



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Carlos Pereira Martins

**EFEITO DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES D3/D2 DOPAMINÉRGICOS NO
MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDO PELA RESERPINA
EM CAMUNDONGOS**

Araranguá

2020

Carlos Pereira Martins

**EFEITO DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES D3/D2 DOPAMINÉRGICOS NO
MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDO PELA RESERPINA
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Neurociências da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de Mestre em
Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra.

Araranguá

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martins, Carlos Pereira
EFEITO DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES D3/D2 DOPAMINÉRGICOS
NO MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDO PELA
RESERPINA EM CAMUNDONGOS / Carlos Pereira Martins ;
orientador, Rafael Cypriano Dutra, 2020.
72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Dor . 3. Reserpina. 4. Pramipexol
. 5. Dopamina. I. Dutra, Rafael Cypriano . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Neurociências. III. Título.

Carlos Pereira Martins

**“EFEITO DA ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES D3/D2 DOPAMINÉRGICOS NO
MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDO PELA RESERPINA
EM CAMUNDONGOS”**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Rafael Cypriano Dutra, Dr.
Orientador – UFSC

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.
Membro Titular Interno – UFSC

Prof. Francisney Pinto do Nascimento, Dr.
Membro Titular Externo – UNILA

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Neurociências - UFSC

Prof. Rafael Cypriano Dutra, Dr.
Orientador - UFSC

Araranguá, 2020.

Este trabalho é dedicado aos meus colegas da Pós-Graduação em Neurociências e a toda minha família, em especial aos meus queridos pais Carlone e Eusébia.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelos ensinamentos e oportunidades a mim ofertados.

Agradecimento aos animais que foram utilizados nos experimentos. Sem esse propósito não teríamos avanços tão significativos no âmbito das ciências e proporcionar tratamentos inovadores para diferentes doenças. Suas vidas foram e são muito importantes para o desenvolvimento da humanidade.

Agradecimento ao Laboratório de Autoimunidade e Imunofarmacologia (LAIF) pela oportunidade e apoio no desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradecimento a CAPES, pelo apoio financeiro recebido.

Agradecimento aos colegas de laboratório pelo apoio ofertado durante minha trajetória enquanto acadêmico de mestrado. Obrigado!

Agradecimento a Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), pelo apoio na realização das análises moleculares e bioquímicas.

Agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra pelo auxílio, dedicação, e atenção em toda minha caminhada até aqui, com certeza com ele adquiri conhecimentos além da vida acadêmica.

Agradeço a minha família pelo apoio e amor incondicional de sempre. Pai (Carlone Santos Martins), mãe (Eusébia Pereira Martins), sobrinhos, cunhadas e irmãos, especialmente, meu irmão Carlone Santos Martins Filho (*in memoriam*).

E agradeço a Deus sobre todas as coisas!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Introdução: A fibromialgia (FM) é um distúrbio musculoesquelético complexo caracterizado por dor crônica generalizada acompanhada de sintomas somáticos e emocionais, incluindo distúrbios do sono, fadiga, ansiedade e depressão. Embora a etiologia da FM ainda seja desconhecida, a diminuição significativa das aminas biogênicas, ou seja, dopamina, norepinefrina e serotonina são características comuns em sua patogênese. Evidências anteriores sugerem que a dopamina está profundamente envolvida no controle da dor. Além disso, as terapias farmacológicas atuais têm um papel limitado e os benefícios clínicos não são satisfatórios, portanto, a modulação do sistema inibitório descendente pode produzir efeito analgésico durante a progressão da FM. **Objetivo:** O presente estudo objetivou investigar o efeito antinociceptivo do pramipexol (PPX) – agonista do receptor D3/D2 dopaminérgico – no modelo experimental de FM induzido por reserpina em camundongos. **Métodos:** O modelo experimental de FM foi induzido por injeção subcutânea (s.c.) de reserpina (0,25 mg/kg) uma vez ao dia por 3 dias consecutivos em camundongos *Swiss* fêmeas. Os animais foram tratados com PPX (0,1, 1 e 5 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia, do dia 4 ao dia 14 (tratamento terapêutico) ou com 1 mg/kg do dia 0 ao dia 4 (tratamento preditivo). Posteriormente, os animais foram eutanasiados, e os tecidos cerebrais (córtex pré-frontal e medula espinhal) foram coletados para análises bioquímicas e moleculares. **Resultados:** O tratamento terapêutico com PPX inibiu significativamente a alodínia mecânica e sensibilidade térmica induzida pela reserpina. Relevantemente, o PPX reduziu o tempo de imobilidade no teste de nado forçado e aumentou o número de *grooming* (comportamento de autolimpeza) no teste de borrifagem de solução de sacarose, respectivamente. No teste de labirinto em cruz elevado, os animais que receberam PPX 1 mg/kg permaneceram maior tempo nos braços abertos, em comparação com o grupo reserpina. A administração repetida de PPX (1 mg/kg, i.p), administrada diariamente, durante 4 dias, bloqueou significativamente a alodínia mecânica induzida pela reserpina, com inibição semelhante àquela observada nos animais tratados com pregabalina (30 mg/kg, v.o), usada como controle positivo, muito embora não tenha alterado significativamente a nocicepção térmica induzida por reserpina. Ainda, foi possível observar que o tratamento com PPX reestabeleceu os níveis diminuídos de dopamina na medula espinhal e córtex pré-frontal quando comparado aos animais controles não tratados. **Conclusão:** Em conjunto, os resultados do presente trabalho demonstram que o agonista preferencial do receptor D3/D2 reduziu os sintomas clínicos induzidos pelo modelo experimental de FM, incluindo a hiperalgesia, comportamento tipo depressivo e ansiogênico. O efeito do PPX ocorreu, em parte, pelo restabelecimento dos níveis das monoaminas, particularmente dopamina, na região infraespinhal.

Palavras chaves: dor; reserpina; pramipexol; dopamina.

ABSTRACT

Introduction: Fibromyalgia (FM) is a complex musculoskeletal disorder characterized by widespread chronic pain accompanied by somatic and emotional symptoms, including sleep disorders, fatigue, anxiety and depression. Although the etiology of FM is still unknown, significant decrease in biogenic amines, i.e., dopamine, norepinephrine, and serotonin are common characteristics in its pathogenesis. Previous evidence suggests that dopamine is deeply involved in pain control. Moreover, current pharmacological therapies have a limited role and proper clinical benefits are far from satisfactory, thus modulation of descending inhibitory system may produce analgesic effect during FM progression. **Aim:** The present study investigated the antinociceptive effect of pramipexole (PPX) – dopaminergic D3/D2 receptor agonist – in the reserpine-induced experimental FM model in mice. **Methods:** FM model was induced with a subcutaneous (s.c.) injection of reserpine (0.25 mg/kg) once daily for 3 consecutive days in female Swiss mice. Animals were treated with PPX (0.1, 1 and 5 mg/kg, i.p.), once a day, from day 4 to day 14 (therapeutic treatment) or with 1 mg/kg from day 0 to day 4 (predictive treatment). Subsequently, the animals were euthanized, and brain tissues (prefrontal cortex and spinal cord) were collected for biochemical and molecular analyzes. **Results:** Therapeutic treatment with PPX inhibited reserpine-induced mechanical allodynia and thermal sensitivity. Relevantly, PPX treatment decreased immobility time and increased number of grooming (self-cleaning behavior) in the forced swimming test and splash test, respectively. In the elevated plus-maze test, animals that received PPX 1 mg/kg remained longer in the open arms, as compared to the reserpine group. The repeated PPX administration (1 mg/kg, i.p.), given daily, during 4 days, significantly blocked the mechanical allodynia induced by reserpine, similarly to pregabalin (30 mg/kg, p.o.) used as positive control, although it failed to significantly affect the reserpine-induced thermal nociception. Still, it was possible to observe that the treatment with PPX reestablished dopamine levels in the spinal cord and prefrontal cortex. **Conclusion:** Altogether, the results of the present study demonstrated that the preferential agonist of the D3/D2 receptor reduced the clinical symptoms induced by the experimental model of FM, including hyperalgesia, depressive and anxiogenic behavior. The effect of PPX occurred, in part, by the increase in the levels of monoamines, particularly dopamine, in the infraspinal region.

Keywords: pain; reserpine; pramipexole; dopamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação da dor de acordo com sua etiologia.....	16
Figura 2. Mecanismo nociceptivo da dor.....	18
Figura 3. Desenvolvimento cronológico da FM.....	20
Figura 4. Pontos anatômicos sensíveis a dígito-pressão.....	21
Figura 5. Vias nociceptivas e alterações dos neurotransmissores na FM.....	27
Figura 6: Receptores dopaminérgicos acoplados a proteína G.....	32
Figura 7. Desenho da sequência experimental – Protocolo I.....	39
Figura 8. Desenho da sequência experimental – Protocolo II.....	40
Figura 9. Efeito antinociceptivo do PPX na alodínia mecânica no modelo experimental de FM induzido por reserpina.....	45
Figura 10. Efeito antinociceptivo do PPX na sensibilidade térmica no modelo experimental de FM induzido por reserpina.....	46
Figura 11. Efeito do tratamento com PPX no comportamento tipo-depressivo induzido por reserpina.....	47
Figura 12. Efeito do tratamento com PPX em animais induzidos ao modelo experimental de FM por reserpina no teste de Borrifagem de solução de sacarose.....	48
Figura 13. Efeito do tratamento com PPX no teste de labirinto em cruz elevado em animais induzidos ao modelo experimental de FM por reserpina.....	49
Figura 14. Efeito do tratamento com PPX no comportamento motor após a administração da reserpina.....	50
Figura 15. Avaliação da massa corporal dos animais.....	51
Figura 16. Efeito antinociceptivo do PPX na hiperalgesia mecânica no modelo experimental de FM induzido por reserpina.....	52
Figura 17. Efeito antinociceptivo do PPX na sensibilidade térmica no modelo experimental de FM induzido por reserpina.....	53
Figura 18. Avaliação da massa corporal dos animais induzidos a FM por reserpina.....	54
Figura 19: Níveis de DA no córtex pré-frontal e medula espinhal dos animais induzidos ao modelo experimental de FM.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Critérios diagnóstico da FM.....	22
Quadro 2. Tratamentos farmacológicos e não farmacológicos dos sintomas da FM.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A- δ - Fibras a-delta

β arr₂ - β -arrestina₂

μ - receptor mu opióide

ACR - Colégio Americano de Reumatologia (da sigla em inglês, *American College of Rheumatology*)

AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina (da sigla em inglês, *Cyclic Adenosine Monophosphate*)

ANOVA - Análise de variância

ATP - Trifosfato de adenosina

BK - Bradicinina

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (da sigla em inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*)

CEUA - Comitê de ética para uso de animais

CID 10 - Classificação Internacional de Doenças

CIND - Controle inibitório nocivo difuso

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DA - Dopamina

DP - Doença de Parkinson

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ESS - Escala de Severidade dos Sintomas

FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos (da sigla em inglês, *Food and Drug Administration*)

FM - Fibromialgia

GABA - Ácido gama butírico

Gi - Proteína G inibidora

Gs - Proteínas G estimulatória

GSH - Glutationa reduzida

GSSG - Glutationa oxidada (forma dimerizada da GSH)

H - Hidrogênio

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HIST - Histamina

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor (da sigla em inglês *International Association for the Study of Pain*)

IDG - Índice de dor generalizada

i.p - Via intraperitoneal

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LFESSQ - Questionário de triagem do estudo epidemiológico de Fibromialgia de Londres (da sigla em inglês, *London Fibromyalgia Epidemiological Study Screening Questionnaire*)

NA - Noradrenalina

NE - Norepinefrina

PBS - Tampão fosfato-salino (da sigla em inglês, *phosphate buffered saline*)

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil (da sigla em inglês, *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PPX - Pramipexol

SNC - Sistema nervoso central

SP - Substância P

TNF - Teste do nado forçado

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

USA - Estados Unidos da América (da sigla em inglês, *United States of America*)

v.o - Via oral

5-HT - Serotonina

5HT3 - Receptor serotoninérgico

6-OHDA - 6- hidroxidopamina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Dor e nocicepção	15
1.2	Fibromialgia.....	19
1.3	Epidemiologia.....	20
1.4	Diagnóstico	21
1.5	Tratamento	23
1.6	Hipóteses fisiopatológicas	24
1.7	Sensibilização central	25
1.8	Sistema dopaminérgico.....	30
1.9	Pramipexol.....	34
2.	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo Geral	36
2.2	Objetivos específicos.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Animais.....	37
3.2	Modelo experimental de FM	37
3.3	Agentes farmacológicos e reagentes.....	38
3.4	Protocolo de tratamentos	38
3.5	Protocolos experimentais.....	38
3.5.2	Sequência experimental.....	39
3.6	Protocolos comportamentais.....	41
3.6.1	Teste de campo aberto	42
3.6.2	Dor térmica ao calor	42
3.6.3	Hipersensibilidade mecânica (<i>von Frey</i>)	42
3.6.4	Teste do nado forçado.....	43

3.6.5	Teste de borrifagem de solução de sacarose.....	43
3.7	Análises bioquímicas	44
3.8	Análises estatísticas	45
4.	RESULTADOS	45
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

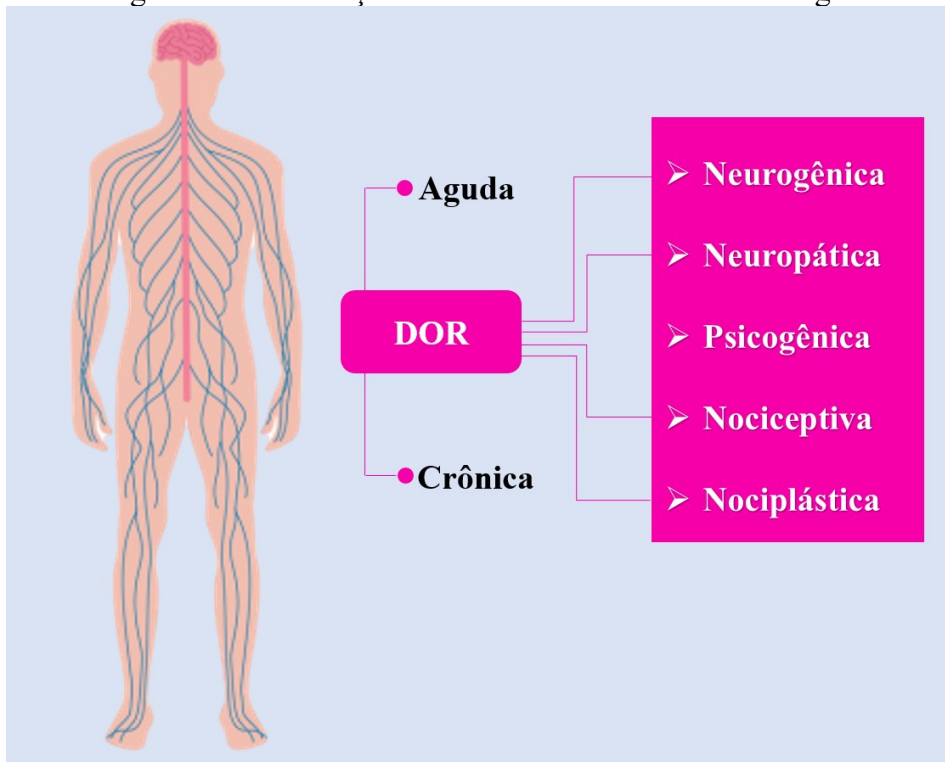
A sensação da dor tem papel fisiológico importante, pois alerta para potenciais ameaças a integridade física do organismo, em vista disso, a ocorrência de dor atualmente se refere a novos hábitos de vida, associado à redução da tolerância ao sofrimento e ao aumento da expectativa de vida do homem moderno (LUIZ, 2007; DELLAROZA et al., 2008).

Nesta perspectiva, a definição atual de dor, publicada em 2020 pela Associação Internacional para Estudos da Dor (da sigla em inglês *International Association for the Study of Pain*, IASP) é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a, dano real ou potencial ao tecido...”. Considerando este conceito, fica evidente, portanto, que a dor não é excepcionalmente uma percepção desagradável, mas representa importante mecanismo para a percepção e manutenção da sobrevivência humana (YANG et al., 2020).

Por conseguinte, Silva e colaboradores (2013) destacam que a dor pode ser classificada de acordo com o tipo de lesão e com os mediadores envolvidos, recebendo as seguintes denominações: neurogênica, quando ocorre lesão do tecido neuronal; neuropática, quando ocorre a disfunção de um nervo; psicogênica, que ocorre por fatores psicológicos; e nociceptiva, quando ocorre por estimulação excessiva dos nociceptores. Os mesmos autores complementam que a dor pode ser de caráter agudo ou crônico, na qual a dor aguda corresponde à ativação local de nociceptores induzida por dano tecidual podendo desaparecer até mesmo antes do restabelecimento do tecido lesado. Em contrapartida, a dor crônica é provocada por uma lesão tecidual ou doença que se caracteriza pela sua longa duração, podendo ultrapassar o tempo de recuperação do organismo, sendo importante fator de incapacidade e sofrimento (SILVA et al., 2013).

Em 2016, a IASP aprovou o novo descritor mecanicista da dor, a então redefinida dor “nociplástica” – caracterizada por nocicepção alterada na ausência de evidências claras de dano ou lesão tecidual ou de doença, a qual afeta o sistema somatossensorial (BRAVO et al., 2019) – Figura 1.

Figura 1. Classificação da dor de acordo com sua etiologia.



Fonte: Adaptação de BRAVO et al (2019).

A figura 1 ilustra a classificação da dor de acordo com sua duração: dor aguda – corresponde à ativação local de nociceptores induzida por dano tecidual; dor crônica – provocada por uma lesão tecidual ou doença, geralmente ultrapassa o tempo de recuperação do organismo. Além disso, a figura ilustra ainda, a classificação da dor de acordo com sua etiologia: (i) nociceptiva, causada por lesão ou potencial dano tecidual que estimula diretamente as fibras C e A δ (dor somática e visceral); (ii) inflamatória causada por processo inflamatório (por exemplo, osteoartrite); (iii) neuropática causada por uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial (por exemplo, neuropatia diabética, lesão pós-herpética); (iv) nociplástica, que é caracterizada por nocicepção alterada na ausência de evidências claras de dano ou lesão tecidual ou de doença que afeta o sistema somatossensorial (por exemplo, a fibromialgia).

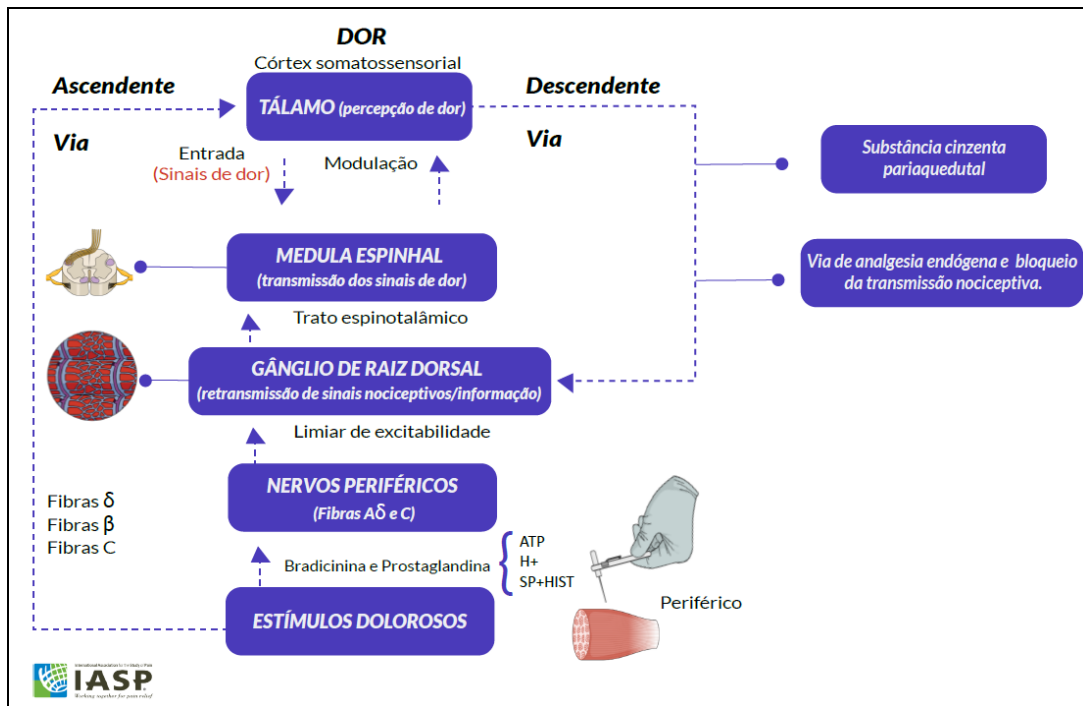
Neste sentido, sabe-se que diferentes moléculas e seus receptores estão envolvidos na nocicepção e na dor. Assim sendo, é importante ressaltar que a nocicepção, em contraste com a dor, não é um sentimento subjetivo, mas a codificação e processamento fisiológicos dos estímulos nociceptivos. Tanto a dor quanto a nocicepção podem existir sem o outro (LEDOWSKI, 2019). Walters e Williams (2019) afirmam que, enquanto a nocicepção é distinta da experiência da dor, fica claro que a atividade nas vias nociceptivas geralmente gera dor, e que a atividade nociceptiva aumentada também aumenta a dor (WALTERS; WILLIAMS, 2019). A dor é primeiramente reconhecida pelos nociceptores periféricos. Esses são ativados por uma variedade de mediadores álgicos e hiperalgésicos, estimulando os nervos aferentes sensoriais A δ e C. Posteriormente, a informação sensorial é transmitida da

periferia para o corno dorsal da medula espinhal, sendo modulada por neurotransmissores endógenos (β -endorfina e meta-enkefalina), desempenhando importante papel no comportamento defensivo (BÁN et al., 2020). Na percepção da dor, os neurônios aferentes primários podem ser envolvidos por fibras intensamente mielinizadas, de maior diâmetro (10 μm) e que apresentam maior velocidade de condução (30-100 m/s), caracterizadas como fibras A β . Entretanto, a maioria dos nociceptores está incluso nas fibras de pequeno (0,4-1,2 μm) e médio diâmetro (2-6 μm), que constituem respectivamente as fibras C, não mielinizadas, e as fibras A δ , pouco mielinizadas e associadas a estímulos mecânicos e térmicos (SILVA et al., 2013).

Considerando o envolvimento de diferentes vias de sinalização no processo da dor, Julius e Basbaum (2001), descreveram que os nociceptores podem ser ativados por estresse mecânico resultante de pressão direta, deformação tecidual ou alterações na osmolaridade, permitindo a detecção de toque, pressão profunda, distensão de um órgão visceral, destruição óssea ou edema. Assim, os nociceptores não apenas sinalizam dor aguda, mas também contribuem para condições de dor persistente e patológica (alodínia) que ocorrem no cenário da lesão, em que a dor é produzida por estímulos inócuos. No mesmo estudo, os autores afirmam que a ativação do nociceptor não apenas transmite estímulos aferentes para o corno dorsal da medula espinhal (e de lá para o cérebro), mas também inicia o processo de inflamação neurogênica (JULIUS; BASBAUM, 2001). Além disso, os neurônios do corno dorsal, por sua vez, projetam seus axônios e transmitem a informação nociceptiva para os centros encefálicos, incluindo a formação reticular, hipotálamo e tálamo que através de neurônios terciários, enviam o sinal ao córtex somatossensorial, particularmente a área 3b de Brodmann no lobo parietal (LUIZ, 2007).

Nesse contexto, o manejo inadequado da dor nociceptiva tem importantes consequências fisiológicas, econômicas e de qualidade de vida, bem como, a possível progressão para a dor crônica. Estímulos nocivos contínuos não resolvidos favorecem a sensibilização periférica e central que iniciam a transformação em dor persistente e crônica (BARAKAT et al., 2018) – Figura 2.

Figura 2: Mecanismo nociceptivo da dor.



Fonte: Adaptado de YAO et al (2019).

A figura 2 representa o mecanismo fisiopatológico da dor. Após a lesão ou estímulo nocivo, substâncias algogênicas, incluindo peptídeos (bradicinina), lipídios (prostaglandinas), neurotransmissores (5-HT), ATP e neurotrofinas (NGF) são liberados. Essas substâncias ativam os nervos periféricos através de fibras Aδ e C. Esses fatores sensibilizam ou excitam terminais do nociceptor, interagindo com os receptores de sinais nociceptivos (gânglio da raiz dorsal). A ativação do nociceptor transmite mensagens aferentes para o corno dorsal da medula espinhal (e, posteriormente ao tálamo), o que resulta na percepção de dor no córtex somatossensorial.

Kamber (2020) descreve que as terminações nervosas livres na pele ou outros tecidos são equipadas com diferentes receptores e canais iônicos para traduzir estímulos nocivos (como temperatura ou pressão) em sinais eletroquímicos. O autor destaca ainda que esses sinais são transmitidos para o corno dorsal da medula espinhal, onde o segundo neurônio é ativado por meio de aminoácidos excitatórios (como o glutamato) e outras substâncias, um processo que é modulado por interneurônios inibitórios. Este segundo neurônio se projeta para localizações cerebrais, principalmente para o tálamo, mas também para o hipotálamo e a amígdala, onde a reação emocional e vegetativa geralmente rápida é gerada. O neurônio de terceira ordem termina no córtex somatossensorial e é inserido em uma rede complexa, a chamada “matriz da dor”. As áreas envolvidas são, por exemplo, o córtex pré-frontal, onde ocorre a tomada de decisões, e as estruturas límbicas, onde ocorrem a memória da dor e os processos de aprendizagem. As projeções descendentes do *locus coeruleus*, dos núcleos da rafe e da medula oblonga rostroventral até a medula espinhal podem facilitar ou inibir a

informação nociceptiva (KAMBER, 2020). A lesão resulta na liberação de mediadores inflamatórios (sopa inflamatória) que potencializam a secreção do nociceptor produzida diretamente pela lesão. O aumento da atividade nos neurônios sensoriais resulta em níveis aumentados de peptídeo (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, substância P, BDNF) no gânglio da raiz dorsal e subsequente liberação destes na medula espinhal e no tecido lesado – Figura 2 (MENDELL, 2011).

De acordo com Nucci (2014) o mecanismo descendente pode modular (aumentando ou diminuindo) a nocicepção por interação com diferentes elementos neuronais no corno posterior, tais como os próprios terminais das fibras aferentes primárias, neurônios de projeção, interneurônios excitatórios ou inibitórios e terminais de outras vias descendentes. Para os autores, o mecanismo descendente inibitório depende do envolvimento de outros neurotransmissores, e dentre as principais vias de controle da dor destacam-se as vias noradrenérgica, serotoninérgica, dopaminérgica, opióideérgica, canabinoideérgica e adenosinérgica, sendo que um mesmo neurotransmissor pode exercer tanto ações inibitórias quanto estimulatórias, dependendo do local de liberação e do tipo de interação com os receptores correspondentes (NUCCI, 2014). Diferentes receptores presentes na medula espinhal parecem exercer diferentes funções no controle da nocicepção. Neste sentido, grande parte da ativação das fibras nociceptivas se dá por receptores específicos acoplados à cascata de segundos mensageiros intracelulares e canais iônicos, os quais se pode destacar o receptor vanilóide, tal como o receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1 (TRPV1), expresso por um subgrupo de neurônios periféricos, tornando-os sensíveis a diferentes estímulos dolorosos (LUIZ, 2007).

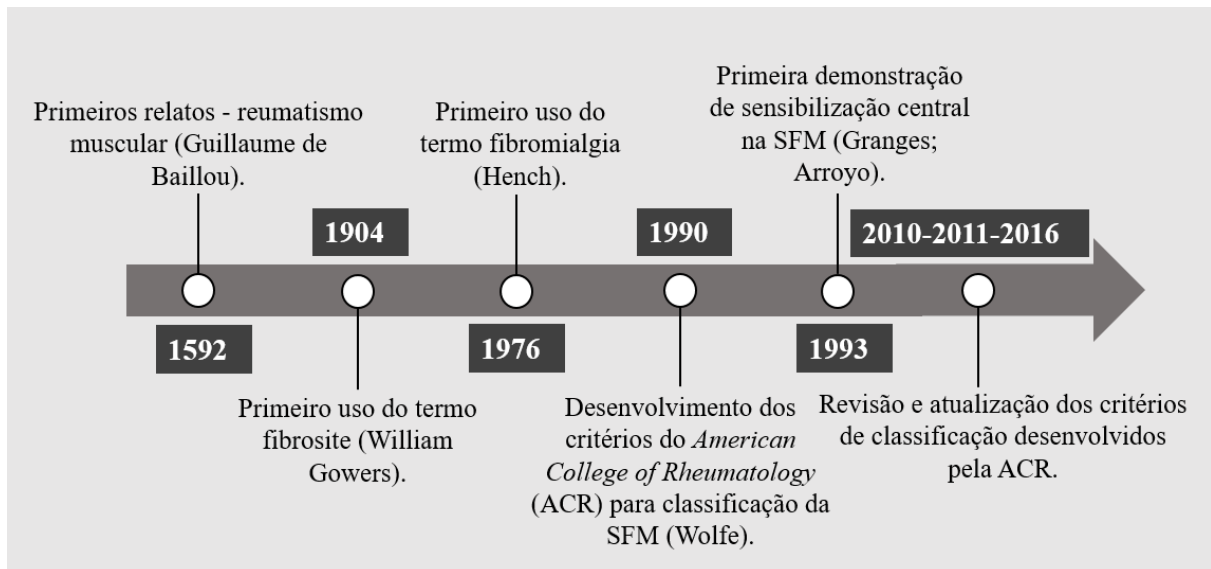
1.2 FIBROMIALGIA

A fibromialgia (FM) é uma síndrome musculoesquelética caracterizada por dor crônica generalizada e, frequentemente, associada a distúrbios do sono, fadiga, ansiedade e/ou depressão, sensibilidade à palpação, rigidez articular, distúrbios cognitivos, parestesias e síndrome do intestino e bexiga irritável (KAUR et al., 2019).

Rodríguez e Mendoza (2020) afirmam que a doença foi originalmente descrita por William Balfour como fibrosite em 1815. No ano de 1950, Graham apresentou o conceito de síndrome dolorosa, uma vez que esta patologia não apresentava uma doença orgânica de base para gerar o quadro algico. O termo “fibromialgia” foi usado pela primeira vez por Hench em

1976, porque não havia evidência de inflamação, e o termo é derivado do latim *fibro* (tecido fibroso, presente em ligamentos, tendões e fâscias), e das palavras gregas *mio* (tecido muscular), *algos* (dor) e *ia* (condição). Além disso, na mesma década, pesquisadores identificaram os *tender points* (pontos gatilhos) característicos da doença. Os critérios de classificação do ACR (do inglês, *American College of Rheumatology*) foram desenvolvidos em 1990, revisados em 2010 e atualizados em 2011 e 2016. Seu código de acordo com a Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID 10) é o M79,7 (INANICI; YUNUS, 2004; BELLATO et al., 2012; CLAUW et al., 2017; BEPLER, 2018; RODRÍGUEZ; MENDOZA, 2020). O desenvolvimento cronológico, com os principais acontecimentos e achados relacionados à FM encontram-se ilustrados na Figura 3.

Figura 3: Desenvolvimento cronológico da FM.



Fonte: Adaptado de CLAUW et al (2017) e WOLFE et al (2016).

A figura 3 destaca de forma cronológica os principais acontecimentos referentes à FM, desde sua primeira descrição até a última atualização realizada pela ACR.

1.3 EPIDEMIOLOGIA

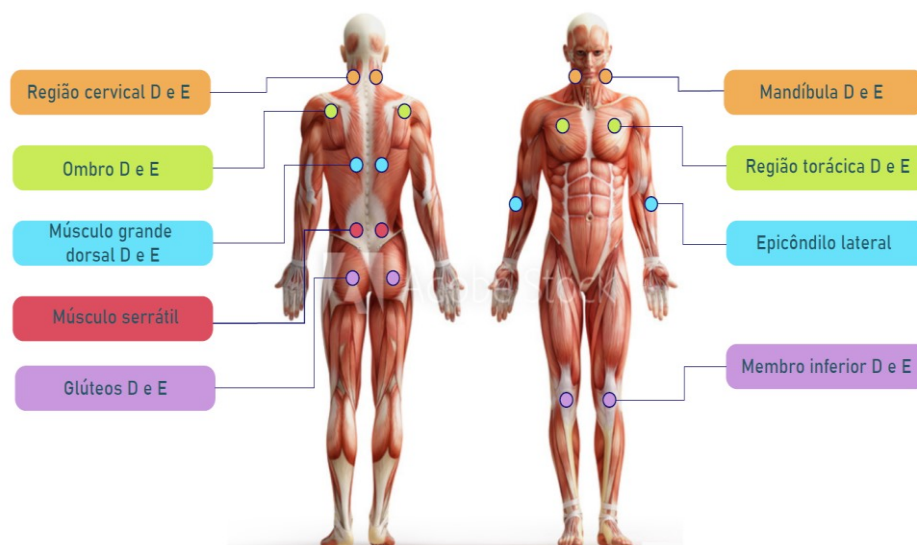
Estudos recentes indicam que a FM acomete 2 a 22% da população em geral, predominantemente mulheres (KAUR et al., 2019). Ainda, Andrade (2009) destacam que no Brasil, a prevalência da doença varia entre 2,5 a 4,4% da população, sendo a segunda maior causa de doença reumatológica depois da osteoartrose (ANDRADE, 2009). A FM afeta cerca de 5 milhões de adultos nos Estados Unidos, tendo como característica, a presença de dor

generalizada no corpo em pelo menos 11 dos 18 possíveis pontos dolorosos à palpação digital (*tender points*) (BELLATO et al., 2012). No Brasil, esses critérios foram validados em 1998, após estudo realizado pela Universidade Federal de São Paulo, o qual demonstrou semelhança com os resultados obtidos pela ACR, validando a utilização desses em pacientes da população brasileira (ANDRADE, 2009).

1.4 DIAGNÓSTICO

Kia e Choy enfatizam que, apesar das descobertas recentes, ainda não há testes bioquímicos de diagnósticos objetivos específicos para a FM. O diagnóstico geralmente é conduzido pela exclusão de outras condições, como síndromes neurológicas e depressão. Outros critérios clínicos são estabelecidos pela ACR, como a dor corporal generalizada, por exemplo, definida como a dor que afeta os dois lados do corpo acima e abaixo da cintura por pelo menos três meses, além de sensibilidade em pelo menos 11 dos 18 pontos sensíveis (Figura 4) (KIA; CHOY, 2017). Ainda nesse contexto, para o diagnóstico são observados os seguintes pontos dolorosos: mandíbula direita e esquerda, pescoço, ombro direito e esquerdo, braço direito e esquerdo, braço inferior direito e esquerdo, região mamilar direita e esquerda, abdômen, quadril ou nádegas direita e esquerda, parte superior das costas, pernas – região superior e inferior direita e esquerda, e pernas inferior direita e esquerda (SILVERMAN et al., 2010).

Figura 4: Pontos anatômicos sensíveis a dígito-pressão.



Fonte: Adaptado de HÄUSER et al (2015) e DUQUE; FRICCHIONE (2019).

A figura 4 ilustra a localização dos 18 possíveis pontos sensíveis à dor utilizado na FM. Durante a avaliação é necessário que o paciente apresente pelo menos 11 dos 18 pontos propostos. D: direito; E: esquerdo.

Curiosamente, duas décadas após a criação dessa ferramenta diagnóstica desenvolvida pela ACR (*tender points*), os critérios foram reavaliados e atualizados em 2010, 2011 e 2016 (RODRÍGUEZ; MENDOZA, 2020). Essa revisão introduziu “critérios de dor generalizada”, definidos como presença de dor em 4 das 5 possíveis regiões corporais dolorosas, o que permitiu a exclusão das síndromes regionais de dor do diagnóstico de FM sem perder a precisão diagnóstica dos critérios estabelecidos (ATZENI et al., 2019). Portanto, a escala incluindo a gravidade dos sintomas foi desenvolvida. Esses sintomas afetam a qualidade de vida do paciente e, em última análise, limitam sua vida diária. Entretanto, para se enquadrarem nos critérios de diagnóstico de FM, as três condições a seguir deverão ser reconhecidas e detectadas (WOLFE et al., 2016).

1. Índice de dor generalizada (WPI) ≥ 7 e escore de gravidade dos sintomas (SS) ≥ 5 ou WPI de 4-6 e escore SS ≥ 9 .
2. A dor generalizada, definida como dor em pelo menos 4 das 5 regiões, deve estar presente. A dor na mandíbula, tórax e dor abdominal não estão incluídas na definição de dor generalizada.
3. Os sintomas geralmente estão presentes há pelo menos três meses.

Quadro 1. Critérios diagnóstico da FM.

Índice de dor generalizada (WPI)
Número de áreas nas quais o paciente apresentou dor na última semana. Em quantas áreas o paciente apresentou dor? (Faixa de pontuação de 0 a 19)
Região 1 (região superior esquerda) - mandíbula esquerda, região escapular esquerda, braço superior esquerdo, braço inferior esquerdo.
Região 2 (região superior direita) - mandíbula direita, região escapular direita, braço superior direito, braço inferior direito.
Região 3 (região inferior esquerda) - quadril esquerdo (nádega, trocânter), perna esquerda superior, perna esquerda inferior.
Região 4 (região inferior direita) - quadril direito (nádega, trocânter), perna superior direita, perna inferior direita.
Região 5 (região axial) - pescoço, parte superior das costas, parte inferior das costas, tórax,

abdômen.
Escala de gravidade dos sintomas (SS)
Fadiga
Sintomas cognitivos
Sono não reparador (levantar-se cansado, não satisfeito)
Para cada um dos três sintomas acima, atribuir o nível:
0) Ausente (não apresentou problemas). 1) Leve (geralmente leves ou intermitentes). 2) Moderados e consideráveis (frequentemente presentes). 3) Grave (problemas generalizados, contínuos e perturbadores da vida).
A pontuação da SS é a soma das pontuações de gravidade dos três sintomas (fadiga, sintomas cognitivos e sono não reparador) (0–9) mais a soma (0–3) do número dos sintomas a seguir. O paciente refere dor durante os seis meses anteriores:
1) Dores de cabeça (0-1)
2) Dor abdominal inferior ou câibras (0–1)
3) Depressão (0-1)
O escore final de gravidade dos sintomas está entre 0 e 12.

Fonte: Adaptado de WOLFE et al (2016) e DUQUE; FRICCHIONE (2019).

Os critérios para diagnóstico da FM podem ser comparados aos sintomas somáticos e psicológicos (cognitivos) em pacientes com dor lombar, artrite reumatoide, enxaqueca e outras síndromes dolorosas (HÄUSER et al., 2015).

1.5 TRATAMENTO

A abordagem terapêutica geral para a FM deve se concentrar no controle dos sintomas associados à doença, bem como melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Conforme cita Turner e colaboradores, a FM possui sintomas difusos e os principais medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento dessa patologia incluem antidepressivos, opióides, sedativos e anticonvulsivantes, os quais apresentam eficácia clínica discreta. Os autores afirmam ainda que, apesar dos sintomas da FM serem efetivamente

minimizados usando diferentes terapias, esses tratamentos não são específicos para a doença e são projetados para o controle sintomático (TURNER et al., 2017).

Quadro 2. Tratamentos farmacológicos e não farmacológicos dos sintomas da FM.

MEDICAMENTOS	MECANISMO DE AÇÃO
Duloxetina	Bloqueador da recaptação de 5-HT e NA no SNC.
Pregabalina	Interação com a subunidade α -2- δ dos canais de cálcio dependentes de tipo 1.
Milnaciprano	Bloqueador da recaptação de 5-HT e NA no SNC.
Gabapentina	Redução na liberação de glutamato; aumento da concentração de ácido gama-aminobutírico (GABA); ao ligar-se na subunidade α -2- δ dos canais de cálcio sensíveis à voltagem do tipo 1, inibe a formação de sinapse excitatória independente da atividade do canal de cálcio.
Tramadol	Agonista seletivo dos receptores μ e inibidor, preferencialmente, da recaptação da NA.
Amitriptilina	Inibidor do transportador responsável pelos neurotransmissores (5-HT e NA), aumentando assim suas concentrações na fenda sináptica.
Ciclobenzaprina	Inibidor seletivo da recaptação da 5-HT e da NA.
Tratamentos Não Farmacológicos Eficazes	
Hidroterapia	Yoga
Exercício aeróbico	Ciclismo
Treinamento de força	Apoio psicológico
Acupuntura ou eletroacupuntura	Terapia cognitiva comportamental
Terapia de insônia comportamental	Oxigenoterapia hiperbárica
Quiropraxia	Reabilitação e fisioterapia

Fonte: Adaptado de BAIR; KREBS (2020).

Conforme cita Bair e Krebs (2020), a FM pode ser efetivamente tratada com terapias medicamentosas e não medicamentosas (Quadro 2). De acordo com as diretrizes mais recentes da *European League Against Rheumatism* (EULAR, da sigla em inglês), uma vez realizado o diagnóstico de FM, deve ser dada prioridade ao tratamento não farmacológico. O motivo está na relação custo-benefício, preferência, segurança e disponibilidade do paciente. Porém, como terapia medicamentosa, a EULAR e a *Food and Drug Administration* (FDA, da sigla em inglês) reconhece a amitriptilina, pregabalina e duloxetina, como os medicamentos que apresentam melhores resultados para o tratamento dos sintomas associado à FM (ATZENI et al., 2019).

1.6 HIPÓTESES FISIOPATOLÓGICAS

A etiopatogenia da FM é complexa e não está claramente definida. Os fatores de risco incluem predisposição familiar, suscetibilidade genética, estímulos nocivos e não nocivos, traumas físicos, idade, especificidade de gênero e dano psicológico. Os estudos bioquímicos afirmam disparidade neuroquímica no cérebro e tecido periférico, juntamente com algumas desregulações autonômicas, neuroendócrinas e imunológicas nos pacientes com FM (SINGH et al., 2019).

Embora a etiopatogenia da FM não esteja totalmente clara, Rus e colaboradores (2018) relatam uma série de fatores que podem contribuir para o seu desenvolvimento. Esses fatores incluem alteração na regulação do SNC acerca da modulação da dor e níveis alterados de neurotransmissores, distúrbios neuroendócrinos, estresse oxidativo e inflamação. Na concepção dos autores, desequilíbrios neuroquímicos devido a níveis alterados de neurotransmissores em pacientes com FM têm sido associados à desregulação da percepção da dor caracterizada por alodínia (sensação dolorosa gerada por estímulo inócuo) e hiperalgesia (aumento da resposta dolorosa frente a estímulo álgico). Dentre os neurotransmissores que merecem destaque estão as monoaminas, as quais derivam de aminoácidos aromáticos e incluem as catecolaminas (RUS et al., 2018). As catecolaminas são derivadas da fenilalanina, e incluem a dopamina (DA), a noradrenalina (NA) e a adrenalina, também chamada de epinefrina.

1.7 SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL

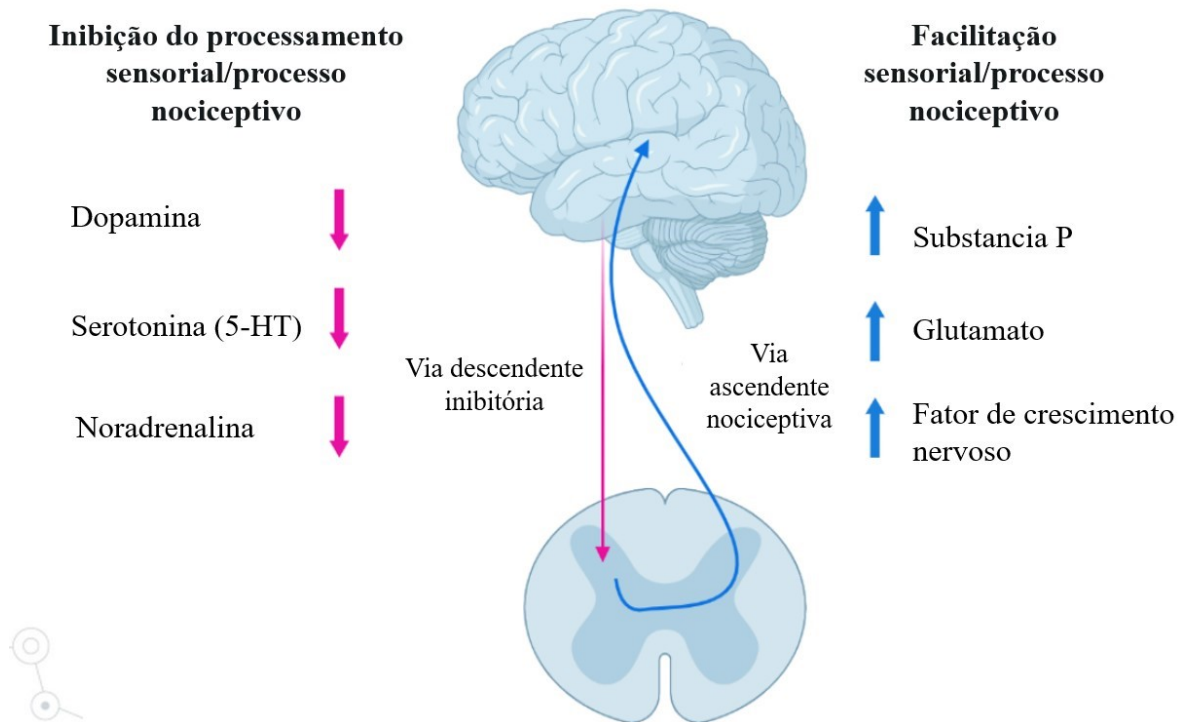
No processamento fisiológico da dor, existem duas vias neuronais principais que envolvem a percepção da dor (Figura 5): vias ascendente e descendente. Os nervos periféricos transmitem sinais sensoriais, incluindo sinais nociceptivos (indutores de dor) para a medula espinhal, para serem transmitidos ao cérebro por meio de vias nociceptivas ascendentes para processamento da dor. Sinais nociceptivos são emitidos quando receptores especializados nos nervos periféricos chamados nociceptores são ativados por estímulos térmicos ou mecânicos. Nos pacientes com FM, as duas principais vias de dor operam de maneira anômala, resultando na amplificação central dos sinais de dor. Esse conceito também é referido na literatura como sensibilização central (CLAW et al., 2011). Fisiologicamente, a sensibilização central promove comportamentos que protegem e imobilizam os tecidos lesionados para maximizar a cicatrização. No entanto, a sensibilização central atípica pode causar dor crônica não adaptativa, pela qual a gravidade da dor é desproporcional ao dano real do tecido, e a dor pode

persistir após a cicatrização dos tecidos, fazendo com que a própria dor se torne uma doença (CHOY, 2015).

Estudos de neuroimagem usando ressonância magnética funcional (RMF) e outras pesquisas demonstraram diferentes alterações no processamento e regulação da dor que amplificam ou diminuem a inibição da dor em pacientes com FM. Algumas dessas alterações incluem maior atividade neuronal nas regiões do cérebro que processam a dor, respostas exageradas da dor a estímulos experimentais (sensibilização), alterações na morfologia cerebral, regulação dos receptores periféricos ou cerebrais e níveis alterados de neuropeptídeos e neurotransmissores relacionados à dor (por exemplo, substância P, fator neurotrófico derivado do cérebro, glutamina e DA). Essas alterações podem se estender ao processamento de outras informações sensoriais, potencialmente explicando outros sintomas, tais como fadiga, interrupção do sono, déficits cognitivos e depressão (BAIR; KREBS, 2020).

A partir dos dados apresentados, evidencia-se, portanto, que o mecanismo fisiopatológico da FM envolve a depleção dos níveis cerebrais de aminas biogênicas, responsáveis pelos principais sintomas clinicamente observados nos pacientes fibromiálgicos. Corroborando com essa hipótese, Singh e colaboradores (2019) demonstraram nível reduzido de diferentes neurotransmissores monoaminérgicos, particularmente 5-HT, DA e NA, no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com FM. Todos esses neurotransmissores desempenham papel vital na manutenção da atividade neuronal no cérebro e nos tecidos periféricos. Sabe-se ainda que a NA e 5-HT são os principais transmissores do sistema descendente inibitório da dor, e sua interrupção resulta no aumento da resposta à estimulação nociva em neurônios nociceptivos espinhais (SHIBRYA et al., 2017). A partir dessa observação, acredita-se que a depleção de 5-HT nas vias descendentes da dor no corno dorsal é essencialmente responsável pela percepção da dor na FM (SINGH et al., 2019).

Figura 5: Vias nociceptivas e alterações dos neurotransmissores na FM.



Fonte: Adaptado de BECKER; SCHWEINHARDT (2012) e YAM et al (2018).

A figura 5 representa de forma esquemática, as alterações neuroquímicas nas vias: i) inibitória descendente (linha rosa) e ii) nociceptiva ascendente (linha azul) no decurso da FM. Conforme a imagem pode-se observar que ocorre importante redução nos níveis de DA, 5-HT e NE na via inibitória descendente. Além disso, observa-se ainda aumento da substância P, do glutamato e dos fatores de crescimento na via nociceptiva ascendente.

Choy refere que os neurônios ascendentes da medula espinhal conduzem impulsos nociceptivos ao tálamo e depois ao córtex somatossensorial, ocorrendo assim à percepção da dor. Além disso, os neurônios eferentes também se projetam na amígdala e no hipotálamo, responsáveis pelas respostas emotivas e de estresse à dor, respectivamente. Anormalidades nessas regiões superiores do cérebro, incluindo diminuição da densidade de substância cinzenta cortical, foram detectadas nos pacientes com FM (CHOY, 2015).

Diferentes achados descrevem a sensibilização central na FM, particularmente nas seguintes áreas: córtex cingulado anterior (CCA); hipotálamo; substância cinzenta periaquedutal (SCP); medula ventromedial rostral, amígdala e tálamo (CHOY, 2015). Conforme cita Serafini e colaboradores, o CCA e a SCP formam importante rede central envolvida com a dor espontânea e que a conectividade entre essas regiões está aumentada nos pacientes com dor crônica. De fato, estudos demonstram que, inibidores da recaptação de 5-HT e NA, são eficazes no tratamento dos sintomas associados à FM, provavelmente devido à sua capacidade de diminuir a conectividade funcional na SCP e no CCA. Ainda, atividades

neurônais relacionadas a essas áreas têm sido associadas tanto a dor crônica, bem como a depressão. Os núcleos da amígdala, portanto, ajudam a regular o estresse emocional e a percepção da dor. A atividade basal elevada na amígdala está associada à dor e à depressão induzidas pela síndrome do intestino irritável causada pela FM (SERAFINI et al., 2020). Além dessas áreas, Flodin e colaboradores referem que existem evidências moderadas de resposta em regiões relacionadas à dor (incluindo córtex somatossensorial primário (S1) e secundário (S2), cerebelo, ínsula, e CCP em pacientes diagnosticados com FM, quando comparado aos indivíduos saudáveis (FLODIN et al., 2014).

Dentro deste contexto, Rus e colaboradores (2018) relataram que pacientes com FM apresentaram níveis plasmáticos significativamente mais elevados de NA e níveis plasmáticos mais baixos de DA quando comparado aos indivíduos saudáveis. Os autores descreveram que há alteração na via catecolaminérgica em pacientes com FM, o que poderia estar relacionado à desregulação do sistema nervoso simpático. Além da alteração de neurotransmissores, Shibrya e colaboradores relataram alterações antioxidantes nos pacientes com FM. Nesse sentido, os autores concluem que os níveis mais altos de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células mononucleares de pacientes com FM sugerem aumento do estresse oxidativo (SHIBRYA et al., 2017).

Atualmente, diferentes estudos e grupos de pesquisa investigam a dor crônica. Pesquisas clínicas e não clínicas têm demonstrado grandes avanços acerca de diferentes patologias do SNC e SNP. Uma das opções que tem se mostrado eficaz ao longo do tempo é a utilização de modelos animais. Diferentes modelos animais que mimetizam a FM têm sido utilizados com o objetivo de desenvolver novas abordagens terapêuticas para a doença, incluindo estresse intermitente pelo frio (NEYAMA; DOZONO; UEDA, 2020), solução salina ácida (UEDA et al., 2020), entre outros. Com base nesta informação, é importante destacar que estudos feitos em roedores demonstraram disfunção mitocondrial e estresse oxidativo nos modelos animais de FM supramencionados, mas esses modelos não levaram em consideração o amplo espectro dos sintomas encontrados na FM, principalmente na abordagem de alterações em vias dopaminérgicas (BRUM et al., 2020). A reserpina, alcaloide proveniente das raízes de *Rauwolfia serpentina*, tem sido amplamente utilizado como agente anti-hipertensivo, mas sua administração crônica está associada à depressão maior e dor musculoesquelética. Assim, a FM induzida por reserpina é o modelo animal bem estabelecido e amplamente utilizado, o qual mimetiza as características etiológicas e clínicas da FM, incluindo depleção de aminas biogênicas, comportamento tipo-depressivo e indução de dor

musculoesquelética, confirmada pelo aumento do limiar de retirada da pata ou cauda (YAO et al., 2019). Devido mimetizar, sobretudo, a hipótese monoaminérgica (depleção das aminas biogênicas) da FM justifica-se, portanto, a utilização deste modelo neste estudo.

Em concordância, Brum e colaboradores (2020), descreve que os moduladores mitocondriais baseados em insulto e proteção apresentam impactos substanciais nos comportamentos nociceptivos, fadiga e depressivos induzidos pela reserpina. Os autores justificam ainda que a disfunção mitocondrial induzida pela reserpina medeia o estresse oxidativo e os sintomas relacionados à FM neste modelo. Portanto, o modelo animal com reserpina contribui para a depleção de aminas biogênicas em diversos tecidos, dor generalizada e sintomas associados, aumento do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, que ocorre em pacientes com FM. Além disso, o modelo experimental de FM induzido por reserpina é responsivo à suplementação de CoQ10 (benzoquinona presente em praticamente todas as células do organismo que participa dos processos de produção de ATP), com perfil farmacológico semelhante ao dos pacientes com FM, o que contribui para a validade preditiva desse modelo (BRUM et al., 2020).

Complementando, Nagakura e colaboradores (2018) relataram que animais induzidos ao modelo experimental de FM utilizando reserpina (0,25 mg/kg, s.c) apresentaram alterações dos neurotransmissores no córtex pré-frontal, tálamo e medula espinhal (NAGAKURA et al., 2018). O comportamento semelhante à FM desencadeado pela reserpina foi acompanhado pela redução significativa dos níveis de DA e 5-HT em todas as estruturas avaliadas, incluindo cérebro total, medula espinhal, córtex e tálamo. Esta observação dos autores complementa a validade do uso de reserpina como modelo de FM em três diferentes aspectos, ou seja, validade de face (manifestação de dor crônica e sintomas relacionados), validade de construto (disfunção do controle da dor no SNC mediado por aminas biogênicas) e validade preditiva (respostas semelhantes aos tratamentos usados em pacientes com FM) (NAGAKURA et al., 2009).

Neste sentido, a reserpina atua como depletor de monoamina através do bloqueio do transportador de monoamina vesicular para transmissão sináptica e/ou armazenamento neuronal, promovendo assim a auto-oxidação da DA e o catabolismo oxidativo mediado pela monoamina oxidase (MAO). A oxidação de DA e NA no citosol induz dano celular (YAO et al., 2019). Esse mecanismo acelerado favorece a formação de dopamina-quinonas e peróxido de hidrogênio, causando assim alternância distinta no estado redox dos terminais nervosos dopaminérgicos, através das concentrações de glutathiona redutase (GSH) e oxidada (GSSG,

forma dimerizada da GSH). Além disso, foram demonstrados níveis séricos elevados de malondialdeído (MDA) (espécie reativa de oxigênio) em pacientes com dor crônica quando comparado aos controles saudáveis (SHIBRYA et al., 2017). Desse modo, evidências crescentes têm demonstrado que compostos antioxidantes possuem efeitos antinociceptivos em diferentes ensaios clínicos e não clínicos de dor neuropática e inflamatória. Além de seus efeitos antinociceptivos, os compostos antioxidantes também apresentam efeito antifadiga e ansiolítica, presentes em pacientes fibromiálgicos, conforme o estudo conduzido por Klein e colaboradores (KLEIN et al., 2016). Assim, em conjunto, torna-se evidente que o modelo experimental da reserpina mimetiza não somente os sinais comportamentais, mas também os fisiopatológicos relacionados à FM.

Tendo em vista as limitações acerca da causa e tratamento da FM, é de grande importância que grupos de estudos continuem pesquisando mecanismos e potencial terapêutico de substâncias para o tratamento dessa condição. Intimamente relacionado, modelos experimentais que mimetizem a doença são igualmente importantes para desvendar os mecanismos fisiopatológicos, bem como investigar a eficácia de diferentes tratamentos (KLEIN, 2014). Referindo-se ao marco conceitual apresentado em outro estudo, os autores descrevem que indivíduos fibromiálgicos apresentam diminuição da massa corporal, presumivelmente por um efeito direto nos receptores dopaminérgico D3 expressos no sistema límbico (HOLMAN; MYERS, 2005). Além disso, foi demonstrado que o modelo experimental de reserpina pode causar até 20% de perda de massa corporal, após uma semana de indução (WELLS et al., 2017). Portanto, tornam-se essenciais novos avanços no conhecimento em relação à gênese da FM, a fim de desenvolver estratégias terapêuticas mais específicas e eficazes.

1.8 SISTEMA DOPAMINÉRGICO

De acordo com Serafini e colaboradores (2020), o sistema mesolímbico é importante circuito do SNC no qual as entradas dopaminérgicas da área tegmental ventral (ATV) inervam regiões do cérebro envolvidas em funções executivas, afetivas e motivacionais, incluindo o córtex pré-frontal, amígdala e núcleo *accumbens* (NAc). O NAc também controla o desenvolvimento de hiperalgesia, uma das características mais proeminentes das condições de dor crônica. Evidências emergentes apontam para o papel crítico do sistema mesolímbico na percepção e modulação da dor crônica, destacando a importância dessa via na terapêutica da

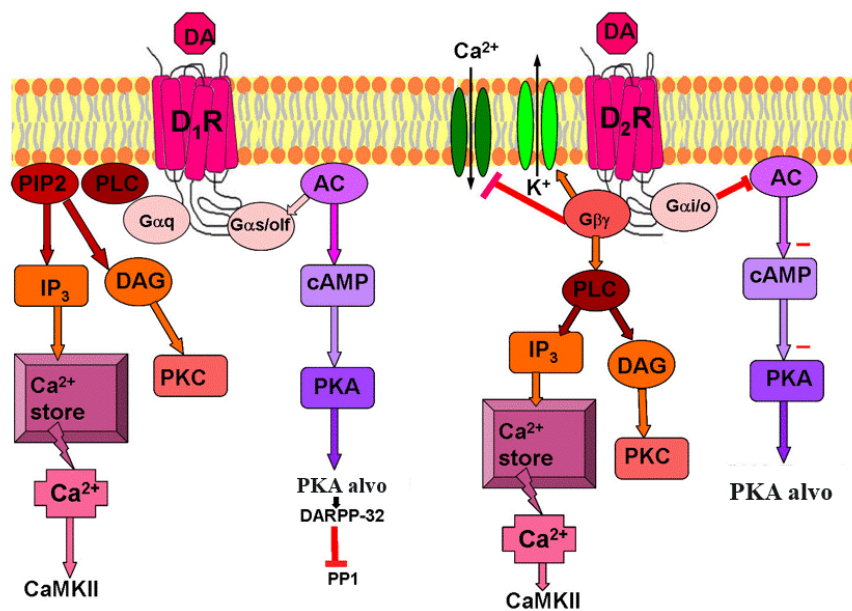
dor. Os autores complementam destacando que estudos de imagem por tomografia computadorizada em pacientes com FM demonstram atividade reduzida da ATV durante a antecipação da dor bem como, redução na ligação do receptor D3/D2 dopaminérgico (SERAFINI et al., 2020; MITSU et al., 2016). A partir disso, é importante observar que os níveis de DA extracelular são modulados por dois mecanismos principais: transmissão fásica e tônica. A liberação de DA fásica é diretamente impulsionada pelo potencial de ação nas células que contêm DA, isso faz com que a concentração desse neurotransmissor próximo ao terminal pré-sináptico aumente rapidamente. Por outro lado, a transmissão tônica ocorre quando a DA é liberada, independentemente de potenciais de ação pré-sináptico, e é regulada pela atividade de outros neurônios e pela recaptação de neurotransmissores (KLEIN et al., 2018).

Estima-se que existam oito vias dopaminérgicas presentes no SNC humano, as quais medeiam diferentes processos relacionados à cognição, atividade motora e modulação de estímulos nociceptivos (ASHBY; VALENTIN; VON MEER, 2015). Como exemplo de vias dopaminérgicas descendentes pode-se citar o grupo celular A11 localizado na porção posterior do hipotálamo com projeções para o tronco cerebral e medula espinhal. Esse grupo celular em específico é um importante mecanismo modulatório descendente da dor (KIM et al., 2015; LI et al., 2019; LIU et al., 2019).

Dessa forma, no que cerne ao papel fisiológico, a DA não pode ser simplesmente classificada como neurotransmissor excitatório ou inibitório, pois pode se ligar a cinco receptores acoplados à proteína G intimamente relacionados, mas funcionalmente distintos denominados receptores dopaminérgicos (DR) (Figura 6). Esses são divididos em dois grupos principais: i) a família D1, que inclui D1R e D5R, é acoplada a proteínas G estimulatória (Gs) que ativa a enzima adenilato ciclase, enquanto que, ii) a segunda é composta pelos receptores D2R, D3R e D4R, os quais estão associados à proteína G α i/o, sendo esses denominados receptores do tipo-D2 (LI et al., 2019). A família de receptores D2 também atua por uma via independente envolvendo β -arrestina-2 (β -arr2) e Akt, proteína quinase, antigamente conhecida como proteína quinase B. Assim, o BDNF interage com o receptor de tirosina quinase B (Trk-B) na superfície neuronal, o qual fosforila o resíduo de Trk-B na superfície do receptor. Eventualmente, a família de receptores D1 é expressa no estriado, representando os principais receptores dopaminérgicos no córtex cerebral e no hipocampo, enquanto a família de receptores D2 é expressa em maior densidade no estriado, córtex cerebral, amígdala e hipocampo (KLEIN et al., 2018; YANG et al., 2020). Ainda, Martikainen e colaboradores

descrevem que apesar de existir pouca evidência para o papel da classe D1 de receptores de DA no controle da dor, há estudos experimentais em animais e humanos de que os receptores D2 estriatal e os receptores D3 (ventro-estriatal) apresentam papéis essenciais na mediação dopaminérgica no controle da dor no cérebro (MARTIKAINEN et al., 2018). Ji-Young Kim e colaboradores demonstraram que a ativação dos receptores do tipo-D1 (D1 e D5) de neurônios pertencentes a A11 foi responsável pela manutenção e cronificação da dor, enquanto que, os receptores do tipo-D2 (D2, D3 e D4) quando ativados, foram capazes de promover analgesia (LIU et al., 2019).

Figura 6: Receptores dopaminérgicos acoplados a proteína G.



Fonte: (POPOVA et al., 2015).

Os receptores da família D1 (incluindo os subtipos D1 e D5), que geralmente são acoplados a Gαs/olf e estimulam a produção de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e a atividade da proteína Quinase A (PKA). Os receptores da família D2 (incluindo os subtipos D2, D3 e D4), que são acoplados a Gαi/o e regulam negativamente a produção de cAMP, resultando em uma diminuição na atividade de PKA.

Puopolo sugeriu que os receptores de DA podem ser expressos na medula espinhal e no núcleo mesencefálico do nervo trigeminal. Além disso, o autor destacou ainda que os receptores de DA também podem ser expressos em neurônios do gânglio da raiz dorsal e nos neurônios do gânglio trigeminal, sugerindo a possibilidade de que eles também sejam expressos em fibras aferentes primárias fazendo contatos sinápticos no corno dorsal da

medula espinhal. É interessante citar que a DA pode desempenhar efeitos antinociceptivos e pró-nociceptivos, entre os quais a ativação dos receptores D2 medeia o efeito antinociceptivo, e a ativação dos receptores D1 medeia o efeito pró-nociceptivo (PUOPOLO, 2019). Vale ressaltar que a modulação descendente da dor é mediada principalmente por vias monoaminérgicas, incluindo projeções descendentes mediadas por DA, NA e 5-HT. Ao ativar diferentes tipos de receptores, as vias dopaminérgicas descendentes podem exercer efeitos de modulação da dor facilitatória ou inibitória. O equilíbrio geral entre a facilitação da dor e a inibição mediada por essas vias dopaminérgicas contribui para a modulação direta da dor (LI et al., 2019). De acordo com os autores, o exemplo é a atuação divergente entre os receptores do tipo D1 e D2, visto que os receptores do tipo D1 favorecem o desenvolvimento de quadros hiperálgicos, enquanto os do tipo D2 mostram-se contrários, ou seja, quando ativados reduzem as sinalizações nociceptivas (LI et al., 2019).

De acordo com Mitsi e colaboradores o centro de recompensa cerebral desempenha papel fundamental na modulação da nocicepção e adaptação no circuito dopaminérgico, uma vez que afeta diferentes componentes sensoriais e afetivos nas síndromes de dor crônica. Essas adaptações incluem alterações nos níveis de DA liberada, e mudanças pós-sinápticas nos níveis de receptores e moléculas de transdução de sinal. Curiosamente, embora os estados de dor crônica promovam mudanças adaptativas na via de recompensa, múltiplas moléculas reguladas por estados de dor crônica no NAc também são conhecidas por desempenhar papéis na transmissão nociceptiva na medula espinhal e nos gânglios da raiz dorsal, e em outras estruturas da matriz de dor (MITSI et al., 2016).

Por outro lado, os agentes dopaminérgicos melhoram a sintomatologia da dor e produzem analgesia. Em contraste, a inativação das regiões dopaminérgicas mesolímbicas (particularmente, estriado, substância negra e ATV), por exemplo, como na doença de Parkinson resulta em dor excessiva. Embora a doença de Parkinson seja tradicionalmente considerada um distúrbio do movimento, ela é acompanhada por diferentes sintomas cognitivos, emocionais e sensoriais. Entre os sintomas sensoriais que ocorrem com frequência na doença de Parkinson está a dor, a qual pode ser caracterizada como dor neuropática central ou nociceptiva. Além disso, é sabido que as vias dopaminérgicas mesolímbicas estão envolvidas à significância da causa e à expectativa de alívio da dor, ou seja, analgesia placebo (ELMAN et al., 2016; MARTIKAINEN et al., 2018). Como argumentação, Martikanen e colaboradores (2018) destacam que os sintomas de dor na doença de Parkinson podem ser inibidos por drogas dopaminérgicas, como a levodopa, com isso, sugere-se que um déficit no

sistema dopaminérgico estaria entre os mecanismos que contribuem para a dor central na doença de Parkinson. Uma extensão dessa hipótese refere-se ao envolvimento dopaminérgico na dor neuropática e dor inflamatória. Do ponto de vista etiológico, a dor neuropática é decorrente de lesão ou disfunção no SNP/SNC que causa disfunção monoaminérgica, mas a dor inflamatória é causada pela ação de mediadores inflamatórios nos nociceptores da periferia e, posteriormente, alterações na excitabilidade da região central dos neurônios (BRAVO et al., 2019).

Torna-se importante mencionar que a dor neuropática está associada à alta disponibilidade da expressão do receptor D3/D2 estriatal, para o qual o baixo tônus da DA endógena é uma explicação plausível, muito embora o aumento compensatório na densidade do mesmo receptor também possa contribuir. Em contraste, a dor musculoesquelética crônica está associada à baixa disponibilidade basal da expressão de receptores D2/D3 estriatal (MARTIKAINEN et al., 2018). Conforme supramencionado, os mecanismos dopaminérgicos e noradrenérgicos estão envolvidos na ação analgésica na dor neuropática. Consistentemente, estudos clínicos relatam que os antidepressivos tricíclicos e os inibidores da recaptação de 5-HT/NA são eficazes na dor neuropática (BÁN et al., 2020). De fato, o principal mecanismo dos antidepressivos que inibem a dor neuropática é, primeiro, aumentar a NA na medula espinhal e, segundo atuar no *locus coeruleus*, inibindo diretamente a dor e ativando o sistema inibidor noradrenérgico descendente prejudicado. A DA e a 5-HT também aumentam no SNC e podem potencializar os efeitos inibitórios da NA de maneira auxiliar (OBATA et al., 2017).

No atual momento, os tratamentos da dor crônica objetiva controlar seus sintomas, e não tratar a patologia propriamente dita. Portanto, descobertas acerca dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e manutenção da doença, assim como novas opções de tratamento são de interesse científico e clínico. Conforme supracitado, a atuação das monoaminas em diferentes processos fisiológicos é fundamental para a manutenção da homeostasia do organismo. Logo, torna-se essencial investigar compostos e/ou drogas capazes de aumentar as concentrações de neurotransmissores e os efeitos de inibidores seletivos da recaptação de DA, 5-HT e NA durante a gênese e progressão da FM. Desta forma, destaca-se a importância da investigação do pramipexol (PPX) – agonista D3/D2 – para além da doença de Parkinson.

1.9 PRAMIPEXOL

O PPX é um agonista dopaminérgico clinicamente utilizado no tratamento dos sintomas motores da doença de Parkinson e na síndrome das pernas inquietas. Estudo recente sugere que o PPX também é eficaz no tratamento da depressão em pacientes que não respondem aos tratamentos típicos (SILVA, 2019). Ainda, de acordo com o autor, o PPX quando ligado pré-sinápticamente a neurônios dopaminérgicos, inibe a liberação de DA; no entanto, quando os neurônios dopaminérgicos sofrem quaisquer danos, tal como ocorre na depressão e doença de Parkinson, o PPX atua como potente agonista pós-sináptico de receptor D2, demonstrando eficácia no tratamento. O PPX possui propriedades neuroprotetoras, provavelmente pela regeneração dos neurônios dopaminérgicos (SILVA, 2019). Escalona e Fawcett demonstraram que na doença de Parkinson, na qual a depressão é comum e a anedonia é uma característica proeminente, a L-dopa e outros agonistas da DA não específicos apresentam pouca eficácia na prevenção ou tratamento da depressão. Os autores relatam ainda que em pacientes deprimidos crônicos e graves resistentes ao tratamento, incluindo transtorno bipolar, o PPX em altas doses mostrou resposta promissora, caracterizado pela expressão seletiva de receptores D3 nas áreas de projeção mesolímbica, incluindo o NAc (ESCALONA; FAWCETT, 2016).

De acordo com Lieberknecht e colaboradores (2016) o efeito neuroprotetor do PPX pode estar associado à indução do BDNF. Neste sentido, para a ocorrência do aumento da expressão de proteínas neurotróficas, sugere-se que o PPX se ligue preferencialmente aos receptores D3/D2 e induza tal efeito. Ainda, Chernoloz, Mansari e Blier descreveram que o PPX produz aumento significativo na neurotransmissão de 5-HT de maneira indireta. O tratamento crônico com PPX aumentou a neurotransmissão dopaminérgica no córtex pré-frontal e a neurotransmissão serotoninérgica no hipocampo. Os autores sugerem que as alterações observadas na função dos sistemas monoaminérgicos possam estar subjacentes, até certo ponto, à eficácia clínica do PPX (CHERNOLOZ; MANSARI; BLIER, 2012).

Kim e colaboradores realizaram estudo no qual investigaram os efeitos neuroprotetores dos agonistas de receptores do tipo D2 na neurodegeneração dopaminérgica. Neste estudo, os autores evidenciaram que o efeito do PPX estaria associado com a redução direta do estresse oxidativo e/ou alteração da sinalização celular induzido por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (KIM et al., 2015). Ainda, recentemente foi demonstrado que o tratamento intratecal com L-dopa em camundongos reduziu a hipersensibilidade tátil e térmica induzidas pela 6-OHDA. Posteriormente, esses efeitos foram confirmados através do tratamento com ropinirol – agonista do receptor tipo-D2 (TANG et al., 2020), evidenciando

uma vez mais a atuação dos receptores do tipo-D2 na modulação nociceptiva. Avançando nesta temática, Vieira e colaboradores demonstraram que o tratamento com terpineol – álcool monoterpeneo – promoveu efeito antidepressivo em animais tratados com LPS, entretanto esses efeitos foram revertidos quando os animais foram tratados com sulpirida – antagonista seletivo dos receptores D2. Esses dados demonstram que os efeitos antidepressivos do terpineol dependem da ativação de receptores D2 (VIEIRA et al., 2020). Neste aspecto é interessante notar que os receptores semelhantes à DA no cérebro (particularmente a subfamília D2) contribuem para a analgesia induzida pela disfunção dopaminérgica na dor inflamatória e neuropática (CHEN et al., 2017). Em resumo, o PPX poderia representar opção importante para o tratamento da FM. Somado à dificuldade de diagnóstico em humanos ao fato de que ainda não existem terapias realmente efetivas, tampouco métodos preventivos eficazes para tratar a FM, torna-se relevante investigar novos alvos terapêuticos objetivando possíveis tratamentos e/ou prevenção da doença, justificando aqui a utilização do PPX. Pautado na ampla caracterização da problemática, a hipótese deste estudo fundamenta-se no fato de que os agonistas dopaminérgicos (D3/D2) podem representar importantes e promissoras ferramentas no controle e/ou desenvolvimento da FM, e, portanto, necessitam serem melhores investigados, principalmente no que se refere às vias de ação aos quais estão envolvidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar o efeito antinociceptivo e neuromodulador do pramipexol (PPX) – agonista dos receptores D3/D2 dopaminérgico – no modelo experimental de FM induzido por reserpina em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do PPX na hiperalgesia mecânica induzida pela reserpina no modelo experimental da FM;

Avaliar o efeito do PPX na sensibilidade térmica no modelo experimental de FM induzido por reserpina;

Avaliar o efeito do PPX no comportamento tipo-depressivo e ansiogênico no modelo experimental de FM induzido por reserpina;

Avaliar a atividade locomotora dos animais induzidos a FM e pós-tratamento com PPX;

Avaliar o efeito neuroquímico do PPX no modelo experimental de FM induzido por reserpina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (*Mus musculus*) com peso de 30-40g provenientes do Biotério Central da UFSC, Campus Florianópolis, e mantidos no Biotério Setorial de Araranguá – Departamento de Ciências da Saúde da UFSC, Campus Araranguá. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética para uso de animais (CEUA/UFSC – nº 2572210218). Os animais foram acondicionados em caixas isoladas e alojados em câmara com ventilação, controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade ($50 \pm 10\%$) em ciclo de 12 horas claro-escuro. Água e ração comercial foram oferecidas “*ad libitum*”. O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram os mínimos necessários para realizar os protocolos *in vivo*. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normatizações da CEUA/UFSC bem como, os princípios dos 3Rs (substituição, redução e refinamento), além das diretrizes de manejo e cuidados de animais para fins científicos internacionais (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*). Os animais foram aclimatizados por no mínimo 1-2 horas antes do início dos testes comportamentais.

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE FM

O modelo experimental de FM utilizado neste estudo consistiu na adaptação do protocolo prévio desenvolvido por Nagakura e colaboradores (2009). Nesse, foi preparada solução estoque de reserpina (Sigma-Aldrich, cristalizada, 99,0% - USA) usando solução tampão fosfato (PBS) e 0,5% de Tween 80 (BEPPLER, 2018), adaptado para camundongos. A indução foi realizada através da administração repetida de reserpina na dose de 0,25 mg/kg, via subcutânea (s.c), 1x/dia, durante 3 dias consecutivos, no período matutino. Os animais do

grupo controle receberam apenas o mesmo volume do veículo (PBS) + 0,5% de Tween 80 (NAGAKURA et al., 2009).

3.3 AGENTES FARMACOLÓGICOS E REAGENTES

As seguintes substâncias foram utilizadas: reserpina (Sigma-Aldrich, cristalizada, 99,0% - USA). Cloridrato de Pramipexol (Aché laboratório farmacêuticos S.A, Guarulhos-São Paulo/Brasil) e Pregabalina (Lupin Limited – Goa, Índia). Todos os demais reagentes e soluções utilizadas nesse estudo apresentaram grau analítico adequado.

3.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTOS

Para investigar a eficácia do PPX no modelo experimental de FM, foram realizados dois protocolos. O primeiro apresentou duração de 15 dias, no qual os animais foram tratados com PPX (0,1, 1 e 5 mg/kg; 1x/dia) por via intraperitoneal (i.p) durante 10 dias consecutivos, baseado em estudos anteriores (WANG et al., 2018; ROMERO-SÁNCHEZ et al., 2019) (Figura 7). O segundo protocolo apresentou duração de 5 dias, no qual os animais receberam PPX na dose de 1 mg/kg (i.p, 1x/dia) durante 4 dias consecutivos, 30 minutos após a administração da reserpina (Figura 8). As injeções foram administradas entre as 07h30min – 10h00min (BREUER et al., 2009; KLEIN, 2014; BRUSCO et al., 2019).

3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 PROTOCOLO I

Para o primeiro protocolo os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

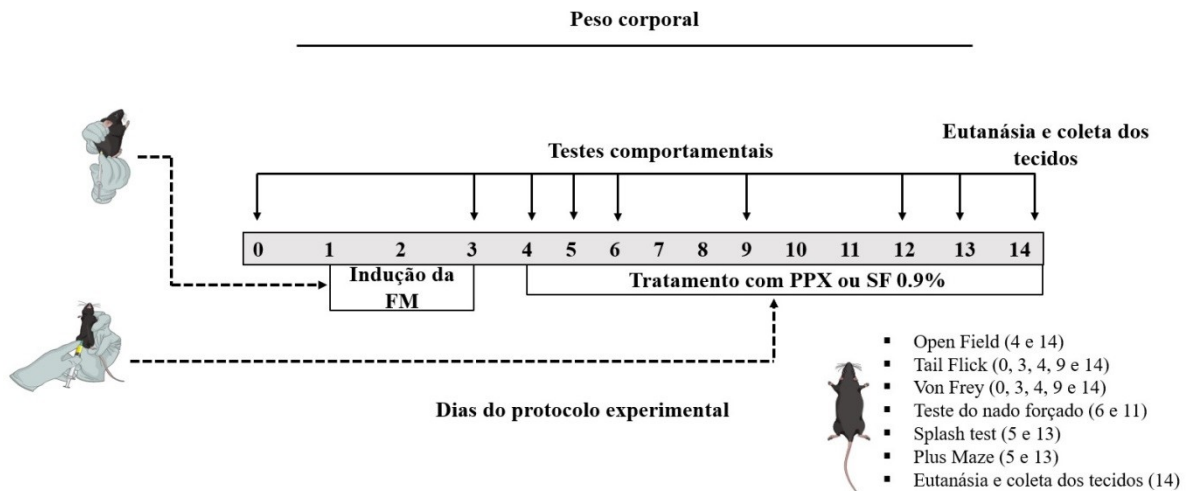
- Grupo controle (C): animais saudáveis tratados com solução salina + Tween 80 (0,5%) i.p., por 10 dias consecutivos.
- Grupo Fibromialgia (FM): animais com FM, induzidos por reserpina via subcutânea, durante três dias consecutivos.
- Grupos controle + PPX (CPPX): animais saudáveis tratados com PPX 1 mg/kg, i.p.; 1x/dia, por 10 dias consecutivos.

- Grupos Fibromialgia + PPX (FMPPX): animais com FM tratados com PPX 0,1 mg/kg, i.p.; 1x/dia, por 10 dias consecutivos.
- Grupo Fibromialgia + PPX (FMPPX): animais com FM tratados com PPX 1 mg/kg, i.p.; 1x/dia, por 10 dias consecutivos.
- Grupo Fibromialgia + PPX (FMPPX): animais com FM tratados com PPX 5 mg/kg, i.p.; 1x/dia, por 10 dias consecutivos.

3.5.2 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL (PROTOCOLO I)

O protocolo experimental apresentou duração de 15 dias. Inicialmente (dia 0 do protocolo) os animais foram subdivididos entre os grupos (C, FM, CPPX e FMPPX). Os animais foram aclimatados antes dos testes comportamentais (dia 0), no qual foram realizados os seguintes testes utilizados como medida basal: hipersensibilidade mecânica (*von Frey*) e dor térmica ao calor (*tail flick*). Do dia 1 ao dia 3 foi realizada a indução da FM utilizando reserpina – doses de 0,25 mg/kg, via subcutânea, 1x/dia, durante 3 dias ininterruptos conforme Nagakura et al (2009). O tratamento com o PPX apresentou duração de 10 dias, 1x/dia, sendo que a primeira dose foi administrada no dia 4 do protocolo experimental (0,1, 1, e 5 mg/kg, i.p.) (ROMERO-SÁNCHEZ et al., 2019). Sendo assim, nos dias 0, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 13 e 14 do protocolo os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: teste de campo aberto (*open field*) – dias 4 e 14; hipersensibilidade mecânica (*von Frey*) – dias 0, 3, 4, 9 e 14; dor térmica ao calor (*tail flick*) – dias 0, 3, 4, 9, e 14; teste do nado forçado (TNF) – dias 6 e 11; teste de labirinto em cruz elevado (*plus maze*) – dias 5 e 13; e teste da borrifagem de solução de sacarose (*splash test*) – dias 5 e 13. No dia 14 do protocolo, os animais foram eutanasiados. A massa corporal dos animais foi monitorada diariamente. O desenho da sequência experimental proposta encontra-se na Figura 7.

Figura 7: Desenho da sequência experimental – Protocolo I.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor.

3.5.3 PROTOCOLO II

Já para o segundo protocolo os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

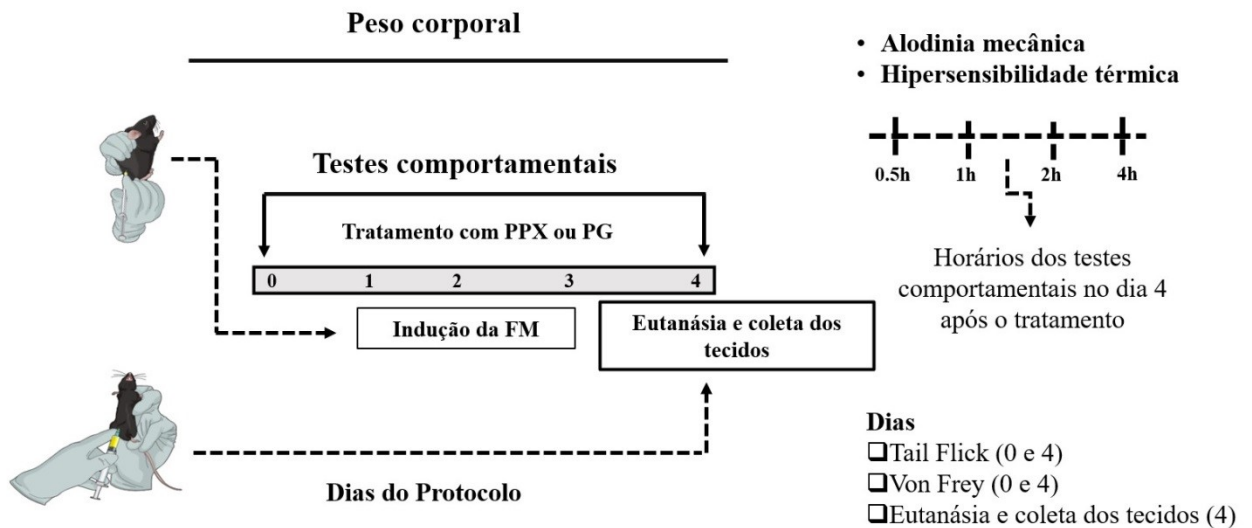
- Grupo controle (C): animais saudáveis tratados durante 4 dias com solução salina + Tween 80 (0,5%), i.p.
- Grupo Fibromialgia (FM): animais com FM, induzidos por reserpina 0,25 mg/kg, s.c., durante três dias consecutivos e tratados durante 4 dias com solução veículo, i.p.; 1x/dia.
- Grupo Fibromialgia + PPX (FMPPX): animais com FM, induzidos com reserpina durante três dias consecutivos e tratados durante 4 dias com PPX 1 mg/kg, i.p.; 1x/dia.
- Grupo Pregabalina (PG): animais com FM, induzidos por reserpina 0,25 mg/kg, s.c., durante três dias consecutivos e tratados durante 4 dias com pregabalina (30 mg/kg, via oral; 1x/dia).

5.3.4 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL (PROTOCOLO II)

O protocolo experimental apresentou duração de 5 dias. Inicialmente (dia 0 do protocolo) os animais foram subdivididos entre os grupos (C, FM, FMPPX e PG). Os animais foram aclimatados antes dos testes comportamentais (dia 0) no qual foram realizados os

seguintes testes utilizados como medida basal: hipersensibilidade mecânica (*von Frey*) e dor térmica ao calor (*tail flick*). Do dia 1 ao dia 3 foi realizada a indução da FM utilizando reserpina – doses de (0,25 mg/kg, s.c) 1x/dia, durante 3 dias ininterruptos, conforme já descrito acima. Após 30 minutos da administração da reserpina, os grupos receberam as seguintes administrações: C (solução salina + Tween 80 (0,5%) i.p, sem reserpina), FM (solução salina, i.p + reserpina), FMPPX (PPX 1 mg/kg, i.p + reserpina) e PG (pregabalina 30 mg/kg, v.o, + reserpina). No dia 4 do protocolo, os animais foram novamente submetidos a testes comportamentais (*von Frey* e *tail flick*) antes da administração dos fármacos/veículos (basal do dia 4), e após administração, os mesmos foram submetidos aos testes comportamentais realizados nos seguintes tempos: 30 minutos, 1, 2 e 4 horas após os tratamentos. Após o período de 4 horas, os animais foram eutanasiados, e coletado o córtex pré-frontal e medula espinhal para posterior análise. A medula foi seccionada no sentido longitudinal e armazenada em tubo plástico de refrigeração. A massa corporal dos animais foi monitorada diariamente (Figura 8).

Figura 8: Desenho da sequência experimental – Protocolo II.



Fonte: Ilustração elaborada pelo autor.

3.6 PROTOCOLOS COMPORTAMENTAIS

Para avaliar a efetividade do tratamento com PPX no desenvolvimento da FM, os seguintes testes comportamentais foram utilizados:

3.6.1 Teste de campo aberto

O teste de campo aberto (*open field*) foi desenvolvido por Calvin Hall em 1934, e foi utilizado para avaliar a atividade locomotora espontânea dos camundongos. Resumidamente, cada animal foi colocado no centro do aparato experimental consistindo em caixa de acrílico com piso branco dividido em quadrados do mesmo tamanho. O teste foi gravado durante 5 minutos utilizando câmera (8 Megapixels, Apple). Dois parâmetros motores foram avaliados: frequência de locomoção (isto é, o número de passagens de um quadrante para outro) e número de levantamentos de patas dianteiras. O aparato experimental foi higienizado com etanol 10% antes, e entre os testes comportamentais para eliminar possíveis odores deixados por outros animais (ZHAO et al., 2015). O teste foi realizado nos dias 4 e 14 do protocolo – após o tratamento com PPX. Todos os animais foram testados no campo aberto (1 hora após a primeira injeção diária do PPX) para observar os efeitos (sub) crônicos da administração da droga (BREUER et al., 2009).

3.6.2 Dor térmica ao calor

De acordo com o protocolo de dor térmica ao calor (*tail flick*) descrito por D'Amour e Smith em 1941 e citado por Cecília e colaboradores (2014), os testes foram realizados utilizando banho-maria com temperatura de $48 \pm 1^\circ\text{C}$ para imersão da cauda. No mesmo momento em que a cauda foi colocada na fonte térmica, o cronômetro foi disparado, sendo que o tempo até a retirada da cauda (período de latência) foi utilizado como determinação do índice de nocicepção, observando o tempo máximo de 10 segundos de imersão para evitar possíveis danos teciduais (CECÍLIA et al., 2014). O teste foi realizado no dia 0 (basal) e dias 3, 4, 9 e 14 do protocolo, após o tratamento com o PPX.

3.6.3 Hipersensibilidade mecânica (*von Frey*)

Este método descrito por Chaplan e colaboradores (1994) foi utilizado para avaliar a alodínia mecânica dos animais, conforme descrito anteriormente por Nagakura e

colaboradores (2018). Os animais foram aclimatizados no aparato 1 hora antes do teste. O teste baseia-se na pressão máxima necessária para que o animal demonstre sensibilidade ao contato com sua pele. Cada animal foi colocado em gaiola transparente com piso de malha de metal. A hiperalgesia foi avaliada através do filamento de *von frey* (0,4 g) pelo método de frequência de retirada, o qual foi aplicado na superfície plantar da pata traseira direita (NAVRATILOVA et al., 2020). A retirada da pata após pressão do filamento foi definida como resposta positiva, e a falta de retirada da pata no período de 6 segundos foi definida como resposta negativa (OE et al., 2010). O teste foi realizado no dia 0 (basal) e dias 3, 4 e 9 do protocolo experimental, além disso, foi repetido no dia 14 do protocolo experimental.

3.6.4 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado (TNF) foi desenvolvido por (PORSOLT et al., 1977) e consiste em observar o comportamento do animal frente a um estresse agudo que não há possibilidade de escapatória, o que remete um comportamento tipo-depressivo dos roedores e, posteriormente, desenvolvimento de opções terapêuticas para o tratamento da depressão. O modelo sugere que a observação do tempo em que o animal permanece imóvel quando é submetido a uma situação da qual não há escapatória, fornece evidência de comportamento tipo-depressivo. Resumidamente, os animais foram forçados a nadar individualmente em recipiente cilíndrico aberto (diâmetro 10 cm x altura 25 cm), contendo 19 cm de água a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O tempo de imobilidade foi avaliado pelo período de 6 minutos. Os animais foram considerados imóveis quando pararam de lutar para encontrar uma alternativa escapatória e permaneceram flutuando na água, fazendo apenas os movimentos necessários para manter a cabeça acima da água (LIEBERKNECHT et al., 2017). O teste foi realizado nos dias 6 e 11 do protocolo experimental.

3.6.5 Teste de borrifagem de solução de sacarose

Para avaliar o comportamento de autocuidado e anedonia, foi utilizado o teste de borrifagem de solução de sacarose (*splash test*). O teste foi realizado seguindo o protocolo previamente descrito por Isingrini e colaboradores (2010), com adaptações. Resumidamente, solução de sacarose a 10% foi pulverizada no dorso dos animais, posteriormente esses foram colocados individualmente em recipiente de vidro com saída de ar. Após pulverizar a solução

de sacarose, a latência para iniciar a autolimpeza foi registrada e usada como medida de autocuidado e comportamento motivacional. Ainda, foi estabelecido o período de 5 minutos para o registro do tempo total de limpeza, usado como indicativo de comportamento anedônico. O recipiente de vidro foi limpo com solução de etanol a 10% entre os testes, a fim de remover traços ou odor dos animais anteriores (LIEBERKNECHT et al., 2017). O teste foi realizado nos dias 5 e 13 do protocolo experimental.

3.5.6 Labirinto em cruz elevado

O teste de labirinto em cruz elevado (LCE) (PELLOW et al., 1985) foi realizado utilizando aparelho sem teto de dois braços abertos (35 x 5 cm) e dois braços fechados (35 x 5 x 15 cm), dispostos de modo que os dois braços de cada tipo sejam opostos um ao outro. O labirinto foi elevado a uma altura de 70 cm do chão (NAZERI et al., 2017). O camundongo foi colocado na área central do labirinto com a cabeça direcionada para um dos braços abertos e, em seguida, foi permitido explorar o labirinto livremente por 5 minutos. Qualquer visita subsequente a um dos quatro braços foi contada quando as quatro patas do animal entraram. O tempo gasto e o número total de entradas nos braços abertos foram necessários para avaliar a extensão da ansiedade. O labirinto foi higienizado com etanol a 10% entre os testes (NAZERI et al., 2017). O teste foi realizado dias 5 e 13 do protocolo experimental.

3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os animais foram eutanasiados no dia 5 do protocolo II com superdosagem de barbitúrico + anestésico local (pentobarbital 250 mg/kg + lidocaína 10 mg/ml, i.p.), e posteriormente coletados tecidos cerebrais (córtex pré-frontal e medula espinhal) para as análises bioquímicas. Para as análises, as amostras foram separadas e pesadas para dosagens de proteínas. O tecido foi adicionado em PBS e homogeneizado, através de triturador manual de tecidos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm durante 10 minutos (4°C), e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C para dosagens de monoaminas (BRUSCO et al., 2019). O pH do sobrenadante de cada amostra foi ajustado para 3,5 com acetato de sódio, posteriormente, filtrados e injetados em coluna de fase reversa com detector eletroquímico, conforme descrito previamente (NAGAKURA et al., 2009). A quantidade de DA na medula espinhal e córtex pré-frontal de todos os grupos experimentais foram dosadas

usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção fluorimétrica (320 nm com excitação a 279 nm), acoplado a bomba LC-20AT, amostrador automático SIL-20AHT, detector de fluorescência RF-20A e software LC solution Shimadzu (Kyoto, Japão). O teor de DA foi quantificado comparando as áreas dos picos das amostras com as áreas dos picos do padrão correspondente. Os resultados foram expressos como níveis de DA (em ng) por μ l da amostra.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism – versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA), através dos dados expressos como média +/- erro padrão da média (EPM). A análise comparativa entre as variáveis numéricas foi realizada utilizando a ANOVA de uma ou duas vias. Em seguida, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste *post-hoc* de *Bonferroni* ou *Newman-Keuls*. Valores de P menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos entre os diferentes grupos do protocolo experimental.

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir correspondem aos dois protocolos experimentais conduzidos neste trabalho, o protocolo I que consistiu no tratamento terapêutico e o protocolo II que inclui o tratamento utilizado para avaliar o efeito preditivo do PPX no modelo experimental de FM, ambos anteriormente detalhados.

No protocolo I, os animais foram submetidos a reexposição dos testes comportamentais, sendo embasada na literatura descrita por Schrader e colaboradores (2018). Os autores destacam que estabelecer a validade de testes comportamentais repetidos ao longo do tempo é de grande valor para a pesquisa neurocomportamental. Demonstraram ainda que testes comportamentais repetidos é válido em estudos bem controlados que incluem um grupo controle não tratado para explicar a variabilidade e habituação entre os ensaios (SCHRADER et al., 2018). A consequência predominante da repetição do estímulo é uma diminuição sistemática na frequência ou amplitude da resposta ao estímulo. Ao se comprovar que esse decréscimo não é causado por alterações fisiológicas nos níveis sensoriais ou motor, infere-se que ocorreu um fenômeno de aprendizagem, conhecido como habituação (URIBE-

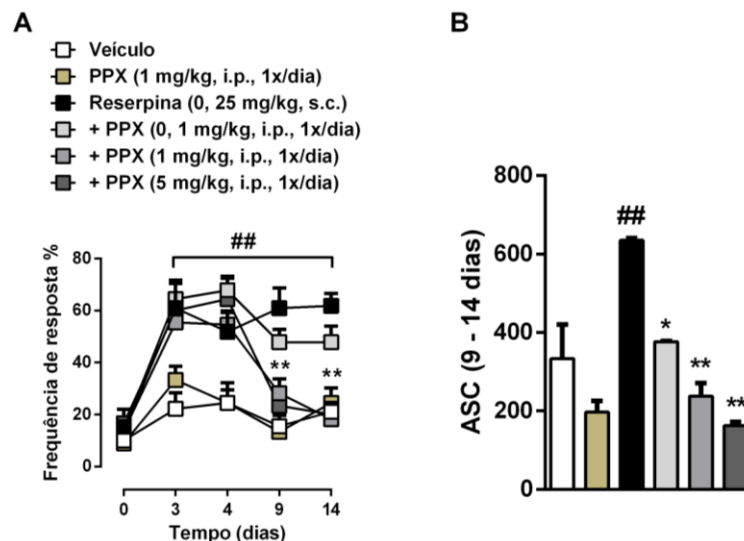
BAHAMONDE et al., 2019). É importante mencionar que o período entre os testes variou de 6 a 10 dias, com exceção do *tail flick* e *von Frey*.

Protocolo I

4.1 EFEITO DO PPX NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA INDUZIDA POR RESERPINA

De acordo com o protocolo I do modelo experimental de FM descrito acima utilizando reserpina, as avaliações da sensibilidade mecânica dos animais foram realizadas através do teste de filamentos de *von Frey*. A alteração do limiar teve início a partir da administração da reserpina (0,25 mg/kg, s.c., 1 x/dia por três dias). Adicionalmente, verificou-se que as doses de 1 e 5 mg/kg de PPX inibiram a redução do limiar nociceptivo provocada pela administração de reserpina, sendo que nos dias 9 e 14 esse efeito tornou-se mais evidente. Por outro lado, a dose de 0,1 mg/kg não apresentou o mesmo efeito (Figura 9).

Figura 9: Efeito antinociceptivo do PPX na alodínia mecânica no modelo experimental de FM induzido por reserpina.

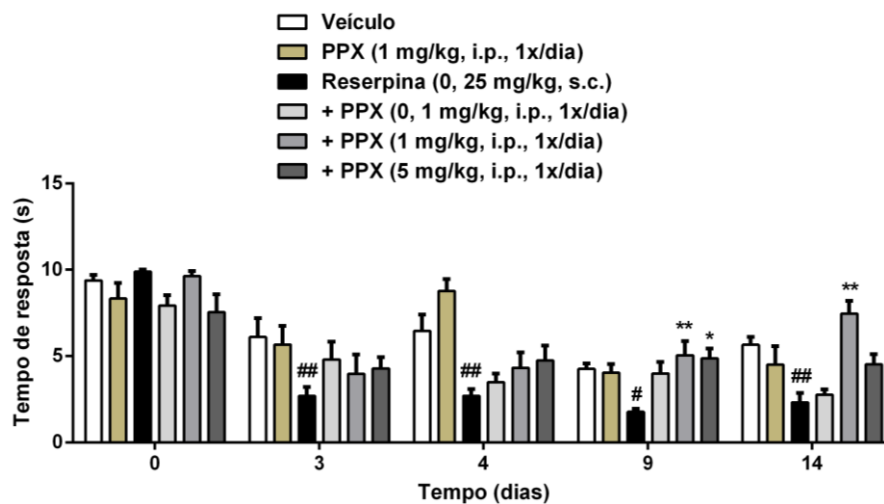


Efeito antinociceptivo do tratamento crônico com PPX no modelo experimental de FM induzido por reserpina. O teste para avaliar a hipersensibilidade mecânica foi realizado em todos os grupos nos dias 0 (basal), 3, 4, 9 e 14 do protocolo I. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=9 animais/grupo). O gráfico A apresenta a frequência de resposta dos grupos durante os dias de avaliação. Foi possível observar hipersensibilidade mecânica no grupo reserpina *versus* grupo veículo (###p<0,01). O grupo reserpina (0,25 mg/kg, s.c., 1x/dia) + PPX (1 mg/kg, i.p., 1x/dia) apresentou redução na hiperalgesia induzida pela reserpina (**p<0,01) quando comparado ao grupo controle reserpina não-tratado. No gráfico B é ilustrada a área sob a curva das frequências de resposta apresentada pelos grupos entre os dias 9 e 14, sendo que, todos os grupos tratados com PPX

apresentaram redução na hiperalgesia induzida pela reserpina. Os grupos reserpina + PPX 0,1, 1 mg/kg e + PPX 5 mg/kg apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo reserpina (** $p < 0,01$). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo reserpina *versus* grupos tratados com PPX, ## $p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo reserpina *versus* o grupo veículo.

Para avaliar se o PPX seria capaz de reduzir a hiperalgesia térmica ao calor no modelo experimental de FM, os animais foram avaliados em diferentes dias do protocolo, através do teste de sensibilidade térmica ao calor (*tail flick*). Conforme ilustrado na Figura 10, nos dias 9 e 14, o tratamento com PPX (1 e 5 mg/kg) inibiu a hiperalgesia térmica quando comparado ao grupo reserpina + veículo, com destaque para a dose de 1 mg/kg que inibiu significativamente este comportamento em ambos os dias de análise. Já o grupo tratado com PPX (0,1 mg/kg) não apresentou efeito no parâmetro analisado (Figura 10).

Figura 10: Efeito antinociceptivo do PPX na sensibilidade térmica no modelo experimental de FM induzido por reserpina.



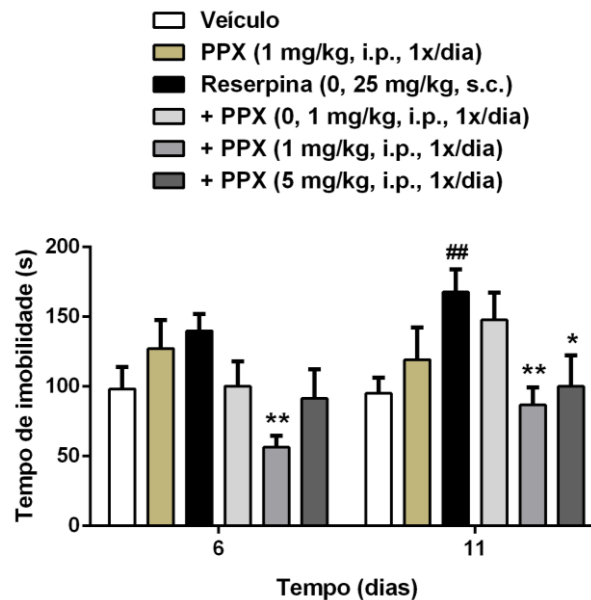
O teste de *tail flick* foi aplicado em todos os grupos nos dias 0 (basal), 3, 4, 9 e 14 do protocolo I, a fim de avaliar a sensibilidade térmica dos animais. Os dados são apresentados como média \pm EPM ($n=9$ animais/grupo). ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de *Bonferroni*. O gráfico demonstra que o grupo tratado somente com reserpina apresentou hipersensibilidade térmica quando comparado ao grupo veículo. ## $p < 0,01$ representa a diferença estatística entre o grupo reserpina *versus* o grupo veículo. O tratamento com PPX 1 e 5 mg/kg reduziu a hipersensibilidade térmica induzida pela reserpina quando comparado ao grupo controle não-tratado, particularmente, nos dias 9 e 14. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ representam a diferença estatística entre o grupo reserpina *versus* grupos tratados com PPX.

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO CONTÍNUO COM PPX NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO POR RESERPINA

Para investigar o efeito do PPX no comportamento tipo-depressivo induzido pela reserpina, os animais foram submetidos ao teste de nado forçado (TNF). Aqui, a

administração repetida do PPX preveniu o comportamento tipo-depressivo induzido por reserpina no TNF (Figura 11). O PPX (1 mg/kg) mostrou-se eficaz na redução do tempo em que os animais permaneceram imóveis nos dias 6 e 11 do protocolo experimental, enquanto a dose de 5 mg/kg apresentou diferença significativa apenas no dia 11 do protocolo em comparação ao grupo reserpina. O grupo tratado com PPX (0,1 mg/kg) não apresentou diferença significativa no modelo experimental de reserpina nos animais submetidos ao TNF (Figura 11).

Figura 11: Efeitos do tratamento com PPX no comportamento tipo-depressivo induzido por reserpina.

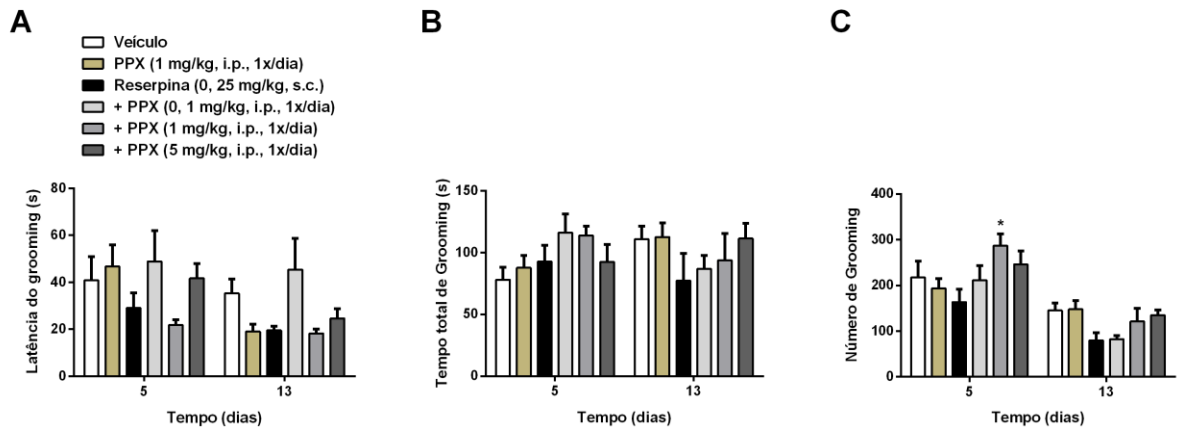


O TNF foi realizado nos dias 6 e 11 do tratamento terapêutico. Os dados são apresentados como média \pm EPM ($n=9$ animais/grupo). ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de *Bonferroni*. O gráfico mostra que o tratamento com PPX 1 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade nos animais quando comparado ao grupo reserpina (0,25 mg/kg, s.c., 1x/dia) (** $p < 0,01$) nos dias 6 e 11 do protocolo. Enquanto o tratamento com PPX na dose de 5 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade apenas no dia 11 quando comparado ao grupo reserpina (* $p < 0,05$). Quando analisado o grupo reserpina *versus* veículo a diferença estatística entre os grupos foi de $###p < 0,001$. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo reserpina *versus* grupos tratados com PPX, $###p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo reserpina *versus* o grupo veículo.

Similarmente ao TNF, foi realizado neste projeto o teste de borrifagem de solução de sacarose com o objetivo de investigar o potencial do PPX no efeito anedônico durante o modelo experimental de FM induzido por reserpina. Aqui, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos na latência de *grooming* (tempo até o primeiro comportamento de autolimpeza), bem como no tempo total de *grooming* (tempo em que os animais permaneceram fazendo autolimpeza). Pontualmente, observou-se diferença significativa no

número de *grooming* nos animais tratados com PPX (1 mg/kg), quando comparado ao grupo controle (Figura 12).

Figura 12: Efeito do tratamento com PPX em animais induzidos ao modelo experimental de FM por reserpina no teste de Borrifagem de solução de sacarose.

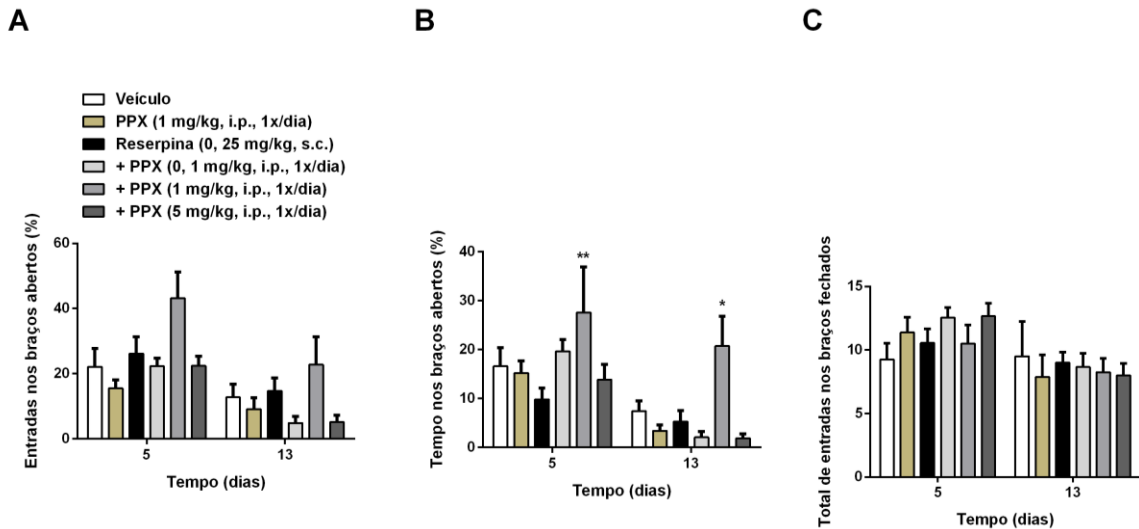


O tratamento com PPX inibiu o comportamento anedônico dos animais no modelo experimental de FM nas doses de 1 e 5 mg/kg i.p. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=9 animais/grupo). ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ representa a diferença estatística entre o grupo reserpina *versus* PPX.

5.3 EFEITO DO TRATAMENTO CONTÍNUO COM PPX NO COMPORTAMENTO ANSIOGÊNICO INDUZIDO PELA RESERPINA

Aqui, buscou-se avaliar o efeito do PPX no comportamento ansiogênico induzido pela reserpina. No teste de labirinto em cruz elevado, o PPX (1 mg/kg, i.p) induziu aumento do percentual de entradas no braço aberto nos dias 5 e 13 do protocolo (Figura 13A). Além disso, os animais tratados com PPX apresentaram aumento significativo no percentual de tempo gasto nos braços abertos em ambos os dias de teste, quando comparado aos animais controles nos dias 5 e 13 (Figura 13B). Ainda, o tratamento com PPX não alterou o percentual de entradas no braço fechado, demonstrando assim que o agonista dopaminérgico não interferiu com o comportamento motor dos animais (Figura 13).

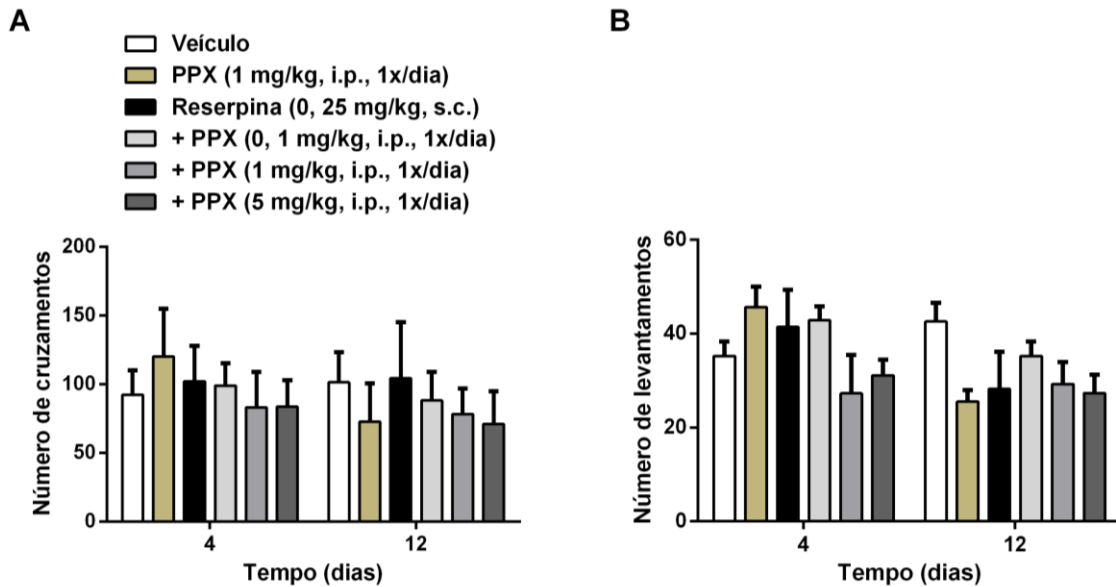
Figura 13: Efeito do tratamento com PPX no teste de labirinto em cruz elevado em animais induzidos ao modelo experimental de FM por reserpina.



A figura 13 apresenta o efeito do PPX (A, B e C) no teste de labirinto em cruz elevado (LCE) após a indução da FM. Nos dias 5 e 13 do tratamento terapêutico foi realizado o LCE para verificar o efeito do PPX no comportamento exploratório dos animais. O tratamento com PPX (1 mg/kg, i.p., 1x/dia) aumentou o % do tempo de permanência nos braços abertos, indicando redução no comportamento ansiogênico induzido pela reserpina. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=9 animais/grupo). ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de *Bonferroni*. $**p < 0,01$ no dia 5 e $*p < 0,05$ no dia 13 representam a diferença estatística entre o grupo reserpina (0,25 mg/kg, s.c., 1x/dia) *versus* grupos tratados com PPX. Nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar o número de entradas nos braços abertos e/ou fechados.

Posteriormente, utilizou-se o teste de campo aberto (TCA), a fim de investigar o comportamento motor dos animais após o tratamento com PPX. Conforme ilustrado na Figura 14, o tratamento com PPX não alterou o padrão motor dos animais durante o modelo experimental de FM induzido pela administração de reserpina.

Figura 14. Efeito do tratamento com PPX no comportamento motor após a administração da reserpina

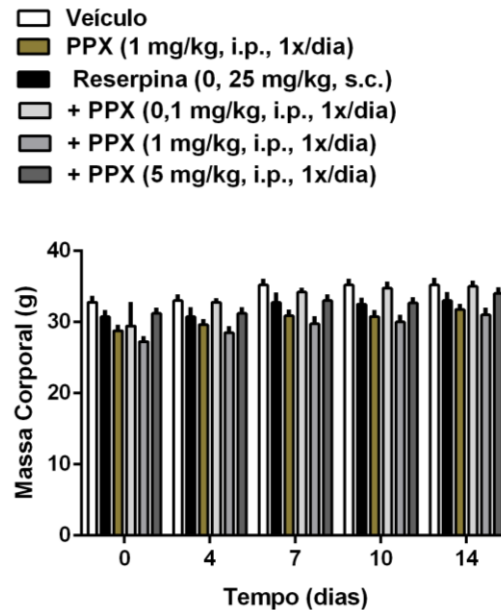


No teste de campo aberto usado para investigar o comportamento motor dos animais, avaliou-se dois parâmetros, o número de cruzamento (A) e o número de levantamentos de patas (B). A figura A e B ilustra que não houve alteração significativa na atividade locomotora dos camundongos do grupo reserpina, assim como dos animais tratados com PPX. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=9 animais/grupo).

5.4 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS NO PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE FM

O peso corporal dos animais (g) foi monitorado diariamente após a indução da FM. Os resultados apresentados na Figura 15 demonstram que a indução da FM e/ou tratamento com PPX não alterou o peso corporal dos animais.

Figura 15: Avaliação da massa corporal dos animais.



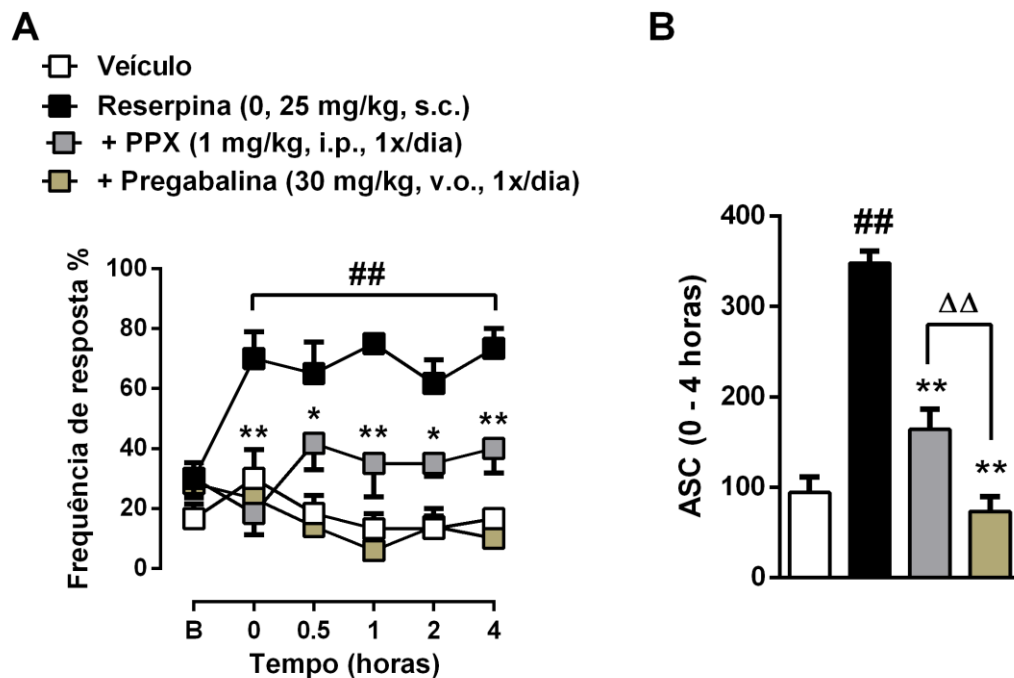
No protocolo I (tratamento terapêutico) o peso corporal dos animais foi monitorado no período de 15 dias. Inicialmente, no dia 0 do protocolo, os animais foram pesados e a medida foi usada como basal. Posteriormente, os animais foram pesados nos dias 4, 7, 10 e 14 do protocolo experimental. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=9 animais/grupo).

Protocolo II

5.5 EFEITO DO PPX NA HIPERALGESIA MECÂNICA E TÉRMICA NO MODELO EXPERIMENTAL DE FM

Inicialmente, avaliou-se o efeito anti-hiperalgésico do tratamento preditivo repetido com PPX durante a gênese do modelo experimental de FM. Assim, do dia 1 ao dia 3 foi realizada a indução da FM utilizando reserpina – dose de (0,25 mg/kg, s.c) 1x/dia, durante 3 dias consecutivos. Após 30 minutos da administração da reserpina, os grupos receberam o tratamento com PPX (1 mg/kg, i.p.; 1x/dia). No dia 4, os animais foram submetidos aos testes comportamentais antes da administração dos fármacos/veículos (basal do dia 4), e após administração esses foram avaliados nos seguintes tempos: 30 minutos, 1, 2 e 4 horas após os tratamentos. Os dados apresentados na Figura 16 A e B ilustram que a administração de reserpina (0,25 mg/kg s.c) durante três dias consecutivos induziu hiperalgesia mecânica no terceiro dia de indução. Por outro lado, o tratamento agudo e repetido com PPX inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pela reserpina, similarmente ao tratamento com pregabalina – usado como controle positivo e padrão-ouro para o tratamento da FM (Figura 16).

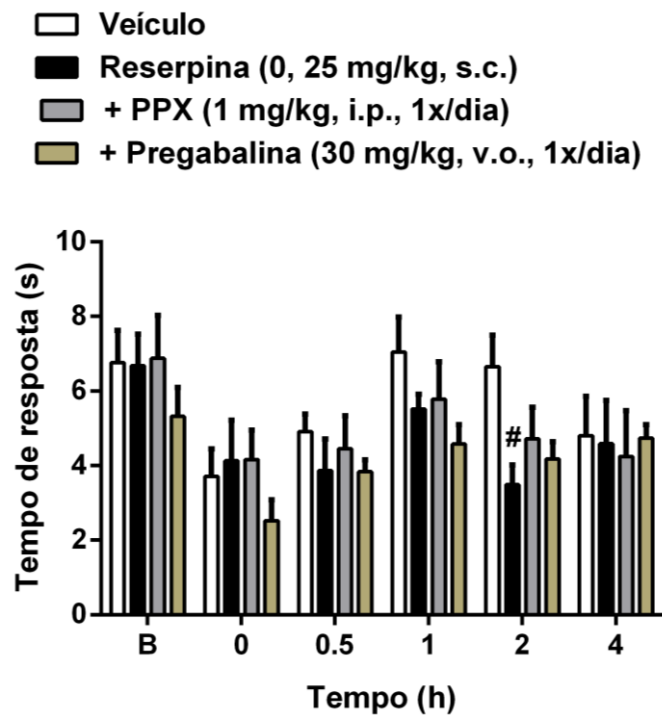
Figura 16: Efeito antinociceptivo do PPX na hiperalgesia mecânica no modelo experimental de FM induzido por reserpina.



Efeito antinociceptivo do tratamento agudo e repetido com PPX no modelo experimental de FM induzido por reserpina. A avaliação da sensibilidade mecânica dos animais foi realizada em todos os grupos no 4º dia do tratamento preventivo durante 4 horas, além, da medida basal. As medidas foram efetuadas após a administração do PPX; 30 minutos; 1; 2 e 4 horas após o último tratamento com PPX. Neste experimento, o tratamento com pregabalina (30 mg/kg, v.o., 1x/dia) foi utilizado como controle positivo. O gráfico **A** apresenta a frequência de resposta dos grupos durante as avaliações, sendo que, o grupo tratado com PPX inibiu a hiperalgesia mecânica induzida pela reserpina (* $p < 0,05$; nos tempos 0,5 e 2 horas; e ** $p < 0,01$ nos tempos de 1 e 4 horas quando comparado ao grupo tratado com reserpina). O gráfico **B** apresenta a área sob a curva das frequências de resposta nas 4 horas, sendo que, tanto o grupo tratado com PPX quanto o grupo tratado com pregabalina reduziram a hiperalgesia mecânica induzida pela reserpina (** $p < 0,01$). Os dados são apresentados como média \pm EPM ($n=6$ animais/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo reserpina *versus* grupos tratados com PPX ou pregabalina, ## $p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo reserpina *versus* o grupo veículo. $\Delta\Delta p < 0,01$ representa a diferença estatística entre o grupo tratado com PPX *versus* o grupo tratado com pregabalina.

A Figura 17 ilustra o efeito do PPX na sensibilidade térmica ao calor no modelo de FM induzida por reserpina. Os dados apresentados na Figura 17 demonstram que a administração da reserpina induziu hiperalgesia térmica quando comparada ao grupo veículo, particularmente no tempo de 2 horas. O tratamento agudo e repetido com PPX, assim como a administração da pregabalina, não demonstrou efeito na sensibilização térmica induzida pela reserpina (Figura 17). Em conjunto, esses dados sugerem que a administração do PPX durante a gênese da doença parece modular, particularmente, a hiperalgesia mecânica induzida pela reserpina.

Figura 17: Efeito antinociceptivo do PPX na sensibilidade térmica no modelo experimental de FM induzido por reserpina.

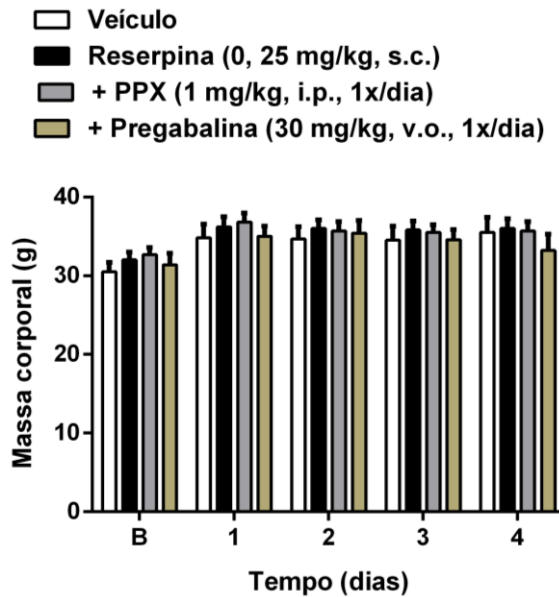


O tratamento preventivo com PPX não alterou a sensibilização térmica induzida pelo modelo experimental da FM. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=6 animais/grupo). ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de *Bonferroni*, [#]p<0,0001 reserpina *versus* grupo tratado com veículo.

5.6 AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS NO PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE FM

O peso corporal dos animais foi monitorado diariamente no tratamento preventivo. Conforme a Figura 18 observa-se que o modelo experimental e/ou tratamento preventivo com PPX ou pregabalina não apresentaram diferença significativa na massa corporal dos animais no desenho experimental proposto.

Figura 18: Avaliação da massa corporal dos animais induzidos a FM por reserpina.

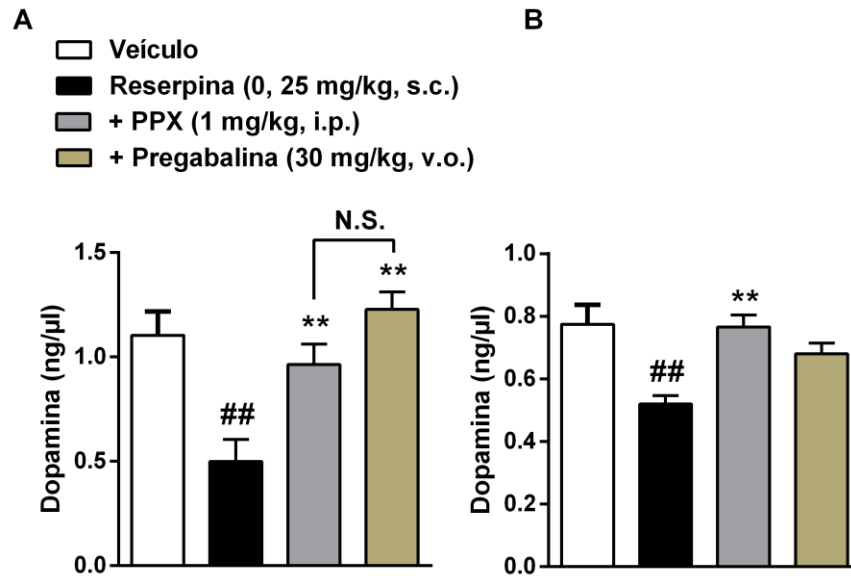


O peso corporal dos animais foi monitorado diariamente durante o desenho experimental proposto. No primeiro dia do protocolo, os animais foram pesados no qual a medida foi considerada como basal. Não foi possível observar diferença significativa no peso corporal dos animais. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=6 animais/grupo).

5.7 DOSAGENS DE MONOAMINAS EM TECIDOS CEREBRAIS

Como supramencionado, as aminas biogênicas, incluindo a DA, desempenham papel fundamental no comportamento, emoções, cognição e controle da dor, assim como indivíduos fibromiálgicos e roedores submetidos à administração da reserpina apresentam baixos níveis desses neurotransmissores no sangue e tecidos cerebrais (NAGAKURA et al., 2018). A Figura 19 ilustra os níveis da DA no córtex pré-frontal e medula espinhal dos animais induzidos ao modelo experimental de FM e tratados com PPX (1 mg/kg, i.p.). Os animais tratados apenas com reserpina apresentaram redução nos níveis de DA quando comparado aos animais tratados com veículo no córtex pré-frontal (Figura 19A) e medula espinhal (Figura 19B). De maneira significativa, o tratamento com PPX reestabeleceu os níveis de DA na medula espinhal e córtex pré-frontal após a indução da FM similarmente aos animais controles saudáveis (Figura 19 A e B).

Figura 19: Níveis de DA no córtex pré-frontal e medula espinal dos animais induzidos ao modelo experimental de FM



Os painéis acima ilustram o efeito do PPX nos níveis de DA no córtex pré-frontal (**A**) e medula espinal (**B**) após a administração da reserpina. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=6 animais/grupo). ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. ** $p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo reserpina *versus* grupos tratados com PPX, ## $p < 0,01$ representam a diferença estatística entre o grupo reserpina *versus* o grupo veículo. N.S.=não significativo.

5. DISCUSSÃO

A fibromialgia é caracterizada por dor musculoesquelética crônica generalizada e fadiga associada, distúrbios do sono e outros sintomas cognitivos e somáticos como depressão, ansiedade, alterações do sono e disfunção cognitiva também são sintomas frequentemente encontrados em pacientes com FM (BAIR; KREBS, 2020; PASSOS et al., 2020). Até o presente momento não há fisiopatologia clara definida para a FM, e ainda o diagnóstico e tratamentos são limitados, implicando na necessidade de se investigar novas alternativas terapêuticas para a doença. A terapia farmacológica utilizada para o tratamento sintomático da FM consiste em medicamentos que aumentam simultaneamente os níveis de 5-HT e NA (inibidores da recaptção de 5-HT – NA) no SNC (SLUKA; CLAUW, 2016). No presente estudo, a administração de reserpina induziu alterações comportamentais e bioquímicas nos animais, sendo observados a hiperalgesia mecânica e hipersensibilidade térmica. Por outro lado, foi possível observar alterações nos neurotransmissores monoaminérgicos como, por exemplo a DA.

Ainda, neste trabalho avaliou-se a participação dos receptores D3/D2 dopaminérgicos durante a gênese e progressão do modelo experimental de FM, visto que dados recentes

sugerem que a DA desempenha papel vital na modulação da dor no SNC (ALBRECHT et al., 2015), e o tratamento com agonistas dopaminérgicos inibiu a alodinia e hiperalgesia em modelos experimentais (YAO et al., 2019). Os mesmos autores apontam que a NA e 5-HT são neurotransmissores endógenos que desempenham papéis importantes na via analgésica descendente, com início na substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo até o término da medula espinhal. Alterações na expressão desses neurotransmissores (NA e 5-HT) resultam na geração de dor nociva. Tais evidências sugerem a DA como um fator neurobiológico fundamental associado aos sintomas de dor crônica e depressão (YAO et al., 2019) estando em acordo com os resultados desse estudo, o qual foi observado que a modulação da concentração de DA, bem como a ativação dos receptores D3/D2 foi capaz de inibir e reverter o desenvolvimento da dor nos protocolos de tratamentos preventivo e terapêutico, respectivamente, observados nos testes comportamentais (*von Frey e tail flick*). Em conjunto, esses dados reforçam os achados descritos na literatura no qual destacam que há intensificação dos sintomas de dor central em indivíduos com FM (NEUMEISTER et al., 2020).

Associado a isso, Albrecht e colaboradores (2015) destacaram que além do possível papel na nocicepção, a DA também é essencial para a função cognitiva. Portanto, a DA pode mediar o comprometimento cognitivo frequentemente relatado por pacientes com dor crônica. No estudo desenvolvido pelos autores supramencionados, eles buscaram caracterizar o sistema dopaminérgico em pacientes do sexo feminino diagnosticados com FM. Para isso, os autores utilizaram tomografia por emissão de pósitrons para avaliar as mudanças nas vias da DA e testar as associações entre receptores os D3/D2 com medidas experimentais de dor (ALBRECHT et al., 2015). O estudo de Arnold e colaboradores (2019) confirmou esses achados relatando que, durante os estímulos dolorosos, foi observado alterações de atividades nas principais áreas nociceptivas (por exemplo, o tronco encefálico – origem da via analgésica descendente), bem como em regiões previamente identificada como fonte potencial de inibição disfuncional da dor na FM. Como já citado, a ativação funcional e a conectividade dos sinais inibitórios da dor endógena estão alteradas nos pacientes com FM (o que significa que há um desequilíbrio entre os diferentes sistemas nociceptivos e antinociceptivos) (SARZI-PUTTINI et al., 2020).

Especificamente, em estudo clínico, os autores avaliaram diferentes genótipos da enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) (envolvida na degradação de neurotransmissores catecolaminérgicos) na saliva de pacientes com FM. É interessante discutir, nesse sentido, que

a alta atividade enzimática da COMT, ocasiona maior degradação da DA, tal como ocorre nos pacientes com FM (FERREIRA et al., 2020). Considerando que alterações em vias descendentes da dor já foram descritas na literatura (WAWRZCZAK-BARGIEŁA et al., 2020), assim como a expressão alterada de enzimas de degradação diretamente implicadas na neurotransmissão dopaminérgica, e que a reserpina degrada as aminas biogênicas (NAGAKURA et al., 2009), os resultados obtidos com a administração de agonistas dopaminérgicos evidencia que os processos neurais mediados pela DA desempenham papéis importantes na regulação de sistemas descendentes para o controle da nocicepção (já que com a administração do PPX foi possível observar redução da hipersensibilidade mecânica e térmica) nos testes comportamentais, bem como na resposta à experiência de dor crônica no modelo experimental de FM. Isso poderia estar relacionado ao fato de que indivíduos com FM apresentam menor disponibilidade de ligação da expressão de receptores dopaminérgicos D3/D2 bem como, da expressão de DA em relação a controles saudáveis (SLUKA; CLAUW, 2016).

Os resultados atuais do presente estudo sugerem possível envolvimento direto da via dopaminérgica na gênese e progressão experimental da FM, sendo possível sugerir que o sistema dopaminérgico representa alvo potencial no tratamento da dor crônica, e os efeitos analgésicos de diferentes fármacos podem ser dependentes da atividade nos circuitos descendentes (BANNISTER; DICKENSON, 2016). Em concordância, Serafini e colaboradores (2020) revisaram diferentes estudos pré-clínicos demonstrando que estímulos nocivos afetam a liberação de DA no centro de recompensa do cérebro. Consistentemente com as observações em estudos humanos, estados de dor crônica em roedores culminam com uma redução na liberação de DA no NAc, e o alívio da dor está associado a níveis aumentados de DA nessa estrutura cerebral (SERAFINI et al., 2020). Nesse sentido, a modulação do sistema dopaminérgico mesolímbico está associada à diminuição da dor (MITSI et al., 2016).

A reserpina induz a depleção das monoaminas cerebrais, que por sua vez induz a redução da atividade locomotora espontânea que reflete em prejuízo na função motora. O teste de campo aberto é um dos métodos comportamentais mais comuns e amplamente utilizado para a avaliação da atividade locomotora em estudos pré-clínicos (YAO et al., 2019). Em concordância, Brusco e colaboradores (2019) realizaram estudo no qual investigaram o envolvimento das cininas e seus receptores no modelo experimental de reserpina em camundongos. Nesse estudo os autores não observaram alteração na atividade

locomotora nos animais após a administração de reserpina (1 mg/kg) no teste do campo aberto. Em conformidade com o estudo realizado por Brusco e colaboradores (2019), nesse estudo não foi possível observar alterações na atividade locomotora dos animais submetidos ao modelo experimental de FM. Por outro lado, tais achados reforçam que o modelo experimental utilizando reserpina como indutor de hiperalgesia/comportamento tipo-depressivo em camundongos, apresentou resultados significativos em comparação com os principais sintomas associados a pacientes com FM.

Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa demonstrou efeito antidepressivo dos receptores D3/D2 no modelo experimental de depressão induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (modelo inflamatório de depressão). Lieberknecht e colaboradores (2017) identificaram propriedades neuroprotetoras e imunomoduladoras do agonista D3/D2 preferencial da DA. Além disso, os autores descreveram que esse agonista dopaminérgico pode induzir efeito semelhante aos antidepressivos clássicos usados na clínica (Duloxetina/Fluoxetina), visto que o tratamento com o PPX inibiu o comportamento tipo-depressivo no teste de suspensão pela cauda (TSC) bem como, o comportamento anedônico no teste de borrifagem de solução de sacarose (*splash test*). Em consonância, já foi relatado na literatura que inibidores da recaptação de 5-HT e NA são eficazes para os tratamentos dos sintomas da depressão e dor em pacientes com FM, sugerindo que a depleção da 5-HT poderia ser uma explicação plausível responsável pelos episódios depressivos no decurso temporal da doença (SINGH et al., 2019). Portanto, os resultados desse estudo referente à alteração do comportamento tipo-depressivo bem como aqueles relacionados à dor induzido por reserpina podem estar associados à modulação dos receptores D3/D2. Nesse estudo foi possível observar ainda que o agonista D3/D2 dopaminérgico inibiu o comportamento tipo-depressivo induzido pela reserpina, no TNF e *splash test*, reforçando que o PPX bloqueia o comportamento anedônico nos animais. Importaneamente, em humanos o comportamento anedônico está, intimamente, associado a depressão, também presente na FM. Ainda, dados anteriores sugerem que a dor crônica e a depressão apresentam alterações semelhantes na neuroplasticidade e envolvem mecanismos neurobiológicos sobrepostos; visto que neurotransmissores monoaminérgicos estão diminuídos em indivíduos com dor crônica e depressão. Além disso, as regiões do cérebro envolvidas nas vias da dor, como o córtex pré-frontal, o hipocampo e a amígdala, são semelhantes às envolvidas nos transtornos do humor. À medida que a dor se transforma em uma condição crônica, estados emocionais negativos podem ser acompanhados por outros distúrbios emocionais, como ansiedade, anedonia e déficits cognitivos (YANG et al., 2019).

Conforme supramencionado, a sinalização dopaminérgica tem sido implicada no comportamento semelhante à ansiedade, presumivelmente por meio de áreas de projeção da DA do mesencéfalo para o hipocampo, amígdala estendida e córtex pré-frontal, dentre outras regiões do cérebro (DEGROOT et al., 2020). Ainda, Zarrindast e Khakpai (2015) sugerem que diferentes regiões do cérebro estão envolvidas na modulação e expressão da ansiedade, incluindo a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal. Os autores destacam ainda que existem evidências de que a circuitaria dopaminérgica mesolímbica, mesocortical e nigroestriatal estão envolvidas no controle da ansiedade (ZARRINDAST; KHAKPAI, 2015). Nesse contexto, no teste do labirinto em cruz elevado utilizado para avaliar o comportamento ansiogênico nos animais, o tratamento com PPX aumentou o tempo de permanência no braço aberto sugerindo, portanto, que esse agonista dopaminérgico (D3/D2) controla o comportamento ansiogênico durante o desenvolvimento da FM através da circuitaria dopaminérgica. Embora existam pesquisas que demonstram consistentemente níveis reduzidos de 5-HT central nos pacientes com FM e em modelos animais, evidências emergentes sugerem que a DA poderia ser outro fator crucial envolvido na dor, ansiedade e depressão, ambos associados à FM (HERNANDEZ-LEON et al., 2019).

Apesar da fisiopatologia da FM ainda não ter sido totalmente elucidada, o tratamento com Pregabalina é uma das principais abordagens terapêuticas recomendadas (BRUSCO et al., 2019). Ainda, de acordo com CROSS e colaboradores (2020), a Pregabalina é estruturalmente semelhante ao neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA). Esse fármaco foi modificado para ser análogo lipofílico objetivando aumentar a difusão através da barreira hematoencefálica. Fármacos como Pregabalina e Gabapentina atuam na FM, em parte, reduzindo a atividade glutamatérgica. Já foi demonstrado que indivíduos com FM que apresentam níveis pré-tratamento de glutamato elevados na ínsula posterior foram os mais responsivos à Pregabalina (ARNOLD et al., 2018). Em conjunto, tais achados sugerem que esse neurotransmissor desempenha papel fundamental na patogênese da FM. No entanto, mesmo a Pregabalina sendo aprovada pela FDA para o tratamento de dor neuropática, FM e outros tipos de dores, torna-se importante destacar que essa droga aumenta significativamente o risco de eventos adversos, incluindo ganho de peso, sonolência, tontura, boca seca, edema periférico, fadiga, distúrbios visuais, ataxia, edema não periférico, vertigem e euforia (ONAKPOYA et al., 2019).

Outro fator interessante descrito por Nagakura e colaboradores (2018) foi que animais induzidos a FM utilizando reserpina apresentaram redução na evolução do estado

geral do corpo, ou seja, do peso corporal. Para os autores, os animais que receberam as doses de reserpina (0,5 mg/kg) apresentaram significativa perda de peso quando comparado ao grupo controle. No mesmo estudo foi avaliado o peso corporal dos animais do grupo que recebeu reserpina na dose de 0,25 mg/kg, e nessa concentração os autores não observaram diferença significativa quando comparado ao grupo controle. Esses resultados corroboram com os dados obtidos no nosso estudo, os quais não foi possível observar diferença significativa na massa corporal dos animais tratados com reserpina 0,25 mg/kg (s.c) quando comparados ao grupo controle.

Dentre as respostas fisiológicas associadas a FM, o esgotamento das aminas biogênicas possui consistência na literatura atual no que se refere à fisiopatologia da doença. Estudos já mostraram que indivíduos com FM apresentam baixos níveis de DA, 5-HT e NA (RUS et al., 2018). Portanto, os sintomas da FM podem ser resultados do comprometimento desses neurotransmissores. Isso reflete o que já foi descrito por Sarzi-Puttini e colaboradores (2020). Nesse, os autores descrevem que para manter a hipoatividade das vias analgésicas descendentes durante a FM, os níveis dos neurotransmissores noradrenérgicos e serotoninérgicos no fluido biológico de pacientes com FM são menores do que em indivíduos saudáveis, e a atividade dopaminérgica cerebral durante a estimulação dolorosa está diminuída (SARZI-PUTTINI et al., 2020). Aqui, as análises bioquímicas demonstraram de maneira significativa que a reserpina diminuiu consideravelmente a expressão de DA na medula espinhal e córtex pré-frontal de camundongos, e após o tratamento com PPX (1 mg/kg) foi possível observar que a expressão de DA nos tecidos cerebrais analisados (medula espinhal e córtex pré-frontal) dos animais tratados com reserpina foram restaurados. Conforme descrito na literatura, farmacologicamente, os agonistas dopaminérgicos possuem alta afinidade e atuam ligando-se seletivamente aos receptores D2 da DA.

As concentrações de PPX utilizadas neste estudo apresentaram efeitos divergentes em diferentes testes comportamentais realizados. Foi possível observar que o PPX na concentração de 1 mg/kg i.p promoveu melhor efeito, portanto, para o tratamento preditivo optou-se por utilizar a dose de 1 mg/kg do agonista dopaminérgico. Em um estudo publicado por Orrù e colaboradores (2020) no qual utilizaram diferentes doses de agonista dopaminérgicos, os resultados mostraram que dosagens mais baixas de D2R pode causar hipolocomoção ou catalepsia no modelo animal de reserpina, enquanto doses mais altas de D3R levaram a uma redução de comportamento nos testes realizados. Apesar dos resultados obtidos neste estudo utilizando o PPX, ainda não foi possível elucidar totalmente os

mecanismos responsáveis pelo aumento da expressão de DA nos tecidos cerebrais analisados, mas pode-se refletir parcialmente uma resposta compensatória a mudanças significativas na liberação de DA mesolímbica. Em analogia aos resultados obtidos por Orrú e colaboradores (2020) esses dados podem refletir um mecanismo mais complexo, provavelmente envolvendo adaptações neuroplásticas a estimulação subcrônica dos alvos envolvidos (ORRÚ et al., 2020).

Nesta perspectiva, Bravo e colaboradores (2019) evidenciaram que o aumento extracelular de NA e 5-HT contribui significativamente no controle e diminuição da dor crônica. De fato, a dor neuropática é comumente tratada com antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos da recaptação de 5-HT, e por gabapentinóides quando os antidepressivos são contraindicados (BRAVO et al., 2019). Apesar da importância de se realizar as dosagens de outros neurotransmissores envolvidos na sensibilização central, devido às limitações na execução deste estudo, não foi possível dosar os níveis de 5-HT e NA nos tecidos de interesse, comprometendo assim a confirmação da hipótese monoaminérgica desse projeto. Dado que o sistema monoaminérgico está intimamente associado a distúrbios como depressão e ansiedade, situações clínicas frequentemente associadas à dor crônica, o sistema monoaminérgico torna-se alvo farmacológico promissor no tratamento das alterações sensoriais e emocionais evidenciadas na dor crônica (BRAVO et al., 2019). Diante disso, os dados obtidos na literatura em conjunto com os achados experimentais deste projeto, reafirmam o efeito neuromodulador, antidepressivo, imunomodulador e antinociceptivo dos agonistas dopaminérgicos, particularmente, dos receptores D3/D2.

Posteriormente, tornar-se-á interessante avaliar a influência da DA, e particularmente dos receptores D3/D2, bem como de outras estruturas cerebrais, nas vias relacionadas ao controle da dor durante desenvolvimento da FM, através de técnicas histológicas e bioquímicas. Ainda, embora já existam evidências clínicas utilizando ressonância magnética na FM que demonstram disfunções neurais, com alterações na ativação cerebral provocadas pela dor experimental e alterações na conectividade do estado de repouso relacionadas à dor crônica, é necessário identificar quais dessas vias dopaminérgicas estão relacionadas a FM (ICHESCO et al., 2016). Outro ponto relevante seria avaliar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) na medula espinhal dos animais. Yildirim e colaboradores (2017) observaram redução dos níveis de catalase e glutathiona peroxidase em pacientes com FM, elucidando a relação do estresse oxidativo com a severidade da doença. Por conseguinte, correlações significativas foram observadas entre os

níveis plasmáticos e séricos de antioxidantes, dor e rigidez articular em pacientes fibromiálgicos, sugerindo que alguns sintomas presentes na FM podem estar associados ao desequilíbrio no estado redox (YILDIRIM et al., 2017).

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados do presente estudo demonstram que o agonista preferencial da DA (PPX) promoveu efeito antinociceptivo, antidepressivo e ansiolítico no modelo experimental de FM induzido pela reserpina. Esses resultados apoiam fortemente o potencial dos agonistas dopaminérgicos, bem como dos inibidores de recaptação de DA, 5-HT e NA no tratamento da dor, depressão e ansiedade (principais sintomas associados à FM na prática clínica) promovendo o aumento significativo dos neurotransmissores monoaminérgicos nesses pacientes. No entanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer sobre quais células o efeito neuromodulador do PPX ocorre, assim como avaliar o efeito dos agonistas dopaminérgicos nas diferentes vias de sinalização relacionadas ao D3/D2R, tais como: i) inibição da resposta mediada pelo receptor glutamatérgico NMDA e AMPA, ii) ativação dos canais de potássio sensíveis à voltagem; iii) modulação do influxo de cálcio/produção de BDNF; iv) modulação da via PI3K/Akt/NF- κ B/ERK1/2, as quais estão intimamente relacionadas a sensibilização central e periférica, bem como envolvidas nos transtornos de humor.

REFERÊNCIAS

- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.1, p.121-126, 1984.
- ALBRECHT, Daniel S.; MACKIE, Palmer J.; KAREKEN, David A. et al. Differential dopamine function in fibromyalgia. **Brain Imaging and Behavior**, v. 10, n. 3, p. 829-839, 24 out. 2015.
- ANDRADE, Alessandra Sousa Braz Caldas de. **Ensaio farmacológico clínico com extrato das raízes do *Panax ginseng* C. A. Meyer no tratamento da fibromialgia**. Tese (doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde / Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Programa de Pós- graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, João Pessoa, 2009.
- ASHBY, F. G.; VALENTIN, V. V.; VON MEER, S. S. Differential effects of dopamine-directed treatments on cognition. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 11, p. 1859–1875, 2015.

ATZENI F; TALOTTA R; MASALA IF. et al. One year in review 2019: fibromyalgia. **Clin Exp Rheumatol**, v. 37, p. 0003 - 0010, 2019.

ARNOLD, Lesley M.; BENNETT, Robert M.; CROFFORD, Leslie J. et al. AAPT Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. **The Journal of Pain**, v. 20, n. 6, p. 611-628, 2019.

BANNISTER, Kirsty; DICKENSON, Anthony H. What do monoamines do in pain modulation? **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 10, n. 2, p. 143-148, 2016.

BÁN, E.G; BRASSAI, A.; VIZI, E.S. The role of the endogenous neurotransmitters associated with neuropathic pain and in the opioid crisis: the innate pain-relieving system. **Brain Research Bulletin**, v. 155, p. 129-136, 2020.

BAIR, Matthew J.; KREBS, Erin E. Fibromyalgia. **Annals of Internal Medicine**, v. 172, n. 5, p. 33, 2020.

BARAKAT, Ahmed; HAMDY, Mostafa M.; ELBADR, Mohamed M. Uses of fluoxetine in nociceptive pain management: a literature overview. **European Journal of Pharmacology**, v. 829, p. 12-25, 2018.

BECKER, Susanne; SCHWEINHARDT, Petra. Dysfunctional Neurotransmitter Systems in Fibromyalgia, Their Role in Central Stress Circuitry and Pharmacological Actions on These Systems. **Pain Research and Treatment**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

BELLATO, Enrico; MARINI, Eleonora; CASTOLDI, Filippo et al. Fibromyalgia Syndrome: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Pain Research and Treatment**, v. 2012, p. 1-17, 2012.

BEPPLER, Larissa May. **Efeito do extrato hidroalcoólico da planta *polygala paniculata* no modelo de fibromialgia induzido pela reserpina em camundongos: avaliação sensorial e emocional**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós - Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2018.

BRAVO, Lidia; LLORCA-TORRALBA, Meritxell; BERROCOSO, Esther. et al. Monoamines as Drug Targets in Chronic Pain: focusing on neuropathic pain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 100-110, 2019.

BREUER, Megan E.; GROENINK, Lucianne; OOSTING, Ronald S. et al. Antidepressant effects of pramipexole, a dopamine D3/D2 receptor agonist, and 7-OH-DPAT, a dopamine D3 receptor agonist, in olfactory bulbectomized rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 616, n. 1-3, p. 134-140, 2009.

BRUM, Evelyne da Silva; FIALHO, Maria Fernanda Pessano; FISCHER, Susana Paula Moreira et al. Relevance of Mitochondrial Dysfunction in the Reserpine-Induced Experimental Fibromyalgia Model. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 10, p. 4202-4217, 2020.

BRUSCO, Indira; JUSTINO, Allisson Benatti; SILVA, Cássia Regina et al. Kinins and their B1 and B2 receptors are involved in fibromyalgia-like pain symptoms in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 168, p. 119-132, 2019.

CECÍLIA, F. V. S; MURGAS, L. D. S. Métodos de avaliação laboratorial da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de produtos naturais. **Boletim Técnico**, n. 97, p. 1-35, 2014.

CHAPLAN, S.R.; BACH, F.W.; POGREL, J.W et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.

CHEN, Qiliang; ROEDER, Zachary; LI, Ming-Hua et al. Optogenetic Evidence for a Direct Circuit Linking Nociceptive Transmission through the Parabrachial Complex with Pain-Modulating Neurons of the Rostral Ventromedial Medulla (RVM). **Eneuro**, v. 4, n. 3, p. 0202-0217, 2017.

CHERNOLOZ, Olga; MANSARI, Mostafa El; BLIER, Pierre. Long-term administration of the dopamine D3/2 receptor agonist pramipexole increases dopamine and serotonin neurotransmission in the male rat forebrain. **The Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 37, n. 2, p. 113-121, 2012.

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

CLAUW, Daniel J.; D'ARCY, Yvonne; GEBKE, Kevin et al. Normalizing fibromyalgia as a chronic illness. **Postgraduate Medicine**, v. 130, n. 1, p. 9-18, 2017.

CLAUW, Daniel J.; ARNOLD, Lesley M.; MCCARBERG, Bill H.. The Science of Fibromyalgia. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 9, p. 907-911, 2011.

CROSS AL; VISWANATH O; SHERMAN AL. Pregabalin. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.

D'Armour, W.L; Smith, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.72, 74-79, 1941.

DELLAROZA, Mara Solange Gomes; FURUYA, Rejane Kiyomi; CABRERA, Marcos Aparecido Sarria et al. Caracterização da dor crônica e métodos analgésicos utilizados por idosos da comunidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 1, p. 36-41, 2008.

DEGROOT, Steven R. et al. Midbrain Dopamine Controls Anxiety-like Behavior by Engaging Unique Interpeduncular Nucleus Microcircuitry. **Biological Psychiatry**, p. 100-115, 2020.

DUQUE, Laura; FRICCHIONE, Gregory. Fibromyalgia and its New Lessons for Neuropsychiatry. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 25, p. 169-178, 2019.

ELMAN, Igor; BORSOOK, David. Common Brain Mechanisms of Chronic Pain and Addiction. **Neuron**, v. 89, n. 1, p. 11-36, 2016.

- ESCALONA, Rodrigo; FAWCETT, Jan. Pramipexole in Treatment Resistant-Depression, Possible Role of Inflammatory Cytokines. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 363-363, 2016.
- FERRERA, David; GÓMEZ-ESQUER, Francisco; PELÁEZ, Irene et al. Efeitos dos genótipos COMT no desempenho da memória operacional em pacientes com fibromialgia. **Journal of Clinical Medicine**, v. 2479, n. 9, p. 1-19, 2020.
- FINAN, Patrick H.; SMITH, Michael T. The comorbidity of insomnia, chronic pain, and depression: dopamine as a putative mechanism. **Sleep Medicine Reviews**, v. 17, n. 3, p. 173-183, 2013.
- FLODIN, Pär; MARTINSEN, Sofia; LÖFGREN, Monika et al. Fibromyalgia Is Associated with Decreased Connectivity Between Pain- and Sensorimotor Brain Areas. **Brain Connectivity**, v. 4, n. 8, p. 587-594, 2014.
- FLOHÉ, L; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.105, p.114-120, 1984.
- HÄUSER, Winfried; ABLIN, Jacob; FITZCHARLES, Mary-Ann et al. Fibromyalgia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 8-9, 2015.
- HERNANDEZ-LEON, Alberto; FERNÁNDEZ-GUASTI, Alonso; MARTÍNEZ, Adrián et al. Sleep architecture is altered in the reserpine-induced fibromyalgia model in ovariectomized rats. **Behavioural Brain Research**, v. 364, p. 383-392, 2019.
- HOLMAN, A. J; MYERS, R. R. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pramipexole, a dopamine agonist, in patients with fibromyalgia receiving concomitant medications. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 8, p.2495-2505, 2005.
- ICHESCO, E; PUIU, T; HAMPSON, J P et al. Altered fMRI resting-state connectivity in individuals with fibromyalgia on acute pain stimulation. **European Journal Of Pain**, v. 20, n. 7, p. 1023-1197, 2016.
- INANICI, F. Fatma; YUNUS, Muhammad B. History of fibromyalgia: past to present. **Current Pain and Headache Reports**, v. 8, n. 5, p. 369-378, 2004.
- ISINGRINI, Elsa; CAMUS, Vincent; GUIQUET, Anne-Marie et al. Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **Plos One**, v. 5, n. 4, p. 1-8, 2010.
- JULIUS, David; BASBAUM, Allan I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.
- KAMBER, Nicole. Neuroanatomie und Pathophysiologie des Schmerzes. **Therapeutische Umschau**, v. 77, n. 6, p. 239-245, 2020.
- KAUR, Anudeep; SINGH, Lovedeep; SINGH, Nirmal et al. Ameliorative effect of imperatorin in chemically induced fibromyalgia: role of nmda/nfkb mediated downstream signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 166, p. 56-69, 2019.

KIA, Sanam; CHOY, Ernet. Update on Treatment Guideline in Fibromyalgia Syndrome with Focus on Pharmacology. **Biomedicines**, v. 5, n. 4, p. 20, 2017.

KIM, Mun Ki; PARK, Hyeon Soo; CHO, Jea Hyeon et al. Pramipexole protects dopaminergic neurons through paraplegin against 6-hydroxydopamine. **Neuroreport**, v. 26, n. 2, p. 74-80, 2015.

KLEIN, Caroline Peres. **Atividade de Mediadores Lipídicos Derivados de Ácidos Graxos Poli-Insaturados sobre Alterações Comportamentais e Bioquímicas em um Modelo de Fibromialgia em Camundongos**. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, 2014.

KLEIN, Caroline Peres; CINTRA, Marcos Rodrigues; BINDA, Nancy et al. Coadministration of Resveratrol and Rice Oil Mitigates Nociception and Oxidative State in a Mouse Fibromyalgia-Like Model. **Pain Research and Treatment**, v. 2016, p. 1-11, 2016.

KLEIN, Marianne O.; BATTAGELLO, Daniella S.; CARDOSO, Ariel R. et al. Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 31-59, 2018.

LEDOWSKI, Thomas. Objective monitoring of nociception: a review of current commercial solutions. **British Journal of Anaesthesia**, v. 123, n. 2, p. 312-321, 2019.

LIEBERKNECHT, Vicente; CUNHA, Mauricio Peña; JUNQUEIRA, Stella Célio et al. Antidepressant-like effect of pramipexole in an inflammatory model of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 365-373, 2017.

LI, Changsheng; LIU, Sufang; LU, Xihua et al. Role of Descending Dopaminergic Pathways in Pain Modulation. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 12, p. 1176-1182, 2019.

LIU, Sufang; TANG, Yuanyuan; SHU, Hui et al. Dopamine receptor D2, but not D1, mediates descending dopaminergic pathway-produced analgesic effect in a trigeminal neuropathic pain mouse model. **Pain**, v. 160, n. 2, p. 334-344, 2018.

LUIZ, A. **Análise do mecanismo de ação antinociceptiva do extrato etanólico obtido das raízes da *Humirianthera ampla* Miers**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós- Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2007.

MARKLUND, S. L. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 148, n. 1-2, p.129-134, 1985.

MARTIKAINEN, Ilkka K.; HAGELBERG, Nora; JÄÄSKELÄINEN, Satu K et al. Dopaminergic and serotonergic mechanisms in the modulation of pain: in vivo studies in human brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 337-345, 2018.

MENDELL, L. M. Computational functions of neurons and circuits signaling injury: relationship to pain behavior. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 108, n. 3, p. 15596-15601, 2011.

MITSI, Vasiliki; ZACHARIOU, Venetia. Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. **Neuroscience**, v. 338, p. 81-92, 2016.

AGAKURA, Yukinori; OE, Tomoya; AOKI, Toshiaki et al. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: a putative animal model of fibromyalgia. **Pain**, v. 146, n. 1, p. 26-33, 2009.

NAGAKURA, Yukinori; OHSAKA, Nana; AZUMAA, Ryutarou. Monoamine system disruption induces functional somatic syndromes associated symptomatology in mice. **Elsevier**, v. 194, p. 505-514, 2018.

NAVRATILOVA, Edita; NATION, Kelsey; REMENIUK, Bethany et al. Selective modulation of tonic aversive qualities of neuropathic pain by morphine in the central nucleus of the amygdala requires endogenous opioid signaling in the anterior cingulate cortex. **Pain**, v. 161, n. 3, p. 609-618, 2019.

NAZERI, Masoud; EBRAHIMI, Arezoo; AGHAEI, Iraj et al. Psychological stress has a higher rate of developing addictive behaviors compared to physical stress in rat offspring. **Excli Journal**, v. 16, p. 903-913, 2017.

NEUMEISTER, Michael W.; NEUMEISTER, Evyn L.. Fibromyalgia. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 47, n. 2, p. 203-213, 2020.

NEYAMA, Hiroyuki; DOZONO, Naoki; UEDA, Hiroshi. NR2A-NMDA Receptor Blockade Reverses the Lack of Morphine Analgesia Without Affecting Chronic Pain Status in a Fibromyalgia-Like Mouse Model. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 373, n. 1, p. 103-112, 2020.

NUCCI, Catharina. **Potencial terapêutico do extrato etanólico dos frutos da *pterodon pubescens benth* no controle da dor aguda e crônica**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2014.

OBATA, Hideaki.. Analgesic Mechanisms of Antidepressants for Neuropathic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 24-83, 2017.

OE, T.; TSUKAMOTO, M.; NAGAKURA, Y. Reserpine causes biphasic nociceptive sensitivity alteration in conjunction with brain biogenic amine tones in rats. **Neuroscience**, v. 169, n. 4, p. 1860-1871, 2010.

ONAKPOYA, Igho J; THOMAS, Elizabeth T; LEE, Joseph J et al. Benefits and harms of pregabalin in the management of neuropathic pain: a rapid review and meta-analysis of randomised clinical trials. **Bmj Open**, v. 9, n. 1, p. 1-19, 2019.

ORRÙ, Marco; STRATHMAN, Hunter J.; FLORIS, Gabriele et al. The adverse effects of pramipexole on probability discounting are not reversed by acute D2 or D3 receptor antagonism. **European Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 104-119, 2020.

PASSOS, João Octávio Sales; ALVES, Marcelo Victor dos Santos; MORAIS, Camilo L. M. et al. Spectrochemical analysis in blood plasma combined with subsequent chemometrics for fibromyalgia detection. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

PELLOW, Sharon; CHOPIN, Philippe; FILE, Sandra E. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: A primary screening test for antidepressants. **Department of Neuropharmacology**, v. 229, p. 327-336, 1977.

PUOPOLO, Michelino. The hypothalamic-spinal dopaminergic system: a target for pain modulation. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 6, p. 925-930, 2019.

RODRÍGUEZ, Diego Felipe García; MENDOZA, Carlos Abud. Physiopathology of fibromyalgia. **Reumatología Clínica**, v. 16, n. 3, p. 191-194, 2020.

ROMERO-SÁNCHEZ, Héctor Alonso; MENDIETA, Liliana; AUSTRICH-OLIVARES, Amaya Montserrat et al. Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway with 6-OHDA induced allodynia and hyperalgesia reverted by pramipexol in rats. **European Journal Of Pharmacology**, v. 869, p. 1728-1735, 2020.

RUS, Alma; MOLINA, Francisco; MORAL, María Luisa del et al. Catecholamine and Indolamine Pathway: a case-control study in fibromyalgia. **Biological Research For Nursing**, v. 20, n. 5, p. 577-586, 2018.

SARZI-PUTTINI, Piercarlo; GIORGI, Valeria; MAROTTO, Daniela et al. Fibromyalgia: an update on clinical characteristics, aetiopathogenesis and treatment. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, n. 11, p. 645-660, 2020.

SCHRADER, Andrew J.; TAYLOR, Rachel M.; LOWERY-GIONTA, Emily G et al. Repeated elevated plus maze trials as a measure for tracking within-subjects behavioral performance in rats (*Rattus norvegicus*). **Plos One**, v. 13, n. 11, p. 0207-0218, 2018.

SERAFINI, Randal A.; PRYCE, Kerri D.; ZACHARIOU, Venetia. The Mesolimbic Dopamine System in Chronic Pain and Associated Affective Comorbidities. **Biological Psychiatry**, v. 87, n. 1, p. 64-73, 2020.

SILVA, Deborah Galvão Coelho da. **Efeitos do pramipexol no comportamento tipo-depressivo em modelo animal da doença de Parkinson induzido por 6-OHDA em ratos**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, setor de Ciências Biológicas. Programa de pós-graduação em Farmacologia, Curitiba, 2019.

SILVA, Juliane Cabral; SARAIVA, Sarah Raquel Gomes de Lima; OLIVEIRA JÚNIOR, Raimundo Gonçalves de et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade

antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, p. 18-23, 2013.

SILVERMAN, Stuart; SADOSKY, Alesia; EVANS, Chris et al. Toward characterization and definition of fibromyalgia severity. **Bmc Musculoskeletal Disorders**, v. 66, n. 11, p. 1-9, 2010.

SINGH, Lovedeep; KAUR, Anudeep; BHATTI, Manpreet S. et al. Possible Molecular Mediators Involved and Mechanistic Insight into Fibromyalgia and Associated Comorbidities. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 7, p. 1517-1532, 2019.

SHIBRYA, Eman E.; RADWAN, Rasha R.; FATTAH, Mai A. Abd El et al. Evidences for amelioration of reserpine-induced fibromyalgia in rat by low dose of gamma irradiation and duloxetine. **International Journal of Radiation Biology**, v. 93, n. 5, p. 105-114, 2017.

SLUKA, Kathleen A.; CLAUW, Daniel J. Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. **Neuroscience**, v. 338, p. 114-129, 2016.

TANG, Dong-Liang; LUAN, Yi-Wen; ZHOU, Chun-Yi et al. D2 receptor activation relieves pain hypersensitivity by inhibiting superficial dorsal horn neurons in parkinsonian mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 90, p. 252-255, 2020.

TURNER, J. A et al. Does association of opioid use with pain and function differ by fibromyalgia or widespread pain status? **Pain**, v. 157, n. 10, p.2208-2216, 2016.

UEDA, Hiroshi; DOZONO, Naoki; TANAKA, Keigo et al. Allodynia by Splenocytes From Mice With Acid-Induced Fibromyalgia-Like Generalized Pain and Its Sexual Dimorphic Regulation by Brain Microglia. **Frontiers In Neuroscience**, v. 14, p. 44-52, 2020.

URIBE-BAHAMONDE, Yercó E.; BECERRA, Sebastián A.; PONCE, Fernando P et al. A Quantitative Account of the Behavioral Characteristics of Habituation: the sometimes opponent processes model of stimulus processing. **Frontiers in Psychology**, v. 10, p. 1-10, 2019.

VIEIRA, Graziela; CAVALLI, Juliana; GONÇALVES, Elaine C. D. et al. Antidepressant-Like Effect of Terpineol in an Inflammatory Model of Depression: involvement of the cannabinoid system and d2 dopamine receptor. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 792-795, 2020.

ZARRINDAST MR, KHAKPAI F. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. **Arch Iran Med**. 18 (9): p.591-603, 2015.

ZHAO, Yuehan; ZHANG, Yongdong; PAN, Fang. Experimental immunology The effects of EGb761 on lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in C57BL/6J mice. **Central European Journal Of Immunology**, v. 1, p. 11-17, 2015.

YAM, Mun; LOH, Yean; TAN, Chu et al. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2164-2165, 2018

YANG, Pengfei; S.PERLMUTTER, Joel; L.S.BENZINGER, Tammie. Dopamine D3 receptor: A neglected participant in Parkinson Disease pathogenesis and treatment? **Ageing Research Reviews**, v. 57, p. 1-30, 2020.

YANG, Seoyon; CHANG, Min Cheol. Chronic Pain: Structural and Functional Changes in Brain Structures and Associated Negative Affective States. **International Journal Molecular**, v. 13, n. 20, p. 327-330, 2019.

YAO, Xianli; LI, Li; KANDHARE, Amit D. et al. Attenuation of reserpine-induced fibromyalgia via ROS and serotonergic pathway modulation by fisetin, a plant flavonoid polyphenol. **Experimental And Therapeutic Medicine**, v. 2, n. 19, p. 1343-1355, 2020.

YILDIRIM, T; ALP, R. The role of oxidative stress in the relation between fibromyalgia and obstructive sleep apnea syndrome. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 21, p. 20-29, 2017.

WALTERS, Edgar T.; WILLIAMS, Amanda C. de C. Evolution of mechanisms and behaviour important for pain. **Philosophical Transactions of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1785, p. 20190275, 2019.

WANG, J et al. The Dopamine Receptor D3 Regulates Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 5, p.448-460, 2018.

WAWRZCZAK-BARGIEŁA, A., Ziółkowska, B., Piotrowska, A. et al. Neuropathic Pain Dysregulates Gene Expression of the Forebrain Opioid and Dopamine Systems. **Neurotox Res** 37, vol. 37,4, p. 800–814, 2020.

WELLS, J. A et al. Functional MRI of the Reserpine-Induced Putative Rat Model of Fibromyalgia Reveals Discriminatory Patterns of Functional Augmentation to Acute Nociceptive Stimuli. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.100-110, 2017.

WOLFE, Frederick; CLAUW, Daniel J; FITZCHARLES, Mary-Ann et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. **Arthritis Care Res**, v. 5, n. 62, p. 600-610, 2010.

WOLFE, Frederick; CLAUW, Daniel J.; FITZCHARLES, Mary-Ann et al. 2016 Revisions to the 2010/2011 fibromyalgia diagnostic criteria. **Seminars in Arthritis And Rheumatism**, v. 46, n. 3, p. 319-329, 2016.