

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Validação e otimização de um modelo animal de fibromialgia em camundongos

KÁSSIO COELHO SILVA

PROFa. DRa. CASSIA REGINA SILVA

“Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.”

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Validação e otimização de um modelo animal de fibromialgia em camundongos

KÁSSIO COELHO SILVA

PROFa. DRa. CASSIA REGINA SILVA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

UBERLÂNDIA - MG

DEZEMBRO – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Validação e otimização de um modelo animal de fibromialgia em camundongos

KÁSSIO COELHO SILVA

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / 2017 Nota: _____

Uberlândia, Dezembro de 2017

AGRADECIMENTOS

À minha família, por me apoiar em todos os momentos da minha vida, e por seu amor servir de base para o meu crescimento.

À minha orientadora Cássia Regina Silva, pela experiência compartilhada e os ensinamentos que me ajudaram e vão me ajudar a crescer profissionalmente e pessoalmente.

Aos meus amigos, que estiveram do meu lado e com empatia me ajudaram e me alegraram.

Aos meus colegas de turma por dividir comigo essa jornada que nos fez crescer juntos, e aos meus professores, por todo ensinamento durante essa graduação.

RESUMO

A fibromialgia é caracterizada como sendo uma doença de dor crônica e difusa, que acomete o sistema musculoesquelético, tendo a presença de múltiplas regiões dolorosas denominado “tender points”. Além da dor, é comum que os indivíduos com fibromialgia apresentem distúrbios funcionais, tendo presente na maioria dos casos a ansiedade e depressão. A doença tem uma maior prevalência em mulheres, com a faixa etária de 40 a 60 anos, e representa até 1-5% da população geral, sendo a terceira doença reumatológica mais frequente. Doenças que causam dor crônica afetam negativamente a qualidade de vida dos pacientes, visto que o indivíduo se encontra com dificuldades para realizar atividades simples do dia a dia, buscando muitas vezes o isolamento social, e resultando em grande parte das ausências frequentes no trabalho. Por ser uma doença de etiologia desconhecida, a importância de estudos que venham esclarecer seu mecanismo são necessários para o entendimento da doença e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e seguros. Os modelos animais pré clínicos utilizados para o estudo da fibromialgia utilizados atualmente se baseiam na indução de hiperalgesia de longa duração, que mimetiza a dor crônica, mas não é capaz de compreender todo o perfil da fibromialgia. Assim, o objetivo deste trabalho é validar um modelo animal para fibromialgia em camundongos, onde todos os aspectos da doença possam ser avaliados, partindo-se de um modelo de hiperalgesia já descrito na literatura, onde crises dolorosas possam ser iniciadas por exposição a uma situação de estresse. Os resultados a partir dos 30 animais utilizados, separados em grupos de 10 camundongos machos e fêmeas que foi aplicado salina acidificada pH: 4 no músculo

gastrocnêmio direito, e 10 camundongos machos onde foi aplicado reserpina intradermal, seguindo assim o protocolo de nocicepção térmica e mecânica com a aplicação de acetona nas patas, e von frey, juntamente com as medidas de ansiedade e depressão, os resultados obtidos apresentou apenas significancia na medida de nocicepção mecânica no grupo de camundongos machos onde foi aplicada a salina acidificada, apresentando um perfil de queda de nocicepção, antes da indução do estresse por isolamento social, após o isolamento não teve resultados significativos, assim como os outros resultado, do mesmo grupo e dos outros grupos de animais. Assim vimos que o modelo de salina acidificada pH:4 e o modelo de reserpina, não foi capaz de mimetizar a doença como é ocorrida em humanos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Fibromialgia.....	11
1.1.1. Dor	12
1.1.2. Diagnóstico	15
1.2. Relação entre fibromialgia, depressão e ansiedade.....	16
1.3. Estudos pré-clínicos.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS A SEREM ALCANÇADOS.....	21
3.1. Objetivo geral	21
3.2. Objetivos específicos	22
4. MEIOS E MÉTODOS A SEREM EMPREGADOS.....	22
4.1. Animais e reagentes.....	22
4.2. Delineamento experimental.....	23
4.2.1. Injeção de salina acidificada.....	24
4.3. Estresse induzido por isolamento social	25
4.4. Parâmetros nociceptivos e inflamatórios	26
4.5. Comportamentos tipo-depressivos.....	27
4.5.1. Nado Forçado.....	27
4.5.2. Teste de Suspensão de cauda	27
4.6. Avaliação do desenvolvimento de ansiedade - Labirinto em cruz elevado	27
4.7. Coordenação motora e ansiedade	28
4.8. Análise Estatística.....	28
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Resposta nociceptiva mecânica após injeção de salina acidificada (pH: 4) em camundongos machos.	28
5.2. Resposta nociceptiva térmica após injeção de salina acidificada (pH: 4) em camundongos machos.	30
5.3. Resposta ao teste de campo aberto induzido após injeção de salina acidificada (pH: 4) em camundongos machos.	31
5.4. Respostas ao teste de Labirinto em Cruz Elevado após aplicação de salina acidificada (pH: 4) em camundongos machos.	31

5.5.	Resposta ao teste de suspensão de cauda após aplicação de salina acidificada (pH 4) em camundongos machos.....	32
5.2.1.	Resposta nociceptiva mecânica após aplicação de salina acidificada (pH: 4) em camundongos fêmeas.	33
5.2.2.	Resposta nociceptiva térmica após aplicação de salina acidificada (pH: 4) em camundongos fêmeas.	34
5.2.3.	Resposta ao teste de campo aberto após aplicação de salina acidificada (pH: 4) em camundongos fêmeas.	35
5.2.4.	Resposta ao teste de nado forçado induzida após aplicação de salina acidificada (pH: 4) em camundongos fêmeas.	36
5.2.5.	Resposta ao teste de suspensão de cauda após aplicação de salina acidificada (pH 4) em camundongos fêmeas.....	37
5.3.1.	Resposta nociceptiva mecânica após aplicação de reserpina em camundongos machos.	38
5.3.2.	Resposta nociceptiva térmica após aplicação de reserpina em camundongos machos.	39
5.3.3.	Resposta ao teste de campo aberto após aplicação de reserpina em camundongos machos.	40
	Na figura 12A podemos observar o numero de rearing, 12B número de Crossing, 12C tempo desprendido no centro, 12D tempo desprendido na periferia, nenhum dos testes apresentou resultados com significância estatística.....	40
5.3.4.	Resposta ao teste de nado forçado após aplicação de reserpina em camundongos machos.	41
5.3.5.	Resposta ao teste de suspensão de cauda após aplicação de reserpina em camundongos machos.	41
6.	DISCUSSÃO	42
6.1.1.	Resposta nociceptiva em camundongos machos e fêmeas após a aplicação de salina acidificada pH: 4.	43
6.1.2.	Teste do campo aberto em camundongos machos e fêmeas após a aplicação de salina acidificada pH: 4.	45
6.2.	Teste do Labirinto em cruz elevado em camundongos machos e fêmeas após a aplicação de salina acidificada pH: 4.	46
6.2.1.	Teste de suspensão de cauda em camundongos machos e fêmeas após a aplicação de salina acidificada pH: 4.....	47
6.2.2.	Teste de nado forçado em camundongos fêmeas após a aplicação de salina acidificada pH: 4.	47
6.2.3.	Resposta nociceptiva mecânica e térmica em camundongos machos após a aplicação de Reserpina.....	48

6.2.4.	Teste do campo aberto em camundongos machos após a aplicação de Reserpina.....	49
6.2.5.	Teste de suspensão de cauda em camundongos machos após a aplicação Reserpina.....	50
6.2.6.	Teste de nado forçado em camundongos machos após a aplicação de Reserpina.....	50
7.	CONCLUSÃO	51
8.	REFERENCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A fibromialgia é a terceira enfermidade reumática mais prevalente em humanos, e que mais frequentemente causa dor, atingindo cerca de 1-5% da população geral, com maior incidência em pessoas na faixa etária entre 40 a 50 anos, sendo de 6 a 8 vezes mais frequente em mulheres. (SENNA et al 2005; WOLFE et al 1990; WOLFE et al 1995; WHITE et al 1999). O perfil socioeconômico dos pacientes desta doença varia, em sua maioria são de pessoas de menor escolaridade, ou que sofreram algum tipo de estresse social, como divórcio, abandono, traumas psicossociais. Wolfe (1995) descreveu que outras síndromes funcionais comumente estavam relacionadas à doença, tais como: depressão, transtornos de ansiedade, sensação de derrame articular, parestesia, rigidez matinal, alteração do sono, fadiga cólon irritável, má percepção com o estado de saúde, todas reduzem a qualidade de vida dos indivíduos com a doença.

A principal característica clínica da fibromialgia são as síndromes dolorosas, caracterizadas por dores musculares difusas, apresentando-se em sítios dolorosos específicos que acometem o sistema musculoesquelético, e destaca-se a ausência de processos inflamatórios articulares ou musculares (WOLFE et al, 1995; WHITE et al, 1999). Além da relação entre a dor e as síndromes funcionais, a doença também sofre a influência de fatores moduladores, tais como mudanças climáticas, grau de atividade física, estresse emocional, entre outros. A fibromialgia é uma doença que afeta diretamente a qualidade de vida dos pacientes, visto que o impacto dos sintomas da doença muda completamente o cotidiano dos pacientes, e devido à cronicidade, a ruptura do cotidiano se estende por longos períodos de tempo. Segundo KAPLAN RM (2000), e MARTINEZ JE (1999), os pacientes com fibromialgia apresentam uma pior qualidade de vida se comparados a pacientes com outras doenças crônicas, tais como: câncer, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e doença pulmonar obstrutiva

crônica. (MARTINEZ JE et al, 1995, 1999; KAPLAN et al, 2000; TEIXEIRA J et al, 2001.

1.1. Fibromialgia

Com uma complexidade multifatorial, e etiologia pouco conhecida, a fibromialgia é uma síndrome de dor crônica que afeta principalmente o sistema musculoesquelético, seja ela como uma dor generalizada, ou localizada em pontos específicos chamados “*tender points*” (WOLFE et al. 1990). A doença é comumente associada a desordens de caráter funcional, o que leva a uma caracterização da fibromialgia como uma doença de dores musculares juntamente com síndromes de depressão, ansiedade, desordens de sono, fadiga, e desordens físicas. De acordo com o colégio americano de reumatologia (ACR), durante o período de 1990 – 2005 a doença atingia de 0,7 – 4,4% da população, tendo uma maior prevalência em mulheres (CAVALCANTE AB et al, 2006). Em relação às desordens relacionadas à fibromialgia, há prevalência de desordens de caráter psicológico, em destaque a depressão, que chega a 40-80%, e pode ser responsável por perpetuar os sintomas da fibromialgia e causar limitação funcional nos pacientes. (ERCOLANI N et al, 1994; HUDSON J et al, 1996; YUNUS MB et al, 1994; KASHIKAR-ZUCK et al, 2002; WOLFE et al, 2010;). Sintomas comuns que são apresentados em indivíduos com fibromialgia são: fadiga, rigidez matinal, sono não reparador, síndrome do cólon irritável, cefaleias, síndrome uretral, incômodos psicológicos como depressão e ansiedade, e queixas cognitivas como problemas de memória e dificuldade de concentração (HAUN et al 1999; WOLFE et al 1990). Os sintomas da fibromialgia causam grandes impactos negativos na qualidade de vida do paciente e dos indivíduos com os quais convive, desestabilizando as relações e causando isolamento social, além de representar um grande impacto na economia do

país. A doença é fortemente associada ao estado emocional do indivíduo, sendo que a intensidade da dor está muitas vezes ligada a períodos em que as pessoas sofreram um grande estresse e/ou depressão. (BENGTSSON et al 1988; ABLIN et al 2013).

No Brasil foi realizado um estudo com início em 2010 chamado “EpiFibro”, onde foi elaborado um banco de dados incluindo 9 estados brasileiros. Assim, foi estimada uma prevalência de 5,5% de fibromialgia em indivíduos residentes na cidade de São Paulo-SP/Brasil, sendo que todos os indivíduos diagnosticados para a doença eram do sexo feminino (SANTOS AM, et al. 2010). No estado de São Paulo foi realizado outro estudo onde se observou resultados semelhantes na prevalência de fibromialgia, cuja amostra obtida era restrita aos sistemas públicos de saúde e a uma população de baixo nível socioeconômico, onde dos 768 indivíduos participantes, 4,4% foram diagnosticado com fibromialgia, todos sendo do sexo feminino (ASSUMPÇÃO A, et al. 2009).

1.1.1. Dor

A fibromialgia é clinicamente caracterizada pela presença de dor crônica generalizada com mais de três meses de duração, se apresentando na forma de alodínia e dor espontânea. Alodínia se refere a um estímulo que essencialmente é inócuo, e na presença de alguma patologia, este mesmo estímulo passa a ser entendido como nocivo, ou seja, um estímulo que antes não causava dor, passa a causar, esta sendo uma característica comum encontrada em indivíduos com fibromialgia (VARGAS AMD, et al. 2006). Além de alodínia e dor espontânea, os indivíduos com a doença, também apresentam hiperalgesia, que é uma sensibilidade aumentada a uma variedade de estímulos, como calor, frio e pressão mecânica, que produzem respostas dolorosas (BRADLEY LA, et al. 2009). Os estímulos são o gatilho para a ativação dos *tender*

points, pontos no corpo que ao serem estimulados iniciam a resposta de dor. Foram caracterizados 18 pontos em comum espalhados pelo corpo, sendo que o diagnóstico para a fibromialgia inclui o indivíduo apresentar dor em pelo menos 11 destes pontos característicos e que apresentam maior sensibilidade em indivíduos com a doença (HAUN MV et al. 1999). Assim sendo, indivíduos com fibromialgia experienciam períodos com ausência de dor, intercalado a períodos com dor de grande intensidade. Em geral, os períodos de dor são iniciados por um gatilho, que pode ser uma situação de grande pressão psicológica, onde o indivíduo se vê sob uma situação de estresse dando início ao período de dor.

A dor é uma experiência única e individual, pois leva em conta aspectos afetivos, autonômicos e comportamentais (RIBEIRO FILHO, et al. 2011). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a terminologia da dor é muito ampla além da alodínia, hiperalgesia, dor espontânea; também temos a nocicepção, que é o processo de codificação neural dos estímulos nocivos (TRINDADE HI et al. 2013). Essa nomenclatura é comumente usada na pesquisa animal, pois em modelos animais não se pode afirmar que a dor está presente, visto que não tem como avaliar o estado emocional do animal. Para entender a dor, é preciso começar por como ela é processada, e quais são os mecanismos envolvidos. Sabe-se que as respostas nociceptivas são transmitidas a partir da estimulação de neurônios sensoriais periféricos, cujo corpo celular se localiza nos ganglios da raiz dorsal e fazem aferência com neurônios de segunda ordem que levam a informação de dor até o sistema nervoso central. Estes neurônios sensoriais são também chamados de fibras nervosas, mielizadas ou pouco mielizadas (A δ e C). As fibras pouco mielizadas A δ tem diâmetro intermediário, e são responsáveis pela condução da dor mais aguda, com velocidade mais rápida. Já as fibras C, ou nociceptores, são neurônios sensoriais de pequeno diâmetro responsáveis pela

dor difusa, sendo sua condução é mais lenta (GREENE, et al. 2010; KLAUMANN, et al. 2008).

A dor pode ser dividida em dor aguda e crônica. Na fibromialgia temos comumente presente o tipo de dor crônica, que é uma dor que perdura por mais de três meses ou que persiste por mais tempo que o normal de cura (KLAUMANN, et al. 2008). A dor crônica é um problema de saúde pública que acomete cerca de 100 milhões de indivíduos, sendo 14% relacionada a articulação e ao sistema musculoesquelético (GAGLIESE L et al. 2003). A qualidade de vida do indivíduo que apresenta alguma síndrome de dor crônica é estreitamente menor que o normal, visto que a condição em que o indivíduo se encontra durante o período de dor, normalmente vem acompanhado de síndromes como depressão, incapacidade física e funcional, afastamento social, mudanças na dinâmica familiar, desequilíbrio econômico entre outros, o que causa alto desconforto físico e psíquico (PIMENTA CA et al. 1997).

Existem vários indícios que mostram que a associação entre a ausência de dano tecidual periférico e a distribuição dos pontos dolorosos sugere que a patologia subjacente à dor na doença seja de origem no SNC. Mesmo que não exista um sítio evidente de inflamação nos pontos de dor nos indivíduos, o processo inflamatório associado ao dano tecidual é provocado, em grande parte, pela liberação no sítio da injúria, de Substância P (SP), que é um neuropeptídeo liberado por fibras aferentes primárias não mielinizadas de pequeno diâmetro, ou nociceptores, quando axônios são estimulados, em resposta a estímulos mecânicos dolorosos. Entretanto, a presença de um mecanismo inflamatório na fisiopatologia da fibromialgia não foi descrita. (RUSSEL IJ, et al. 1994; LARSON AA, et al. 2001).

1.1.2. Diagnóstico

Devido a ausência de exames complementares que possa indentificar a fibromialgia e a dificuldade no estabelecimento da etiologia da doença, os diagnosticos são baseados somente em critérios clínicos. Em 1990, o Colégio Americano de Reumatologia/ACR determinou alguns critérios clínicos para caracterizar o paciente com fibromialgia. Tais critérios analisavam dor difusa muscular, sensibilidade em 11 dos 18 pontos no corpo onde o paciente tinha uma resposta dolorosa a partir de um estímulo mecânico, e a dor crônica que persistia por mais de três meses (HAUN MVA, et al. 1999). A partir dos criterios estabelecidos pela ACR, surgiram variações de metodologias descritas para o diagnóstico da doença, como as de Wolfe et al (1997), que além dos criterios usados na ACR, como a classificação da dor como crônica, e a medição de dolerimetria nos *Tender Points*, passou a utilizar-se ainda um questionário que levava em conta a ansiedade, depressão e capacidade funcional do indivíduo. Outro estudo foi desenvolvido em 2010 por Wolfe et al, que se baseava na criação de uma escala de severidade de sintomas, que avaliou os pacientes a partir de cinco variáveis: fadiga, distúrbio do sono, sono não revigorante, humor e sintomas cognitivos. Essa pesquisa foi dividida em duas fases; na primeira ocorreu á avaliação do índice de extensão da dor (*widespread pain index - WPI*), e na segunda fase foi aplicado um questionário onde se apresentavam um conjunto de variáveis, capazes também de categorizar a fibromialgia, assim como a avaliação do WPI. O estudo permitiu a conclusão de um diagnóstico mais claro e preciso, unindo as análises da escala de severidade de sintomas, o índice de extensão de dor correlacionando com a contagem dos *Tender Points* (WOLFE F, et al. 2010). Esse estudo foi reconhecido e aprovado pelo ACR, devido a sua simplicidade, facilidade de reprodução e eficácia no diagnóstico da doença.

A fisiopatologia da fibromialgia está ligada a uma variedade de anormalidades nos múltiplos fatores e mecanismos envolvidos na patogênese; tais como: predisposição genética, variáveis psicossociais e estressores ambientais, aminas biogênicas, neurotransmissores, hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, estresse oxidativo e mecanismos de modulação da dor de sensibilização central e funções autonômicas na fibromialgia (BRADLEY LA, et al. 2009; OZGOCMEN S, et al. 2006).

O tratamento da fibromialgia consiste na utilização de terapias medicamentosas, cognitivo-comportamental, terapia de exercícios físicos, bloqueio do nervo, e inclusive algumas terapias alternativas têm sido utilizadas (NAKAJIMA et al., 2015).

No entanto, devido ao fato da etiologia da fibromialgia ser ainda desconhecida, não existe atualmente um tratamento capaz de levar a resolução da doença. Portanto, estudos pré-clínicos e clínicos são ferramentas extremamente importantes para o entendimento da doença, permitindo avanços na busca e na melhoria de tratamentos mais eficazes.

1.2. Relação entre fibromialgia, depressão e ansiedade.

Os distúrbios psicológicos são sintomas que normalmente acompanham a doença, e são responsáveis pela incapacitação funcional dos pacientes, ajudando assim a iniciar ou perpetuar os outros sintomas presentes na fibromialgia, especialmente a depressão que atinge um total de 49-80% dos indivíduos com fibromialgia (ERCOLANI M et al. 1994; HUDSON J et al. 1996). A depressão piora consideravelmente o condicionamento físico, a funcionalidade física, a dor, funcionalidade social e emocional, e esses efeitos estão relacionados ao grau de depressão, visto que o distúrbio depressivo é capaz de alterar a percepção da dor, dificultar a adesão ao tratamento, diminuir o suporte social e desregular os sistemas humoral e imunológico (JACOBSON

JL et al. 2001; BERBER JSS et al. 2005). A ansiedade é outra síndrome também comumente presente, e normalmente acompanha a depressão. Seu efeito modulador na doença também pode ser quantificado, facilitando assim o diagnóstico da doença que leva em conta o grau de depressão e de ansiedade, correlacionando com os outros sintomas.

A fibromialgia tem sido chamada “desordem relacionada ao estresse”, devido ao fato de ter o início e/ou a exacerbação dos sintomas no contexto de eventos estressores (WOOD et al, 2004). Outro estudo, indicou o estresse como um fator etiopatogênico, desde que associado a fatores de predisposição genética, pois observou uma alta prevalência de fibromialgia entre parentes de pacientes com fibromialgia. Este fato pode ser atribuído tanto a fatores genéticos como ambientais, uma vez que indivíduos de uma mesma família costumam compartilhar ambos os fatores (VAN HOUDENHOVE et al. 2005; NEUMANN & BUSKILA, et al. 2003).

1.3. Estudos pré-clínicos

Sabe-se que para mimetizar a doença, é preciso um modelo animal que apresente os sintomas de dor crônica, que tenha a ausência de dano tecidual, e também que seja capaz de mimetizar as disfunções psicológicas apresentadas em humanos. Há uma imensa dificuldade quanto aos modelos animais presentes na literatura em reproduzir fielmente as características da doença, isso devido a sua etiologia até então pouco conhecida.

Os modelos animais descritos em sua maioria se baseiam na indução de dor generalizada, por múltiplas injeções de salina acidificada, fadiga junto com a aplicação de injeções de salina acidificada, *priming* hiperalgésico, depleção de aminas biogênicas no sistema nervoso central, e a indução de estresse como modelo de fibromialgia, pois

já são conhecidos como gatilhos dos sintomas em pacientes de fibromialgia (SLUKA KA, et al. 2013).

A escolha do modelo animal pré-clínico é essencial para o processo de estudo da patologia, e, atualmente, conforme descrito acima, os modelos presentes na literatura para o estudo da fibromialgia consiste na aplicação de salina acidificada (pH 4), repetidas vezes ou uma única por via intramuscular (SHARMA NK et al. 2009). É capaz de causar a dor generalizada crônica, que é uma característica da doença. Segundo a literatura, nesse modelo a hiperalgesia é reprodutível igualmente em camundongos machos e fêmeas, e causa o mínimo de dano tecidual no músculo gastrocnêmico, sítio da injeção, após o estabelecimento da hiperalgesia mecânica. Neste modelo já foi observado a ocorrência de ansiedade e depressão nos animais no mesmo período da ocorrência de dor provocada pelas injeções de salina (LIU YU-TING et al. 2014).

Já o modelo de *priming* hiperalgésico, que consiste na inflamação aguda induzida no músculo, que gera uma sensibilidade local, e após a injúria é aplicada uma dose de prostaglandina 2 (PG2) incapaz de produzir hiperalgesia em um tecido normal, mas que no tecido previamente injuriado passa a produzir uma hiperalgesia intensa que pode durar por semanas (ALEY et al. 2000). Neste modelo não há ainda muito conhecimento sobre seu mecanismo, ou uma possível diferença entre fêmeas e machos em relação ao desenvolvimento de dor.

O modelo de dor muscular por fadiga consiste na combinação de fadiga muscular por exercício físico forçado, como colocar o animal para correr durante 2 horas em uma roda, ou aplicar estímulos elétricos repetitivos no músculo. Este processo juntamente com injúrias musculares de baixa intensidade feitas com a aplicação de salina pH 5, é capaz de causar uma hiperalgesia generalizada sem a presença de dano

muscular, com duração de 7 dias em machos e até 35 dias em fêmeas, porém características como depressão e ansiedade ainda não foram estudadas neste método. (YOKOYAMA T et al. 2007; DINA AO et al. 2008; SLUKA et al. 2010).

Os outros modelos incluem a depleção de aminas biogênicas sistemicamente pela reserpina, que consiste na aplicação repetida de reserpina, que além da hiperalgesia muscular, também causa o decréscimo de aminas biogênicas na medula espinhal e córtex pré-frontal, características que estão presentes em indivíduos com fibromialgia (NAGAKURA Y et al. 2009). A hiperalgesia muscular tem duração aproximada de 1 semana, e os animais também apresentam quadro depressivo, apesar de ser necessários estudos futuros para entender a alteração no mecanismo do sistema serotoninérgico (NAGAKURA Y et al. 2009; OGINO S et al. 2013).

Há ainda modelos de fibromialgia induzida por estresse, como estresse por frio onde o camundongo é mantido em uma sala fria por um período de 12 h em três dias subsequentes, e após esse período é transferido a uma sala de temperatura normal a 24°C (NISHIYORI M, et al. 2011). A hiperalgesia muscular neste método dura três semanas com o estresse causado pela indução repetida ao frio, onde se observa o aumento da concentração de corticosterona no plasma, porém sem desenvolver comportamentos de ansiedade e depressão (NASU T et al. 2010; NISHIYORI M et al. 2011). Há ainda a indução por estresse sonoro onde os animais são expostos por quatro dias em uma gaiola na qual é emitido quatro tons diferentes com sua amplitude variando de acordo com o tempo, e então é aplicado no músculo uma injeção de PGE2 e lipopolissacarídeos (LPS). O estresse sonoro por si só é incapaz de produzir sensibilidade mecânica, porém, em associação a PGE2 e LPS pode vir a desenvolver a hiperalgesia de longa duração (KHASAR SG et al. 2009; GREEN PG et al 2011;

DINA AO et al. 2011). Comportamentos do tipo ansiedade, depressão, fadiga e distúrbio de sono ainda devem ser estudados nesse modelo.

Outro modelo é induzido por nado forçado. Neste método, o animal é colocado de 10-20 minutos por dia durante três dias para nadar forçadamente em água a temperatura ambiente, o que leva ao desenvolvimento de hiperalgesia térmica, perda de força muscular até por 9 dias, e aumento na resposta frente a estímulos inflamatórios. Ainda não há estudos avaliando a hiperalgesia mecânica ou disfunções psicológicas como ansiedade e depressão neste modelo (QUINTERO L et al. 2000; 2003; SUAREZ-ROCA H et al. 2006).

Diferentemente de outras doenças onde se pode mimetizar sua etiologia e sintomatologia com modelos animais, na fibromialgia não se tem um modelo animal bem estabelecido que permita o estudo da doença com grandes perspectivas de translação dos resultados encontrados. Seria interessante a utilização de um modelo animal capaz de apresentar características sintomatológicas iguais a fibromialgia, como a falta de uma injúria tecidual muscular, característica importante na doença, além de ser possível correlacionar a dor a outros sintomas, como fadiga, depressão e ansiedade. Os diferentes modelos animais atualmente utilizados para o estudo da fibromialgia incluem a indução de dor, mas ainda poucos se voltam para a análise do desenvolvimento de déficits cognitivos associados à fibromialgia, como depressão e ansiedade.

Neste sentido, avanços poderiam ser alcançados se houvesse um modelo animal que permitisse a análise de um maior número de sintomas característicos da fibromialgia, compreendendo períodos em que o animal estivesse sem dor, e períodos de dor iniciados por gatilhos, como estímulos de estresse, igualmente capazes de

deflagrar períodos de dor generalizada em indivíduos com a doença (SLUKA et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho busca estabelecer a validação de um modelo animal de fibromialgia que permita a análise de diferentes sintomas característicos da doença e, onde a dor seja iniciada de maneira mais fidedigna com o observado em humanos. O modelo consiste da exposição de animais previamente submetidos a um modelo de fibromialgia já descrito na literatura, mas que não apresentam mais o quadro de dor, a uma situação de estresse agudo, com o objetivo de deflagrar nova resposta dolorosa, e ainda outras características da doença como depressão e ansiedade. O estudo busca facilitar o entendimento da fibromialgia através da melhoria nos processos de identificação e caracterização da mesma em animais, fornecendo ferramentas mais robustas para o estudo da doença, visando avanços na busca por alvos terapêuticos mais eficazes e seguros que resultem na melhoria da qualidade de vida dos portadores da doença.

3. OBJETIVOS A SEREM ALCANÇADOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente projeto é validar um modelo animal de fibromialgia em roedores, por meio da aplicação de salina acidificada pH: 4 no musculo gastrocnêmio direito de camundongos.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Analisar o tempo de duração da nocicepção induzida por dois modelos animais de fibromialgia

3.2.2. Verificar se após a resolução da dor, a exposição do animal a uma situação de estresse é capaz de iniciar nova resposta nociceptiva e qual o tempo de duração desta resposta.

3.2.3. Avaliar se há comprometimento de função motora, desenvolvimento de fadiga, depressão ou ansiedade nestes animais, sempre comparando entre as diferentes fases da doença (com ou sem nocicepção).

3.2.4. Avaliar se há diferença entre os sexos quanto ao desenvolvimento da fibromialgia.

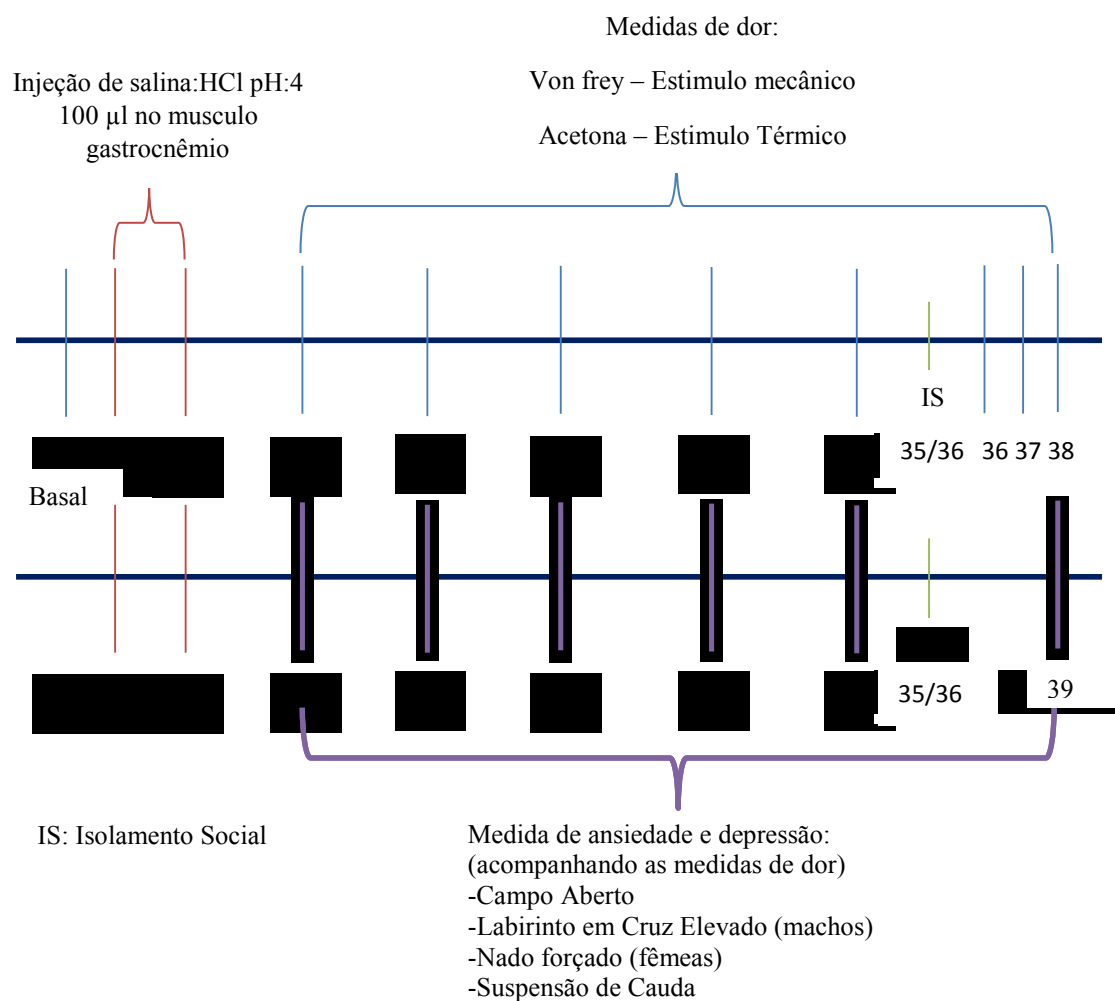
4. MEIOS E MÉTODOS A SEREM EMPREGADOS

4.1. Animais e reagentes

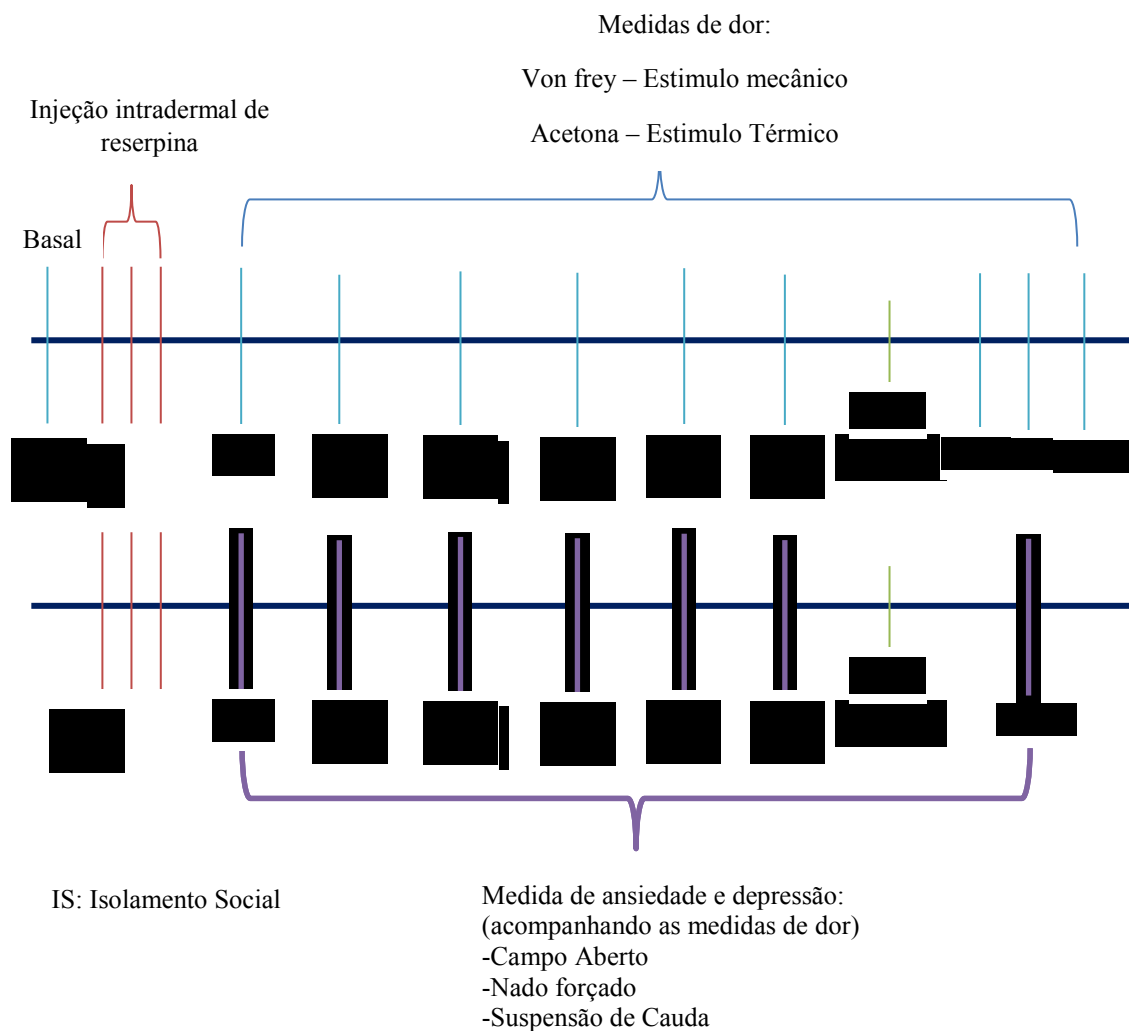
Foi utilizados camundongos C57BL/6 machos e fêmeas de 6-8 semanas de idade (20g), provenientes do biotério do Centro de Criação de Camundongos da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, mantidos sob condições de temperatura (23-25 °C) e o ciclo claro/escuro de 12 h, com livre acesso à ração e água. Os experimentos foi conduzidos de acordo com o comitê de ética animal da UFU Umuarama (protocolo 100/16) e normas recomendadas pela IASP (ZIMMERMANN, 1983). A maioria dos reagentes utilizados foi adquiridos da Sigma (EUA). Os reagentes que não tiverem esta procedência foi de qualidade P.A. e de fonte confiável.

4.2. Delineamento experimental

O Delineamento experimental referente aos testes de medidas de nocicepção mecânica e térmica, e medidas de ansiedade e depressão realizados com os camundongos fêmeas e machos, seguindo o modelo de dor a partir da aplicação de salina acidificada pH: 4 no musculo gastrocnêmio direito dos animais.



Delineamento 1: Delineamento experimental referente aos camundongos 10 machos e 10 camundongos fêmeas seguindo o modelo de dor a partir da aplicação de salina acidificada pH: 4 no músculo gastrocnêmio direito.



Delineamento 2: Delineamento experimental referente aos 10 camundongos machos seguindo o modelo de dor a partir da aplicação intradermal de reserpina.

4.2.1. Injeção de salina acidificada

O modelo de fibromialgia induzido pela injeção de salina acidificada pela adição de HCl (pH: 4.0), no músculo gastrocnêmico (músculos laterais da região logo acima

das patas traseiras) direito, não causando danos teciduais (SLUKA et al., 2001). Foi aplicadas duas injeções de 100µL da solução de salina pH 4,0, com um intervalo de cinco dias entre as injeções, em camundongos previamente anestesiados com isoflurano. O grupo controle recebeu injeções de salina apenas. Os animais foram observados quanto ao desenvolvimento de dor, fadiga muscular, comprometimento de memória e aprendizado, função motora e desenvolvimento de ansiedade, sintomas clínicos característicos de indivíduos com fibromialgia.

4.2.2. Injeção de Reserpina

O modelo de fibromialgia induzido pela aplicação intradermal de reserpina, foi aplicado em três dias consecutivos. Os animais também foram observados quanto ao desenvolvimento de dor, fadiga muscular, comprometimento de memória e aprendizado, função motora e desenvolvimento de ansiedade, sintomas clínicos característicos de indivíduos com fibromialgia.

4.3. Estresse induzido por isolamento social

Segundo dados da literatura, a dor induzida pela injeção de salina pH 4,0 tem duração máxima de 30 dias a partir da segunda injeção (SLUKA et al., 2001). Neste sentido, os animais serão observados até não se observar mais a presença de comportamentos nociceptivos. Neste ponto, será dado um intervalo de uma semana e feita nova medida basal dos animais que serão então submetidos a um modelo de estresse induzido por isolamento social. O modelo compreende a exposição dos animais a 12 h de isolamento em gaiolas individuais (30 × 20 × 12.5 cm) (TAKATSU-COLEMAN et al., 2013). 24 horas após este procedimento, os animais serão novamente

avaliados quanto ao desenvolvimento de dor e dos demais parâmetros clínicos característicos de fibromialgia citados anteriormente.

4.4. Parâmetros nociceptivos e inflamatórios

Como parâmetros nociceptivos foram avaliados a sensibilidade mecânica e térmica dos animais submetidos à injeção de salina (pH4,0). A avaliação da sensibilidade mecânica foi feita pela utilização de camundongos aclimatizados (1-2 h) em caixas desobstruídas individuais de vidro (9 x 7 x 11 cm) em uma plataforma elevada com fundo gradeado, para permitir o acesso por parte do experimentador à pata traseira do animal. A sensibilidade mecânica foi então analisada com o auxílio de filamentos de Von Frey (0,02-6 g) aplicados na superfície das patas traseiras direita e esquerda dos animais com uma pressão que faz com que o filamento se dobre. Utilizando o método de “Up-and-Down” descrito por (CHAPLAN et al., 1994), onde foram aplicados seis estímulos seguidos, iniciando com o filamento de intensidade intermediária (0,4 g). Se o animal responder ao estímulo é usado o próximo filamento menor (0,16 g). Se o animal não responder ao estímulo é utilizado o próximo filamento maior (0,6 g), e este procedimento se segue por até 6 estimulações seguidas. O limiar de retirada de pata é expresso em gramas e calculado como previamente descrito por (DIXON et al., 1982). A sensibilidade térmica dos animais foi avaliada frente a um estímulo “frio”, a acetona, segundo CASPANI et al., (2009). Para a alodinia por estímulo frio será observado a resposta nocifensiva (lambida de pata e shaking) do animal após o resfriamento causado pela evaporação da acetona aplicada topicamente na pata traseira do animal. 20 μ l de acetona foram aplicados nas patas traseiras. O comportamento do animal foi observado durante 30 segundos antes e após a aplicação de acetona em vários tempos após a exposição ao modelo de fibromialgia, da mesma

forma que o observado para a sensibilidade mecânica, com o tempo sendo cronometrado.

4.5. Comportamentos tipo-depressivos

4.5.1. Nado Forçado

Os camundongos foram colocados individualmente em cilindros de vidro (17 cm de diâmetro e 25 cm de altura) contendo água até 10 cm de altura e mantida a 23-25 °C. Eles serão deixados neste ambiente por 6 min, sendo que nos últimos 4 minutos o tempo em que permanecerem imóveis (realizando apenas pequenos movimentos para auxiliar na flutuação) foi registrado (ZANELATTI et al., 2010).

4.5.2. Teste de Suspensão de cauda

Os animais são suspensos pela calda em uma altura de 25 cm, usando uma fita adesiva localizada a 2 cm da ponta da cauda. Foram observados durante 3 minutos e o observador não terá conhecimento dos grupos que esta analisando. O tempo de latência até o primeiro episódio de imobilidade e a duração da imobilidade foi quantificado manualmente com o uso de um cronômetro. A imobilidade é considerada como estando o animal completamente imóvel quando pendurado.

4.6. Avaliação do desenvolvimento de ansiedade - Labirinto em cruz elevado

O LCE para camundongos é feito de madeira e constituído por dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) sem paredes laterais, perpendiculares a dois braços cercados por paredes laterais (30 x 5 x 15 cm), apresentando uma plataforma central comum a todos os braços (5 x 5 cm). O aparelho é elevado 50 cm do solo e possui uma borda de acrílico (1 cm) nos braços abertos para impedir a queda do animal. Os camundongos

foram posicionados no centro da plataforma com a cabeça virada para o braço fechado, podendo explorar livremente o labirinto durante 5 minutos. Foi observado o número de entradas nos braços abertos e fechados, bem como o tempo de permanência nestas regiões (CAMPOS et al., 2013).

4.7. Coordenação motora e ansiedade

Os animais são colocados no centro de uma arena circular (50 cm de diâmetro) com o assoalho marcado com pequenos quadrados simétricos, o que permite a quantificação da atividade locomotora dos animais. Os animais foram observados por 3 minutos e será quantificado o número de crossing (cruzamentos), o número de vezes em que o animal fica apoiado nas patas traseiras (rearing), a defecação do animal e o tempo despendido o centro e na periferia da arena.

4.8. Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados serão realizadas pelos métodos de variância multivariada (MANOVA), variância a um critério (one-way ANOVA), e teste de comparações múltiplas de Bonferroni (teste t), de acordo com as variáveis e grupos comparados, sendo que as diferenças serão consideradas significativas para valores de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS.

5.1. Resposta nociceptiva mecânica após injeção de salina acidificada (pH: 4) em camundongos machos.

Na figura 1A, podemos observar que a injeção de salina acidificada levou ao desenvolvimento de nocicepção que pode ser observada 10 dias após a última injeção de salina, sendo que 30 dias após, os limiares de retirada de pata retornaram aos valores basais, indicando que estes animais não estavam mais com dor. Após o isolamento social foi observado um aumento no limiar de retirada de pata, e, devido ao fato de estes animais não apresentarem uma retomada da nocicepção, como era o esperado, as análises foram encerradas cinco dias após o IS (Fig 1A).

Na figura 1B podemos observar que após 10 dias a indução com a injeção de salina acidificada o animal levou a queda do limiar de retirada de pata indicando nocicepção mecânica, e voltando a medida basal 30 dias após a injeção de salina acidificada indicando que os animais já não estavam com dor. Após o isolamento social foi observado não teve aumento no limiar de retirada de pata e devido ao fato de estes animais não apresentarem uma retomada da nocicepção, como era o esperado, as análises foram encerradas cinco dias após o IS.

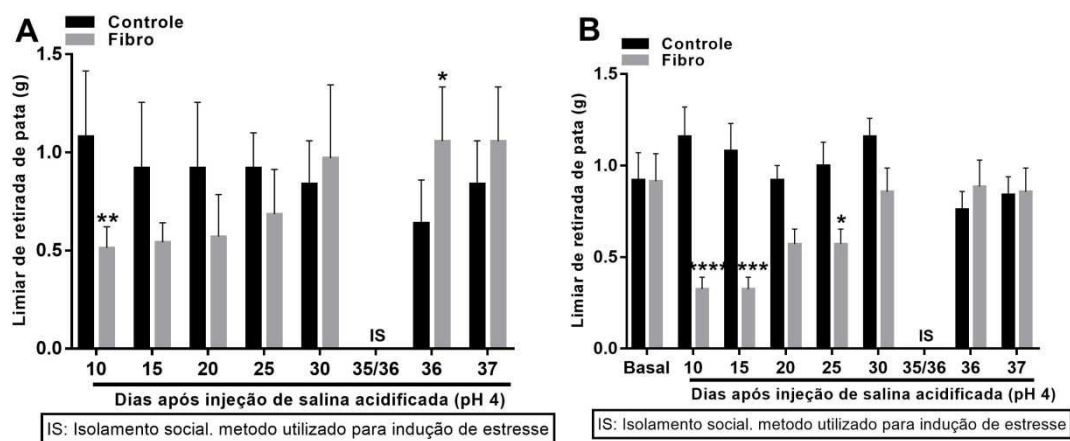


Figura 1: Limiar de retirada da pata esquerda contralateral a injeção(A) e pata direita ipsilateral a injeção (B) (gramas) em diferentes dias após a terceira aplicação de salina acidificada (pH 4) no músculo gastrocnêmio de camundongos machos em comparação a animais controle.

(*); (**); (***): Significância obtida a partir da análise de multicomparação. Para $\alpha < 0,05$, $< 0,01$, $< 0,001$.

5.2. Resposta nociceptiva térmica após injeção de salina acidificada (pH: 4) em camundongos machos.

Além da nocicepção mecânica, foi avaliado também a nocicepção térmica frente ao estímulo frio com a aplicação tópica de acetona nas patas dos animais.

Na figura 2A é observada a resposta nociceptiva na pata esquerda dos animais com fibromialgia induzida com a salina acidificada, onde não apresentaram perfil diferente dos animais controles, apresentando em ambos um pequeno aumento no tempo de resposta após a aplicação tópica da acetona, sendo assim inconclusivo a hiperalgesia esperada no modelo. Na figura 2B podemos observar a resposta da pata direita dos animais com fibromialgia induzida com salina acidificada. O perfil de resposta dos animais fibromialgicos também acompanha o perfil de resposta dos animais controles, com um aumento do tempo de resposta frente ao estímulo térmico, com um pico após IS no dia 32 e depois uma queda, voltando ao normal o perfil, com os animais não apresentando dor.

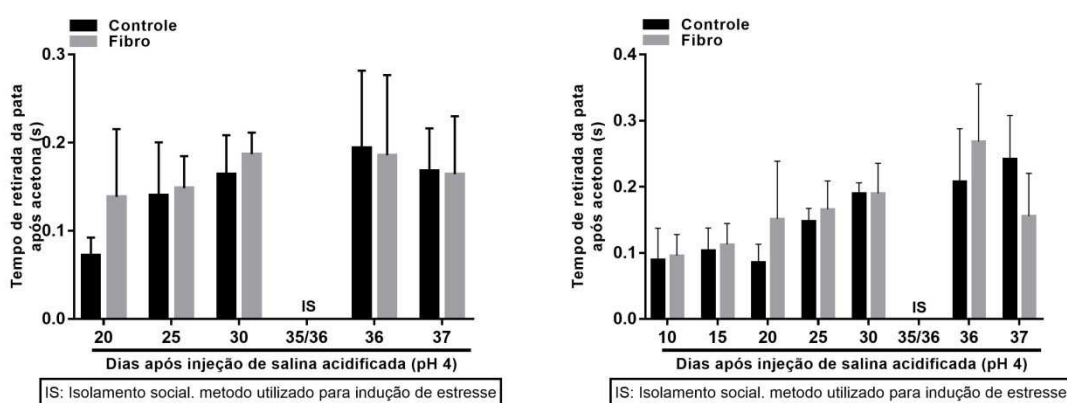


Figura 2: Tempo de resposta em segundos após a aplicação tópica de acetona na pata esquerda contra lateral a injeção (A) e pata direita ipsilateral a injeção (B), em diferentes dias após a terceira aplicação de salina acidificada (pH 4) no músculo gastrocnêmio de camundongos machos fibro em comparação com animais controle.

5.3. Resposta ao teste de campo aberto induzido após injeção de salina acidificada (pH: 4) em camundongos machos.

As respostas obtidas na figura 3 são referentes ao teste de campo aberto, que consiste nos parâmetros: número de rearing (3A) (número de vezes que o animal se apoia nas patas traseiras), número de crossing (3B) (número de vezes que o animal atravessa um quadrante) e o número de fezes (3C). Apesar de haver uma queda no número de rearing nos animais fibromialgicos em relação aos animais controle 10 dias após a injeção de salina acidificada, não foram evidenciadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros observados e as análises foram encerradas no dia 25.

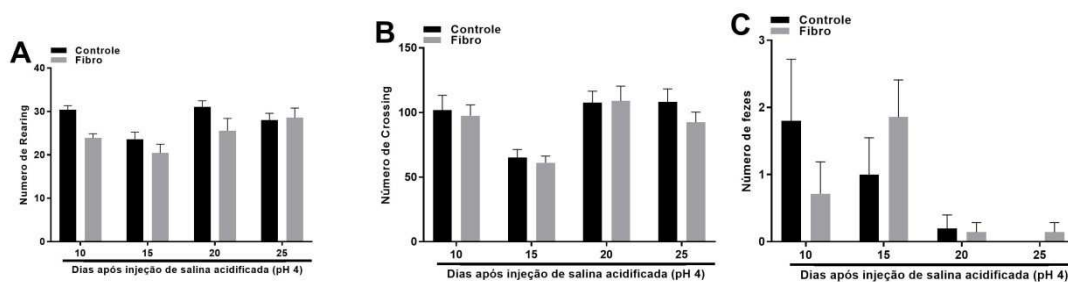


Figura 3: Numero de vezes que o animal fica apoiado nas duas patas traseira (A) (*rearing*), numero de vezes que o anima atravessa os quadrantes desenhados no campo aberto (B) (*crossing*), e numero de fezes (C) durante os 5 minutos de teste, em diferentes dias após a aplicação de salina acidificada (pH 4) no músculo gastrocnêmio de camundongos machos fibro em comparação com animais controle.

5.4. Respostas ao teste de Labirinto em Cruz Elevado após aplicação de salina acidificada (pH: 4) em camundongos machos.

Na figura 1A podemos observar que os camundongos com fibromialgia induzida com a injeção de salina acidificada demonstraram quase o mesmo perfil que os animais

controle, no tempo de permanência no braço fechado, mas não tendo um resultado que apresentasse diferenças significativas.

Na figura 1B referente ao braço aberto, é observável uma tendência de que os animais com fibromialgia induzida com a injeção de salina acidificada desprenderam mais tempo explorando o braço aberto em relação ao controle durante os 25 dias após a injeção, mas não apresentou diferença significativa nas respostas ao teste. Contudo, um incremento no número de animais testados deveria ser realizado para se obter resultados mais robustos.

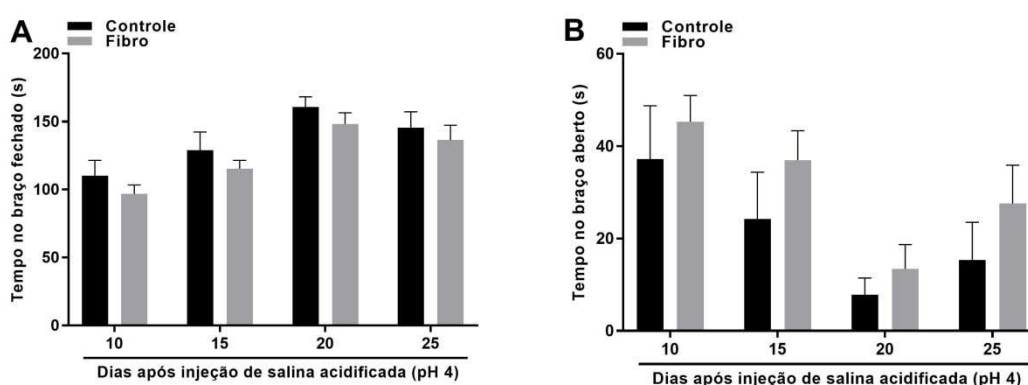


Figura 4: Tempo em segundos em que o camundongo se localiza no braço fechado (A) e no braço aberto (B) do Labirinto em cruz elevado, de acordo com os dias após a aplicação de salina acidificada (pH 4) no músculo gastrocnêmio de camundongos machos fibro comparados com animais controle.

5.5. Resposta ao teste de suspensão de cauda após aplicação de salina acidificada (pH 4) em camundongos machos.

Na figura 5 podemos observar que após a aplicação de salina acidificada os camundongos com fibromialgia induzida por salina acidificada não apresentaram resultados com diferença significativa.

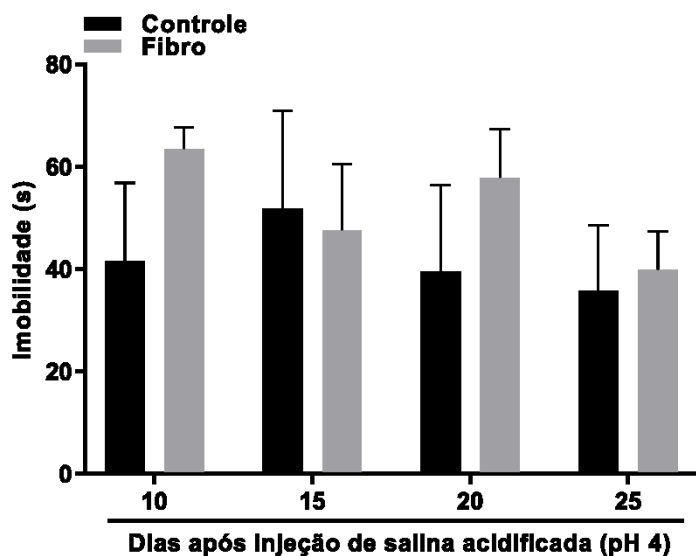


Figura 5: Tempo em que o camundongo permanece imóvel de acordo com os dias após a aplicação de salina acidificada (pH 4) no músculo gastrocnêmio de camundongos machos fibro, induzidos pela injeção e machos controle.

5.2.1. Resposta nociceptiva mecânica após aplicação de salina acidificada (pH: 4) em camundongos fêmeas.

Na figura 6A podemos observar à pata esquerda, contra lateral à aplicação de salina acidificada que o limiar frente ao estímulo mecânico se manteve maior após a injeção de salina quando comparado a medida basal, mas não teve significância estatística.

Na figura 6B referente à pata direita, ipsilateral a aplicação de salina, os animais fibromialgicos apresentaram o perfil de nocicepção não esperado, indicando que após a aplicação da salina acidificada no musculo gastrocnêmio não ocorreu uma resposta significativa. Diferente do que foi evidenciado com os camundongos machos, onde nos primeiros 25 dias os animais demonstraram uma queda no limiar de retirada de pata em

relação ao basal e aos animais controle. O perfil de resposta se manteve parecido com o basal, e com o grupo controle, mesmo após a indução de estresse por isolamento social.

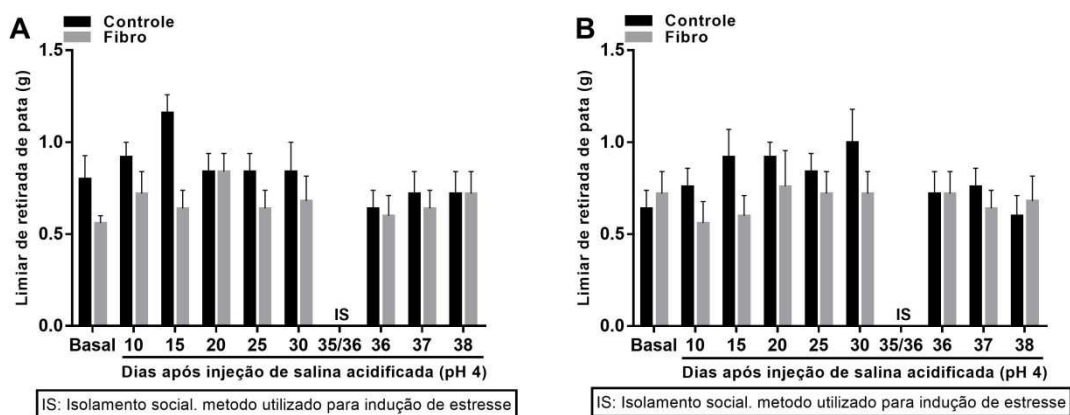


Figura 6: Limiar de retirada da pata esquerda contra lateral a injeção (A) e pata direita ipsilateral a injeção (B) (gramas) em diferentes dias após a terceira aplicação de salina acidificada (pH 4) no músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas fibro em comparação a animais controle.

5.2.2. Resposta nociceptiva térmica após aplicação de salina acidificada (pH: 4) em camundongos fêmeas.

Na figura 7A podemos observar que a resposta ao estímulo frio após a aplicação de salina na pata esquerda (contralateral a aplicação), mostrou um perfil de resposta crescente, diferente do esperado para o modelo, visto que a medida 10 dias após a aplicação se mantem a mesma que a medida basal, e a mesma que o controle, e apenas depois de um tempo ocorre um aumento no perfil de resposta. Após a indução de estresse o perfil de resposta se manteve maior que o basal, sugerindo que o modelo de indução de estresse por isolamento social pode ter alterado a nocicepção térmica, mesmo os dados não apresentando nenhuma alteração significativa.

Na figura 7B referente a pata direita, contralateral a aplicação de salina acidificada, não obteve resposta com significância estatística. De qualquer forma, a

resposta não seguiu o modelo, que é apresentado como dor generalizada, mas os animais tiveram um maior perfil de nocicepção na pata ipsilateral a aplicação.

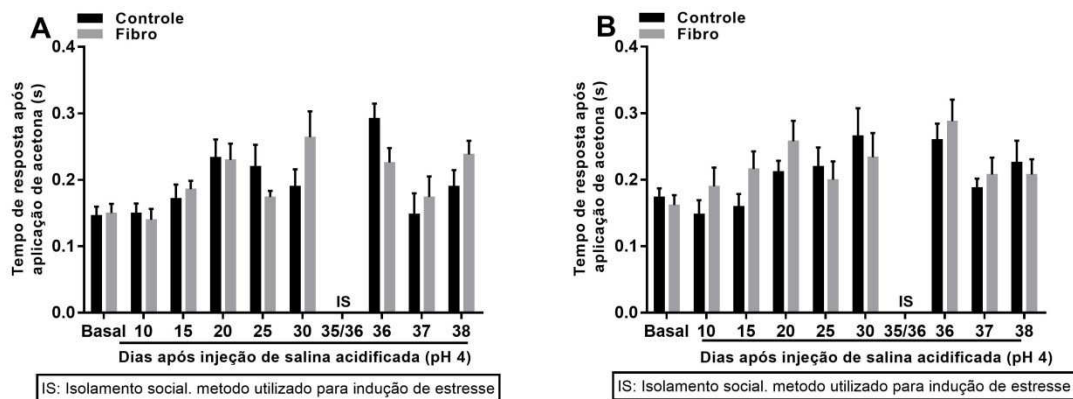


Figura 7: Tempo de resposta em segundos após a aplicação topica de acetona na pata esquerda contralateral a injeção (A) e pata direita ipsilateral a injeção (B), em diferentes dias após a terceira aplicação de salina acidificada (pH 4) no músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas fibro em comparação com animais controle.

5.2.3. Resposta ao teste de campo aberto após aplicação de salina acidificada (pH: 4) em camundongos fêmeas.

Na figura 8A podemos observar o numero de rearing, 8B número de Crossing, 8C tempo desprendido no centro, 8D tempo desprendido na periferia, nenhum dos testes apresentou resultados com significância estatística.

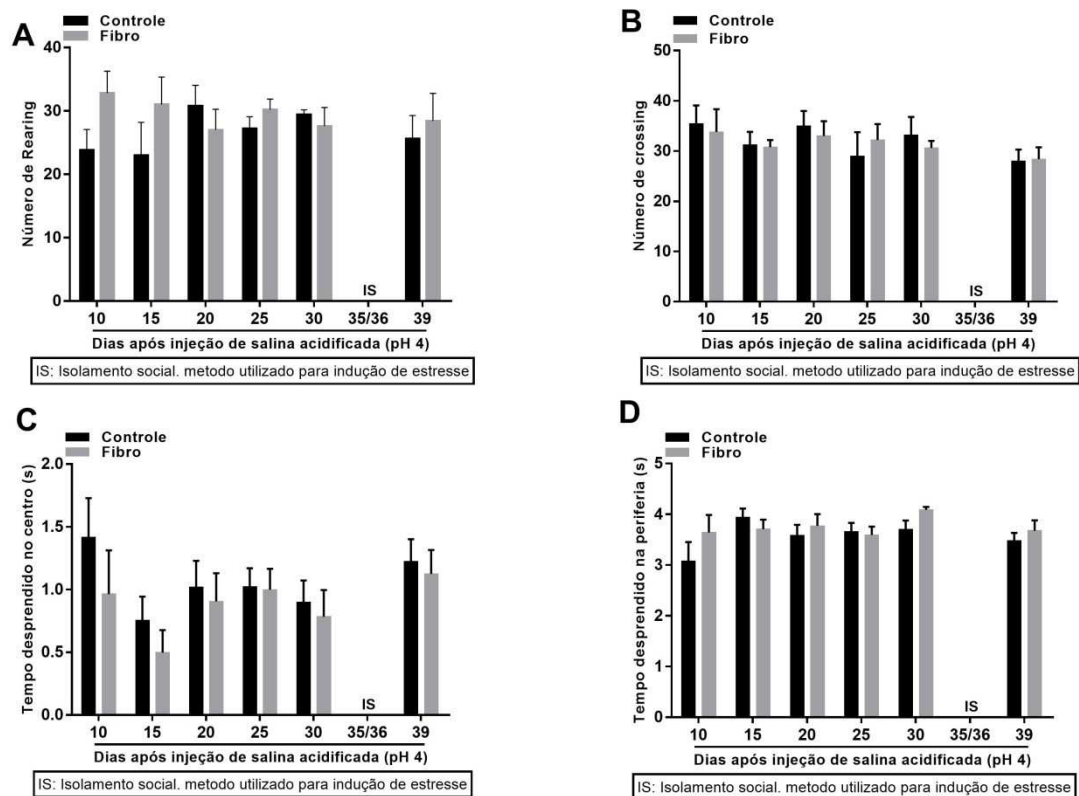


Figura 8: Numero de vezes que o animal fica apoiado nas duas patas traseira (A), numero de vezes que o anima atravessa os quadrantes desenhados no campo aberto (B), tempo desprendido no centro (C), e tempo desprendido na periferia (D) durante os 5 minutos de teste, em diferentes dias após a aplicação de salina acidificada (pH 4) no músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas fibro em comparação com animais controle.

5.2.4. Resposta ao teste de nado forçado induzida após aplicação de salina acidificada (pH: 4) em camundongos fêmeas.

Na figura 9 podemos observar que o perfil de resposta dos animais induzidos com a salina acidificada apresentou maior tempo de imobilidade durante os primeiros 15 dias após a injeção, mas não apresentou diferenças estatísticas.

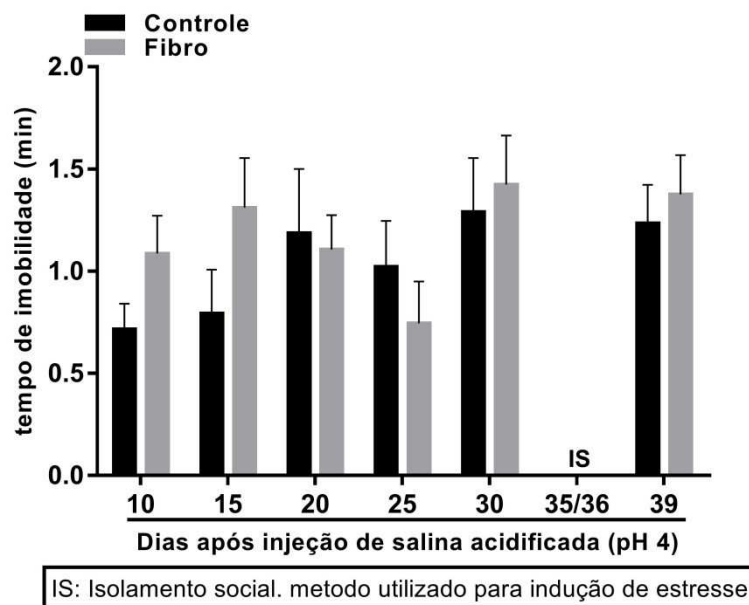


Figura 9: Tempo em minutos em que o camundongo permanece imóvel durante os 4 minutos de teste, descontando 1 minuto de adaptação, em diferentes dias após a terceira aplicação de salina acidificada (pH 4) no músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas fibro, em comparação com animais controle.

5.2.5. Resposta ao teste de suspensão de cauda após aplicação de salina acidificada (pH 4) em camundongos fêmeas.

Na figura 10 podemos observar que após a aplicação da salina acidificada os animais não apresentaram diferença significativa nas respostas ao teste, nem antes e nem depois da indução de estresse por IS.

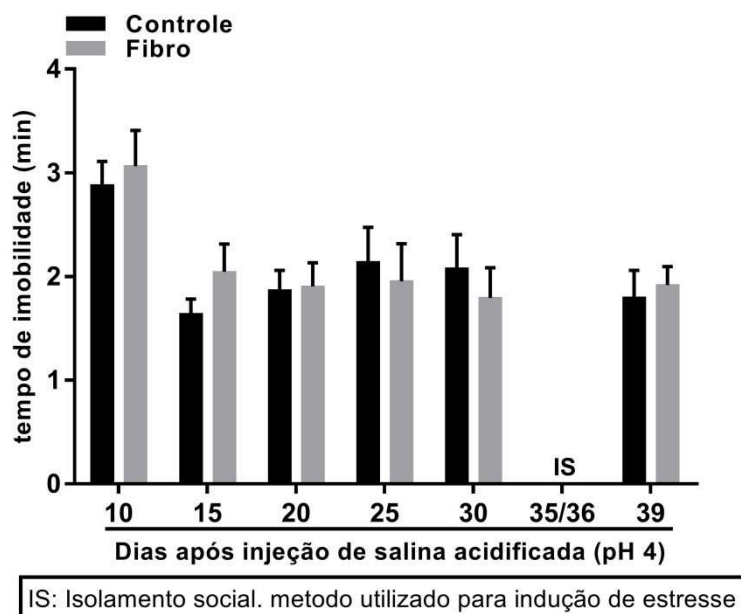


Figura 10: Tempo em que o camundongo permanece imóvel de acordo com os dias após a aplicação de salina acidificada (pH 4) no músculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas fibro em comparação com animais controle.

5.3.1. Resposta nociceptiva mecânica após aplicação de reserpina em camundongos machos.

Na figura 10A observamos que após a aplicação de reserpina o limiar de retirada os animais não apresentaram diferença significativa, tendo que alterar o n de animais para poder comprovar o perfil de resposta

Na figura 10B os animais também não apresentaram diferenças significativas nas resposta frente ao teste de nocicepção mecânica.

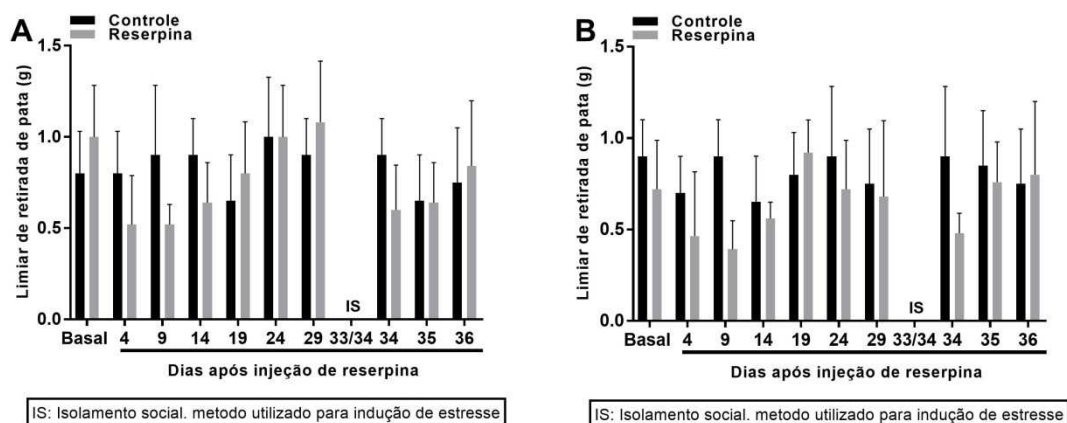


Figura 10: Limiar de retirada da pata esquerda (A) e pata direita (B) (gramas) em diferentes dias após a aplicação de reserpina intradermal de camundongos machos em comparação a animais controle.

5.3.2. Resposta nociceptiva térmica após aplicação de reserpina em camundongos machos.

Na figura 11A foi observado que após a aplicação da reserpina os animais induzidos teve um aumento no tempo de resposta mas não apresentando respostas significativas.

Na figura 11B é apresentado a nocicepção por estímulo frio na pata direita, o perfil não apresentou uma resposta que indicava o esperado.

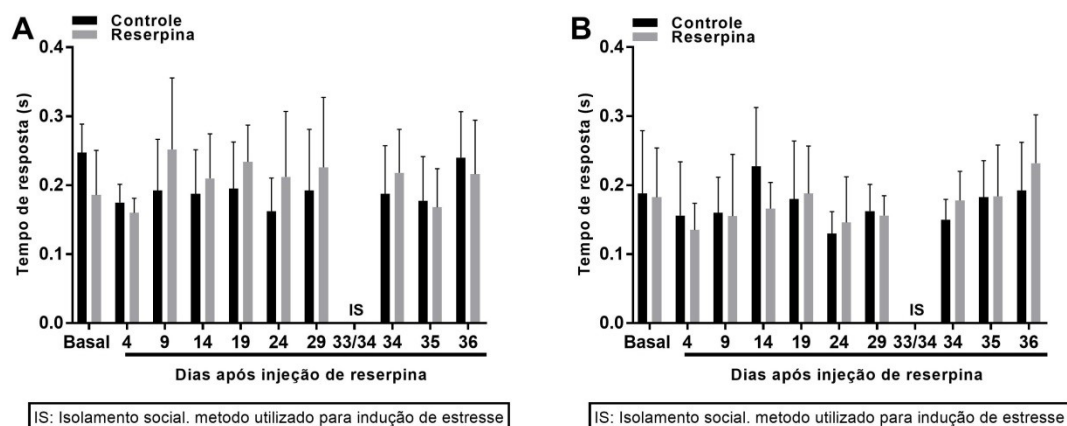


Figura 11: Tempo de resposta em segundos após a aplicação topica de acetona na pata esquerda (A) e pata direita (B), em diferentes dias após a aplicação intradermal de reserpina de camundongos machos em comparação com animais controle.

5.3.3. Resposta ao teste de campo aberto após aplicação de reserpina em camundongos machos.

Na figura 12A podemos observar o numero de rearing, 12B número de Crossing, 12C tempo desprendido no centro, 12D tempo desprendido na periferia, nenhum dos testes apresentou resultados com significância estatística.

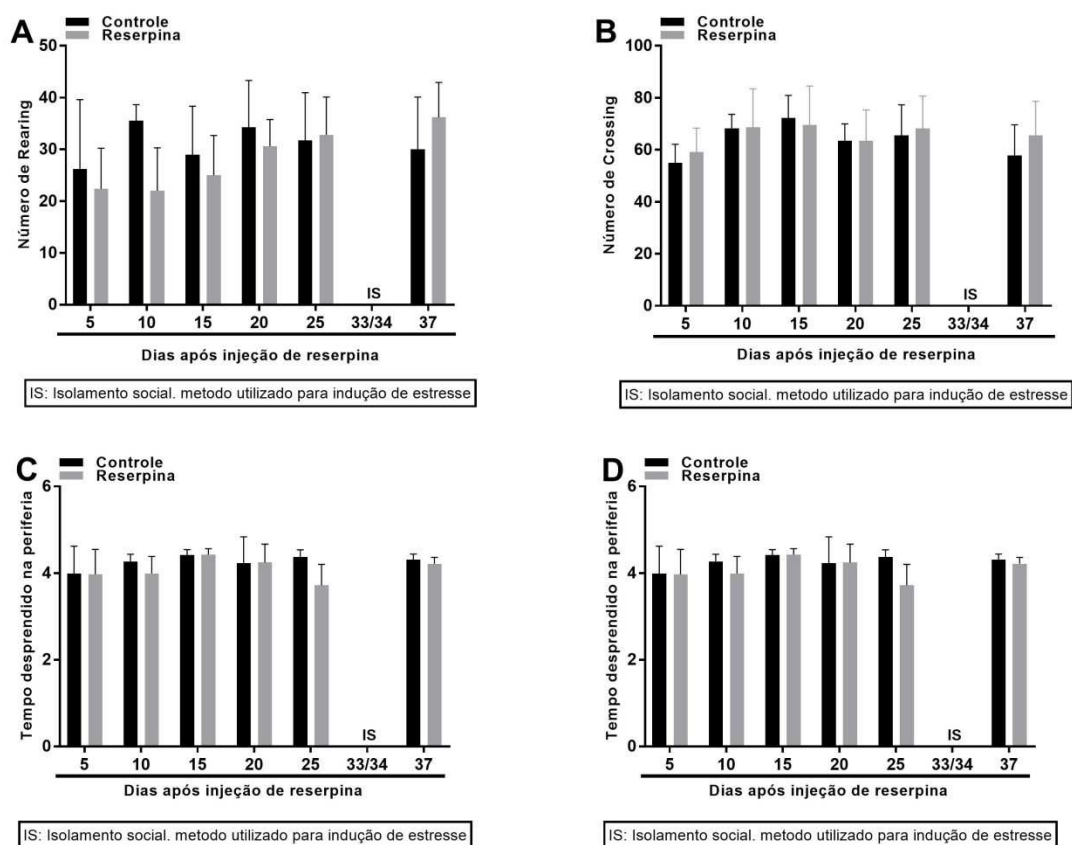


Figura 12: Numero de vezes que o animal fica apoiado nas duas patas traseira (A), numero de vezes que o anima atravessa os quadrantes desenhados no campo aberto (B), tempo desprendido

no centro (C), e tempo desprendido na periferia (D) durante os 5 minutos de teste, em diferentes dias após a aplicação intradermal de reserpina em camundongos machos em comparação com animais controle.

5.3.4. Resposta ao teste de nado forçado após aplicação de reserpina em camundongos machos.

O teste de nado forçado nos camundongos induzidos com reserpina indicado na figura 13 mostra que os animais não apresentaram um resultado esperado, sendo as resposta ao teste sem diferenças significativas.

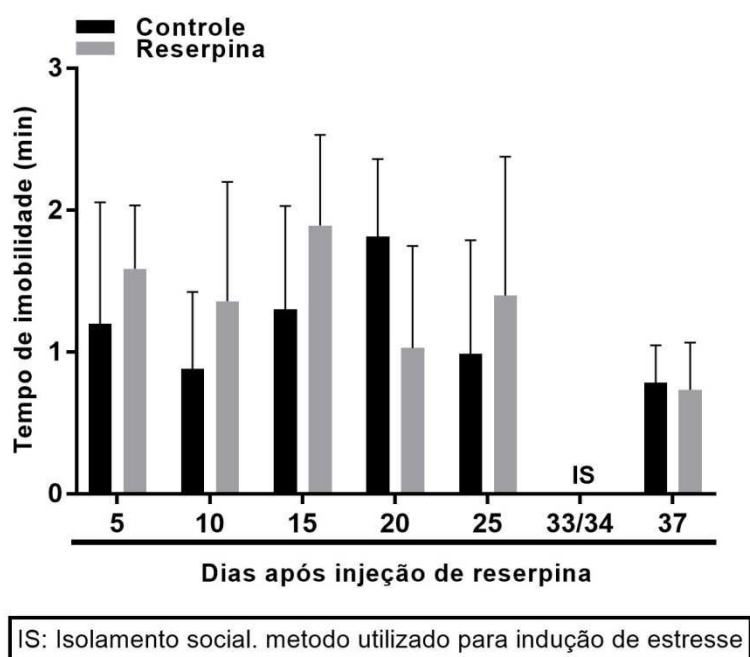


Figura 13: Tempo em minutos em que o camundongo permanece imóvel durante os 4 minutos de teste, descontando 1 minuto de adaptação, em diferentes dias após a aplicação intradermal de reserpina em camundongos machos, em comparação com animais controle.

5.3.5. Resposta ao teste de suspensão de cauda após aplicação de reserpina em camundongos machos.

Na figura 14 observamos que os animais induzidos com a reserpina não apresentara um perfil de resposta com significância estatística.

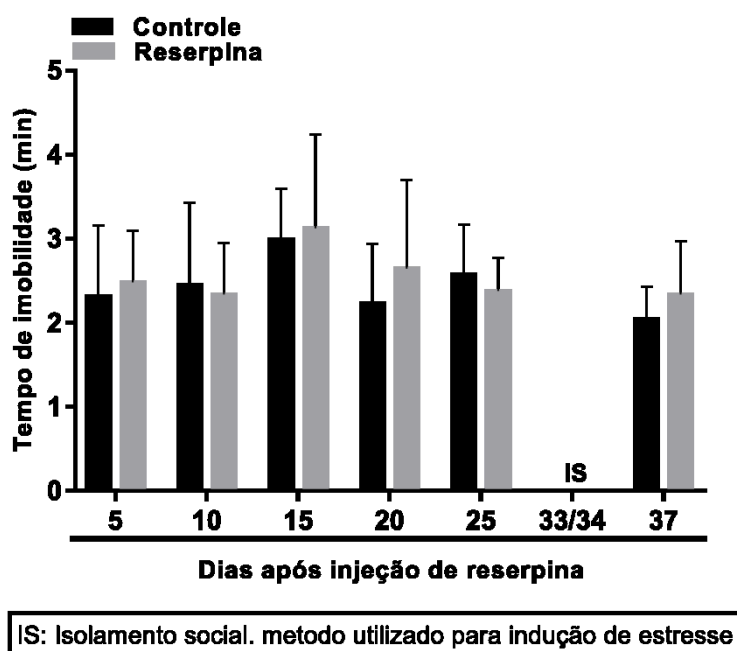


Figura 14: Tempo em que o camundongo permanece imóvel de acordo com os dias após a aplicação intradermal de reserpina em camundongos machos, comparados com animais controle.

6. DISCUSSÃO

A fibromialgia é uma doença que afeta inteiramente a vida social e também econômica dos indivíduos acometidos pela doença, visto que os mesmos apresentam sintomas como distúrbios cognitivos, fadiga, rigidez matinal, distúrbios de sono, além de outras comorbidades como a depressão e ansiedade. Esses sintomas têm grande impacto negativo na qualidade de vida, prejudicando as relações sociais e a vida econômica dos indivíduos (PROVENZA JR et al. 2006). Segundo um estudo feito por BERGER A et al. (2007) nos Estados Unidos, indivíduos com fibromialgia tem um gasto de 3 a 5 vezes maior que indivíduos em situação normal, pois procuram os

serviços médicos e de diagnóstico com mais frequência comparado a indivíduos normais. Segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR), os indivíduos com fibromialgia representam 3% da população brasileira, sendo a segunda doença mais frequente em consultórios de reumatologia (CARMONA L et al. 2001). Devido a incidência da doença na população, e seu impacto socioeconômico, a busca de estudos que venham compreender a etiologia da fibromialgia é de extrema importância, e tais estudos ainda são de difícil desenvolvimento devido a falta de um modelo pré-clínico adequado.

Não há um modelo animal capaz de mimetizar a doença como ocorre em humanos, o que dificulta os estudos etiológicos. Sabe-se que a doença é representada por uma dor generalizada e crônica, acometendo o sistema musculoesquelético, acompanhado de distúrbios funcionais como fadiga, distúrbios de sono, rigidez matinal e etc, além de depressão e ansiedade (WOLFE et al. 1990). Os modelos animais usados na literatura são capazes de mimetizar a dor, entretanto a fibromialgia é uma doença que além da dor apresenta sintomas de ordem funcional. Assim, é necessário um modelo animal que além da dor mimetize as demais características encontradas na doença como ansiedade e depressão, que se apresentem de maneira recorrente, associadas a um gatilho como uma situação de estresse, como evidenciado em humanos.

6.1.1. Resposta nociceptiva em camundongos machos e fêmeas após a aplicação de salina acidificada pH: 4.

De acordo com os dados apresentados nos gráficos na figura 1 A e B, e figura 2 A e B, referentes aos testes de nocicepção mecânica e térmica em camundongos machos, o modelo de fibromialgia induzida pela aplicação de salina acidificada (pH4) no músculo gastrocnêmico direito reproduziu os dados já encontrados na literatura, com

desenvolvimento de dor nos camundongos machos durante 25 dias, quando comparadas com os camundongos controle (LIU Y-T et al. 2014). Com o passar dos dias a queda do limiar de retirada de pata vai diminuindo e os valores retornam ao basal, ou seja, os animais não apresentam mais um quadro doloroso. Pode-se observar que o limiar de retirada de pata é menor na pata direita, que é a pata ipsi-lateral ao local da injeção da salina, em relação às medidas realizadas na pata esquerda. Isto pode se dar em razão do local da injeção, contudo, por se tratar de um modelo de fibromialgia seria mais fidedigno da situação clínica que a dor se manifestasse de mesma forma tanto no lado ipsi, quanto no lado contra-lateral a injeção da salina. Em humanos não há uma lateralização da dor e a dor da fibromialgia é descrita como difusa pelo corpo (SLUKA et al. 2009).

Na figura 6 A e B, e figura 7 A e B, podemos observar que a resposta nociceptiva mecânica e térmica em camundongos fêmeas difere da observada em camundongos machos, e não há diferenças significativas entre o grupo com fibromialgia e o grupo controle. Este dado nos surpreendeu bastante, uma vez que a fibromialgia é uma doença de maior incidência em indivíduos do sexo feminino. Era esperado que pudéssemos observar uma resposta de dor mais pronunciada em camundongos fêmeas. Segundo SLUKA et al. (2003), o modelo de hiperalgesia por aplicação de salina acidificada se desenvolve em camundongos fêmeas similarmente ao desenvolvimento da hiperalgesia em camundongos machos. Após a indução do estresse por isolamento social os camundongos não tiveram uma retomada na dor, como o esperado segundo o ocorrido com indivíduos doentes. Em humanos a doença é acompanhada de características singulares, como a modulação dos sintomas na presença de situações de estresse e ansiedade. como descrito na literatura, estas situações podem causar uma piora nos sintomas da doença (YUNNUS et al. 1981). Como o modelo de estresse por

isolamento social é um tipo de modelo de estresse brando, pode ser que não foi o suficiente para que a resposta nociceptiva voltasse a se manifestar.

6.1.2. Teste do campo aberto em camundongos machos e fêmeas após a aplicação de salina acidificada pH: 4.

Na figura 3 podemos ver os gráficos referentes ao número de *rearing* (número de vezes que o camundongo fica apoiados apenas nas patas traseiras), o número de *crossing* (número de vezes que o camundongo atravessa os quadrantes desenhados no campo aberto), e o número de fezes. Na figura 8 podemos observar o numero de *rearing* (A), *crossing* (B), tempo desprendido na periferia (C), e tempo desprendido no centro (D). As medidas servem para avaliar a capacidade funcional do animal, e assim analisar se o animal desenvolveu características do tipo depressivas ou de ansiedade, apresentadas no comportamento ao decorrer do teste. Um animal com comportamento de ansiedade passa um maior tempo na periferia, tentando se esconder da situação de risco, além de aumentar o numero de *rearing* e de *crossing*. As respostas em machos e em fêmeas não seguiram o descrito na literatura. Podemos perceber na figura 3 A, B e C que o perfil de resposta dos animais em que foi aplicada a injeção de salina acidificada se manteve praticamente igual ao perfil de resposta dos animais controle. Na figura 8 A, B, C, e D os resultados demonstram um mesmo perfil que os animais controle, apresentando pouca diferença com os animais em que foi aplicada a salina acidificada.

Assim, podemos dizer que os animais não sofreram alterações no sistema locomotor a partir da aplicação de salina acidificada pH:4 e responderam ao teste como os animais controle, diferente do esperado, visto que estudos mostraram que a situação de dor em camundongos pode aumentar os comportamentos do tipo ansiedade e depressão (LIU Y, et al. 2014). Em estudos clínicos em humanos foi observado que os

sintomas da doença podem reaparecer ou piorar na presença de situações estressantes (BECKER RMR, et al. 2010), assim após o isolamento social o esperado era um aumento do comportamento do tipo ansiedade, o que não foi visto nos camundongos machos e nem fêmeas.

6.2. Teste do Labirinto em cruz elevado em camundongos machos e fêmeas após a aplicação de salina acidificada pH: 4.

O teste no labirinto em cruz elevada representado na figura 4 apresentam o tempo desprendido no braço fechado (figura 4 A), e o tempo desprendido no braço aberto (figura 4 B). O teste consiste na avaliação de ansiedade nos animais em que foram aplicada a injeção de salina acidificada, comparando-os com os animais controle. Em situações normais os animais apresentam aversão ao braço aberto, desprendendo um maior tempo no braço fechado devido a tendência natural de esquiwa do animal, evitando situações possivelmente perigosas e conflituosas, assim quanto maior tempo desprendido no braço aberto maior é o comportamento do tipo ansiedade nos animais. (LISTER RG, et al. 1987).

Podemos ver na Figura 4 que mesmo que os animais em que foi aplicada a injeção de salina acidificada permaneceram maior tempo no braço aberto comparado ao controle, esses animais também desprenderam um maior tempo no braço fechado, representando a situação de resposta normal, diferente do encontrado na literatura, onde está descrito que após aplicar salina acidificada em ratos que desenvolveram hiperalgesia de longa duração, mimetizando a dor crônica, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado e campo aberto, e observaram que os animais desenvolveram comportamentos do tipo ansiedade (LIU Y-T, et al. 2014).

6.2.1. Teste de suspensão de cauda em camundongos machos e fêmeas após a aplicação de salina acidificada pH: 4.

O teste de suspensão de cauda avalia o comportamento do tipo depressivo nos animais, de acordo com o tempo de imobilidade, que representa o tempo em que o animal desiste de fugir da situação estressante em que se encontra. Podemos observar na figura 5 referente aos camundongos machos que os camundongos em que foi aplicada a injeção de salina acidificada demonstraram comportamento do tipo depressivo a partir do tempo de imobilidade apenas nos dias 10, 20 e 25, não sendo conclusivo, podendo dizer que apesar dos animais terem apresentado um maior tempo de imobilidade, não foi significativo pra dizer que estavam com o comportamento do tipo depressivo. Em um estudo prévio, CRISTIANO R, et al. (2010) observou que animais com hiperalgesia apresentavam um maior tempo de imobilidade, quando comparado com animais tratados com antidepressivos, sugerindo assim que animais com hiperalgesia de longa duração apresenta um quadro do tipo depressivo.

Na figura 9 referente aos camundongos fêmeas observamos que o perfil de respostas dos animais em que foi injetado a salina acidificada e os animais controle foi praticamente igual, também demonstrando que o teste não foi conclusivo para o comportamento do tipo depressivo, nem mesmo após o isolamento social, diferente do encontrado na literatura, onde observaram que o isolamento social aumenta o tempo de imobilidade dos animais (SIEGFRIED B, et al. 1981).

6.2.2. Teste de nado forçado em camundongos fêmeas após a aplicação de salina acidificada pH: 4.

O teste de nado forçado assim como o teste de suspensão de cauda avalia o tempo de imobilidade do animal frente a uma situação estressante. Em condições

normais o animal se movimenta mais a procura de sair da situação, sendo assim a imobilidade do animal um indicativo de comportamento do tipo depressivo. Na figura 10 podemos ver que os animais após a aplicação de salina ficaram um maior tempo imóvel nos primeiros 15 dias caracterizando um comportamento depressivo em relação aos animais controle, e a medida após a indução de estresse (dia 35) apesar de não ser significativa, sugere uma tendência destes animais a voltarem a apresentar um perfil de resposta considerado depressivo em relação aos animais controle. Fato este que esta de acordo com o descrito na literatura, onde no estado de hiperalgesia, ou seja, o período em que o animal está sentindo dor, ele apresenta um maior tempo de imobilidade durante o teste de nado forçado, isso devido ao comportamento do tipo depressivo (SIEGFRIED B, et al. 1981).

6.2.3. Resposta nociceptiva mecânica e térmica em camundongos machos após a aplicação de Reserpina.

O modelo de hiperalgesia pela aplicação intradermal de reserpina já tem seu mecanismo descrito e conhecido na literatura, a depleção de aminas biogênicas é capaz de desenvolver a hiperalgesia muscular, e também depressão, pela depleção das mesmas no sistema nervoso central (NAGAKURA Y et al. 2009). O objetivo de fazer os testes no modelo de fibromialgia induzida por reserpina se deu em razão do modelo com salina acidificada não reproduzir os resultados apresentados na literatura. A nocicepção mecânica no modelo pela aplicação de reserpina seguiu como o indicado na literatura, causando dor com duração média de uma semana (NAGAKURA Y, et al. 2009). Por outro lado, o teste de nocicepção térmica não apresentou diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo em que foi aplicado a reserpina. NAGAKURA Y, et al. (2012) demonstrou que após a aplicação de reserpina, os animais apresentam um

aumento no tempo de resposta com o estímulo frio. Como o principal ponto do trabalho era analisar se após a indução de estresse por isolamento social poderia ocorrer a retomada da dor nos animais, como ocorre em humanos, este modelo se mostrou mais confiável, podendo ser promissor em próximos estudos com modelos animais de fibromialgia.

6.2.4. Teste do campo aberto em camundongos machos após a aplicação de Reserpina.

No teste de campo aberto com os camundongos machos em que foi aplicado reserpina, podemos observar pela figura 12 o número de crossing e rearing, e na figura 12 o tempo desprendido no centro e na periferia, em situações normais o instinto natural do animal é explorativo, sendo assim um indicativo de ansiedade o animal permanecer maior tempo na periferia (RODRIGUES et al. 1996). Segundo testes feitos com ratos e camundongos, após a aplicação de reserpina os animais apresentaram uma queda na resposta cognitiva no teste de campo aberto, o que não foi observado no nosso teste, pois os camundongos mantiveram quase o mesmo perfil que os animais controle, até desprendendo maior tempo no centro do campo aberto, o que é contrario ao perfil de um animal com comportamento do tipo ansiedade.

Estes experimentos foram realizados em um ambiente controlado, e com equipamentos adequados, de maneira mais reprodutível que no primeiro caso, assim, o esperado com o experimento em que foi aplicado a reserpina, era um perfil de resposta em que o animal apresentasse comportamentos do tipo ansiedade. Contudo, quando se trata de testes comportamentais em animal existem diversas variantes que podem influenciar nos resultados, como luminosidade, temperatura, controle sonoro, manuseio, estado do animal e etc.

6.2.5. Teste de suspensão de cauda em camundongos machos após a aplicação Reserpina.

No teste de suspensão de cauda representado na figura 13 referente ao tempo em que o animal fica imóvel, é possível observar que os animais após a aplicação de reserpina apresentou perfil de resposta um pouco maior que os animais controle, mas não foi significativo para dizer que desenvolveram comportamento do tipo depressivo. Usualmente na literatura os testes para o comportamento do tipo depressão apresentam resultados mais robustos, devido ao conhecimento sobre o mecanismo de ação da reserpina, que se dá pela depleção de aminas biogênicas no sistema nervoso central. Assim, no teste de suspensão de cauda era esperada uma maior significância nos resultados, o que não foi observado, podendo ser um indicativo da dificuldade de reprodução de testes comportamentais encontrados na literatura, devido a diversas variantes como, estado do animal, estrutura local, falta de treinamento no manuseio, alterações na droga e etc.

6.2.6. Teste de nado forçado em camundongos machos após a aplicação de Reserpina.

Na figura 14, podemos observar a resposta ao teste de nado forçado, sendo o tempo de imobilidade relacionado com o comportamento do tipo depressivo em animais. Os animais em que foi aplicado a reserpina, não apresentaram um perfil de resposta significativo. Segundo SERRA A B, et al. 2016 após a aplicação de reserpina pode-se observar que em ratos havia um aumento no tempo de imobilidade, caracterizado como comportamento do tipo depressivo. Neste teste observamos que o comportamento depressivo pode ter sido brando, mas presente, não como esperado para o modelo de hiperalgesia pela aplicação de reserpina, visto que na literatura é citado que

a reserpina é capaz de modular negativamente, ou seja, reduzir as aminas biogênicas no sistema nervoso central, assim causando depressão (NAGAKURA Y et al. 2009).

7. CONCLUSÃO

A partir dos dados referentes aos testes de nocicepção térmica e mecânica, juntamente com a avaliação de estresse, depressão e ansiedade, o modelo animal de fibromialgia induzida pela injeção de salina acidificada pH4 no musculo gastrocnêmio de camundongos fêmeas e machos apesar de apresentar o perfil de dor esperado durante os 30 dias de medidas, não foi capaz de apresentar o perfil esperado após a indução de estresse por isolamento social, não validando o modelo aqui sugerido, e não pudemos mimetizar o que ocorre na fibromialgia em humanos. Os resultados referentes aos camundongos machos com fibromialgia induzida pela reserpina, também não apresentaram retomada da dor após a indução de estresse. Novos estudos devem ser realizados para que se continue a busca por um modelo animal com características mais próximas as evidenciadas na doença em humanos, favorecendo um maior poder de translação dos resultados encontrados em camundongos nos estudos clínicos.

8. REFERENCIAS

Ablin J, Fitzcharles MA, Buskila D, et al. Treatment of fibromyalgia syndrome: recommendations of recent evidence-based interdisciplinary guidelines with special emphasis on complementary and alternative therapies. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:485272.

Aley KO, Messing RO, Mochly-Rosen D, Levine JD. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J Neurosci* 20. 2000.

Assumpção A, Cavalcante AB, Capela CE, Sauer JF, Chalot SD, Pereira CA, et al. Prevalence of fibromyalgia in a low socioeconomic status population. *BMC Musculoskelet Disord*. 2009;10:64.

Becker RMR, Silva VK, Machado FS, Santos AF, Meireles DC, Mergener M et al. Interação entre qualidade do meio ambiente, estresse e a variação do gene APOE na determinação da suscetibilidade à fibromialgia. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50(6): 617-30.

Berber, Joana de Souza. Emil Kupek, Emil. Berber, Saulo Caíres. Prevalence of Depression and its Relationship with Quality of Life in Patients with Fibromyalgia Syndrome. *Rev Bras Reumatol*, 2005 v. 45, n. 2, p. 47-54.

Berger A, Dukes E, Martin S, Edelsberg J, Oster G. Characteristics and healthcare costs of patients with fibromyalgia syndrome. *Int J Clin Pract* 2007; 61(9):1498-508.

Bengtsson A, Lars Bodegård, K. G. Henriksson, Jörgen Larsson, Muscle changes in work-related chronic myalgia, *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 1988; 59:5, 552-556.

Bradley LA. Pathophysiology of fibromyalgia. *Am J Med*. 2009;122(12 Suppl):S22-30.

Campos AC, Ortega Z, Palazuelos J, Fogaça MV, Aguiar DC, Díaz-Alonso J, OrtegaGutiérrez S, Vázquez-Villa H, Moreira FA, Guzmán M, Galve-Roperh I,

Guimarães FS. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013. 9:1-13.

Carmona L, Ballina J, Gabriel R, Laffon A, EPISER study group. The Burden of Musculoskeletal Diseases in the General Population of Spain: results from a national survey. *Ann Rheum Dis*, 2001; 60:1040-1045.

Cavalcante AB, Sauer JF, Chalot SD, Assumpção A, Lage LV. The Prevalence of Fibromyalgia: a Literature Review. *Rev Bras Reumatol*, v. 46, n. 1, p. 40-48, 2006.

Dina OA, Levine JD, Green PG: Enhanced cytokine-induced mechanical hyperalgesia in skeletal muscle produced by a novel mechanism in rats exposed to unpredictable sound stress. *Eur J Pain*. 2011, 15: 796-800. 10.1016/j.ejpain.2011.02.005.

Ercolani M, Trombini G, Chatatt R, et al: Fibromyalgia Syndrome: depression and abnormal illness behavior. *Psychoterapy and Psychosomatic* 61: 178-86, 1994.

Gagliese L, Farrel M. The neuralbiology of ageing nociception and pain. *Pain in the older person*. 2003; 25-44.

Gracely RH, Petzke F, Wolf JM, Clauw DJ. Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(5):1333-43.

Gran JT. The epidemiology of chronic generalized musculoskeletal pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003;17(4):547-61.

Green PG, Alvarez P, Gear RW, Mendoza D, Levine JD: Further validation of a model of fibromyalgia syndrome in the rat. *J Pain*. 2011, 12: 811-818. 10.1016/j.jpain.2011.01.006.

Haun MVA, Ferraz MB, Pollak DF: Validação dos critérios do Colégio Americano de Reumatologia (1990) para classificação da fibromialgia em uma população brasileira. *Rev Bras Reumatol* 39: 221-30, 1999.

Hudson J: The Relationship Between Fibromyalgia and Major Depressive Disorder. *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 22: 285-93, 1996.

Jacobson JL, Jacobson AM: *Psychiatric Secrets*. Hanley e Belfus: Philadelphia, 2001.

Kasper, C E, McNulty, A L, Otto A J, Thomas D P. Alterations in skeletal muscle related to impaired physical mobility: An empirical model. *Research in nursing & health*, New York, v. 16, p. 265-273, 1993.

Kashikar-Zuck S, Vaught M, Goldschneider KR, Graham TB, M 1995, JC, et al: Depression, Coping and Functional Disability in Juvenile Primary Fibromyalgia Syndrome. *The Journal of Pain* 3: 412-19, 2002.

Kaplan RM, Schmidt SM, Cronan, Terry A. Quality of well being in patients with fibromyalgia. *Journal of Rheumatology* 2000; 27(3). p.9-785.

Khasar SG, Dina OA, Green PG, Levine JD: Sound stress-induced long-term enhancement of mechanical hyperalgesia in rats is maintained by sympathoadrenal catecholamines. *J Pain*. 2009, 10: 1073-1077. 10.1016/j.jpain.2009.04.005.

Klaumann PR, Wouk AFPF, Sillas T. Patofisiologia da dor. Archives Veterinary Science. 2008; v.13: 1-12.

Larson AA, Kovacs KJ. Nociceptive aspects of fibromyalgia. Curr Pain Headache Rep. 2001;5(4):338-46.

Liu TL, Shao YW, Yen CT, Shaw FZ. Acid-induced hyperalgesia and anxiety-depressive comorbidity in rats. Physiology & Behavior 131 (2014) 105–110.

Lister RG, The Use of Plus-Maze to Measure Anxiety in the Mouse. Psychopharmac (Berl). 1987. 48(4):254-60.

Martinez JE, Ferraz MB, Sato E I, Atra E. Fibromyalgia versus rheumatoid arthritis: a longitudinal comparison of the quality of life. J Rheumatol 22:270- 4, 1995.

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. 2009;146(1-2):26-33.

Nasu T, Taguchi T, Mizumura K: Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. Eur J Pain. 2010, 14: 236-244. 10.1016/j.ejpain.2009.05.009.

Nishiyori M, Uchida H, Nagai J, Araki K, Mukae T, Kishioka S, Ueda H: Permanent relief from intermittent cold stress-induced fibromyalgia-like abnormal pain by repeated intrathecal administration of antidepressants. Mol Pain. 2011, 7: 69-10.1186/1744-8069-7-69.

Ogino S, Nagakura Y, Tsukamoto M, Watabiki T, Ozawa T, Oe T, Shimizu Y, Ito H: Systemic administration of 5-HT(2C) receptor agonists attenuates muscular

hyperalgesia in reserpine-induced myalgia model. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013, 108: 8-15.

Ozgocmen S, Ozyurt H, Sogut S, Akyol O. Current concepts in the pathophysiology of fibromyalgia: the potential role of oxidative stress and nitric oxide. *Rheumatol Int.* 2006;26(7):585- 97.

Pinheiro Fde V, Villarinho JG, Silva CRetall. The involvement of the TRPA1 receptor in a mouse model of sympathetically maintained neuropathic pain.*Eur J Pharmacol.* 2015. 15;747:105-13.

Porsolt, R.D.; Bertin, A.; Jalfre, M. Behavioural despair in mice: A primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de thérapie*, v. 229, p. 327- 336, 1977.

Provenza JR, Paiva E, Heymann RE. Manifestações Clínicas. In: Heymann RE, coordenador. *Fibromialgia e Síndrome Miofascial*. São Paulo: Legnar, 2006, pp. 31-42.

Quintero L, Moreno M, Avila C, Arcaya J, Maixner W, Suarez-Roca H: Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000, 67: 449-458. 10.1016/S0091-3057(00)00374-9.

Russell IJ, Orr MD, Littman B, Vipraio GA, Alboukrek D, Michalek JE, et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum.* 1994;37(11):1593-601.

Santana, Josimari M. Cruz, Kamilla ML. Sluka, Kathleen A. Animal models of fibromyalgia. *Arthritis Research & Therapy.*2013. 15:222.

Santos AM, Burti JS, Lopes JB, Scazufca M, Marques AP, Pereira RM. Prevalence of fibromyalgia and chronic widespread pain in community-dwelling elderly subjects living in Sao Paulo, Brazil. *Maturitas*. 2010;67(3):251-5.

Sharma NK, Ryals JM, Liu H, Liu W, Wright DE: Acidic saline-induced primary and secondary mechanical hyperalgesia in mice. *J Pain*. 2009, 10: 1231-1241. 10.1016/j.jpain.04.014. 2009.

Sluka KA, Kalra A, Moore SA. Analyzing Muscular Pain And The Effects of Exercise on Chronic Pain. *Muscle Nerve*. 2001 ;24(1):37-46.

Sluka KA, Kalra A, Moore SA: Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve*. 2001.

Sluka, Gregory NS, Gibson-Corley K, Frey-Law L. Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: induction and development occur in a sex-dependent manner. *Pain*. 2013.

Suarez-Roca H, Quintero L, Arcaya JL, Maixner W, Rao SG: Stress-induced muscle and cutaneous hyperalgesia: differential effect of milnacipran. *Physiol Behav*. 2006, 88: 82-87. 10.1016/j.physbeh.2006.03.010.

Takatsu-Coleman, Patti, Zanin. Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: Mood-congruent memory in male mice? *J Psychiatry Neurosci* 2013;38(4).

Teixeira J, Figueiró JAB: Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001.

Trindade HI, Batista MCS, Silva LLB. Pain: mechanisms involved in its transmission and treatment resources applied to its inhibition. *Medicina Veterinária*, Recife, v.7, n.4, p.6-18, 2013.

Vargas A, Hernandez-paz R, Sánchez-Huerta JM, Romero-Ramirez R, Amzcua-Guerra L, Kooh M, Nava A, Pineda C, Rodrigues-Leal G, Martínez-Lavín M. Sphygmomanometry-Evoked Allodynia—A Simple Bedside Test Indicative of Fibromyalgia. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology* v 12, N 6. 2006.

White KP, Speenchley M, Harth M, Ostbye T. Comparing self-reported function and work disability in 100 community cases of Fibromyalgia syndrome versus control in London, Ontario. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 76-83.

Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis care & research*. 2010;62(5):600-10.

Wolf F, Ross K, Anderson J, Hebert L. The prevalence and characteristics of Fibromyalgia in the general population. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 19-28.

Wolf F, Smyth HAA, Yunus MB, Bennett AM, Bombardier CE, Goldenberg DL. The american college of rheumatology 1990. Criteria of classification of Fibromyalgia: Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 160-72.

Yokoyama T, Lisi TL, Moore SA, Sluka KA: Muscle fatigue increases the probability of developing hyperalgesia in mice. *J Pain*. 2007, 8: 692-699. 10.1016/j.jpain.2007.05.008.

Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimarães FS, Joca SR. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol*. 2010 ;159(1):122-8.