IL-10 ( $p=0,0255$ ) e TNF ( $p=0,0024$ ) na região do córtex (Figura 21). Esses resultados indicam um aumento na resposta inflamatória nessas citocinas no córtex do grupo tratado com reserpina em comparação ao grupo controle e aos demais

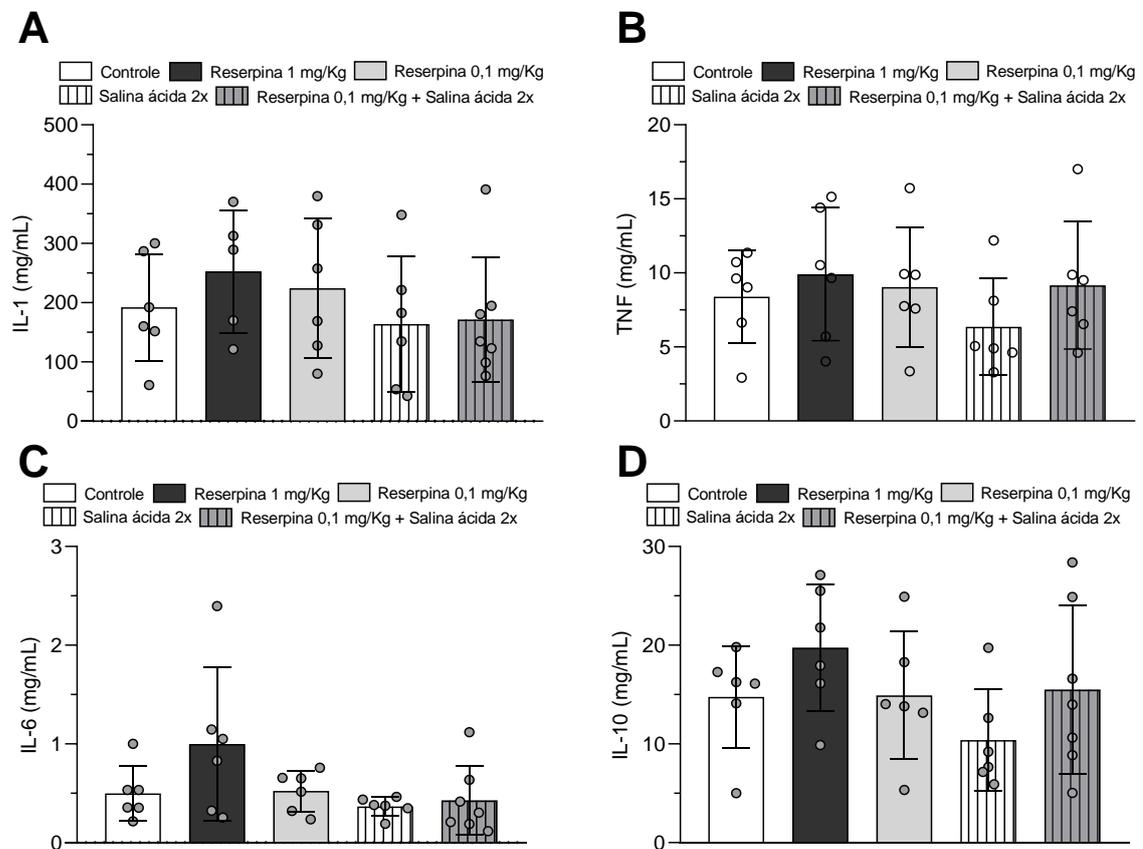
modelos propostos. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nas análises das concentrações de citocinas no hipocampo (Figura 22).

**Figura 21: Concentração de citocinas inflamatórias no córtex de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida.**



**Legenda:** Concentração de interleucina 1 (A), TNF (B), interleucina 6 (C) e interleucina 10 (D) no córtex dos animais do grupo controle (veículo), Reserpina (1 mg/Kg), Reserpina (0,1 mg/Kg), Salina ácida (2 injeções) e Reserpina + Salina ácida (0,1 mg/Kg + 2 injeções), respectivamente. As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparados aos animais do grupo controle (veículo).

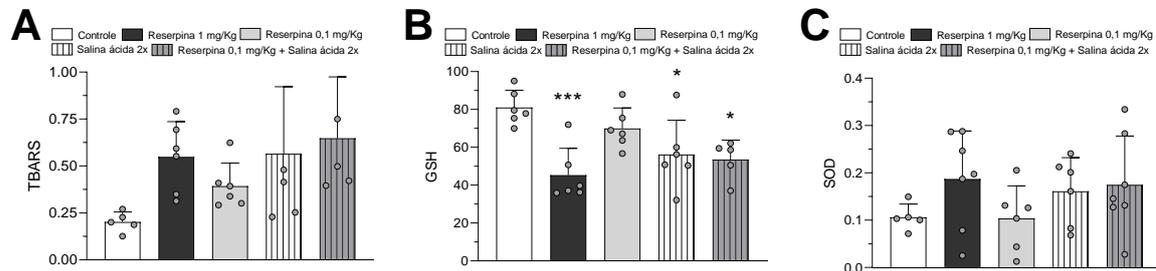
**Figura 22: Concentração de citocinas inflamatórias no hipocampo de ratos submetidos aos modelos de Reserpina e Salina ácida.**



**Legenda:** Concentração de interleucina 1 (A), TNF (B), interleucina 6 (C) e interleucina 10 (D) no hipocampo dos animais do grupo controle (veículo), Reserpina (1 mg/Kg), Reserpina (0,1 mg/Kg), Salina ácida (2 injeções) e Reserpina + Salina ácida (0,1 mg/Kg + 2 injeções), respectivamente. As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM.

Na análise dos tecidos obtidos após a remoção do gastrocnêmio direito dos animais, avaliamos os níveis de glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos diferentes grupos experimentais. Observamos que os grupos que receberam Reserpina 1 mg/Kg ( $p=0,007$ ), Reserpina 0,1 mg/Kg + salina ácida 2x ( $p=0,0225$ ) e salina ácida ( $p=0,0149$ ) apresentaram uma redução significativa nos níveis de GSH na estrutura do gastrocnêmio em comparação ao grupo controle (Figura 23B). Em relação às medidas de SOD e TBARS, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

**Figura 23:** Dosagem dos níveis de estresse oxidativo e substâncias antioxidantes em animais submetidos a modelos de Reserpina e Salina ácida.



**Legenda:** Concentração de TBARS (A), GSH (B) e SOD (C) no músculo gastrocnêmio dos animais do grupo controle (veículo), Reserpina (1 mg/Kg), Reserpina (0,1 mg/Kg), Salina ácida (2 injeções) e Reserpina + Salina ácida (0,1 mg/Kg + 2 injeções), respectivamente. As colunas representam os grupos experimentais, os círculos os animais do grupo e as barras representam o EPM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparados aos animais do grupo controle (veículo).

## 6 DISCUSSÃO

Na primeira etapa deste estudo, investigamos os efeitos de modelos experimentais de FM induzida por reserpina e por salina ácida em ratos machos e fêmeas sob a hiperalgesia mecânica e térmica, nocicepção espontânea, força e funcionalidade, locomoção, aspecto tipo-depressivo e tipo-ansioso, memória e concentração de BDNF. Nossos resultados demonstram que ambos os modelos foram capazes de promover alterações nas variáveis observadas. Foi identificado aumento da nocicepção e redução da força nos animais machos e fêmeas do modelo reserpina e apenas em fêmeas do modelo salina ácida. Com relação ao comportamento tipo-depressivo, apenas fêmeas apresentaram comportamento de desesperança e, quando analisada a memória, os animais machos de ambos os grupos apresentaram alterações na memória de curta duração.

Está bem estabelecido da literatura que o modelo de reserpina é capaz de mimetizar a FM (NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009; OE; TSUKAMOTO; NAGAKURA, 2010; TAMANO; ISHIDA; ASAKI; HASEGAWA *et al.*, 2016). Nosso estudo parece ser consistente com outras pesquisas que observaram alterações na nocicepção. Estudos anteriores foram capazes de demonstrar que animais tratados com reserpina demonstraram aumento da nocicepção espontânea através da avaliação da expressão facial (NAGAKURA; MIWA; YOSHIDA; MIURA *et al.*, 2019;

TANEI; MIWA; YOSHIDA; MIURA *et al.*, 2020). Outro achado consistente está relacionado aos efeitos da reserpina sob a força muscular dos animais. Quando submetidos ao modelo de FM em questão, os animais apresentaram redução da força muscular no teste de preensão (BRUM, E. D. S.; FIALHO, M. F. P.; FISCHER, S. P. M.; HARTMANN, D. D. *et al.*, 2020; BRUSCO; JUSTINO; SILVA; SCUSSEL *et al.*, 2021; DAGNINO; DA SILVA; CHAGASTELLES; PEREIRA *et al.*, 2019; FISCHER; BRUSCO; BRUM; FIALHO *et al.*, 2020).

Dentre os achados quanto ao comportamento do tipo-depressivo, o presente estudo corrobora com pesquisas em ratos realizadas anteriormente, assim como em nosso estudo, os animais tratados com reserpina tendem a aumentar o tempo de imobilidade e reduzir o tempo de natação durante o teste de nado forçado (ARORA; CHOPRA, 2013; ARORA; KUHAD; TIWARI; CHOPRA, 2011; BRUM, E.; FIALHO, M.; FISCHER, S.; HARTMANN, D. *et al.*, 2020; BRUSCO; JUSTINO; SILVA; FISCHER *et al.*, 2019; DAGNINO; DA SILVA; CHAGASTELLES; PEREIRA *et al.*, 2019; NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009; OLIVEIRA; MARCONDES SARI; ZBOROWSKI; PRADO *et al.*, 2016).

Surpreende discrepância no resultado entre machos e fêmeas, onde a literatura ainda não apresenta uma provável causa para esta resposta apenas em fêmeas para o modelo de fibromialgia usando reserpina. Estudos que investigaram o comportamento do tipo depressivo em animais de ambos os sexos foram capazes de demonstrar que há uma regulação dependente de testosterona na expressão de quinase regulada por sinal extracelular (ERK2) no hipocampo, este mecanismo permite que animais machos respondam melhor ao estresse e apresentem menores níveis de comportamento tipo depressivo em testes comportamentais (CARRIER, 2012).

Outro mecanismo sexualmente dimórfico está relacionado à resposta ao estresse a partir de um mediador primário de resposta ao estresse, o fator de liberação de corticotrofina (CRF), estudo demonstraram que o receptor de CRF (CRFr) é sinalizado de maneira diferente, potencializando a resposta ao estresse e diminuindo a capacidade de adaptação em fêmeas, tornando-as mais suscetíveis a transtornos do tipo depressivo (BANGASSER; CURTIS; REYES; BETHEA *et al.*, 2010; XIA; WANG; ZHANG; LIU *et al.*, 2023).

De acordo com os presentes resultados apresentados em relação a redução da memória dos machos tratados com reserpina, um estudo anterior realizado por

Blasco-Serra et al. (2020) sugere déficits cognitivos e comprometimento da consolidação da memória após administração de reserpina capaz de explicar tal alteração (BLASCO-SERRA; ALFOSEA-CUADRADO; CERVERA-FERRI; GONZÁLEZ-SOLER *et al.*, 2020). A diferença de resultados entre os sexos ainda não foi bem esclarecida e parece não ser um fator que interfira no uso deste modelo (HERNANDEZ-LEON; DE LA LUZ-CUELLAR; GRANADOS-SOTO; GONZÁLEZ-TRUJANO *et al.*, 2018).

Ao contrário das expectativas, este estudo não foi capaz de encontrar diferenças significativa com relação a hiperalgesia quando observados os resultados de machos e fêmeas isoladamente. Nossos resultados não demonstraram alteração no limiar de retirada da pata e hiperalgesia térmica ao frio nesses animais. Esses sintomas são amplamente abordados na literatura onde animais tratados com reserpina apresentaram redução no limiar de resposta tátil e hipersensibilidade térmica ao frio e foram observados aqui apenas quando os animais dos dois sexos ficaram no mesmo grupo experimental (BRUM, E. D. S.; FIALHO, M. F. P.; FISCHER, S. P. M.; HARTMANN, D. D. *et al.*, 2020; BRUSCO; JUSTINO; SILVA; FISCHER *et al.*, 2019; BRUSCO; DOREIAN; STEINLEY, 2021; HERNANDEZ-LEON; DE LA LUZ-CUELLAR; GRANADOS-SOTO; GONZÁLEZ-TRUJANO *et al.*, 2018; HERNANDEZ-LEON; FERNANDEZ-GUASTI; MARTINEZ; PELLICER *et al.*, 2019; NAGAKURA; MIWA; YOSHIDA; MIURA *et al.*, 2019; NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009; NAGAKURA; TAKAHASHI; NOTO; SEKIZAWA *et al.*, 2012).

Nesta fase do protocolo, a indução de FM por salina ácida foi capaz de gerar alterações apenas em machos. Estes ratos apresentaram aumento na nocicepção espontânea e alterações de memória de curta duração, resultados até então não expressos na literatura. Os animais tratados com salina ácida apresentaram redução de força muscular. No entanto, Tillu, Gebhart, & Sluka, 2008, usando o teste de preensão, não demonstraram redução na força muscular de ratos 24 horas após a segunda injeção de salina ácida (TILLU; GEBHART; SLUKA, 2008).

Na segunda etapa deste estudo, investigamos os efeitos de um modelo experimental de FM utilizando uma subdose de reserpina associado à injeção de salina ácida no músculo gastrocnêmio de animais, comparando-o aos demais modelos. Foram investigadas as respostas de ratos machos e fêmeas aos estímulos nociceptivos, a hiperalgesia mecânica e térmica, força e funcionalidade, locomoção, mobilidade, aspecto tipo-depressivo e tipo-ansioso, memória, distúrbios do sono,

concentração de citocinas, estresse oxidativo e resposta antioxidante. Nossos resultados reforçaram o modelo de reserpina (dose de 1 mg/Kg) como o mais completo dentre os modelos avaliados neste estudo, quando observados os sintomas apresentados em humanos.

Nesta fase, os animais tratados com reserpina desenvolveram alterações positivas no limiar de retirada da pata, na alodínia térmica ao frio, na nocicepção espontânea, na força muscular e aspecto tipo-depressivo, como vem sendo observado em estudos anteriores (BRUM, E. D. S.; FIALHO, M. F. P.; FISCHER, S. P. M.; HARTMANN, D. D. *et al.*, 2020; BRUSCO; JUSTINO; SILVA; FISCHER *et al.*, 2019; BRUSCO; DOREIAN; STEINLEY, 2021; HERNANDEZ-LEON; DE LA LUZ-CUELLAR; GRANADOS-SOTO; GONZÁLEZ-TRUJANO *et al.*, 2018; HERNANDEZ-LEON; FERNANDEZ-GUASTI; MARTINEZ; PELLICER *et al.*, 2019; NAGAKURA; MIWA; YOSHIDA; MIURA *et al.*, 2019; NAGAKURA; OE; AOKI; MATSUOKA, 2009; NAGAKURA; TAKAHASHI; NOTO; SEKIZAWA *et al.*, 2012).

Quando observados os aspectos antioxidantes e o estresse oxidativo, encontramos redução dos níveis de GSH no musculo dos animais, achado similar foi encontrado por Kaur *et. al.*, (2019) quando observou os efeitos da reserpina no musculo gastrocnêmio de camundongos. Tal comportamento não foi acompanhado do aumento dos níveis de TBARS e redução da expressão de SOD, como observado no estudo supracitado (KAUR; SINGH; SINGH; BHATTI *et al.*, 2019). O aumento nos níveis de citocinas corroboram com os achados de Arora & Chopra (2013) que identificaram aumento dos níveis de IL1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em tecidos cerebrais (ARORA; CHOPRA, 2013).

Foi hipotetizado em nosso estudo que o modelo de fibromialgia com uma subdose de reserpina associado a injeção de salina ácida em duas doses seria capaz de mimetizar o comportamento “top down” e “botton up” proposto na fisiopatologia da fibromialgia. Como podemos observar através dos resultados encontrados, o modelo proposto é capaz de desenvolver alguns dos sintomas cardinais da fibromialgia, sendo capaz de potencializar os sintomas apresentados pelo tratamento isolado com salina ácida em duas doses, porém ainda inferior aos encontrados no modelo utilizando reserpina em dose de 1 mg/Kg.

## 7 CONCLUSÃO

A FM é um desafio clínico significativo, e a pesquisa contínua é necessária para melhorar nosso conhecimento sobre a doença, aprimorar a detecção precoce, desenvolver tratamentos mais eficazes e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. O entendimento dos mecanismos moleculares e dos efeitos dos diferentes modelos experimentais é um passo importante nesse processo e pode fornecer insights valiosos para a busca de soluções terapêuticas mais eficazes para a fibromialgia.

Os resultados do presente estudo fornecem evidências importantes sobre os efeitos do modelo experimental de reserpina em ratos, confirmando sinais e sintomas encontrados nos animais que mimetizam a doença em humanos (Tabela 1). Os animais tratados com reserpina apresentaram hiperalgesia mecânica e térmica, nocicepção espontânea, redução da força e funcionalidade, redução da capacidade locomotora, além de aspecto tipo-depressivo. Ademais, os animais com reserpina apresentaram aumento de citocinas inflamatórias no córtex pré-frontal e redução da atividade antioxidante no músculo. Desta forma, o modelo de reserpina apresentou características semelhantes à FM e, se mostrou mais aplicável para a mimetização do problema, comparado ao modelo de salina ácida intramuscular.

Tabela 1: Resumo da caracterização dos modelos de indução de fibromialgia estudado na presente pesquisa.

Desfecho	Controle	Reserpina 1mg/Kg	Salina ácida 1x	Salina ácida 2x	Reserpina 0,1 mg/Kg	Reserpina 0,1 mg/Kg + SA 1x	Reserpina 0,1 mg/Kg + SA 2x
1. Hiperalgesia mecânica							
2. Hiperalgesia térmica							
3. Nocicepção espontânea							
4. Força/funcionalidade							
5. Locomoção							
6. Mobilidade prejudicada							
7. Aspecto tipo-depressivo							
8. Aspecto tipo-ansioso							
9. Memória de curta duração							
10. Memória de longa duração							
11. Alteração do sono							
12. Aumento da concentração de citocinas:							
a – IL1 $\beta$							
b - TNF- $\alpha$							
c - IL-6							
d - IL-10							
13. Aumento de TBARS							
14. Diminuição de GSH							
15. Diminuição da SOD							

**Legenda:** Representação visual dos desfechos obtidos através da avaliação dos animais nos modelos de indução de fibromialgia. Os locais em destaque representam os achados significativos comparados aos animais controle. Os locais em branco representam animais não avaliados. SA – Salina ácida.

De forma importante, mostramos no presente estudo que o efeito da reserpina, assim como da salina ácida, são distintos em animais machos e fêmeas (Tabela 2). As fêmeas que receberam salina ácida não desenvolveram nocicepção e diminuição de força, o que foi observado nos animais machos. Ainda, as fêmeas que receberam reserpina apresentaram comportamento de desesperança, relacionado à depressão, o que não foi observado nos demais grupos experimentais. Ademais, apenas ratos machos, que receberam salina ácida e reserpina, apresentaram alteração de memória de curta duração. Para compreender melhor como essas diferenças ocorrem, são necessários mais estudos, especialmente trabalhos com avaliações em nível molecular e neuroquímico para identificação dos mecanismos que diferem o comportamento de machos e fêmeas.

Tabela 2: Resumo da caracterização dos modelos de fibromialgia induzida por Reserpina e Salina ácida estudados na presente pesquisa.

Desfecho	Reserpina 1mg/Kg fêmeas	Reserpina 1mg/Kg machos	Salina ácida (pH 4.0) fêmeas	Salina ácida (pH 4.0) machos
1. Hiperalgisia mecânica				
2. Hiperalgisia térmica				
3. Nocicepção espontânea				
4. Força/funcionalidade				
5. Locomoção				
6. Aspecto tipo-depressivo				
7. Aspecto tipo-ansioso				
8. Memória de curta duração				
9. Memória de longa duração				
10. Concentração de BDNF				

**Legenda:** Representação visual dos desfechos obtidos através da avaliação dos animais machos e fêmeas nos modelos de fibromialgia induzida por Reserpina e Salina ácida. Os locais em destaque representam os achados significativos comparados aos animais controle.

Neste estudo, nós demonstramos alguns resultados positivos na caracterização de um modelo de FM induzido por injeção de uma subdose de reserpina associado à salina ácida, como um aumento na frequência de despertares (alteração no sono). Contudo, essas respostas não foram significativamente diferentes das encontradas nos modelos de reserpina (1 mg/kg) ou de salina ácida (duas injeções), clássicos modelos de FM. Apesar de estimular mecanismos top-down e botton-up, o grupo experimental proposto apresentou resultados pouco significativos, principalmente quando comparado ao modelo de FM induzido por reserpina em uma dose já estabelecida na literatura.

Portanto, acredita-se que a complexidade da doença requer abordagens abrangentes e estudos adicionais para traduzir esses achados em intervenções terapêuticas eficazes e personalizadas para pacientes com fibromialgia. Além disso, é fundamental investigar outros aspectos relacionados à FM, como fatores genéticos, influências ambientais, estresse psicossocial e fatores hormonais, que desempenham papéis importantes na manifestação e progressão da doença. A compreensão mais completa dos mecanismos subjacentes à FM é fundamental para avançar no diagnóstico e tratamento dessa condição desafiadora.

## **8 PERSPECTIVAS**

Ao término do processo de avaliação da Tese, pretendemos publicar os dados advindos deste estudo em uma revista científica da área, com um bom fator de impacto e rigorosa política editorial.

Embora tenhamos acompanhado as evidências para o uso e aplicabilidade da reserpina no contundente modelo de indução de fibromialgia em animais com doses de 1 mg/Kg, demonstrando sua segurança para mimetizar os principais sintomas da doença, acreditamos que novos estudos devem ser conduzidos para elucidar ainda mais a relação dos mecanismos de ação da substância com os achados clínicos da patologia.

Neste sentido, pretendemos desenvolver uma investigação com pacientes portadores de FM comparando sinais clínicos como dor, limitações de força e funcionalidade, distúrbios do sono e alimentares à estudos pré-clínicos desenvolvidos com modelos experimentais. Além disso, pretendemos através do uso de diferentes doses de reserpina associada a salina ácida, buscar um modelo de fibromialgia capaz de gerar mudanças sensoriais através dos mecanismos “botton up” e “top down” promovendo melhor compreensão sobre as manifestações clínicas e progressão da doença.

## **9 AGÊNCIA DE FOMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELLATIEF, R. B.; MOHAMED, H. K.; KOTB, H. I. Reactive Astrogliosis in an Experimental Model of Fibromyalgia: Effect of Dexmedetomidine. **Cells Tissues Organs**, 205, n. 2, p. 105-119, 2018.

AKINTAYO, R. O.; ADELOWO, O. O.; AHMED, B. A.; OLAFIMIHAN, K. O. *et al.* Fibromyalgia in a rheumatology clinic in north-central Nigeria: An audit of the characteristics of the syndrome and the sensitivities of 4 sets of American College of Rheumatology criteria. **International Journal of Rheumatic Diseases**, 23, n. 7, p. 970-976, 2020.

AKKUŞ, S.; NAZIROĞLU, M.; ERIŞ, S.; YALMAN, K. *et al.* Levels of lipid peroxidation, nitric oxide, and antioxidant vitamins in plasma of patients with fibromyalgia. **Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease**, 27, n. 4, p. 181-185, 2009.

ALBRECHT, D. S.; FORSBERG, A.; SANDSTRÖM, A.; BERGAN, C. *et al.* Brain glial activation in fibromyalgia—A multi-site positron emission tomography investigation. **Brain, behavior, and immunity**, 75, p. 72-83, 2019.

ALEY, K.; MESSING, R. O.; MOCHLY-ROSEN, D.; LEVINE, J. D. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the  $\epsilon$  isozyme of protein kinase C. **Journal of Neuroscience**, 20, n. 12, p. 4680-4685, 2000.

ALVAREZ, P.; CHEN, X.; BOGEN, O.; GREEN, P. G. *et al.* IB4 (+) nociceptors mediate persistent muscle pain induced by GDNF. **Journal of neurophysiology**, 108, n. 9, p. 2545-2553, 2012.

ALVAREZ, P.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Role for monocyte chemoattractant protein-1 in the induction of chronic muscle pain in the rat. **PAIN®**, 155, n. 6, p. 1161-1167, 2014.

ANDREWS, N.; LEGG, E.; LISAK, D.; ISSOP, Y. *et al.* Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. **Eur J Pain**, 16, n. 4, p. 485-495, Apr 2012.

ARNOLD, L. M.; GEBKE, K. B.; CHOY, E. Fibromyalgia: management strategies for primary care providers. **International Journal of Clinical Practice**, 70, n. 2, p. 99-112, 2016.

ARORA, V.; CHOPRA, K. Possible involvement of oxido-nitrosative stress induced neuro-inflammatory cascade and monoaminergic pathway: underpinning the correlation between nociceptive and depressive behaviour in a rodent model. **Journal of affective disorders**, 151, n. 3, 2013 Dec 2013.

ARORA, V.; KUHAD, A.; TIWARI, V.; CHOPRA, K. Curcumin ameliorates reserpine-induced pain-depression dyad: behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. **Psychoneuroendocrinology**, 36, n. 10, p. 1570-1581, Nov 2011.

AZEVEDO, P. M. **A ciência da dor: sobre fibromialgia e outras síndromes dolorosas**. Editora Unesp, 2019. 8595462925.

BANGASSER, D. A.; CURTIS, A.; REYES, B. A.; BETHEA, T. T. *et al.* Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology. **Molecular psychiatry**, 15, n. 9, p. 896-904, 2010.

BARDIN, L.; MALFETES, N.; NEWMAN-TANCREDI, A.; DEPOORTERE, R. Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia, and enhances inflammatory pain in rat: Relevance to human stress-associated painful pathologies. **Behav Brain Res**, 205, n. 2, p. 360-366, Dec 28 2009.

BENARROCH, E. Monoamine transporters: structure, regulation, and clinical implications. **Neurology**, 81, n. 8, 08/20/2013 2013.

BENNETT, R. M.; GOLDENBERG, D. L. Fibromyalgia, myofascial pain, tender points and trigger points: splitting or lumping? : BioMed Central. 13: 1-3 p. 2011.

BJORKLUND, G.; DADAR, M.; CHIRUMBOLO, S.; AASETH, J. Fibromyalgia and nutrition: Therapeutic possibilities? **Biomed Pharmacother**, 103, p. 531-538, Jul 2018.

BLASCO-SERRA, A.; ALFOSEA-CUADRADO, G.; CERVERA-FERRI, A.; GONZÁLEZ-SOLER, E. *et al.* Hippocampal oscillatory dynamics and sleep atonia are altered in an animal model of fibromyalgia: Implications in the search for biomarkers. **The Journal of comparative neurology**, 528, n. 8, 2020 Jun 2020.

BONATERRA, G. A.; THEN, H.; OEZEL, L.; SCHWARZBACH, H. *et al.* Morphological Alterations in Gastrocnemius and Soleus Muscles in Male and Female Mice in a Fibromyalgia Model. **PLoS One**, 11, n. 3, p. e0151116, 2016.

BORCHERS, A. T.; GERSHWIN, M. E. Fibromyalgia: A Critical and Comprehensive Review. **Clin Rev Allergy Immunol**, 49, n. 2, p. 100-151, Oct 2015.

BORG-STEIN, J.; SIMONS, D. G. Myofascial pain. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, 83, p. S40-S47, 2002.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. UNIÃO, D. O. D. Brasília, 2008.

BRASIL. Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. UNIÃO, D. O. D. Brasília. 2018.

BRON, C.; DOMMERHOLT, J. D. Etiology of myofascial trigger points. **Curr Pain Headache Rep**, 16, n. 5, p. 439-444, Oct 2012.

BRUM, E.; FIALHO, M.; FISCHER, S.; HARTMANN, D. *et al.* Relevance of Mitochondrial Dysfunction in the Reserpine-Induced Experimental Fibromyalgia Model. **Molecular neurobiology**, 57, n. 10, 2020 Oct 2020.

BRUM, E. D. S.; FIALHO, M. F. P.; FISCHER, S. P. M.; HARTMANN, D. D. *et al.* Relevance of Mitochondrial Dysfunction in the Reserpine-Induced Experimental Fibromyalgia Model. **Mol Neurobiol**, 57, n. 10, p. 4202-4217, Oct 2020.

BRUM, E. S.; BECKER, G.; FIALHO, M. F. P.; OLIVEIRA, S. M. Animal models of fibromyalgia: What is the best choice? **Pharmacol Ther**, 230, p. 107959, Feb 2022.

BRUSCO, I.; JUSTINO, A.; SILVA, C.; SCUSSEL, R. *et al.* Inhibitors of angiotensin I converting enzyme potentiate fibromyalgia-like pain symptoms via kinin receptors in mice. **European journal of pharmacology**, 895, 03/15/2021 2021.

BRUSCO, I.; JUSTINO, A. B.; SILVA, C. R.; FISCHER, S. *et al.* Kinins and their B(1) and B(2) receptors are involved in fibromyalgia-like pain symptoms in mice. **Biochem Pharmacol**, 168, p. 119-132, Oct 2019.

BRUSCO, M.; DOREIAN, P.; STEINLEY, D. Deterministic blockmodelling of signed and two-mode networks: A tutorial with software and psychological examples. **Br J Math Stat Psychol**, 74, n. 1, p. 34-63, Feb 2021.

CARRIER, N. Sex Differences in Anxiety and Depressive-like Behaviors in Rats. 2012.

CAVALCANTE, A. B.; SAUER, J. F.; CHALOT, S. D.; ASSUMPÇÃO, A. *et al.* A prevalência de fibromialgia: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 46, p. 40-48, 2006.

CAVALCANTI, I. L.; MADDALENA, M. L. **Dor**. Rio de Janeiro: SAERJ, 2003. 299 p.

CHANG, C. T.; FONG, S. W.; LEE, C. H.; CHUANG, Y. C. *et al.* Involvement of Acid-Sensing Ion Channel 1b in the Development of Acid-Induced Chronic Muscle Pain. **Front Neurosci**, 13, p. 1247, 2019.

CHEN, W. N.; CHEN, C. C. Acid mediates a prolonged antinociception via substance P signaling in acid-induced chronic widespread pain. **Mol Pain**, 10, p. 30, May 21 2014.

CHEN, W. N.; LEE, C. H.; LIN, S. H.; WONG, C. W. *et al.* Roles of ASIC3, TRPV1, and NaV1.8 in the transition from acute to chronic pain in a mouse model of fibromyalgia. **Mol Pain**, 10, p. 40, Jun 23 2014.

CHOY, E. H. The role of sleep in pain and fibromyalgia. **Nature Reviews Rheumatology**, 11, n. 9, p. 513-520, 2015.

CLAUW, D. J. Fibromyalgia: a clinical review. **Jama**, 311, n. 15, p. 1547-1555, 2014.

CLAUW, D. J., 2015, **Fibromyalgia and related conditions**. Elsevier. 680-692.

CORDERO, M. D.; ALCOCER-GOMEZ, E.; CANO-GARCIA, F. J.; DE MIGUEL, M. *et al.* Clinical symptoms in fibromyalgia are better associated to lipid peroxidation levels in blood mononuclear cells rather than in plasma. **PLoS One**, 6, n. 10, p. e26915, 2011.

CORDERO, M. D.; DE MIGUEL, M.; MORENO FERNANDEZ, A. M.; CARMONA LOPEZ, I. M. *et al.* Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease. **Arthritis Res Ther**, 12, n. 1, p. R17, 2010.

DA ROSA, H.; COELHO, I.; DA SILVA, M.; FERNANDES, M. *et al.* Sida tuberculata extract reduces the nociceptive response by chemical noxious stimuli in mice: Implications for mechanism of action, relation to chemical composition and molecular docking. **Phytotherapy research : PTR**, 33, n. 1, 2019 Jan 2019.

DA SILVA, L. F.; DESANTANA, J. M.; SLUKA, K. A. Activation of NMDA receptors in the brainstem, rostral ventromedial medulla, and nucleus reticularis gigantocellularis mediates mechanical hyperalgesia produced by repeated intramuscular injections of acidic saline in rats. **J Pain**, 11, n. 4, p. 378-387, Apr 2010.

DAGNINO, A. P. A.; DA SILVA, R. B. M.; CHAGASTELLES, P. C.; PEREIRA, T. C. B. *et al.* Nociceptin/orphanin FQ receptor modulates painful and fatigue symptoms in a mouse model of fibromyalgia. **Pain**, 160, n. 6, p. 1383-1401, Jun 2019.

DANIEL, W. W.; CROSS, C. L. **Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences**. Wiley, 2018. 1119282373.

DE ALBUQUERQUE, N. M. Q.; BERARDINELLI, L. M. M.; LOPES, J. R.; DE ALBUQUERQUE SANTOS, M. *et al.* Estilos de vida de pessoas com adoecimento crônico a fibromialgia em tempos de pandemia do Coronavírus. **Research, Society and Development**, 11, n. 8, p. e52511831327-e52511831327, 2022.

DE LA LUZ-CUELLAR, Y. E.; RODRIGUEZ-PALMA, E. J.; FRANCO-ENZASTIGA, U.; SALINAS-ABARCA, A. B. *et al.* Blockade of spinal alpha(5)-GABA(A) receptors differentially reduces reserpine-induced fibromyalgia-type pain in female rats. **Eur J Pharmacol**, 858, p. 172443, Sep 5 2019.

DEACON, R. M. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. **Nat Protoc**, 1, n. 1, p. 118-121, 2006.

DESANTANA, J. M.; SLUKA, K. A. Central mechanisms in the maintenance of chronic widespread noninflammatory muscle pain. **Current pain and headache reports**, 12, p. 338-343, 2008.

DINA, O. A.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. **Neuroscience**, 152, n. 2, p. 521-525, 2008.

DIXON, W. J. Staircase bioassay: the up-and-down method. **Neurosci Biobehav Rev**, 15, n. 1, p. 47-50, Spring 1991.

ELLMAN, G. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, 82, n. 1, 1959 May 1959.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, 31, n. 1, p. 47-59, Nov 1 1988.

FASOLINO, A.; DI STEFANO, G.; LEONE, C.; GALOSI, E. *et al.* Small-fibre pathology has no impact on somatosensory system function in patients with fibromyalgia. **Pain**, 161, n. 10, p. 2385-2393, Oct 2020.

FELBER, D. T.; MALHEIROS, R. T.; TENTARDINI, V. N.; SALGUEIRO, A. C. F. *et al.* Dry needling increases antioxidant activity and grip force in a rat model of muscle pain. **Acupunct Med**, 40, n. 3, p. 241-248, Jun 2022.

FERREIRA, C. P.; TECHERA ANTUNES, F. T.; REBELO, I. N.; DA SILVA, C. A. J. *et al.* Application of the UV-vis spectrophotometry method for the determination of glutamate in the cerebrospinal fluid of rats. **J Pharm Biomed Anal**, 186, p. 113290, Jul 15 2020.

FISCHER, M. J.; HORVATH, G.; KRISMER, M.; GNAIGER, E. *et al.* Evaluation of mitochondrial function in chronic myofascial trigger points-a prospective cohort pilot study using high-resolution respirometry. **BMC musculoskeletal disorders**, 19, p. 1-9, 2018.

FISCHER, S.; BRUSCO, I.; BRUM, E.; FIALHO, M. *et al.* Involvement of TRPV1 and the efficacy of  $\alpha$ -spinasterol on experimental fibromyalgia symptoms in mice. **Neurochemistry international**, 134, 2020 Mar 2020.

FLATTERS, S. J.; BENNETT, G. J. Ethosuximide reverses paclitaxel-and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, 109, n. 1-2, p. 150-161, 2004.

FLECKENSTEIN, J.; ZAPS, D.; RÜGER, L. J.; LEHMEYER, L. *et al.* Discrepancy between prevalence and perceived effectiveness of treatment methods in myofascial pain syndrome: results of a cross-sectional, nationwide survey. **BMC musculoskeletal disorders**, 11, p. 1-9, 2010.

GALVEZ-SÁNCHEZ, C. M.; REYES DEL PASO, G. A.; DUSCHEK, S. Cognitive impairments in fibromyalgia syndrome: Associations with positive and negative affect, alexithymia, pain catastrophizing and self-esteem. **Frontiers in Psychology**, p. 377, 2018.

GOLAN, M.; SCHREIBER, G.; AVISSAR, S. Antidepressants,  $\beta$ -arrestins and GRKs: from regulation of signal desensitization to intracellular multifunctional adaptor functions. **Current pharmaceutical design**, 15, n. 14, p. 1699-1708, 2009.

GREGORY, N. S.; GIBSON-CORLEY, K.; FREY-LAW, L.; SLUKA, K. A. Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner. **PAIN®**, 154, n. 12, p. 2668-2676, 2013.

- HERNANDEZ-LEON, A.; DE LA LUZ-CUELLAR, Y.; GRANADOS-SOTO, V.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. *et al.* Sex differences and estradiol involvement in hyperalgesia and allodynia in an experimental model of fibromyalgia. **Hormones and behavior**, 97, 2018 Jan 2018.
- HERNANDEZ-LEON, A.; FERNANDEZ-GUASTI, A.; MARTINEZ, A.; PELLICER, F. *et al.* Sleep architecture is altered in the reserpine-induced fibromyalgia model in ovariectomized rats. **Behav Brain Res**, 364, p. 383-392, May 17 2019.
- HEYMANN, R. E.; PAIVA, E. D. S.; HELFENSTEIN JUNIOR, M.; POLLAK, D. F. *et al.* Consenso brasileiro do tratamento da fibromialgia. **Revista brasileira de reumatologia**, 50, p. 56-66, 2010.
- HSU, W. H.; LEE, C. H.; CHAO, Y. M.; KUO, C. H. *et al.* ASIC3-dependent metabolomics profiling of serum and urine in a mouse model of fibromyalgia. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 12123, Aug 20 2019.
- HUNG, C. H.; LEE, C. H.; TSAI, M. H.; CHEN, C. H. *et al.* Activation of acid-sensing ion channel 3 by lysophosphatidylcholine 16:0 mediates psychological stress-induced fibromyalgia-like pain. **Ann Rheum Dis**, 79, n. 12, p. 1644-1656, Dec 2020.
- HÄUSER, W.; ABLIN, J.; FITZCHARLES, M.-A.; LITTLEJOHN, G. *et al.* Fibromyalgia. **Nature reviews Disease primers**, 1, n. 1, p. 1-16, 2015.
- HÄUSER, W.; PERROT, S.; SOMMER, C.; SHIR, Y. *et al.* Diagnostic confounders of chronic widespread pain: not always fibromyalgia. **Pain reports**, 2, n. 3, 2017.
- JOSEPH, E. K.; LEVINE, J. Hyperalgesic priming is restricted to isolectin B4-positive nociceptors. **Neuroscience**, 169, n. 1, p. 431-435, 2010.
- KAUR, A.; SINGH, L.; SINGH, N.; BHATTI, M. S. *et al.* Ameliorative effect of imperatorin in chemically induced fibromyalgia: Role of NMDA/NFkB mediated downstream signaling. **Biochem Pharmacol**, 166, p. 56-69, Aug 2019.
- KEHL, L. J.; TREMPER, T. M.; HARGREAVES, K. M. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. **Pain**, 85, n. 3, p. 333-343, Apr 2000.
- KHASAR, S. G.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Repeated sound stress enhances inflammatory pain in the rat. **Pain**, 116, n. 1-2, p. 79-86, Jul 2005.
- KITA, T.; HATA, T.; IIDA, J.; YONEDA, R. *et al.* Decrease in pain threshold in SART stressed mice. **Jpn J Pharmacol**, 29, n. 3, p. 479-482, Jun 1979.
- KOSEK, E.; COHEN, M.; BARON, R.; GEBHART, G. F. *et al.* Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? **Pain**, 157, n. 7, p. 1382-1386, 2016.
- LARSON, A. A.; PARDO, J. V.; PASLEY, J. D. Review of overlap between thermoregulation and pain modulation in fibromyalgia. **Clin J Pain**, 30, n. 6, p. 544-555, Jun 2014.

LI, S.; HAN, J.; WANG, D. S.; FENG, B. *et al.* Echinocystic acid reduces reserpine-induced pain/depression dyad in mice. **Metab Brain Dis**, 31, n. 2, p. 455-463, Apr 2016.

LIN, J. G.; HSIEH, C. L.; LIN, Y. W. Analgesic Effect of Electroacupuncture in a Mouse Fibromyalgia Model: Roles of TRPV1, TRPV4, and pERK. **PLoS One**, 10, n. 6, p. e0128037, 2015.

LITTLEJOHN, G.; GUYMER, E., 2018, **Neurogenic inflammation in fibromyalgia**. Springer. 291-300.

LIU, Y. T.; SHAO, Y. W.; YEN, C. T.; SHAW, F. Z. Acid-induced hyperalgesia and anxio-depressive comorbidity in rats. **Physiol Behav**, 131, p. 105-110, May 28 2014.

LÓPEZ-SOLÀ, M.; WOO, C.-W.; PUJOL, J.; DEUS, J. *et al.* Towards a neurophysiological signature for fibromyalgia. **Pain**, 158, n. 1, p. 34, 2017.

MAIXNER, W.; FILLINGIM, R. B.; WILLIAMS, D. A.; SMITH, S. B. *et al.* Overlapping chronic pain conditions: implications for diagnosis and classification. **The Journal of Pain**, 17, n. 9, p. T93-T107, 2016.

MARQUES, A. P.; SANTO, A. D. S. D. E.; BERSSANETI, A. A.; MATSUTANI, L. A. *et al.* A prevalência de fibromialgia: atualização da revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 57, p. 356-363, 2017.

MEEUS, M.; NIJS, J.; HERMANS, L.; GOUBERT, D. *et al.* The role of mitochondrial dysfunctions due to oxidative and nitrosative stress in the chronic pain or chronic fatigue syndromes and fibromyalgia patients: peripheral and central mechanisms as therapeutic targets? **Expert Opin Ther Targets**, 17, n. 9, p. 1081-1089, Sep 2013.

MEZHOV, V.; GUYMER, E.; LITTLEJOHN, G. Central sensitivity and fibromyalgia. **Internal Medicine Journal**, 51, n. 12, p. 1990-1998, 2021.

MILLER, A. L.; LEACH, M. C. The effect of handling method on the mouse grimace scale in two strains of laboratory mice. **Lab Anim**, 50, n. 4, p. 305-307, Aug 2016.

MINERBI, A.; VULFSONS, S. Challenging the Cinderella hypothesis: A new model for the role of the motor unit recruitment pattern in the pathogenesis of myofascial pain syndrome in postural muscles. **Rambam Maimonides medical journal**, 9, n. 3, 2018.

MYERS, T. W.; HILLMAN, S. K. **Anatomy trains**. Primal Pictures Limited, 2004. 1904369448.

NAGAKURA, Y.; MIWA, M.; YOSHIDA, M.; MIURA, R. *et al.* Spontaneous pain-associated facial expression and efficacy of clinically used drugs in the reserpine-induced rat model of fibromyalgia. **Eur J Pharmacol**, 864, p. 172716, Dec 1 2019.

NAGAKURA, Y.; OE, T.; AOKI, T.; MATSUOKA, N. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. **Pain**, 146, n. 1-2, p. 26-33, 2009.

NAGAKURA, Y.; TAKAHASHI, M.; NOTO, T.; SEKIZAWA, T. *et al.* Different pathophysiology underlying animal models of fibromyalgia and neuropathic pain: comparison of reserpine-induced myalgia and chronic constriction injury rats. **Behav Brain Res**, 226, n. 1, p. 242-249, Jan 1 2012.

NASU, T.; TAGUCHI, T.; MIZUMURA, K. Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. **Eur J Pain**, 14, n. 3, p. 236-244, Mar 2010.

NAZIROĞLU, M.; KILINÇ, F.; UĞUZ, A. C.; ÇELİK, Ö. *et al.* Oral vitamin C and E combination modulates blood lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in maximal exercising basketball players. **Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease**, 28, n. 4, p. 300-305, 2010.

NIELSEN, A. N.; MATHIESEN, C.; BLACKBURN-MUNRO, G. Pharmacological characterisation of acid-induced muscle allodynia in rats. **Eur J Pharmacol**, 487, n. 1-3, p. 93-103, Mar 8 2004.

NIRMAL, P.; KOPPIKAR, S.; BHONDAVE, P.; NARKHEDE, A. *et al.* Influence of six medicinal herbs on collagenase-induced osteoarthritis in rats. **The American journal of Chinese medicine**, 41, n. 6, 2013 2013.

NISHIYORI, M.; UEDA, H. Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia. **Mol Pain**, 4, p. 52, Nov 6 2008.

NUGRAHA, B.; KARST, M.; ENGELI, S.; GUTENBRUNNER, C. Brain-derived neurotrophic factor and exercise in fibromyalgia syndrome patients: a mini review. **Rheumatology international**, 32, n. 9, 2012 Sep 2012.

OE, T.; TSUKAMOTO, M.; NAGAKURA, Y. Reserpine causes biphasic nociceptive sensitivity alteration in conjunction with brain biogenic amine tones in rats. **Neuroscience**, 169, n. 4, 09/15/2010 2010.

OLIVEIRA, C. E. S.; MARCONDES SARI, M. H. M.; ZBOROWSKI, V. A.; PRADO, V. C. *et al.* Pain-depression dyad induced by reserpine is relieved by p,p'-methoxydiphenyl diselenide in rats. **Eur J Pharmacol**, 791, p. 794-802, Nov 15 2016.

PARADA, C. A.; REICHLING, D. B.; LEVINE, J. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKC $\epsilon$  second messenger pathways. **Pain**, 113, n. 1-2, p. 185-190, 2005.

PARK, J. H.; NIERMANN, K. J.; OLSEN, N. J. Evidence for metabolic abnormalities in the muscles of patients with fibromyalgia. **Current Rheumatology Reports**, 2, n. 2, p. 131-140, 2000.

PERCIE DU SERT, N.; AHLUWALIA, A.; ALAM, S.; AVEY, M. T. *et al.* Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. **PLoS Biol**, 18, n. 7, p. e3000411, Jul 2020.

PERCIE DU SERT, N.; HURST, V.; AHLUWALIA, A.; ALAM, S. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. **BMJ Open Sci**, 4, n. 1, p. e100115, Jul 20 2020.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol**, 47, n. 4, p. 379-391, Feb 15 1978.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, 463, n. 1-3, p. 3-33, Feb 28 2003.

QUINTERO, L.; MORENO, M.; AVILA, C.; ARCAYA, J. *et al.* Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. **Pharmacol Biochem Behav**, 67, n. 3, p. 449-458, Nov 2000.

RADHAKRISHNAN, R.; SLUKA, K. A. Increased glutamate and decreased glycine release in the rostral ventromedial medulla during induction of a pre-clinical model of chronic widespread muscle pain. **Neurosci Lett**, 457, n. 3, p. 141-145, Jul 3 2009.

RAJA, S. N.; CARR, D. B.; COHEN, M.; FINNERUP, N. B. *et al.* The revised IASP definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. **Pain**, 161, n. 9, p. 1976, 2020.

REZENDE, R. M.; GOUVEIA PELUZIO, M. D. C.; DE JESUS SILVA, F.; DELLA LUCIA, E. M. *et al.* Does aerobic exercise associated with tryptophan supplementation attenuates hyperalgesia and inflammation in female rats with experimental fibromyalgia? **PLoS One**, 14, n. 2, p. e0211824, 2019.

ROVERSI, K.; DE DAVID ANTONIAZZI, C. T.; MILANESI, L.; ROSA, H. *et al.* Tactile stimulation on adulthood modifies the HPA axis, neurotrophic factors, and GFAP signaling reverting depression-like behavior in female rats. **Molecular Neurobiology**, 56, p. 6239-6250, 2019.

RYABKOVA, V. A.; CHURILOV, L. P.; SHOENFELD, Y. Neuroimmunology: what role for autoimmunity, neuroinflammation, and small fiber neuropathy in fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, and adverse events after human papillomavirus vaccination? **International journal of molecular sciences**, 20, n. 20, p. 5164, 2019.

SARZI-PUTTINI, P.; GIORGI, V.; MAROTTO, D.; ATZENI, F. Fibromyalgia: an update on clinical characteristics, aetiopathogenesis and treatment. **Nature Reviews Rheumatology**, 16, n. 11, p. 645-660, 2020.

SCHERTZINGER, M.; WESSON-SIDES, K.; PARKITNY, L.; YOUNGER, J. Daily Fluctuations of Progesterone and Testosterone Are Associated With Fibromyalgia Pain Severity. **J Pain**, 19, n. 4, p. 410-417, Apr 2018.

SERRA, J.; COLLADO, A.; SOLA, R.; ANTONELLI, F. *et al.* Hyperexcitable C nociceptors in fibromyalgia. **Ann Neurol**, 75, n. 2, p. 196-208, Feb 2014.

SHAH, J. P.; THAKER, N.; HEIMUR, J.; AREDO, J. V. *et al.* Myofascial trigger points then and now: a historical and scientific perspective. **PM&R**, 7, n. 7, p. 746-761, 2015.

SIMONS, D.; MENSE, S. Diagnosis and therapy of myofascial trigger points. **Schmerz (Berlin, Germany)**, 17, n. 6, p. 419-424, 2003.

SIMONS, D. G. Understanding effective treatments of myofascial trigger points. **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, 6, p. 81-88, 2002.

SIMONS, D. G.; TRAVELL, J. G.; SIMONS, L. S. **Travell & Simons' myofascial pain and dysfunction: upper half of body**. Lippincott williams & wilkins, 1999. 0683083635.

SINGH, L.; KAUR, A.; GARG, S.; SINGH, A. P. *et al.* Protective Effect of Esculetin, Natural Coumarin in Mice Model of Fibromyalgia: Targeting Pro-Inflammatory Cytokines and MAO-A. **Neurochem Res**, 45, n. 10, p. 2364-2374, Oct 2020.

SKYBA, D. A.; LISI, T. L.; SLUKA, K. A. Excitatory amino acid concentrations increase in the spinal cord dorsal horn after repeated intramuscular injection of acidic saline. **Pain**, 119, n. 1-3, p. 142-149, Dec 15 2005.

SLUKA, K. A.; KALRA, A.; MOORE, S. A. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. **Muscle Nerve**, 24, n. 1, p. 37-46, Jan 2001.

SLUKA, K. A.; O'DONNELL, J. M.; DANIELSON, J.; RASMUSSEN, L. A. Regular physical activity prevents development of chronic pain and activation of central neurons. **J Appl Physiol (1985)**, 114, n. 6, p. 725-733, Mar 15 2013.

SLUKA, K. A.; PRICE, M. P.; BREESE, N. M.; STUCKY, C. L. *et al.* Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. **Pain**, 106, n. 3, p. 229-239, Dec 2003.

SOTOCINAL, S. G.; SORGE, R. E.; ZALOUM, A.; TUTTLE, A. H. *et al.* The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Mol Pain**, 7, p. 55, Jul 29 2011.

SOUSA, F. S. S.; BIRMANN, P. T.; BALDINOTTI, R.; FRONZA, M. G. *et al.* alpha-(phenylselanyl) acetophenone mitigates reserpine-induced pain-depression dyad: Behavioral, biochemical and molecular docking evidences. **Brain Res Bull**, 142, p. 129-137, Sep 2018.

SOUZA, J. B. D.; PERISSINOTTI, D. M. N. A prevalência da fibromialgia no Brasil—estudo de base populacional com dados secundários da pesquisa de prevalência de dor crônica brasileira. **BrJP**, 1, p. 345-348, 2018.

SUAREZ-ROCA, H.; QUINTERO, L.; ARCAYA, J. L.; MAIXNER, W. *et al.* Stress-induced muscle and cutaneous hyperalgesia: differential effect of milnacipran. **Physiol Behav**, 88, n. 1-2, p. 82-87, Jun 15 2006.

SUTTON, B. C.; OPP, M. R. Musculoskeletal sensitization and sleep: chronic muscle pain fragments sleep of mice without altering its duration. **Sleep**, 37, n. 3, p. 505-513, Mar 1 2014a.

SUTTON, B. C.; OPP, M. R. Sleep fragmentation exacerbates mechanical hypersensitivity and alters subsequent sleep-wake behavior in a mouse model of musculoskeletal sensitization. **Sleep**, 37, n. 3, p. 515-524, Mar 1 2014b.

SUTTON, B. C.; OPP, M. R. Acute increases in intramuscular inflammatory cytokines are necessary for the development of mechanical hypersensitivity in a mouse model of musculoskeletal sensitization. **Brain Behav Immun**, 44, p. 213-220, Feb 2015.

SÁNCHEZ, C. Stress-induced vocalisation in adult animals. A valid model of anxiety? **European Journal of Pharmacology**, 463, n. 1-3, p. 133-143, 2003.

SÁNCHEZ-DOMÍNGUEZ, B.; BULLÓN, P.; ROMÁN-MALO, L.; MARÍN-AGUILAR, F. *et al.* Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and, inflammation common events in skin of patients with Fibromyalgia. **Mitochondrion**, 21, p. 69-75, 2015.

SÜDHOF, T. C.; STARKE, K. **Pharmacology of neurotransmitter release**. Springer, 2008. 3540748040.

TAGUCHI, T.; KATANOSAKA, K.; YASUI, M.; HAYASHI, K. *et al.* Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. **Pain**, 156, n. 3, p. 415-427, Mar 2015.

TAMANO, R.; ISHIDA, M.; ASAKI, T.; HASEGAWA, M. *et al.* Effect of spinal monoaminergic neuronal system dysfunction on pain threshold in rats, and the analgesic effect of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. **Neuroscience letters**, 615, 02/26/2016 2016.

TANEI, S.; MIWA, M.; YOSHIDA, M.; MIURA, R. *et al.* The method simulating spontaneous pain in patients with nociplastic pain using rats with fibromyalgia-like condition. **MethodsX**, 7, p. 100826, 2020.

TILLU, D. V.; GEBHART, G. F.; SLUKA, K. A. Descending facilitatory pathways from the RVM initiate and maintain bilateral hyperalgesia after muscle insult. **Pain**, 136, n. 3, p. 331-339, Jun 2008.

TORT, A. B.; NETO, W. P.; AMARAL, O. B.; KAZLAUCKAS, V. *et al.* A simple webcam-based approach for the measurement of rodent locomotion and other behavioural parameters. **J Neurosci Methods**, 157, n. 1, p. 91-97, Oct 15 2006.

TREEDE, R.-D.; RIEF, W.; BARKE, A.; AZIZ, Q. *et al.* Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). **pain**, 160, n. 1, p. 19-27, 2019.

TSYBKO, A.; IL'CHIBAEVA, T.; KONDAUROVA, E.; BAZOVKINA, D. *et al.* The effect of central administration of the neurotrophic factors BDNF and GDNF on the functional activity and expression of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in mice genetically predisposed to depressive-like behavior. **Molekuliarnaia Biologiia**, 48, n. 6, p. 983-989, 2014.

UCEYLER, N.; HAUSER, W.; SOMMER, C. Systematic review with meta-analysis: cytokines in fibromyalgia syndrome. **BMC Musculoskelet Disord**, 12, p. 245, Oct 28 2011.

UEDA, H.; NEYAMA, H. LPA1 receptor involvement in fibromyalgia-like pain induced by intermittent psychological stress, empathy. **Neurobiology of Pain**, 1, p. 16-25, 2017.

VAN BETTERAY, J. N.; VOSSEN, J. M.; COENEN, A. M. Behavioural characteristics of sleep in rats under different light/dark conditions. **Physiol Behav**, 50, n. 1, p. 79-82, Jul 1991.

WAKATSUKI, K.; Y, T. U.; MATSUBARA, T.; NASU, T. *et al.* Peripheral nociceptive mechanisms in an experimental rat model of fibromyalgia induced by repeated cold stress. **Neurosci Res**, 162, p. 22-30, Jan 2021.

WOLFE, F.; CLAUW, D. J.; FITZCHARLES, M.-A.; GOLDENBERG, D. L. *et al.*, 2016, **2016 Revisions to the 2010/2011 fibromyalgia diagnostic criteria**. Elsevier. 319-329.

WOOLF, C. J. Capturing Novel Non-opioid Pain Targets. **Biol Psychiatry**, 87, n. 1, p. 74-81, Jan 1 2020.

XIA, J.; WANG, H.; ZHANG, C.; LIU, B. *et al.* The comparison of sex differences in depression-like behaviors and neuroinflammatory changes in a rat model of depression induced by chronic stress. **Frontiers in behavioral neuroscience**, 16, p. 1059594, 2023.

XU, Y.; ZHANG, L.; SHAO, T.; RUAN, L. *et al.* Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates depression-like behaviors in reserpine-treated mice: behavioral and neurobiological analyses. **Metab Brain Dis**, 28, n. 4, p. 571-583, Dec 2013.

YAMADA, E. F.; SALGUEIRO, A. F.; GOULART, A. D. S.; MENDES, V. P. *et al.* Evaluation of monosodium iodoacetate dosage to induce knee osteoarthritis: Relation with oxidative stress and pain. **Int J Rheum Dis**, 22, n. 3, p. 399-410, Mar 2019.

YAO, X.; LI, L.; KANDHARE, A. D.; MUKHERJEE-KANDHARE, A. A. *et al.* Attenuation of reserpine-induced fibromyalgia via ROS and serotonergic pathway modulation by fisetin, a plant flavonoid polyphenol. **Exp Ther Med**, 19, n. 2, p. 1343-1355, Feb 2020.

YEN, L. T.; HSIEH, C. L.; HSU, H. C.; LIN, Y. W. Targeting ASIC3 for Relieving Mice Fibromyalgia Pain: Roles of Electroacupuncture, Opioid, and Adenosine. **Sci Rep**, 7, p. 46663, Apr 25 2017.

YEN, L. T.; HSIEH, C. L.; HSU, H. C.; LIN, Y. W. Preventing the induction of acid saline-induced fibromyalgia pain in mice by electroacupuncture or APETx2 injection. **Acupunct Med**, 38, n. 3, p. 188-193, Jun 2020.

YEN, L. T.; HSU, Y. C.; LIN, J. G.; HSIEH, C. L. *et al.* Role of ASIC3, Nav1.7 and Nav1.8 in electroacupuncture-induced analgesia in a mouse model of fibromyalgia pain. **Acupunct Med**, 36, n. 2, p. 110-116, Apr 2018.

YILMAZ, E.; TAMAM, L. Attention-deficit hyperactivity disorder and impulsivity in female patients with fibromyalgia. **Neuropsychiatr Dis Treat**, 14, p. 1883-1889, 2018.

YOKOYAMA, T.; MAEDA, Y.; AUDETTE, K. M.; SLUKA, K. A. Pregabalin reduces muscle and cutaneous hyperalgesia in two models of chronic muscle pain in rats. **J Pain**, 8, n. 5, p. 422-429, May 2007.

YUKSEL, E.; NAZIROGLU, M.; SAHIN, M.; CIG, B. Involvement of TRPM2 and TRPV1 channels on hyperalgesia, apoptosis and oxidative stress in rat fibromyalgia model: Protective role of selenium. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 17543, Dec 13 2017.

YUNUS, M. B., 2008, **Central sensitivity syndromes: a new paradigm and group nosology for fibromyalgia and overlapping conditions, and the related issue of disease versus illness**. Elsevier. 339-352.

## ANEXO I - Certificado de aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais.



Universidade Federal  
de Santa Catarina

Comissão de Ética no  
Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DE UM MODELO DE FIBROMIALGIA COM UMA [SUBDOSE] DE RESERPINA ASSOCIADO A DOR MUSCULAR INDUZIDA POR SALINA ÁCIDA EM RATOS.", protocolada sob o CEUA nº 6504200122 (ID 002040), sob a responsabilidade de **Morgana Duarte da Silva e equipe; Daniel Felber; Caroline Cadore Ramires** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/04/2022.

We certify that the proposal "EFFECT OF A FIBROMYALGIA MODEL WITH A [SUBDOSE] OF RESERPINE ASSOCIATED WITH ACID SALINE-INDUCED MUSCLE PAIN IN RATS.", utilizing 64 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 6504200122 (ID 002040), under the responsibility of **Morgana Duarte da Silva and team; Daniel Felber; Caroline Cadore Ramires** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 04/05/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [01/2022](#) a [12/2024](#)

Área: [Ciências Fisiológicas](#)

Origem: [Biotério Central](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [45 a 60 dias](#)

N: [64](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [250 a 300 kg](#)

Local do experimento: Local da Pesquisa Este projeto será desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC.

Florianópolis, 21 de julho de 2022

*Luciana A. Honorato*

Luciana Aparecida Honorato  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina

Rua Desembargador Vitor Lima, 222, sala 401 - Trindade - Florianópolis/Santa Catarina-SC CEP: 88040-400 - tel: 55 (48) 3721-6093

Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 8h às 12h e das 14h às 18h - e-mail: ceua.propesq@contato.ufsc.br

CEUA N 6504200122

## ANEXO II – Diretrizes ARRIVE 2.0.

### Os 10 itens essenciais

Estes itens são o mínimo a ser incluído em um manuscrito. Sem estas informações, leitores e revisores não serão capazes de avaliar a confiabilidade dos resultados.

<b>Desenho do Estudo</b>	1	<p>Para cada experimento, descreva detalhes resumidos do desenho do estudo:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Os grupos comparados, incluindo o(s) grupo(s) controle. Se um grupo controle não foi usado, isto deve ser justificado.</li> <li>A unidade experimental (ex: um único animal, uma ninhada, ou uma gaiola de animais).</li> </ol>
<b>Tamanho da amostra</b>	2	<ol style="list-style-type: none"> <li>Especifique o número exato de unidades experimentais alocadas em cada grupo, e o número total em cada experimento. Indique também o número total de animais utilizados.</li> <li>Explique como o tamanho da amostra foi definido. Descreva os detalhes do cálculo amostral, caso ele tenha sido realizado.</li> </ol>
<b>Critérios de inclusão e exclusão</b>	3	<ol style="list-style-type: none"> <li>Descreva quaisquer critérios utilizados para inclusão e exclusão de animais (ou unidades experimentais) durante o experimento, e de dados durante a análise. Especifique se estes critérios foram definidos a priori. Se nenhum critério foi definido, declare explicitamente.</li> <li>Para cada grupo experimental, relate quaisquer animais, unidades experimentais ou dados não incluídos na análise e explique por que foram excluídos. Caso não haja exclusões, declare explicitamente.</li> <li>Para cada análise, relate o valor exato do n em cada grupo experimental.</li> </ol>
<b>Randomização</b>	4	<ol style="list-style-type: none"> <li>Declare se foi utilizada randomização para alocar as unidades experimentais nos grupos controle e tratado. Caso tenha sido, descreva o método utilizado para gerar a sequência de randomização.</li> <li>Descreva a estratégia utilizada para minimizar potenciais variáveis de confusão, como a ordem dos tratamentos e medidas ou a localização dos animais/gaiolas no biotério. Se variáveis de confusão não foram controladas, declare explicitamente.</li> </ol>
<b>Cegamento</b>	5	<p>Descreva quem estava ciente da alocação das unidades experimentais nos grupos nos diferentes momentos do experimento (durante a alocação, condução do experimento, avaliação dos desfechos e análise de dados).</p>
<b>Desfechos</b>	6	<ol style="list-style-type: none"> <li>Defina claramente todos os desfechos avaliados (ex: morte celular, marcadores moleculares ou mudanças comportamentais).</li> <li>Para estudos que testam hipóteses, especifique o desfecho primário, ou seja, o desfecho utilizado para determinar o tamanho da amostra.</li> </ol>
<b>Métodos estatísticos</b>	7	<ol style="list-style-type: none"> <li>Descreva em detalhes os métodos estatísticos usados em cada análise, incluindo o software utilizado.</li> <li>Descreva quaisquer métodos usados para avaliar se os dados atendem às premissas da abordagem estatística, e o que foi feito caso elas não tenham sido atendidas.</li> </ol>
<b>Animais experimentais</b>	8	<ol style="list-style-type: none"> <li>Descreva detalhes apropriados à espécie sobre os animais utilizados, incluindo espécie, linhagem e sublinhagem, sexo, idade ou estágio de desenvolvimento e, caso seja relevante, peso.</li> <li>Descreva informações adicionais relevantes sobre a procedência dos animais, estado de saúde/imunidade, modificações genéticas, genotipagem, e quaisquer procedimentos prévios.</li> </ol>

<b>Procedimentos experimentais</b>	9	Para cada grupo experimental, incluindo controles, descreva os procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros os repitam, incluindo: <ul style="list-style-type: none"> <li>a. O que foi feito, como foi feito e o que foi utilizado.</li> <li>b. Quando e com que frequência.</li> <li>c. Onde (incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimação).</li> <li>d. Por quê (justifique os procedimentos).</li> </ul>
<b>Resultados</b>	10	Para cada experimento conduzido, incluindo replicações independentes, relate: <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Estatísticas resumidas/descriptivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade quando aplicável (ex: média e desvio-padrão, ou mediana e amplitude).</li> <li>b. Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança.</li> </ul>

## Os itens recomendáveis

Estes itens complementam os 10 essenciais e adicionam contexto relevante ao estudo. Relatar os itens nos dois conjuntos representa a prática ideal.

<b>Resumo</b>	11	Inclua um resumo preciso dos objetivos da pesquisa, espécie animal utilizada, linhagem/raça e sexo, métodos e resultados principais e conclusões do estudo.
<b>Embasamento científico</b>	12	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Inclua embasamento científico suficiente para compreender a justificativa e o contexto do estudo, e explique a abordagem experimental.</li> <li>b. Explique como a espécie e modelo animal utilizados atendem aos objetivos científicos e, quando aplicável, sua relevância para a biologia humana.</li> </ul>
<b>Objetivos</b>	13	Descreva claramente a pergunta e objetivos da pesquisa e, quando apropriado, a(s) hipótese(s) específica(s) sendo testada(s).
<b>Declaração ética</b>	14	Inclua o nome do Comitê de Ética para Uso de Animais ou equivalente que aprovou o uso de animais neste estudo, e quaisquer números de licença ou protocolo (caso aplicável). Caso a aprovação ética não tenha sido solicitada ou concedida, justifique.
<b>Alojamento e manejo</b>	15	Descreva detalhes das condições de alojamento e criação, incluindo qualquer enriquecimento ambiental.
<b>Cuidados com animais e monitoramento</b>	16	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Descreva quaisquer intervenções ou cuidados tomados nos protocolos experimentais para minimizar dor, sofrimento e angústia.</li> <li>b. Relate qualquer evento adverso esperado ou inesperado.</li> <li>c. Descreva os critérios de ponto final humanitário estabelecidos para o estudo, os sinais monitorados e a frequência de monitoramento. Caso não tenha havido critérios de ponto final humanitário, declare explicitamente.</li> </ul>
<b>Interpretação / Implicações científicas</b>	17	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Interprete os resultados, levando em conta os objetivos e hipóteses do estudo, teorias atuais e outros estudos relevantes na literatura.</li> <li>b. Comente as limitações do estudo, incluindo fontes potenciais de viés, limitações do modelo animal e imprecisões associadas aos resultados.</li> </ul>
<b>Aplicabilidade / tradução</b>	18	Comente sobre a probabilidade dos achados deste estudo serem generalizáveis para outras espécies ou condições experimentais, incluindo qualquer relevância para a biologia humana (quando apropriado).

---

<b>Registro do Protocolo</b>	19	Faça uma declaração indicando se um protocolo (incluindo a pergunta do estudo, principais pontos do desenho experimental e plano de análise) foi preparado antes do estudo e, caso tenha sido, onde foi registrado.
<b>Acesso aos dados</b>	20	Apresente uma declaração descrevendo se e onde os dados do estudo estão disponíveis.
<b>Declaração de interesses</b>	21	a. Declare quaisquer potenciais conflitos de interesse, sejam eles financeiros ou não. Caso não exista nenhum, isso deve ser declarado. b. Liste todas as fontes de financiamento (incluindo o identificador da verba) e o papel do(s) financiador(es) no desenho, análise e relato do estudo.

---

## ANEXO III – Escala *grimace* para ratos.



National Centre  
for the Replacement  
Refinement & Reduction  
of Animals in Research

# Escala de Expressão Facial em Rato

Pesquisas têm demonstrado que alterações na expressão facial é um meio para a avaliação de dor em ratos.

A Escala de Expressão Facial em Rato foi elaborada utilizando unidades de ação específicas faciais mostradas abaixo. Essas unidades de ação aumentam na intensidade em resposta à dor pós-procedimento e podem ser usadas como parte da avaliação clínica.

As unidades de ação devem ser usadas apenas em animais acordados. Cada animal deve ser observado por um período curto de tempo para evitar registrar alterações temporárias na expressão facial que não estejam relacionadas ao bem-estar animal.

	Unidades de ação		
	Ausente "0"	Moderadamente presente "1"	Obviamente presente "2"
<b>Estreitamento orbital</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fechamento palpebral (constricção da área orbital)</li> <li>Uma ruga pode ser visível ao redor do olho</li> </ul>			
<b>Achatamento de nariz/bochecha</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Achatamento e alongamento da ponte nasal</li> <li>Achatamento das bochechas (com aparência afundada)</li> </ul>			
<b>Alterações das orelhas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Orelhas se curvam para dentro e são anguladas para a frente com uma forma pontiaguda</li> <li>Espaçamento maior entre as orelhas</li> </ul>			
<b>Alteração na vibrissa</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Vibrissas enrijecem e angulam ao longo da face</li> <li>Vibrissas podem se aglomerar</li> <li>Vibrissas perdem sua curvatura natural "para baixo"</li> </ul>			

Por favor, consulte o artigo original para detalhes: Sotocinal SG, Serge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mappleback JCS, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. 2011. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain* 7:55. doi: 10.1186/1744-8069-7-55

Para orientação sobre o uso da Escala de Expressão Facial em Rato, pesquise artigos que originaram essa técnica, e para escalas de expressão facial em outras espécies, visite [www.nc3rs.org.uk/grimacescales](http://www.nc3rs.org.uk/grimacescales).

Para solicitar cópias deste pôster, envie um e-mail: [enquiries@nc3rs.org.uk](mailto:enquiries@nc3rs.org.uk). O NC3Rs fornece uma variedade de recursos dos 3Rs em [www.nc3rs.org.uk/resources](http://www.nc3rs.org.uk/resources).

Imagens cedidas gentilmente pelo Dr. Jeffrey Mogil, McGill University. Traduzido para o português por Dra Karen Maciel de Oliveira, Universidade Federal de São Paulo, e Dr Douglas Lopes, University College London.