



DURAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DA SENSIBILIDADE TÉRMICA E MECÂNICA EM MODELO ANIMAL DE FIBROMIALGIA

GABRIELA DO NASCIMENTO TONIOLO BERTOLO; PATRÍCIA SEVERO DO NASCIMENTO

RESUMO

A fibromialgia é uma síndrome musculoesquelética caracterizada por dor crônica generalizada, fadiga, sensibilidade à palpação, depressão e ansiedade. Essa síndrome afeta 2% da população geral e afeta indiscutivelmente a saúde pública. Os mecanismos patogênicos da fibromialgia ainda são desconhecidos. Para estudo da fibromialgia tem sido utilizado o modelo animal da aplicação subcutânea de reserpina, que causa a depleção dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e serotonina, surgindo um quadro clínico nos ratos semelhante ao da fibromialgia em humanos. Este estudo teve como objetivo avaliar por quanto tempo se mantém a alteração das sensibilidades térmica e mecânica causada pela aplicação de reserpina. Foi realizada a aplicação de Reserpina 1mg/kg durante três dias consecutivos em ratos Wistar machos (n=6) pesando em média 100g. A avaliação da sensibilidade térmica foi feita pelo teste de *Hargreaves* e a avaliação da sensibilidade mecânica foi feita pelo teste de filamentos de Von Frey (dados mostrados em gramas), ambos antes da aplicação de reserpina (basal) e em três momentos após. A análise estatística foi realizada através do teste T de Student e foi considerado estatisticamente significativo quando $P < 0,05$. Para *Hargreaves* houve diferença estatística no pós-imediato à aplicação de reserpina quando comparado com a avaliação basal, porém, após 28 dias a diferença se manteve, quando comparado ao basal, e se manteve, ainda, após 42 dias. No teste de von Frey houve diferença estatística no pós-imediato à aplicação de reserpina quando comparado com a avaliação basal e a diferença se manteve 14 e 30 dias após a aplicação, no entanto, após 40 dias não havia alteração da sensibilidade mecânica quando comparado aos valores basais. A aplicação de reserpina de 1 mg/kg em modelos animais de fibromialgia resulta hipersensibilidade térmica e alteração da resposta mecânica por 42 e 30 dias, respectivamente, de acordo com os testes de *Hargreaves* e von Frey.

Palavras-chave: fibromialgia; modelo animal; reserpina; *Hargreaves*; von Frey

1 INTRODUÇÃO

O professor doutor francês Serge Perrot, da Paris Descartes University, postulou, em sua revisão de literatura de 2012, assertivamente que “se a fibromialgia não existisse, deveríamos tê-la inventado” (Perrot, 2012). De fato, a síndrome é uma das causas mais comuns de dor crônica generalizada no mundo, embora seja caracterizada por uma complexa polissintomatologia que compreende, dentre outros, fadiga, distúrbios do sono e disfunções executivas (Sarzi-Puttini; Giorgi; Marotto, et al. 2020).

Em 2018, a estimativa era de que a prevalência da fibromialgia seja de 2% da

população (de Souza; Perissinotti, 2018). O fardo imposto pela síndrome na saúde pública traduz-se pela maior utilização de serviços de saúde pelas pessoas acometidas pela síndrome quando comparados com outras doenças com perfil clínico ou prevalência semelhantes. Para além, a doença acarreta na perda de produtividade por incapacidade funcional, diminuição no número de horas e dias trabalhados, altas taxas de desemprego e retirada precoce do mercado de trabalho por motivo de invalidez (Alberti; Blatt; Pilger, 2021). É igualmente essencial ressaltar que pessoas acometidas pela fibromialgia têm risco significativamente maior de ideias suicidas, tentativas de suicídio e morte por suicídio do que a população geral (Gill; Perez; Gill, et al. 2020)

Modelos animais de fibromialgia favorecem a compreensão da síndrome e são amplamente utilizados desde o início do século 21, uma vez que auxiliam na identificação de mecanismos subjacentes à síndrome e têm potencial translacional para desenvolver novas terapias direcionadas ao tratamento, bem como colaborar com o melhor entendimento dos mecanismos patogênicos da doença (Brum; Becker; Fialho, et al. 2022). Para o estudo da fibromialgia se tem utilizado o modelo animal de depleção de aminas biogênicas com a aplicação subcutânea de reserpina, o que resulta em um quadro clínico em ratos semelhante ao da fibromialgia em humanos (Nagakura; Oe; Aoki; Matsuoka, 2009). No entanto, não há estudo na literatura que mostrem por quanto tempo se mantém as alterações sensoriais causadas pela administração de reserpina.

Para avaliação de alterações sensoriais em modelos animais foram utilizados os testes de Hargreaves e von Frey. O teste de Hargreaves tem por objetivo avaliar a sensibilidade térmica de roedores e tem sido utilizado em experimentos envolvendo sensibilização à dor ou recuperação da resposta térmica à dor após lesão neural e regeneração (Cheah; Fawcett; Andrews, 2017; Hargreaves; Dubner; Brown et al., 1988). O teste de von Frey, por sua vez, tem por objetivo avaliar a sensibilidade mecânica através da quantificação, em gramas, do limiar de dor à pressão tátil utilizando um conjunto de filamentos de náilon de comprimento constante e diâmetro crescente (Tena; Escobar; Arguis et al., 2012). O teste de von Frey foi optado pois uma resposta nocifensiva exagerada a estímulos mecânicos é considerada um indicador chave de processamento sensorial anormal na maioria dos modelos de dor patológica em roedores (Bonin; Boris; de Konick, 2014).

O presente estudo teve por objetivo caracterizar o modelo animal de fibromialgia quanto a duração das alterações sensoriais causadas pela reserpina através da avaliação da sensibilidade térmica pelo teste de Hargreaves e da sensibilidade mecânica pelo teste de von Frey. O estudo foi aprovado pela Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo protocolo 9476140521 e apoiado pelo programa Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado entre julho de 2021 e agosto de 2021. Foi realizada a aplicação de Reserpina 1mg/kg durante três dias consecutivos em ratos Wistar machos pesando em média 100g. A amostra total do estudo foi de 6 ratos. Os dados colhidos foram registrados em uma ficha de coleta de dados específica para cada animal.

Para o procedimento do teste de Hargreaves foi utilizado o aparelho da marca Ugo Basile, e as pesquisadoras selecionavam os ratos em ordem aleatória para a aplicação do teste, que consiste na observação do comportamento do animal quando aplicado aquecimento, por meio de fonte de luz infravermelha dirigida, na cauda do animal. O tempo do teste foi medido em segundos e uma latência de retirada mais longa significa uma resposta de retirada mais lenta e vice-versa. O teste de Hargreaves foi realizado na avaliação basal dos animais (antes da aplicação da reserpina), após a última aplicação de reserpina, após 28 dias e após 42 dias.

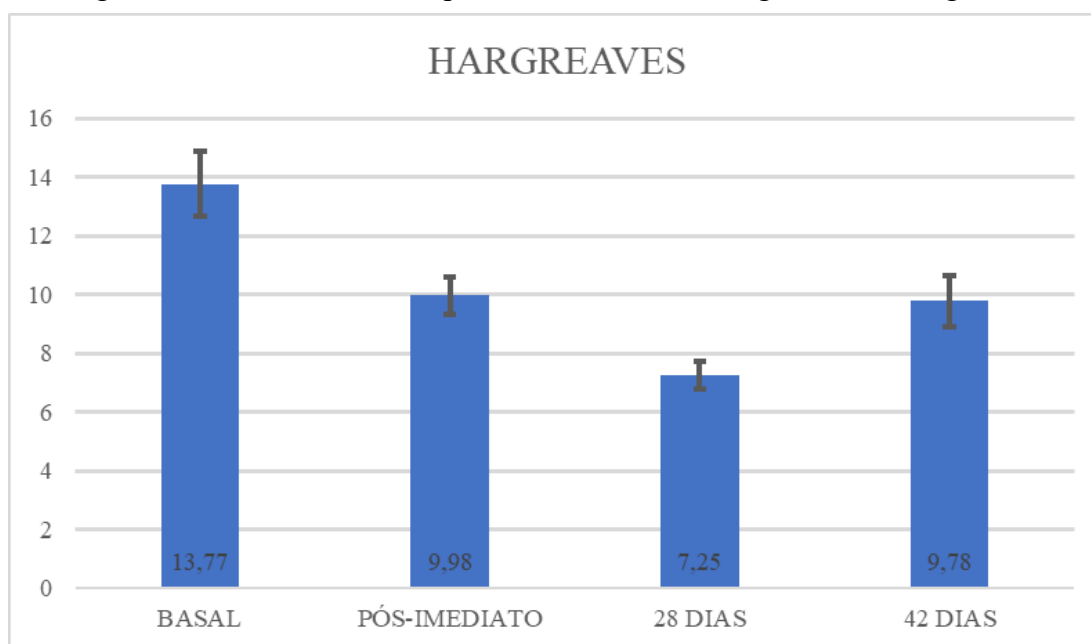
O teste dos filamentos de von Frey foi realizado antes da aplicação e um dia após a última aplicação de reserpina e, novamente, a cada duas semanas por um período total de 40 dias. Os animais foram colocados em gaiolas de acrílico sem fundo, sobre uma plataforma vazada de alumínio, de forma com que as pesquisadoras pudessem observar o comportamento do animal durante o teste. Os animais foram mantidos nas gaiolas por cerca de 15 minutos para adaptação antes do experimento. Cada um dos filamentos foi aplicado três vezes consecutivas com intervalo de 3 a 5 segundos nas patas traseiras dos animais, bilateralmente (Do Nascimento; Lovatel; Ilha et al., 2013).

Para a análise estatística foi utilizado o teste T de Student no programa GraphPadPrism® 9.5.0. e considerado estatisticamente significativo quando $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

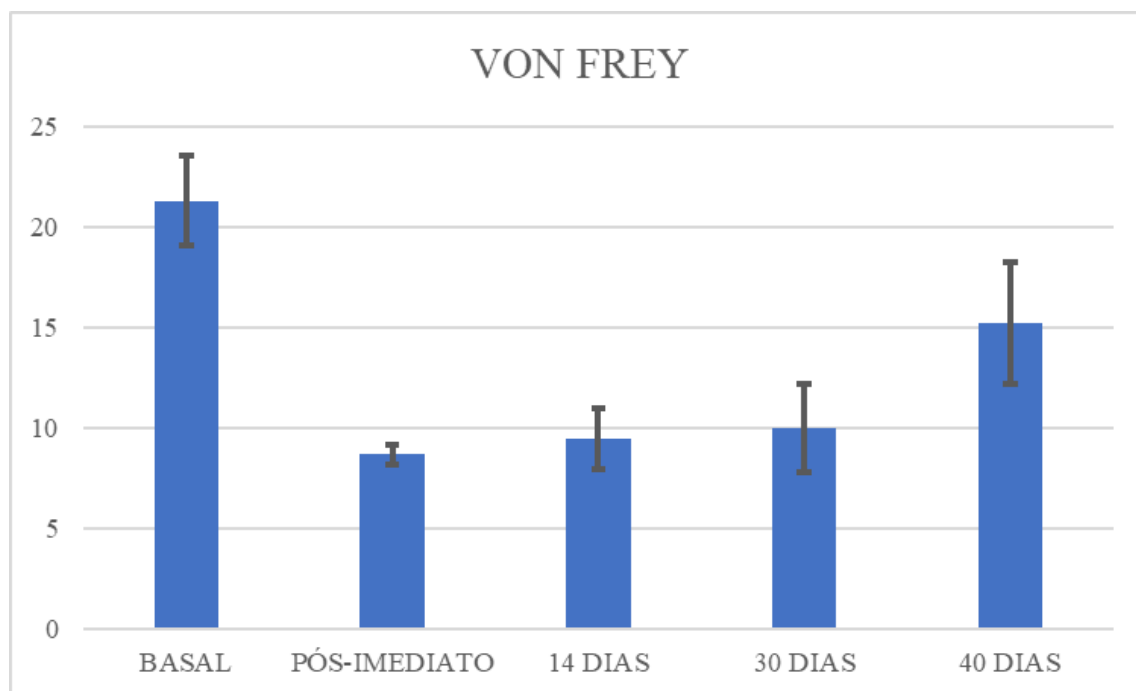
Para o teste de Hargreaves houve diferença estatística no pós-imediato ($9,98 \pm 0,64$; $P < 0,05$) à aplicação de reserpina quando comparado com a avaliação basal ($13,77 \pm 1,11$; $P < 0,05$). Após 28 dias ($7,25 \pm 0,46$; $P < 0,05$) a diferença se manteve, quando comparado ao basal, e se manteve, ainda, após 42 dias ($9,78 \pm 0,86$; $P < 0,05$). Os dados são representados em segundos.

Figura 2 - gráfico de médias e desvio padrão dos testes de Hargreaves, em segundos.



Baseado nos protocolos de aplicação do teste de Hargreaves e nos resultados obtidos pelo estudo, podemos observar que a aplicação de reserpina de 1 mg/kg em ratos Wistar induz estados de hipersensibilidade térmica, com pico 28 dias após a aplicação. No 42º dia pode-se observar que os valores possuem tendência a retornar aos valores encontrados imediatamente após a aplicação, sugerindo que o período de ação da reserpina em roedores é melhor observado no primeiro mês após a aplicação.

Para o teste de von Frey houve diferença estatística no pós-imediato ($8,67 \pm 0,49$; $P < 0,05$) à aplicação de reserpina quando comparado com a avaliação basal ($21,33 \pm 2,22$; $P < 0,05$). Após 14 dias ($9,5 \pm 1,52$; $P < 0,05$) a diferença se manteve, quando comparado ao basal. As alterações ainda se mantiveram após 30 dias ($10 \pm 2,18$; $P < 0,05$). Após 40 dias ($15,25 \pm 3,02$; $P > 0,05$) da aplicação de reserpina não havia alteração da sensibilidade mecânica quando comparado aos valores basais. Os dados são representados em gramas.

Figura 2 - gráfico de médias e desvio padrão dos testes de von Frey, em gramas.

Os resultados dos testes de von Frey, quando equiparados aos protocolos de execução, indicam que a aplicação de reserpina 1 mg/kg causa anomalia na resposta nociceptiva mecânica dos ratos. O efeito obtido tem pico imediatamente após a aplicação da reserpina e mantém-se por até 30 dias com resultados consistentes. É inegável a relevância do presente estudo para a compreensão da duração das se as alterações sensoriais causadas pela administração de reserpina em ratos, o que subsidia a ocorrência de pesquisas futuras em modelos animais tanto para melhor domínio da fisiopatologia da síndrome bem como o estudo de novos tratamentos, sejam fármacos ou não.

4 CONCLUSÃO

A aplicação de reserpina de 1 mg/kg em modelos animais de fibromialgia resulta hipersensibilidade térmica e alteração da resposta mecânica por 42 e 30 dias, respectivamente, de acordo com os testes de Hargreaves e von Frey. A melhor resposta de hiperalgesia nos ratos em ambos os testes pode ser obtida por volta de 1 mês após a aplicação de reserpina.

REFERÊNCIAS

- ALBERTI, F. F.; BLATT, C. R.; PILGER, D. Custos diretos e indiretos da fibromialgia: uma revisão de escopo. **J. Bras. Econ. Saúde**. v. 13, n. 3, p. 338-344, 2021.
- BONIN, R. P.; BORIS, C.; DE KONICK, Y. A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments. **Molecular Pain**. v. 10, n. 26, 2014.
- BRUM, E. S.; BECKER, G.; FIALHO, M. F. P.; OLIVEIRA, S. M. Animal models of fibromyalgia: What is the best choice? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 230, 2022.
- CHEAH, M.; FAWCETT, J. W.; ANDREWS, M. R. Assessment of Thermal Pain Sensation

in Rats and Mice Using the Hargreaves Test. **Bio-protocol**. v. 7, n. 16, e2506, 2017.

DE SOUZA, J. B.; PERISSINOTTI, D. M. N. The prevalence of fibromyalgia in Brazil – a population-based study with secondary data of the study on chronic pain prevalence in Brazil. **Br J Pain**. São Paulo, v. 1, n. 4, p. 345-348, 2018.

DO NASCIMENTO, P. S. ; LOVATEL, G. A. ; ILHA, J. ; SCHAAN, B. D.; ACHAVAL, M. Diabetes increases mechanical sensitivity and causes morphological abnormalities in the sural nerve that are prevented by treadmill training. **Muscle & Nerve (Print)**. v. 47, p. 46-52, 2013.

GILL, H.; PEREZ, C. D.; GILL, B.; EL-HALABI, S.; LEE, Y.; LIPSITZ, O.; PARK, C.; MANSUR, R. B.; RODRIGUES, N. B.; MCINTYRE, R. S. The Prevalence of Suicidal Behaviour in Fibromyalgia Patients. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 8, n. 108:110078, 2021.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32,p. 77-88, 1988.

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

PERROT, S. If fibromyalgia did not exist, we should have invented it. A short history of a controversial syndrome. **Reumatismo**. v. 64, n. 4, p. 186-193, 2012.

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