



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ANA BEATRIZ DA SILVA OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA HIPERALGESIA
MUSCULAR CRÔNICA DIFUSA NA GESTAÇÃO E NO
NEURODESENVOLVIMENTO DA PROLE DE RATAS
WISTAR

SÃO CRISTÓVÃO

2022

Ana Beatriz da Silva Oliveira

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA HIPERALGESIA MUSCULAR CRÔNICA
DIFUSA NA GESTAÇÃO E NO NEURODESENVOLVIMENTO DA PROLE
DE RATAS WISTAR**

2022

ANA BEATRIZ DA SILVA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA HIPERALGESIA
MUSCULAR CRÔNICA DIFUSA NA GESTAÇÃO E NO
NEURODESENVOLVIMENTO DA PROLE DE RATAS
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Patrícia Rodrigues Marques de Souza

Co-Orientador: Prof. Dr. Leandro Marques de Souza

SÃO CRISTÓVÃO

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Oliveira, Ana Beatriz da Silva
O48a Avaliação do impacto da hiperalgesia muscular crônica difusa na
gestação e no neurodesenvolvimento da prole de ratas wistar / Ana
Beatriz da Silva Oliveira ; orientadora Patrícia Rodrigues Marques
de Souza. – São Cristóvão, SE, 2022.
78 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas)–Universidade
Federal de Sergipe, 2022.

1. Fibromialgia. 2. Hiperalgesia. 3. Reflexos. I. Souza, Patrícia
Rodrigues Marques de, orient. II. Título.

CDU 612.884:616.74-009

ANA BEATRIZ DA SILVA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA HIPERALGESIA
MUSCULAR CRÔNICA DIFUSA NA GESTAÇÃO E NO
NEURODESENVOLVIMENTO DA PROLE DE RATAS
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Profª Drª. Patrícia Rodrigues Marques de Souza (Orientadora)

Profª Drª Isabela Azevedo Freire Santos (1ª examinadora)

Profª Drª Fernanda Barbosa Lima (2ª examinadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço muito a Deus, sem ele não estaria aqui! Eu sei, já ficamos muito tempo brigados, foi difícil voltar a ter contato, ainda fico sem jeito as vezes, mas sei que estás aqui por mim, agradeço por não ter desistido, então não desistirei do Senhor também! Confio no seu tempo e sei que será justo! “Muitas vezes não consigo os teus planos compreender, mas prefiro confiar sem entender” (Eu Cuido de Ti - Canção e Louvor)

Muito obrigada painho e mainha, por terem feito o possível e o impossível, abdicado de tanto, para que eu pudesse estudar. Espero um dia dar o retorno que vocês nunca me cobraram, mas eu sei que merecem. Em especial à mainha que chorou comigo tantas vezes, me apoia tanto, sempre acredita em mim mesmo quando duvido de mim mesma, preparou tudo pra minha formatura basicamente sozinha, sei que fez tudo ao seu alcance para me ver realizada. A senhora me move e me motiva todos os dias, te amo muito! Obrigada a minha irmã pelo apoio, as conversas bobas, as cantorias, o alívio cômico.

Muito obrigada madrinha Isabel, padrinho, tia Carminha por terem apostado em mim e me apoiado nos estudos. Muito obrigada a todos meus familiares paternos e maternos que de um jeito ou de outro contribuíram para que eu pudesse continuar estudando. Em especial a voinha Alice (in memoriam), voinha Josefina, tio Eduardo. Obrigada tia Ana por ter cuidado tão bem de mim mesmo quando era uma criancinha chatinha enrolando pra fazer o dever de casa. Obrigada tio Luiz e tio Adriano pelo suporte para que eu me graduasse.

Muito obrigada Akssen por ser tão bom para mim, tão acolhedor, tão presente mesmo distante, tenta fazer eu me sentir bem o tempo todo, obrigada por ser tanto em minha vida. Muito obrigada Thay, sem você eu nem teria entrado no mestrado, na época da seleção eu estava sem internet em casa e você me proveu internet para que eu pudesse estudar, ler artigos e escrever o projeto. Obrigada Lua por ter me apoiado a falar com a profª Patrícia, foi comigo no laboratório e me deu muito apoio moral você fez toda a diferença! Obrigada Camila Perete, minha parceira e minha inspiração, você foi a primeira pessoa que conheci no laboratório, fez eu me sentir super bem acolhida e me deu motivação para seguir com tudo, é minha parceiraaaaaa. Muito obrigadas às Neuroimunogirls (rs) Camila Dalan, Isabella e Perete, pelo apoio, pelas conversas, parcerias, estudos, discussões de artigos, almoços, risadas, tudo ficava bom só em ter vocês por perto. Obrigada meu brother André, pelas conversas, pelo apoio e ensinamentos. Michelly, muito obrigada por tudo, pela parceria que deu certo! Compartilhamos risadas e choros, repetindo o mantra “vai dar certo!”, e deu, olha só! Deeeus não rejeita oração...

Em todas as faltas de energia, falta de insumos, pandemia, aparelhos falhando, falta de animais, ter tantos parceiros para chorar junto e rir junto, tornaram os dias mais leves e a barra mais fácil de segurar. Foram vários guinchos para rebocar os guinchos, vários dias exaustivos seguidos de repetição de experimento, mas parece que agora foi!!!

Preciso agradecer também à melhor turma que o PROCFIS já teve! Meus queridos, Bia, Carlini, Éverton, Jai, Valéria, Mih, Mona e Rapha; vocês foram tudo, nossa união tornou as obrigatórias e o mestrado muito mais fácil e feliz. Obrigada Camila Carlini e Dona Isabel pelo super acolhimento que me deram, ainda mais num período tão importante do experimento. Agradeço muito à Renivan, que entrou na minha vida tão brevemente e deixou uma marca enorme, mesmo distante eu sempre torço por você, muito obrigada pelo apoio e pelas belas palavras de conforto que você sempre proporciona a todos. Grande Renivas!

Sou extremamente grata por ter dois orientadores INCRÍVEIS, que me ensinaram tanto sobre tudo, tiveram tanta paciência comigo. Prof^a Patrícia e Prof Leandro, eu tenho certeza que Deus colocou vocês no meu caminho, vocês são luz, bondade e muito amor. Amo vocês, os levarei em meu coração para sempre!

Agradeço às agências de fomento à pesquisa, em especial a CAPES pelo suporte financeiro, que possibilitaram minha dedicação à pesquisa. Ao corpo docente do PROCFIS e a minha banca PROASA (prof. Enilton, prof. Felipe e prof. Murilo) por todas sugestões, sempre visando o melhor para a pesquisa. Aos amigos que fiz na família do Laboratório de Pesquisa em Neurociências – LAPENE, minha eterna gratidão. Muito obrigada prof^a Josimari por ter me recebido tão bem na nossa família LAPENE, a senhora é admirável!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu estivesse aqui, mesmo que não citados, deixo meu agradecimento!

“A coragem de levantar vem do medo de cair.
Use sempre a coragem para se fortalecer.
E quando o medo surgir não precisa se esconder.
Faça que seu próprio medo tenha medo de você.”

(Bráulio Bessa)

RESUMO

Avaliação do impacto da hiperalgesia muscular crônica difusa na gestação e no neurodesenvolvimento da prole de ratas wistar. Ana Beatriz da Silva Oliveira, São Cristóvão, SE, Brasil, 2022.

Introdução: A Fibromialgia (FM) é uma das doenças musculoesqueléticas crônicas mais comuns, atinge em sua maioria mulheres e sua etiologia ainda desconhecida. Suspeita-se do envolvimento de fatores ambientais, autoimunes, hormonais ou até mesmo genéticos, para seu desenvolvimento. Por conta disso, há preocupação do impacto da Fibromialgia para a descendência dessas mulheres. A hiperalgesia muscular crônica bilateral induzida por salina ácida, não gera lesões teciduais e se mantêm por até 04 semanas se assemelhando à Fibromialgia em humanos. A hiperalgesia é um potente fator estressor e a hipótese de programação fetal afirma que eventos adversos ocorridos na mãe durante a gestação, como um estresse crônico, implica em alterações no padrão de saúde-doença de sua descendência. Esse estudo teve como objetivo avaliar o impacto da hiperalgesia muscular crônica difusa (HCMD) na gestação, bem como a resposta de reflexos neonatais e de marcos do desenvolvimento da prole. **Métodos:** 18 ratas foram divididas em três grupos: 1- Salina Ácida (SA), 2- Salina Neutra (SN) e 3- Controle (CTRL). Inicialmente foi induzida a HCMD no grupo SA, então seguiu-se o acasalamento programado de todos os grupos. As ratas genitoras foram avaliadas quanto ao comportamento. A avaliação dos reflexos e marcos do desenvolvimento da prole foi realizada por dois avaliadores independentes, desde o dia pós-natal 01, até o 21. **Resultados:** A hiperalgesia dos ratos progenitores do grupo salina ácida apresentou diferença significativa no grupo salina ácida com redução do limiar no pós indução, mostrando que a hiperalgesia foi efetiva ($p=0,0004$). Não houve hiperalgesia nos grupos neutra e controle, assim como esperado ($p=0,0846$, $p=0,5339$, respectivamente). Os resultados obtidos demonstram que a HCMD não impede a fecundação e a cópula, as fêmeas do grupo salina ácida (SA) realizaram a cópula no primeiro dia de união com o macho, evidenciando um comportamento pró-social e maior receptividade ao macho do que os grupos salina neutra (SN) e Controle (CTRL). A gestação do grupo SA durou 22 dias, já os grupos SN e CTRL, 21 dias. O grupo SA pariu 64 ratos, o grupo SN pariu 42 ratos, já o grupo controle pariu 44 ratos. Notou-se o óbito de 8 filhotes no segundo dia pós-natal do grupo SA. Quanto aos reflexos, a prole do grupo SA apresentou um atraso no dia de aparecimento dos reflexos: preensão palmar, preensão plantar, endireitamento, aversão ao precipício, sobressalto auditivo e endireitamento em queda livre; quando comparados aos grupos SN e CTRL. **Conclusão:** Nosso estudo demonstra que a hiperalgesia favorece a cópula e não impede a gestação, mas influencia na gestação levando a uma maior mortalidade na prole do grupo salina ácida. Foi observado um impacto em seis reflexos sensorio-motores no grupo SA, apresentando diferença significativa, indicando que a hiperalgesia afetou o neurodesenvolvimento fetal dessa prole.

Descritores: Fibromialgia; Programação Fetal; Hiperalgesia; Reflexo.

ABSTRACT

Evaluation of the impact of widespread chronic muscle hyperalgesia on pregnancy and on the neurodevelopment of the offspring of wistar rats. Ana Beatriz da Silva Oliveira, São Cristóvão, SE, Brazil, 2022.

Introduction: Fibromyalgia (FM) is one of the most common chronic musculoskeletal diseases, affecting mostly women and its etiology is still unknown.. It is suspected the involvement of environmental, autoimmune, hormonal or even genetic factors for its development. Because of this, there is concern about the impact of Fibromyalgia on the offspring of these women. The animal model of widespread chronic muscle hyperalgesia (WCMH) induced by acid saline, does not generate tissue damage and remains for up to 04 weeks, resembling fibromyalgia in humans. Hyperalgesia is a potent stressor and the fetal programming hypothesis states that adverse events occurring in the mother during pregnancy, such as chronic stress, imply changes in the health-disease pattern of her offspring. This study aimed to assess the impact of widespread chronic muscle hyperalgesia on pregnancy, as well as the response of neonatal reflexes and developmental milestones in the offspring. **Methods:** 18 rats were divided into three groups: 1- Acid saline (AS), 2- Neutral saline (NS) and 3- Control (CTRL). Initially WCMH was induced in the AS group, then scheduled mating of all groups followed. The mother rats were evaluated for behavior. The evaluation of the reflexes and developmental milestones of the offspring was performed by two independent evaluators, from postnatal day 01 to 21. **Results:** The hyperalgesia of the parent rats in the acid saline group showed a significant difference in the acid saline group with a reduction in the threshold after induction, showing that hyperalgesia was effective ($p=0.0004$). There was no hyperalgesia in the neutral and control groups, as expected ($p=0.0846$, $p=0.5339$, respectively). The results obtained demonstrate that WCMH does not prevent fertilization and copulation, the females of the acid saline group (AS) performed copulation on the first day of union with the male, showing a prosocial behavior and greater receptivity to the male than the males. neutral saline (NS) and Control (CTRL) groups. The gestation of the SA group lasted 22 days, while the NS and CTRL groups lasted 21 days. The AS group gave birth to 64 mice, the NS group gave birth to 42 mice, and the control group gave birth to 44 mice. The death of 8 pups was observed on the second postnatal day of the AS group. As for the reflexes, the offspring of the AS group presented a delay in the day of the appearance of the reflexes: palm grip, plantar grip, straightening, aversion to the precipice, auditory startle and straightening in free fall; when compared to the NS and CTRL groups. **Conclusion:** Our study demonstrates that hyperalgesia favors copulation and does not prevent pregnancy, but influences pregnancy leading to higher mortality in the offspring of the acidic saline group. An impact on six sensorimotor reflexes was observed in the AS group, showing a significant difference, indicating that hyperalgesia affected the fetal neurodevelopment of this offspring.

Keywords: Fibromyalgia; Fetal Programming; Hyperalgesia; Reflex.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Reflexos Neonatais Avaliados em Ratos.....	26
Quadro 2. Características Físicas Avaliadas em Ratos.....	29
Tabela 1. Dados da Gestação.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de programação fetal.....	18
Figura 2. Monitor de Atividades.....	23
Figura 3. Von Frey Eletrônico	24
Figura 4. Placa Quente.....	25
Figura 5. Linha do Tempo do Delineamento Experimental	31
Figura 6. Limiar de Retirada Mecânica da Pata.....	33
Figura 7. Limiar de Latência Térmica	34
Figura 8. Distância Percorrida	35
Figura 9. Preensão Palmar	39
Figura 10. Preensão Plantar	40
Figura 11. Endireitamento	41
Figura 12. Acomodação de Membros Inferiores	42
Figura 13. Acomodação de Membros por Vibrissas.....	43
Figura 14. Aversão ao Precipício.....	44
Figura 15. Marcha.....	45
Figura 16. Geotaxia Negativa	46
Figura 17. Postura.....	47
Figura 18. Endireitamento em Queda Livre	48
Figura 19. Sobressalto Auditivo	49
Figura 20. Reflexos sensório-motores	50
Figura 21. Abertura Ocular.....	51
Figura 22. Abertura do Conduto Auditivo.....	52
Figura 23. Irrupção dos Incisivos Superiores	53
Figura 24. Irrupção dos Incisivos Inferiores.....	54
Figura 25. Características Físicas totais.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

11β-HSD2	11 β -Hidroxiesteroide Desidrogenase-2
ACR	Colégio Americano de Reumatologia (American College of Rheumatology)
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise de Variância
ASIC	Canais Iônicos Sensíveis ao Ácido
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
Ctrl	Grupo Controle
DG	Dia Gestacional
DOHaD	Origens Desenvolvimentistas da saúde e da doença (Developmental Origin of Health and Disease)
DPN	Dia Pós-Natal
FM	Fibromialgia
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
Gi	Núcleo Gigantocellularis
HMCD	Hiperalgisia Muscular Crônica Difusa
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IASP	Associação Internacional para Estudo da Dor (International Association for the Study of Pain)
LAPENE	Laboratório de Pesquisas em Neurociências
NRM	Núcleo Magno da Rafe
RVM	Bulbo rostro-ventromedial (Rostral ventromedial medulla)
SA	Grupo Salina Ácida
SN	Grupo Salina Neutra
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Neurofisiologia da dor	12
2.2 Fibromialgia.....	13
2.3 Hiperalgesia Muscular Crônica Difusa.....	14
2.4 Gestação e Fibromialgia	15
2.5 Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença (DOHaD).....	16
2.6 Reflexos Neonatais	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo Geral:	20
3.2 Objetivos Específicos:	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Animais.....	21
4.2 Protocolos Experimentais	22
4.2.1 Indução da hiperalgesia muscular crônica	22
4.2.2 Monitor de Atividades	23
4.2.3 Mensuração da hiperalgesia mecânica cutânea.....	24
4.2.4 Latência térmica.....	25
4.2.5 Reflexos Neonatais e Características Físicas.....	26
4.3 Delineamento Experimental	30
4.4 Análise Estatística.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1 FASE 1 – HIPERALGESIA NA GESTAÇÃO	32
5.1.1 Hiperalgesia Muscular Crônica Difusa.....	32
5.1.2 Gestação.....	36
5.2 FASE 2 – RESPOSTA DA PROLE	38
5.2.1 Reflexos Neonatais e Características Físicas.....	38
5.2.2 Reflexos Sensório-Motores.....	39
5.2.3 Desenvolvimento de características físicas.....	51

6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A.....	69

1. INTRODUÇÃO

A Dor é um importante mecanismo sinalizador de condições anormais do estado de homeostasia corporal (SANTOS, 2014). É definida pela *International Association for the Study of Pain* (IASP) como “Experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”, mas por ser subjetiva, cada indivíduo define sua sensação como dolorosa ou não por experiências próprias (RAJA et al., 2020).

Os receptores da dor podem ser estimulados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos. O processo de percepção, transdução, transmissão e modulação desses estímulos nocivos é chamado de nocicepção. Há duas vias para a transmissão dos sinais dolorosos, a via aferente de fibra A-delta com transmissão de dor rápida ao Sistema Nervoso Central (SNC), e a de fibra C com transmissão lenta (HALL, 2017). A IASP define a hiperalgesia como uma consequência da perturbação do sistema nociceptivo com sensibilização periférica e/ou central, causando uma hiperexcitabilidade, onde estímulos menores podem levar à uma resposta dolorosa aumentada (RAJA et al., 2020; HALL, 2017; ALVES, 2017).

A dor pode ser classificada quanto à sua intensidade, localização, mecanismo fisiopatológico, frequência ou duração. Quanto à duração, se ela persiste por mais de três meses, ela é considerada crônica (VASCONCELOS, 2018). A Fibromialgia (FM) é uma síndrome dolorosa crônica, porém, sua ação fisiopatológica ainda é desconhecida (HEYMANN et al., 2010). Seu diagnóstico é clínico, feito através de observação de sinais e sintomas e excetuando-se demais patologias através de diagnóstico diferencial (BHARGAVA, 2021). Além disso, a Sociedade Brasileira de Reumatologia, seguindo o Colégio Americano de Reumatologia (ACR), adotou, como um critério diagnóstico, a manifestação de pelo menos 11 de 18 pontos musculares dolorosos (tender points).

A principal queixa em um paciente diagnosticado com Fibromialgia é a dor musculoesquelética difusa (HEYMANN et al., 2010; BHARGAVA, 2021). As mulheres são mais atingidas pela Fibromialgia e representam quase 90% dos diagnosticados. A dor pode vir acompanhada de outros sintomas, como fadiga crônica, distúrbios cognitivos, parestesia, padrão de sono ineficaz, alterações de humor, transtorno de ansiedade, quadros de depressão, distúrbios do Trato Gastrointestinal (HEYMANN et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2013). É considerada uma das doenças musculoesqueléticas crônicas mais comuns, correspondendo a boa parte dos atendimentos realizados em consultas reumatológicas (BHARGAVA, 2021).

Estima-se que devido a essas comorbidades, seja gasto por volta de seis mil dólares por ano por pessoa nos Estados Unidos (IMAMURA et al., 2014). O tratamento pode ser medicamentoso ou não-farmacológico, visando diminuir os efeitos das comorbidades e a dor. Há evidências científicas que comprovam os benefícios de exercícios físicos na qualidade de vida de uma pessoa com FM (BHARGAVA, 2021).

A Fibromialgia foi reconhecida como uma doença pela OMS somente no final da década de 70, sendo mais estudada há três décadas (BHARGAVA, 2021; MACIEL et al., 2014). Por muito tempo os pacientes com FM foram considerados portadores de uma doença psicossomática e não com uma manifestação real de dor. Isso se deve ao fato dela ser uma doença reumática de etiologia ainda desconhecida, sem marcadores bioquímicos para o diagnóstico e sem manifestações inflamatórias visíveis ou lesões de tecidos (MACIEL et al., 2014).

Um estado de hiperalgesia durante a gestação pode ser considerado um potente fator estressor crônico materno. A hipótese de *Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD)*, ou Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença, traz o conceito de programação fetal, que aborda sobre eventos adversos recorrentes, ocorridos na mãe durante a gestação, implica em alterações no padrão de saúde-doença daquele bebê durante o seu crescimento até a fase adulta (GOYAL, 2019; BISCHOFFA et al., 2018). Uma das linhas de estudo dessa hipótese é a programação de comportamento, onde padrões de alimentação, exercícios, medicações poderiam favorecer o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis para aquela descendência (LOBATO et al., 2016).

Ainda não está claro na literatura, se o sexo biológico de uma criança modifica a sua resposta durante a programação fetal. Devido às diferenças evolutivas no desenvolvimento embrionário em relação ao gênero, é importante investigar se os efeitos da programação fetal no feto são dependentes do gênero, levando a uma resposta mais expressiva no sexo feminino ou masculino. Foi observado que, quando expostos a estresse intrauterino, meninas podem apresentar um maior prejuízo nas funções motoras, cognitivas e nas funções cardiovasculares. Enquanto meninos apresentam maiores alterações respiratórias e psicológicas, como asma, depressão e esquizofrenia. (SUTHERLAND, 2018)

Estudos epidemiológicos e experimentais demonstraram que o estresse fetal intrauterino, seja ele de natureza hormonal, nutricional, ambiental ou farmacológica, traz alterações de maneira duradoura ou irreversível na estrutura e função do tecido, que são

observáveis durante toda a vida desse indivíduo (BISCHOFFA et al., 2018). O estresse pode ser desencadeado por fatores químicos, físicos, biológicos, emocionais e ambientais através da ativação do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (eixo HPA). Nesse sentido, a exposição crônica aos glicocorticoides maternos, resulta em uma atividade alterada do eixo HPA, que estaria envolvida na programação do padrão de saúde do indivíduo (SILVEIRA, 2007).

Em condições normais, os níveis de glicocorticoides fetais são muito menores que os maternos, por conta da ação da barreira natural enzimática ao cortisol chamada 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase-2 (11 β -HSD2) que protege o feto, embora ainda permita a passagem de cerca de 10 a 20%. Os níveis plasmáticos maternos de hormônio liberador de corticotropina (CRH) aumentam exponencialmente conforme a gestação avança, tendo seu pico no momento do parto. A estimulação da pituitária fetal pelo CRH aumenta a produção de ACTH e, conseqüentemente, de cortisol pela adrenal, amadurecendo o eixo HPA fetal e induzindo a formação de surfactante nos pulmões (SILVEIRA, 2007).

A regulação da liberação hormonal na gravidez é fundamental para o correto desenvolvimento fetal, e qualquer desvio da concentração normal desses hormônios, através de um estresse crônico, pode produzir alterações microscópicas e macroscópicas no hipocampo da prole, com distúrbios comportamentais e psicopatológicos, neurodegeneração inflamatória do hipocampo e comprometimento da aprendizagem espacial (GUEST, 2013; LINS et al., 2018; WANG et al., 2010; BATINIC et al., 2016). Nesse sentido, a Hiperalgesia Muscular Crônica Difusa durante a gestação, enquanto modelo animal que mimetiza a Fibromialgia, poderia desencadear alterações epigenéticas e hormonais.

Nesse contexto, a avaliação dos reflexos neonatais, ou reflexos primitivos é necessária para o acompanhamento do desenvolvimento do feto mediante ações estressoras. Tais reflexos são definidos como reações involuntárias e repetitivas a um estímulo externo (YAGER, 2017; GUIMARÃES, 2003; ODILARA et al., 2019; KUMAR, 2017). A maturação do sistema nervoso central (SNC) é progressiva, ou seja, a ausência, persistência, exacerbação ou atraso dos reflexos primitivos, são indicadores válidos de disfunção cerebral não focal e expressa alterações na gênese dessas estruturas nervosas, o que pode indicar sinal precoce de lesão neurológica grave, encefalopatia, comprometimento do sistema nervoso central, transtornos psiquiátricos ou outras anormalidades neurológicas, geralmente graves (YAGER, 2017; GUIMARÃES, 2003; ODILARA et al., 2019; KUMAR, 2017; PEDROSO, 2010).

A análise de reflexos neonatais em modelo experimental permite uma análise ontogênica da maturação cerebral e do sistema nervoso, uma vez que os ratos neonatos apresentam alguns reflexos semelhantes aos humanos, porém com um tempo diferente de evolução e subsequente aparecimento (KUMAR, 2017). Avaliar reflexos neonatais é de suma importância, pois identifica precocemente possíveis distúrbios neurais e/ou motores na criança.

Considerando-se que fatores estressores crônicos durante a gestação influenciam o desenvolvimento de órgãos e tecidos fetais, assim como influenciam no estilo de vida e de doenças que aquele indivíduo enfrentará durante toda sua vida; um ambiente adverso durante o processo gestacional, permitiria a avaliação de efeitos a longo prazo sobre a descendência (BISCHOFFA, 2018; SILVEIRA, 2007; LINS et al., 2018). Os resultados de investigações com programação fetal, poderão impactar positivamente na prevenção de doenças crônicas, além de contribuir na busca por sua etiologia e na promoção da saúde. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo analisar o impacto da Hiperalgisia Muscular Crônica Difusa na gestação e na prole de ratas wistar, tendo como principal foco do estudo, a influência da Fibromialgia em gerações futuras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neurofisiologia da dor

Em 1979, a *International Association for the Study of Pain* (IASP) publicou uma definição que tentava retratar a complexidade da dor e ajudar no manejo da pessoa com dor. Na definição mais recente, de 2020, a dor é retratada como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano (RAJA et al., 2020; DESANTANA, 2020).

Quanto aos processos neurais da sua percepção, o corpo possui receptores sensoriais que são ativados ao notar danos reais ou potenciais, estes recebem o nome de nociceptores. Os nociceptores podem ser classificados em térmicos, mecânicos, polimodais ou silentes. Ao notar o estímulo nocivo, os receptores sensoriais convertem essa energia térmica, mecânica ou química, em potenciais elétricos que despolarizam terminais nervosos e geram potenciais de ação que são propagadas ao sistema nervoso central. A velocidade com que os potenciais de ação são conduzidos, depende do diâmetro e do tipo da fibra, se são mielinizadas ou não. (KANDEL, 2014; COLLOCA et al., 2017)

Os nociceptores são inervados por dois tipos de fibras: Fibras A δ , e fibras C. As fibras A δ são mielinizadas, assim, sua velocidade de condução é mais rápida, transmitindo informações de dor de latência curta (aguda). Fibras C apresentam diâmetro pequeno e são amielinizadas, logo, a velocidade de condução das informações é lenta, característica de uma dor difusa (KANDEL, 2014; COLLOCA et al., 2017).

Os sinais dos nociceptores são transmitidos para os neurônios do corno dorsal da medula espinhal. Então, a informação nociceptiva é transmitida da medula ao tálamo por cinco vias ascendentes principais, sendo elas, os tratos: espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, cervicotalâmico e espino-hipotalâmico. O trato espinotalâmico é a via que desempenha um papel fundamental na transmissão da informação nociceptiva (KANDEL, 2014). Uma vez no tálamo, vários núcleos de retransmissão participam do processamento central da informação ao córtex cerebral, que é quando de fato percebemos a dor. Todo esse caminho resulta na dor nociceptiva, visto que os receptores dos nociceptores e as vias da dor foram ativados por estímulos específicos. Já a dor nociplástica, não está associada a receptores específicos, ela é produzida por disfunções ou doenças das células do sistema nervoso somatossensorial (MIRANDA, 2016; COLLOCA et al., 2017; CHEN et al., 2021).

Segundo a IASP, a hiperalgesia pode ser entendida como uma resposta exacerbada a um estímulo doloroso considerado brando, havendo uma hiperexcitabilidade dos nociceptores, causando uma resposta dolorosa aumentada (JENSEN, 2014; SCHOLZ et al., 2019). Nesse contexto, a fibromialgia é uma doença musculoesquelética crônica com sensibilização central e periférica, de dor nociplástica, sendo comum os pacientes apresentarem hiperalgesia (SIRACUSA, 2021).

2.2 Fibromialgia

A Fibromialgia (FM) é uma doença reumatológica crônica, caracterizada por dor musculoesquelética difusa, além de estar associada a outras condições, como fadiga, depressão, padrão de sono ineficaz, entre outros. A FM é uma doença de etiologia ainda desconhecida, que atinge em sua maioria mulheres. Suspeita-se do envolvimento de fatores genéticos, ambientais, autoimunes ou hormonais para seu desenvolvimento. O diagnóstico é clínico e a influência de aspectos sociais, psicológicos e culturais torna sua expressão clínica altamente variável, podendo atrasar ou prejudicar o correto diagnóstico e subsequente abordagem terapêutica (BHARGAVA, 2021; MARTINEZ et al., 2016; HEYMANN et al., 2017).

A partir de 1980, foram discutidos critérios diagnósticos para a FM. Apenas em 1990, o Colégio Americano de Reumatologia, American College of Rheumatology (ACR), elaborou critérios de classificação, podendo ser chamados de ACR 90. Esses critérios, que se baseavam na dor difusa e no exame físico dos pontos dolorosos (tender points), foram bem aceitos pela comunidade científica e contribuíram para o avanço dos estudos sobre a Fibromialgia. Além disso, a classificação da ACR 90 também foi importante para diminuir a subjetividade na análise clínica desses pacientes (MARTINEZ et al., 2016; HEYMANN et al., 2017).

Ao passar dos anos, com o avanço dos estudos, notou-se a necessidade da atualização dos critérios diagnósticos, logo, foram publicadas atualizações nos anos de 2010, 2011 e 2016 (MARTINEZ et al., 2016). As principais mudanças trouxeram novos critérios e índices, como por exemplo a avaliação de distúrbios funcionais e alterações de cognição, que avaliados com os critérios ACR 1990, proporcionam uma acurácia diagnóstica. A prevalência da Fibromialgia no Brasil é estimada em 2,5%, sendo em sua maioria mulheres (HEYMANN et al., 2017).

Apesar da fisiopatologia da fibromialgia ainda não estar totalmente elucidada, seu desenvolvimento está relacionado ao processo de sensibilização central, com o aumento de estímulos excitatórios no corno dorsal da medula espinal, como glutamato; e a redução de neurotransmissores inibitórios de serotonina e noradrenalina nos tratos inibitórios descendentes.

A literatura tem demonstrado que os mecanismos patológicos da fibromialgia possam estar ligados a uma resposta a estímulos estressores resultando em níveis elevados de substância P e neurocinina 1, associados ao eixo hipotálamo-hipófise adrenal (HPA), cognição, afeto e sensibilização central no corno dorsal. Acredita-se que o eixo HPA e o sistema nervoso autônomo (SNA), desempenham um papel no aparecimento e/ou manutenção da fibromialgia (DESANTANA, 2008).

2.3 Hiperalgisia Muscular Crônica Difusa

Por ser uma doença de etiologia desconhecida, é importante que sejam feitas pesquisas que ajudem a diagnosticar, identificar causas, marcadores e possíveis tratamentos para a Fibromialgia. Pesquisadores buscam formas de desenvolver em laboratório um estado de dor musculoesquelética crônica e difusa que se assemelhe com a Fibromialgia (MACIEL et al., 2014). O modelo animal considerado padrão ouro para mimetizar a FM é o da Hiperalgisia Muscular Crônica Difusa, que consiste em duas injeções unilaterais de salina ácida (pH 4,0) no músculo gastrocnêmio esquerdo, com intervalo de cinco dias entre as injeções. Esse protocolo induz uma hiperalgisia bilateral não inflamatória no animal, mediada por mecanismos centrais, que se mantém por 4 semanas e não gera lesões teciduais, desencadeando um resultado característico da Fibromialgia (MACIEL et al., 2014; SLUKA, 2001).

Para a indução do modelo, dentre os quatro canais iônicos sensíveis ao ácido, o ASIC3 parece desempenhar um papel fundamental para o desenvolvimento de hiperalgisia secundária e sensibilização central (LESNAK, 2019). O controle do pH é fundamental para a indução. A diminuição do pH e do lactato ativam ASICs; os ASIC3 mediam os efeitos iniciais da hiperalgisia muscular crônica difusa induzida por salina ácida (LESNAK, 2019; DESANTANA, 2008).

Após a segunda injeção da salina, há um aumento duradouro na liberação de glutamato e aspartato no corno dorsal da medula espinhal. O glutamato se liga ao receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) que é crucial no desenvolvimento de dores musculares. O núcleo magno da rafe (NRM) e o núcleo gigantocellularis (Gi), do Bulbo rostro-ventromedial (RVM), são áreas importantes para o desenvolvimento e manutenção da hiperalgisia mecânica após a injeção, devido a um desequilíbrio entre as influências inibitórias e excitatórias (LESNAK, 2019; DESANTANA, 2008).

Nesse modelo hiperalgésico induzido por ácido desenvolvido por Sluka (2001), há ainda aumentos na fosforilação da quinase relacionada ao sinal extracelular do fator de

transcrição (pERK), na medula espinhal, amígdala e o núcleo paraventricular talâmico anterior. Sendo importante para a indução e manutenção da hiperalgesia crônica (LESNAK, 2019).

2.4 Gestação e Fibromialgia

As alterações que o corpo sofre para acomodar o feto durante o período gestacional é extenso e integrado, envolvendo todos os sistemas. Dentre as principais alterações, podemos citar: 1- alterações endócrinas, promovendo o crescimento fetal e a manutenção da vida; 2- dermatológicas, como o aparecimento dos tubérculos de Montgomery e hiperpigmentação; 3- cardiovasculares, com desenvolvimento da rede vascular uterina, aumento da volemia e pré-carga; 4- musculoesqueléticas, com mobilidade articular e posturas alteradas; 5- digestórias e urinárias, com êmese, pirose e aumento da taxa de filtração glomerular (BORON, 2015; PASCUAL, 2021).

No entanto, o desenvolvimento de anormalidades durante a gravidez, podem levar a complicações tanto para a mãe quanto para o feto, por isso é muito importante um acompanhamento rigoroso da gestação desde antes da concepção (PASCUAL, 2021). A saúde mental e física dos genitores, pode trazer predisposição de alguns problemas como depressão, ansiedade e doenças crônicas não transmissíveis para sua descendência (HIGGINS et al., 2015). Gestantes com fibromialgia apresentam uma potencialidade aos sintomas dolorosos, a regulação neuroendócrina que acontece durante a gravidez, pode acabar potencializando alguns sintomas da FM mesmo em mulheres saudáveis. A associação dos hormônios gonadais femininos com a modulação da dor, a baixa de serotonina, acabam por potencializar um padrão de sono ineficaz, depressão e dor crônica (GENÇ, 2017).

O estudo de Saa'd e colaboradores (2013), acompanhou um grupo de mulheres grávidas saudáveis, sem diagnóstico de Fibromialgia, e aplicou questionários sobre qualidade de vida com o SF-36 e o questionário sobre impacto da fibromialgia (FIQ), além de avaliar os critérios diagnósticos do Colégio Americano de Reumatologia para a FM. As mulheres que preencheram os diagnósticos para uma sintomatologia de fibromialgia (critérios ACR positivos) foram alocadas em um grupo e tiveram seus desfechos obstétricos comparados com outras mulheres também saudáveis, porém sem sintomatologia. As mulheres com sintomatologia, apresentaram prejuízo no desenvolvimento de atividades de vida diárias antes do terceiro trimestre, diferente do outro grupo de grávidas saudáveis que não apresentaram qualquer sintomatologia (SAA'D, 2013).

A gravidez é um período de vulnerabilidade biopsicossocial para a mulher. Ansiedade e sintomas depressivos na gravidez estão associados a implicações adversas para o neurodesenvolvimento fetal e com baixo peso ao nascer. Foi observado que ansiedade e depressão são mais frequentes na gestação de pessoas com Fibromialgia. (GENÇ, 2017)

Estudos que avaliaram os filhos de mulheres que tinham diagnóstico de dor crônica, observaram que esses filhos eram mais propensos a relatar queixas de dor em comparação com filhos de mães saudáveis (HIGGINS et al., 2015). Além disso, foi apontado que adolescentes cujos pais tenham dor crônica, apresentavam maior risco de desenvolvimento de ansiedade e depressão do que adolescentes de pais sem dores crônicas. (HIGGINS et al., 2015; GENÇ, 2017).

A Fibromialgia não é hereditária, mas acredita-se que um dos fatores para seu aparecimento, tenha relação com predisposição genética. Mulheres representam a maioria da população com Fibromialgia, mas apesar disso, o impacto que a FM e os medicamentos que essas pessoas tomam, exerceriam na gestação, ainda não é tão claramente definido.

2.5 Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença (DOHaD)

O ramo da ciência que estuda a associação de agravos ocorridos em fases iniciais de desenvolvimento e a predisposição a doenças nesse indivíduo até a fase adulta, é denominado: origens desenvolvimentistas da saúde e doença, do inglês, developmental origins of health and disease (DOHaD) (SILVEIRA, 2007; MANDY, 2018). Efeitos adversos ocorridos em fases precoces do desenvolvimento humano, como no ambiente intrauterino através de mecanismos epigenéticos, sinais hormonais transmitidos ao feto através da placenta ou através da lactação, influenciam no padrão de saúde e doença ao longo da vida desse indivíduo (SILVEIRA, 2007).

Na década de 30, Kermack et al. publicou um estudo que analisava taxas de mortalidade na Inglaterra e na Suécia, onde foi constatado que as condições ambientais durante a vida fetal e a infância poderiam estar determinando a taxa de mortalidade de cada geração (KERMACK, 1934; SILVEIRA, 2007). O período em que o evento adverso ocorre também influencia no desfecho do indivíduo (SILVEIRA, 2007; HEINDEL, 2015). Em 1976, ao analisar 300.000 filhos de mulheres expostas a um período de escassez alimentar da Holanda na Segunda Guerra Mundial, Ravelli demonstrou uma relação direta do período estressor materno, ao desenvolvimento do indivíduo (RAVELI, 1976; SILVEIRA, 2007). Caso a mãe houvesse sofrido desnutrição durante o primeiro semestre da gestação, havia uma grande incidência de obesidade nos filhos, já se foram expostos a desnutrição no último trimestre da

gestação, esse grupo apresentava uma baixa incidência de obesidade (RAVELI, 1976; SILVEIRA, 2007).

Desde então, tem se desenvolvido o conceito de programação fetal, onde um estímulo aplicado em um período crítico do desenvolvimento pode ter efeitos duradouros sobre a estrutura ou função de um organismo (SILVEIRA, 2007; HEINDEL, 2015). A vida pré-natal, a infância e a adolescência são períodos críticos caracterizados por alta plasticidade neural (SILVEIRA, 2007; GOYAL, 2019). A exposição a um estímulo estressor materno significativo, pode levar a alterações persistentes no padrão de saúde da sua descendência, demonstrando uma relação causal entre condições intrauterinas e o favorecimento ao surgimento de doenças crônicas como hipertensão, diabetes, obesidade, doenças cardíacas, entre outros, até a fase adulta desse indivíduo (SILVEIRA, 2007). O principal produto resultante de um período estressor materno, é um aumento na produção de glicocorticoides, por hiperestimulação do eixo HPA.

Os glicocorticoides (GC) atuam no metabolismo dos carboidratos, na resposta inflamatória, síntese de proteínas, na maturação fetal, entre outras funções fundamentais para a homeostase corporal (MANDY, 2018). Ao final da gestação, os glicocorticoides agem na maturação do eixo HPA fetal e na produção de surfactante pulmonar (SILVEIRA, 2007; MANDY, 2018). A carga de GC que passa da mãe para o feto é normalmente regulada pela barreira natural enzimática 11 β -hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD2), uma enzima placentária que inativa os GC circulantes, e impede que o feto seja exposto a níveis elevados de GC antes do final da gestação ou em casos de estresse agudo materno (GUEST, 2013; MANDY, 2018). No entanto, quando o estresse é crônico, através de infecções, dores crônicas, desnutrição ou tratamento medicamentoso com GC, há uma hiperestimulação do eixo HPA materno, com expressão reduzida do feedback negativo no hipotálamo, aumento da produção de GC e atenuação da expressão de 11 β -HSD2, aumentando assim, a exposição fetal aos glicocorticoides (MANDY, 2018; GOYAL, 2019). Podendo resultar em mudanças irreversíveis na estrutura de órgãos, alterações macroscópicas e microscópicas no hipocampo da prole e alterações na expressão gênica (GUEST, 2013; LINS et al., 2018; MANDY, 2018). Esses eventos estão representados no fluxograma abaixo (Figura 1).

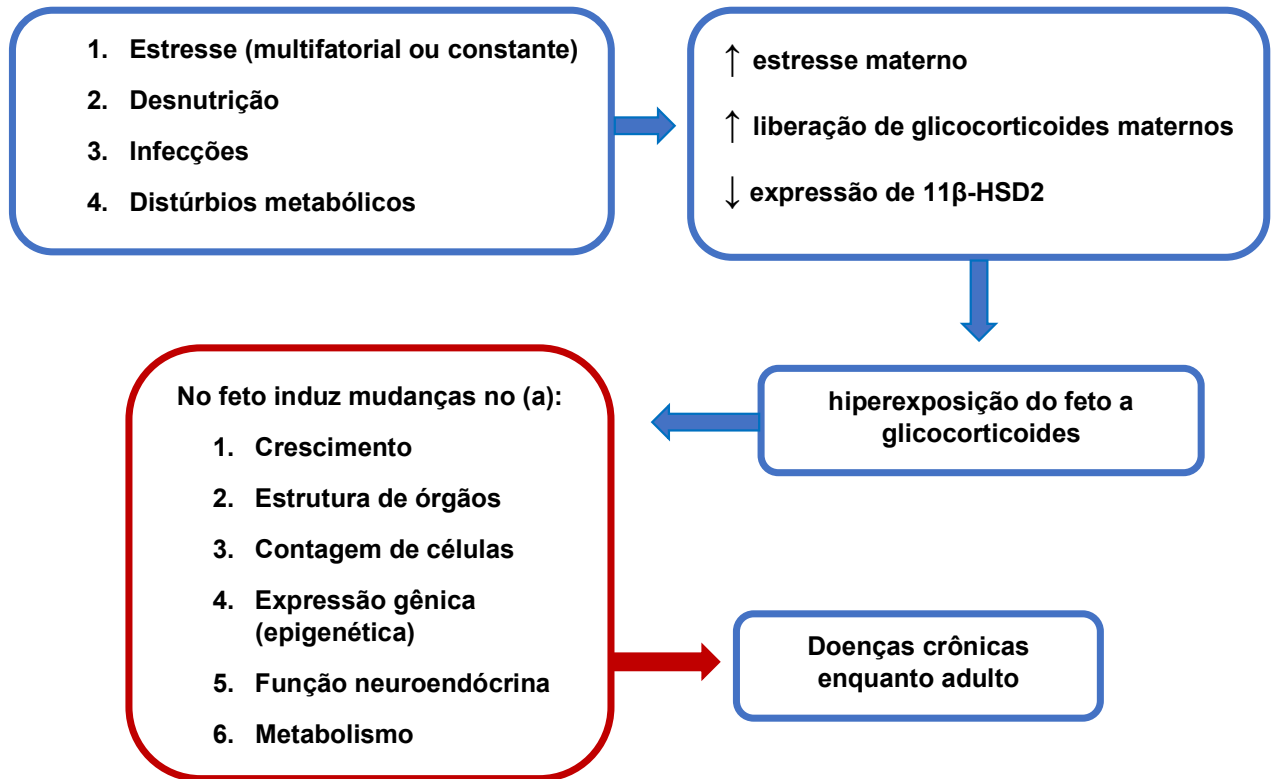


Figura 1. Fluxograma da associação de glicocorticoides e fatores ambientais na programação fetal. Adaptado de Mandy (2018) e Goyal (2019)

A atividade do eixo HPA materno resultando na hiperexcitabilidade do eixo HPA fetal é o mecanismo fisiológico mais comumente utilizado para explicar a relação entre o estresse materno e os desfechos com a prole. Estudos que fizeram a aplicação de glicocorticoides sintéticos também resultaram em alterações na prole. Todavia, outros mecanismos também podem fazer parte dessa relação. O estresse materno que uma hiperalgesia pode causar, por exemplo, afeta diretamente a saúde materna como alteração em comportamentos regulatórios, como do sono, da atividade intestinal, da atividade do sistema simpático adrenomedular que regula a resposta ao estresse agudo, bem como o sistema imunológico (BUSSIÈRES, 2015).

2.6 Reflexos Neonatais

O neurodesenvolvimento e a maturação do sistema nervoso são usualmente avaliados na prática clínica através de reflexos neonatais e marcos do desenvolvimento. Os reflexos primitivos são movimentos involuntários e repetitivos desencadeados pelo tronco cerebral e medula espinhal e sua presença no tempo certo demonstra um bom desenvolvimento neurossensoriomotor (YAGER, 2017; GUIMARÃES, 2003). Quando esses reflexos estão ausentes, permanecem por mais tempo que o necessário ou quando aparecem fora do período esperado, indicam possíveis anormalidades no neurodesenvolvimento do bebê (KVARIK, 2016; YAGER, 2017).

Em humanos, tais testes são realizados ainda na maternidade logo após o nascimento, sendo os principais: Reflexo de Moro, de sucção, de busca, de Galant, de colocação, preensão palmar, preensão plantar, apoio plantar, marcha reflexa e o reflexo Tônico-Cervical Assimétrico. Estima-se, através de encefalograma e análises anatômicas, as semelhanças da maturação neurológica entre animais e humanos. Os pré-oligodendrócitos são as células predominantes no cérebro fetal humano em desenvolvimento, de 23 a 32 semanas de gestação; um rato com um dia de nascimento possui um nível de maturação cerebral semelhante (YAGER, 2017; GUIMARÃES, 2003; ODILARA et al., 2019; KUMAR, 2017).

Em roedores, entre 8 e 10 dias de gestação, há o desenvolvimento da placa neural e do processo cefálico, além do fechamento do sulco neural por volta do 11º dia de gestação (CARMO, 2004; YAGER, 2017). O desenvolvimento cerebral de roedores se difere do desenvolvimento humano, quanto ao período de maturação. Em humanos, a maior parte desse desenvolvimento ocorre no período pré-natal, enquanto nos roedores, o ápice da mielinização, por exemplo, ocorre no período pós-natal. Colocando em equivalência a maturação neural de humanos e roedores, pode-se afirmar que as duas primeiras semanas do período pós-natal dos roedores equivalem ao terceiro trimestre de gestação em humanos, quando ocorre um rápido crescimento encefálico, com arborização dendrítica, crescimento axonal e mielinização (MELO, 2020).

Diante do exposto, trabalhos que avaliem o impacto de processos estressores durante o período gestacional no desenvolvimento da prole são de grande importância. Nesse sentido, estudos que investigam a fibromialgia como potencial indutor do estresse durante a gestação permitiria a avaliação de efeitos a longo prazo sobre a descendência, resultando em dados importantes na investigação de doenças que aquele indivíduo enfrentará durante toda sua vida.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Hipótese: Fatores estressores crônicos durante a gestação influenciam o desenvolvimento fetal, causam alterações no hipocampo, assim como influenciam no estilo de vida e patologias que aquela criança enfrentará enquanto adulta, portanto o modelo de Hiperalgisia Crônica Difusa pode desencadear distúrbios na prole que favoreçam o desenvolvimento de doenças ou cause alterações comportamentais até a vida adulta.

Objetivo: Avaliar a influência da hiperalgisia muscular crônica difusa no processo gestacional e na resposta de reflexos neonatais e desenvolvimento da prole de ratas.

3.2 Objetivos Específicos:

Hipótese 1: A hiperalgisia muscular crônica difusa poderá influenciar na gestação.

Objetivo 1: Analisar a influência hiperalgisia muscular crônica difusa no processo gestacional.

Hipótese 2: A hiperalgisia muscular crônica difusa pode alterar as respostas dos reflexos neonatais da prole.

Objetivo 2: Avaliar as respostas dos reflexos neonatais na prole de ratas submetidas a hiperalgisia muscular crônica difusa.

Hipótese 3: Fatores hormonais têm influência no desenvolvimento da Fibromialgia, visto que o maior número de pacientes é do sexo feminino. É importante avaliar se o gênero influencia na resposta da prole.

Objetivo 3: Investigar o dimorfismo sexual na resposta comportamental da prole de ratas submetidas a hiperalgisia muscular crônica difusa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental, utilizando ratos *Wistar*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA), da Universidade Federal de Sergipe, através do nº de protocolo 8239041219 (Anexo A).

4.1 Animais

Foram utilizados 27 ratos adultos (18 fêmeas e 9 machos), pesando entre 200 g e 250 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. Para o desenvolvimento da pesquisa eles ficaram alocados no Laboratório de Pesquisas em Neurociências (LAPENE), mantidos em gaiolas de fundo sólido mini-isoladoras com sistema fechado de ventilação, e um ciclo claro-escuro de 12h / 12h (claro das 6h às 18h), à temperatura de 21 ± 1 °C, com acesso livre à ração e água apropriadas.

Aos 90 dias de vida, foi iniciada a aclimação de dois dias para o início do experimento. Foi realizado o protocolo da indução da Hiperalgesia Crônica Bilateral nas fêmeas do grupo Salina Ácida (SA), no grupo Salina Neutra (SN) foi realizado o mesmo protocolo, mas com salina neutra ao invés da salina ácida, e o grupo Controle (Ctrl) foi avaliado quanto ao comportamento nos mesmos momentos dos grupos SA e SN, mas sem intervenção. Os ratos foram divididos em três grupos de 06 fêmeas e 03 machos; cada macho realizou a cobertura de duas fêmeas durante a fase reprodutiva de união e cópula. Quando identificado o tampão mucoso vaginal nas ratas, indicando que houve cópula, aquele era considerado o dia gestacional (DG) 0.

Para os estudos que avaliaram neurodesenvolvimento através de reflexos neonatais em outros roedores com dimorfismo sexual, utilizaram um número amostral de 6 a 8 ratos de cada sexo por grupo. Esses resultados permitiram estabelecer o número amostral necessário para o estudo da prole. Ficou estabelecido o número de 8 ratos como número mínimo para a avaliação dos reflexos neonatais, sendo 8 machos e 8 fêmeas por grupo (FRAGOSO, 2017; MESQUITA, 2007; OLIVEIRA, 2011).

4.2 Protocolos Experimentais

4.2.1 Indução da hiperalgesia muscular crônica

Após mensuração dos parâmetros basais, as ratas fêmeas foram anestesiadas com Isoflurano (2-5%). Um volume de 100 μ L de salina estéril com pH 4,0, calibrada em Phmetro foi injetado no músculo gastrocnêmio esquerdo no dia 0 e, novamente 05 dias após a primeira injeção (dia 05). Este procedimento produz hiperalgesia bilateral persistente no músculo e na pata, por um período de até 4 semanas (MACIEL et al., 2014; SLUKA, 2001). Houve cegamento dos pesquisadores para a indução da hiperalgesia. Um pesquisador distribuiu aleatoriamente os animais nos três grupos experimentais, um segundo pesquisador realizou a instilação da salina e as análises comportamentais. O cegamento foi mantido até o fim do experimento.

Os três grupos experimentais estão descritos a seguir

- 1) Grupo Salina Ácida (n=6): Foi realizada a indução de Hiperalgesia difusa através de duas instilações de salina ácida.
- 2) Grupo Salina Neutra (n=6): Realizados os mesmos procedimentos do grupo 1, mas com a instilação de salina neutra.
- 3) Grupo Controle (n=6): Apenas comportamento sem intervenção.

4.2.2 Monitor de Atividades

Para complementar a avaliação comportamental, foi utilizado o monitor de atividades (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) que consiste em um equipamento destinado a monitorização de movimentos em cobaias colocadas dentro de uma caixa de polietileno. Os movimentos são monitorados por sensores infravermelhos nos eixos x, y e z, ou seja, altura, largura e profundidade. O programa é capaz de captar o caminho efetuado pelo animal, além de reconhecer movimentos circulares, horário e anti-horário, com a possibilidade de ser medido o espaço percorrido, a velocidade do trajeto, a duração, a distância percorrida e o tempo. É possível ainda a contagem de vezes em que o animal ficou de pé; tempo de descanso e movimentos estereotípicos, como coçar e tempo de inércia. Para realização do teste, os animais são retirados das suas caixas e colocados no equipamento. O software é então programado para avaliação, após 5 segundos de adaptação dos ratos ao ambiente, o registro das atividades é feito por um período posterior de 5 minutos. Após esse período foi gerada uma tabela gráfica do caminho efetuado pelo animal, velocidade média, duração do trajeto e distância percorrida. O relatório é emitido em forma de planilha pelo Microsoft Excel (INSIGHT, 2019).

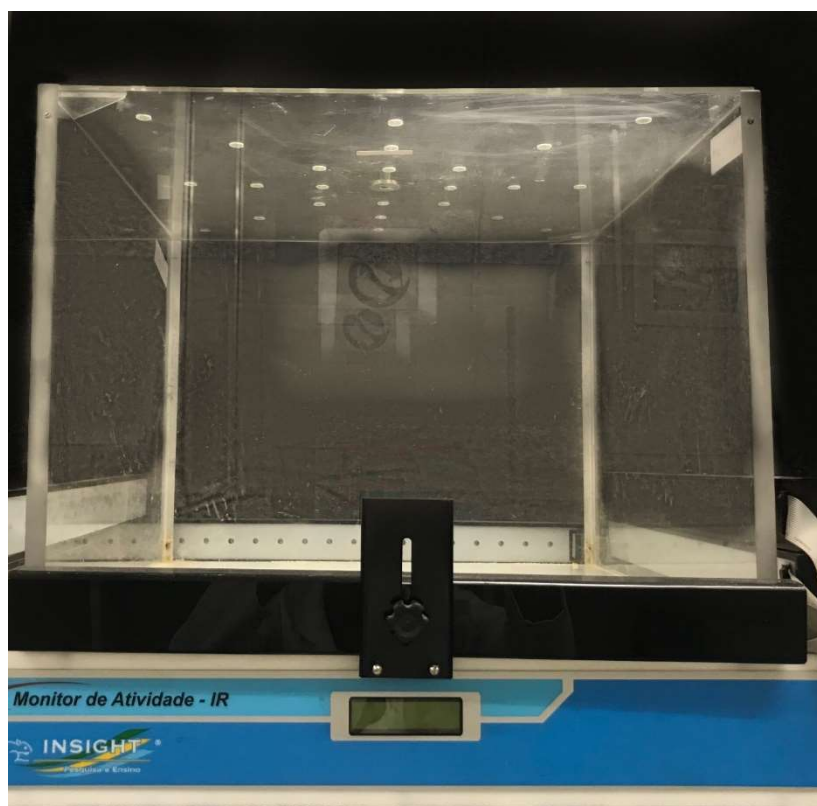


Figura 2. Monitor de atividades. O aparelho é utilizado para avaliação da atividade locomotora do animal. Acervo do Laboratório de Pesquisa em Neurociência – UFS.

4.2.3 Mensuração da hiperalgesia mecânica cutânea

Para avaliação da hiperalgesia mecânica cutânea foi utilizado o Analgesímetro Digital (Insight®, São Paulo, SP, Brasil), também chamado de Von Frey Eletrônico. O aparelho consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor à pata dos animais é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro acoplada ao analgesímetro. Inicialmente os animais são aclimatados em suas caixas por 30 minutos na sala de comportamento. Na sequência, são colocados em cubículos transparentes, cujo assoalho é uma malha de arame não maleável, e aclimatados novamente por 30 minutos. Este procedimento é repetido por dois dias consecutivos antes de iniciar o teste comportamental, durante o tempo de permanência na plataforma eles recebem estimulação com a ponteira. O experimentador aplicará uma pressão linearmente crescente no centro plantar das patas traseiras do animal até que ele produza uma resposta flexora característica denominada de “*flinch*”. São registradas três medidas similares de cinco tentativas, posteriormente calculada uma média aritmética desses valores mais próximos. O resultado obtido é considerado o limiar mecânico de retirada da pata é interpretado como hiperalgesia mecânica secundária (cutânea). As mensurações de limiar mecânico foram realizadas imediatamente antes e após as injeções de salina ácida (MACIEL et al., 2014).

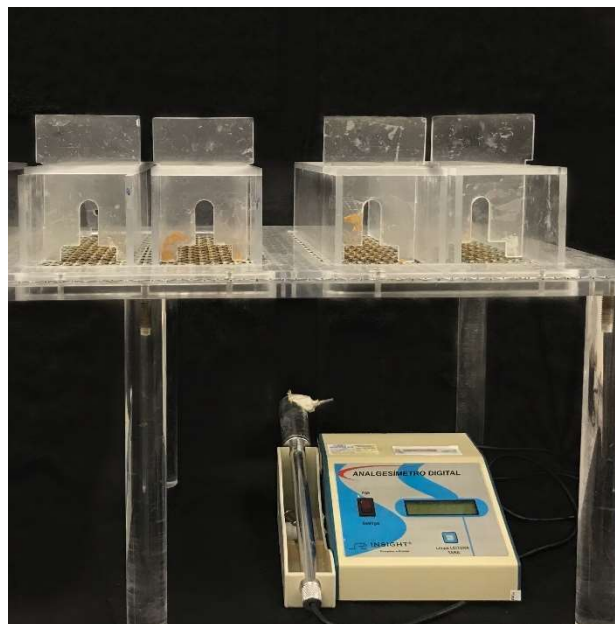


Figura 3. Von Frey Eletrônico. Os animais são mantidos nos cubículos, que contém o assoalho vazado, permitindo o contato do transdutor com as patas traseiras do animal. Acervo do Laboratório de Pesquisa em Neurociência – UFS.

4.2.4 Latência térmica

Para avaliação da latência térmica, foi utilizado o teste da placa quente (*Hot Plate*) (modelo EFF-361, Insight®). Nesse teste, considera-se como latência de resposta, o tempo (em segundos) em que os animais permanecem sobre uma placa metálica aquecida ($50\pm0,5^{\circ}\text{C}$) até reagirem ao estímulo térmico. Essa reação é caracterizada pelo comportamento de levantar ou lambear as patas traseiras, sendo considerada a reação que primeiro for manifestada pelo animal. O tempo de latência para a resposta é registrado com um cronômetro e o tempo de permanência máxima do animal sobre a superfície é de 20s a fim de evitar lesões térmicas (NASCIMENTO et al., 2013). A mensuração da latência térmica foi realizada antes da administração da primeira injeção de solução salina e após 24h da administração da segunda injeção de solução salina (MACIEL et al., 2014).



Figura 4. Placa Quente. A plataforma quente é utilizada para investigação da latência térmica dos animais. Acervo do Laboratório de Pesquisa em Neurociências – UFS.

4.2.5 Reflexos Neonatais e Características Físicas

Os animais foram avaliados por dois avaliadores independentes, previamente treinados, adotando duplo cegamento até o fim do experimento. O cegamento teve como finalidade de evitar ou diminuir viés de indução na condução do estudo, os avaliadores não sabiam de qual grupo aquele neonato fazia parte, além disso, um avaliador não interferia ou participava da avaliação do outro. A expressão do resultado foi escrita nas fichas de avaliação assim como apontado no quadro 1, mas para fins de tabulação, o reflexo foi considerado apenas quando apresentava uma resposta completa, quando realizado de forma efetiva.

As análises dos reflexos primitivos tiveram início no Dia Pós-Natal (DPN) 1, com cada estímulo sendo realizado como descrito nos quadros abaixo (quadro 1 e quadro 2). Foi aferida a massa em gramas da prole nos dias pós-natal 1, 10 e 21. As mensurações de cada estímulo seguiram até uma resposta bem-sucedida dos mesmos, sendo o dia final de avaliação neonatal o DPN 20. Os quadros a seguir foram adaptados dos estudos de *Yager et al* (2017) e *Kumar* (2017), no quadro 1 estão descritos os reflexos neonatais.

Quadro 1. Reflexos neonatais avaliados em ratos.

Reflexo	Estímulo	Resposta Adequada	Expressão de Resultado
Preensão palmar (PPS)	Leve preensão manual com uma haste fina na palma das patas dianteiras	Flexão dos dígitos ao redor da haste.	0 – Não agarra 1 – Agarra com uma das patas 2 – Agarra com sucesso com as duas patas
Preensão plantar (PPI)	Leve preensão manual com uma haste fina na palma das patas traseiras	Flexão dos dígitos ao redor da haste.	0 – Não agarra 1 – Agarra com uma das patas 2 – Agarra com sucesso com as duas patas
Endireitamento (E)	Segura o filhote em decúbito dorsal com as quatro patas	O filhote é capaz de rolar sobre as quatro patas e ficar em	0 – Sem sucesso em até 10s

	perpendiculares ao corpo. Solta o filhote e inicia imediatamente o cronômetro	decúbito ventral em no máximo 15 segundos (s).	1 – Decúbito lateral ou postura inadequada em até 15s 2 – Rolamento bem sucedido com postura adequada (patas perpendiculares ao corpo) em até 15s
Acomodação de membros inferiores (AMI)	Segura o filhote verticalmente pelo tronco, acaricia o dorso da pata traseira com a borda romba de uma superfície	Flexão de membro ao estímulo seguido de extensão para acomodar o membro sobre a superfície.	0 – Sem sucesso 1 – Coloca apenas uma pata traseira 2 – Colocação bem sucedida das duas patas traseiras
Acomodação de membros anteriores pelas vibrissas (APV)	Suspende o filhote pela cauda de tal modo que suas vibrissas toquem levemente a borda de uma superfície plana	Acomoda o membro sobre a superfície em menos de 10 segundos (s).	0 – Sem sucesso em até 10s 1 – Coloca apenas uma pata dianteira em até 10 s 2 – Colocação bem sucedida das duas patas dianteiras em até 10s

Aversão ao precipício (AQ)	Coloca o filhote na borda de uma superfície plana com as patas dianteiras e o focinho além da borda. O pesquisador mantém as mãos e uma espuma abaixo do precipício a fim de evitar a queda do filhote	Em uma resposta protetora o filhote se afasta da beira do precipício em até 10 segundos (s).	0 – Nenhum movimento para sair da borda em até 10s 1 – Se movimenta, mas as patas ou a cabeça se mantêm fora da borda em até 10s 2 – Movimento bem sucedido para longe do precipício em até 10s
Marcha (M)	Coloca o filhote no centro de um círculo de 15 cm de diâmetro	Em no máximo 30 segundos o filhote é capaz de sair do círculo.	Registra o tempo que o filhote levou para ter as duas patas dianteiras fora do círculo, sendo o máximo 30 segundos
Sobressalto auditivo (SA)	O filhote é exposto a um ruído alto (percussão de estruturas metálicas) a uma distância de 10 cm do pavilhão auditivo	Movimento de sobressalto para o lado oposto ao estímulo sonoro.	+ presente - ausente
Postura (P)	Coloca os filhotes em uma superfície aberta e plana e observa sua postura ao se mover	O filhote levanta o abdômen da superfície e as patas ficam paralelas ao corpo. Uma postura imatura é quando o abdômen é arrastado pela superfície ou as	0 – Sem movimento 1 – Postura imatura 2 – Postura madura

		patas ficam perpendiculares ao corpo.	
Geotaxia negativa (GN)	Acomoda o filhote no centro de uma rampa inclinada (45°), com a cabeça no sentido descendente	O animal é capaz de girar o corpo posicionando a cabeça no sentido ascendente em no máximo 10 segundos (s).	0 – Sem movimento em até 10s 1 – Gira parcialmente em até 10s 2 – Geotaxia bem sucedida em até 10s
Endireitamento em queda livre (EQ)	Segura o filhote pelas patas em decúbito dorsal sobre uma superfície algodoadada ou de espuma a 30 cm de distância e então o solta	O filhote é capaz de endireitar-se e virar-se para cair sobre a superfície em decúbito ventral pousando suas patas.	0 – Pousa em decúbito dorsal 1 – Pousa em decúbito lateral 2 – Pousa em decúbito ventral sobre as patas

Quadro 1. Reflexos neonatais avaliados em ratos.

Elaboração: autora. Adaptado de *Yager e Kumar*. (Yager, 2017; Kumar, 2017).

No quadro 2 a seguir, estão descritas as características físicas que foram avaliadas na prole.

Quadro 2. Características físicas avaliadas em ratos.

Reflexo	Estímulo	Resposta Adequada	Expressão de Resultado
Abertura Ocular (AO)	Registrar o dia em que as duas pálpebras abrem	Houve abertura das pálpebras	+ presente - ausente
Abertura do conduto auditivo (ACA)	Registrar o dia em que o óstio acústico externo pode ser visualizado	O óstio acústico externo pôde ser visualizado	+ visível - coberto

Irrupção dos incisivos superiores (IIS)	Registrar o dia em que há a irrupção dos incisivos superiores	Há o rompimento da gengiva com exposição incisal	+ presente ou – ausente
Irrupção dos incisivos inferiores (IIS)	Registrar o dia em que há a irrupção dos incisivos inferiores	Há o rompimento da gengiva com exposição incisal	+ presente ou – ausente

Quadro 2. Características físicas avaliadas em ratos.

Elaboração: autora. Adaptado de *Yager e Kumar*. (Yager, 2017; Kumar, 2017).

4.3 Delineamento Experimental

Os ratos machos não passaram por intervenção e foram utilizados apenas para a cópula. As ratas foram aclimatadas por 2 dias, então no terceiro dia (considerado dia 0), foram colhidos os dados do Analgesímetro digital, Monitor de Atividades e Placa quente para mensurar os valores basais desses animais. Após as mensurações, as fêmeas do grupo salina ácida receberam uma injeção unilateral no gastrocnêmio esquerdo de solução salina estéril ácida (pH 4,0), como primeira etapa da indução da hiperalgesia. Já as fêmeas do grupo salina neutra receberam uma injeção unilateral no gastrocnêmio esquerdo de salina estéril neutra (pH 7,0), para ser o controle da hiperalgesia. As fêmeas do grupo controle não passaram por intervenção, sendo o controle da gestação. Com cinco dias, foram feitas novas injeções de salina estéril nos grupos salina ácida e salina neutra, seguindo o mesmo protocolo do dia 0. Após 24h (dia 6), foram realizadas novas mensurações comportamentais, onde foram colhidos os dados do Analgesímetro digital, Monitor de Atividades e Placa quente para mensurar os valores pós indução desses animais. A linha do tempo do delineamento experimental é demonstrada na figura a seguir (Figura 2).

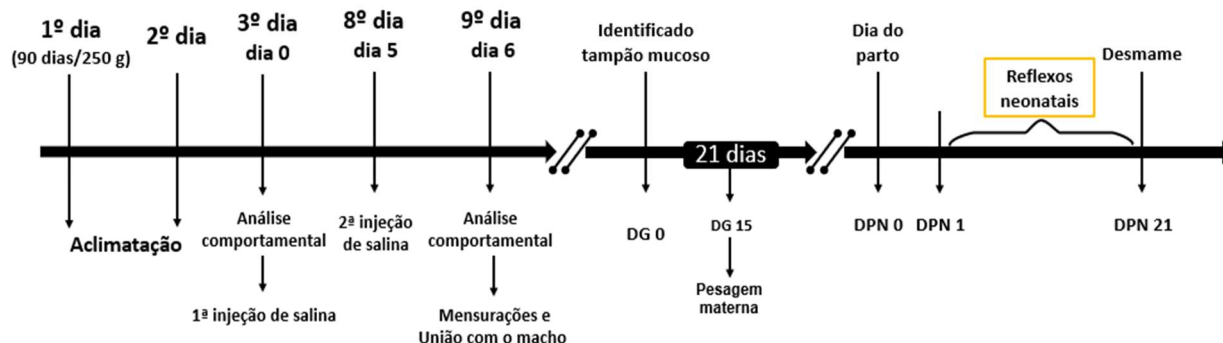


Figura 5. Linha do tempo do delineamento experimental. Legenda: DG: Dia gestacional e DPN: Dia pós natal.

Ao fim do desenvolvimento do projeto, os ratos foram eutanasiados de maneira controlada e assistida, através da administração de dose excessiva do anestésico Tiopental sódico (150 mg/Kg, i.p.), seguindo rigorosamente os preceitos éticos estabelecidos pelas diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA); com a Resolução Normativa nº 23 de 2015, referente a Introdução Geral do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica; pela Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos; a Lei nº 11.794 de 2008 e o Decreto nº. 6899 de 2009. Suas carcaças foram dispostas em sacos brancos devidamente identificados como material biológico, armazenadas em freezer e entregues ao Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe, até o recolhimento por empresa especializada com contrato vigente com a instituição (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009; BENTO-SANTOS et al., 2012; BRASIL, 2018).

4.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média, utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism® versão 8.0 (GraphPad Software, Inc., USA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, com o valor de $p > 0,05$, foram considerados paramétricos. Os dados dos ratos genitores (Monitor de atividades, analgesímetro digital e placa quente) foram analisados através do Teste T pareado com os valores pré e pós indução (dia 0 e dia 6). Os dados da prole foram analisados usando análise de variância de duas vias (2-way ANOVA) com pós teste de Tukey. Foi adotado um nível de significância de 95% para todas as análises estatísticas.

5. RESULTADOS

5.1 FASE 1 – HIPERALGESIA NA GESTAÇÃO

5.1.1 Hiperalgesia Muscular Crônica Difusa

Limiar mecânico de retirada da pata

Podemos observar na figura a seguir (figura 6) que nas ratas do grupo Salina Ácida, o limiar mecânico de retirada da pata atingiu diferença significativa tanto na pata contralateral (direita) quanto na pata ipsilateral (esquerda), logo, as ratas do grupo salina ácida apresentavam hiperalgesia mecânica secundária (cutânea) bilateral, mostrando que a hiperalgesia crônica bilateral foi efetiva.

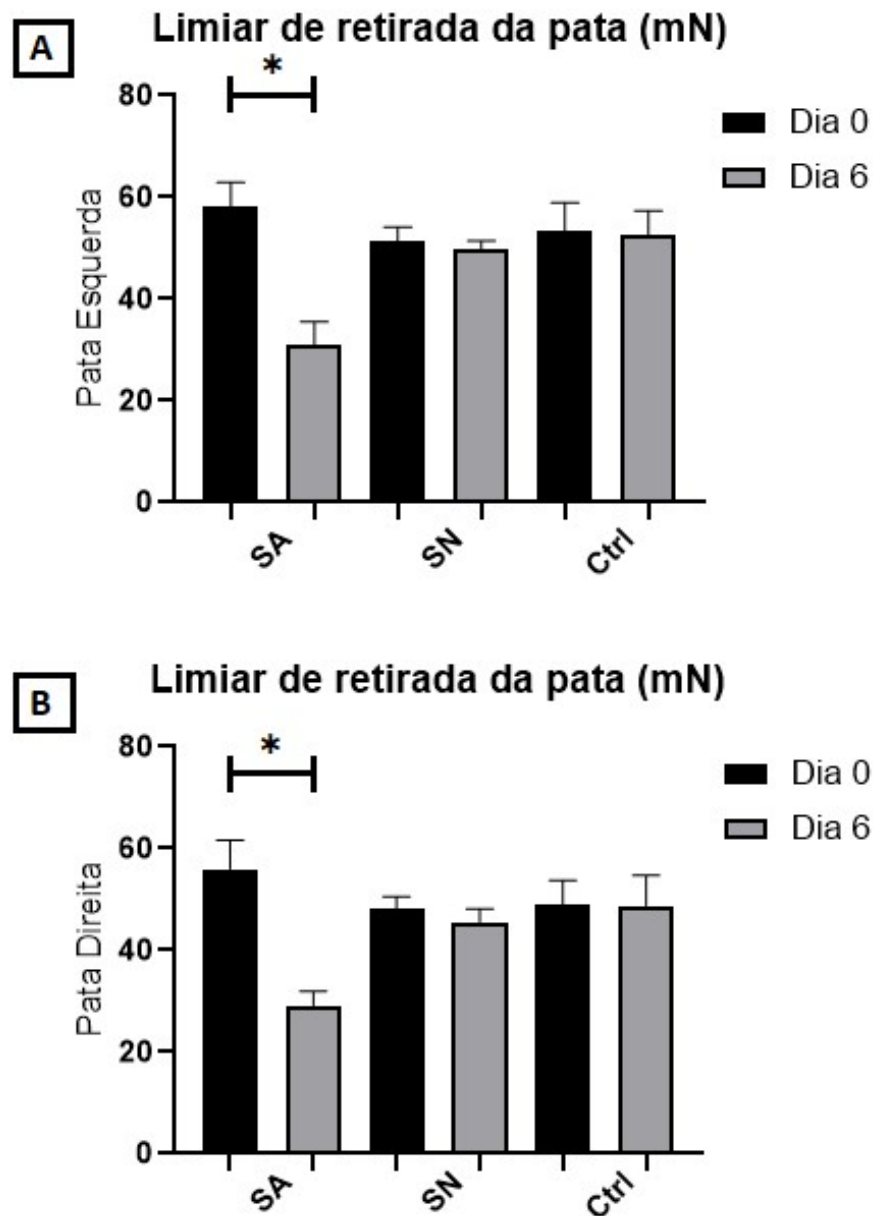


Figura 6. Limiar mecânico de retirada da pata. Valores médios do limiar mecânico de retirada da pata ipsilateral (2-A) e contralateral (2-B) do experimento, no Analgesímetro digital (mN). Os dados foram colhidos nos momentos pré-indução (dia 0) enquanto valor basal, e pós-indução (dia 6) que compreende para os grupos experimentais o período de indução do modelo de hiperalgesia. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados por Teste T pareado. O grupo SA apresentou no dia 6 redução significativa do limiar de retirada mecânica da pata quando comparado ao seu basal. Os grupos SN e Ctrl não apresentaram redução significativa de limiar. Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle. *Variação estatística significativa intragrupo ($p < 0,05$).

Latência Térmica

Como resultado da latência térmica, podemos observar, que ao comparar os valores basais (dia 0) e pós intervenção (dia 6), houve redução significativa da latência térmica apenas no grupo salina ácida. Esse dado complementa o resultado do limiar de retirada mecânica da pata, demonstrando que as ratas do grupo salina ácida estavam em um estado de hiperalgesia bilateral.

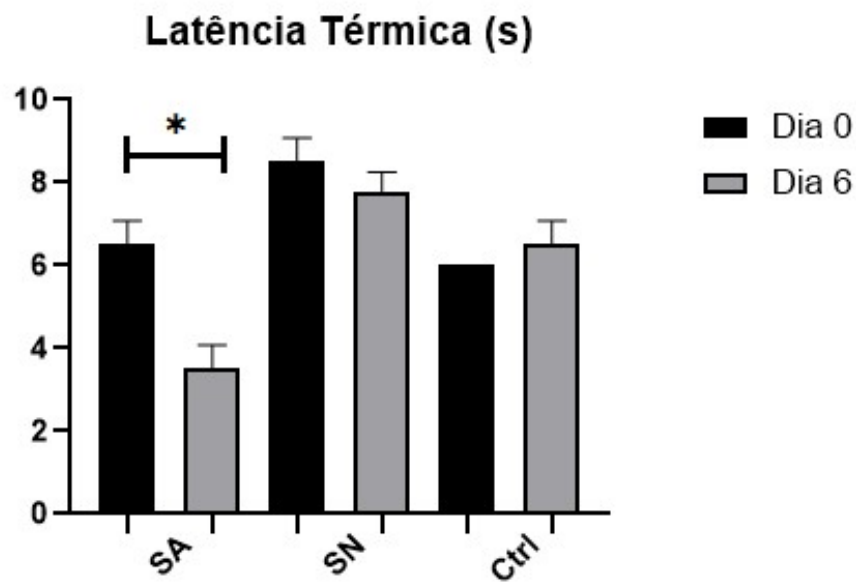


Figura 7. Limiar de latência térmica. Valores médios de latência térmica (s) na Placa Quente. Os dados foram colhidos nos momentos pré-indução (dia 0) enquanto valor basal, e pós-indução (dia 6) que compreende para os grupos experimentais o período de indução do modelo de hiperalgesia. Os dados foram expressos em segundos (s) como média $\pm$ desvio padrão e analisados por Teste T pareado. O grupo SA apresentou no dia 6 redução significativa do limiar de latência térmica quando comparado ao seu basal. Os grupos SN e Ctrl não apresentaram redução significativa do limiar. Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle. *Variação estatística significativa intragrupo ($p < 0,05$).

Monitor de Atividades

No monitor de atividades nossos resultados demonstram uma redução significativa da distância percorrida apenas para o grupo salina ácida. Os valores do gráfico foram representados com as médias de deslocamento em centímetros do monitor de atividades de cada grupo, para a avaliação basal e do dia 6.

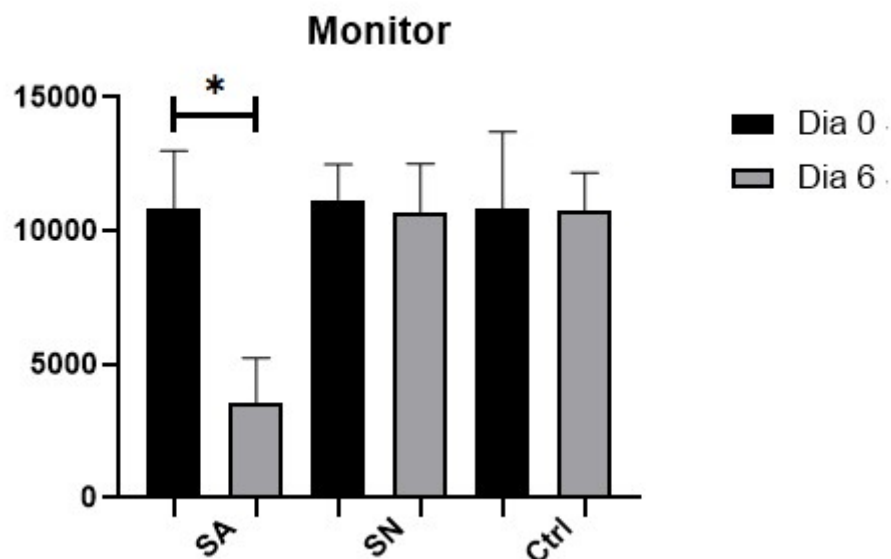


Figura 8. Distância Percorrida. Os Valores médios da distância percorrida (cm) no Monitor de Atividades. Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. A aptidão locomotora dos animais foi avaliada nos momentos pré-indução (dia 0) enquanto valor basal, e pós-indução (dia 6) que compreende para os grupos experimentais o período de indução do modelo de hiperalgesia. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e analisados por Teste T pareado. O grupo SA apresentou no dia 6 redução significativa da distância percorrida quando comparado ao seu basal. Os grupos SN e Ctrl, não apresentaram redução do limiar. Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle. *Variação estatística significativa intragrupo ($p < 0,05$).

5.1.2 Gestação

Somente após efetivado o protocolo de hiperalgesia, houve a união dessas ratas com os machos para o acasalamento programado. Após instituído o protocolo, a hiperalgesia se mantém por até 4 semanas. A gestação de ratas *Wistar* dura em média 21 dias, sendo assim, as ratas do grupo salina ácida estariam em um estado de hiperalgesia durante toda a prenhez. Quanto à cópula, foi possível observar que as ratas do grupo salina ácida estavam com pouca resistência ao macho, favorecendo a cópula, havendo a formação do tampão mucoso logo no primeiro dia de união das fêmeas com os machos. Quando identificado o tampão mucoso, aquele era considerado o dia gestacional (DG) 0.

As gestações duraram de 21 à 22 dias, as ratas tiveram sua massa em gramas aferidas antes da união com o macho e novamente no dia gestacional 15 (DG 15). O grupo SA pariu 64 ratos, o grupo SN pariu 42 ratos, já o grupo controle pariu 44 ratos.

O dia do parto foi considerado o dia pós-natal (DPN) 0. No DPN 0 apenas observamos o comportamento materno com a prole, para notar comportamentos agressivos ou de abandono. Então no DPN 1 foi feita a pesagem da prole e eles foram marcados com caneta de tinta permanente para controle da evolução de cada filhote.

Foi observada a diminuição de 8 filhotes salina ácida no segundo dia de vida pós-natal, eles foram devorados pelas mães. Já dois filhotes do grupo salina neutra, da mesma rata, não foram amamentados e morreram. Não observamos mais perdas no número de animais nos dias subsequentes, resultando em um N total de 140 ratos.

Os reflexos foram avaliados pelo menos 2 dias antes do seu possível aparecimento, para conseguirmos captar o início do reflexo e sua maturação. Em relação à massa da prole, o grupo salina ácida apresentou uma média de massa significativamente menor em relação a prole dos grupos salina neutra e controle ($p=0,0051$; e $p=0,0033$). Os dados da gestação podem ser visualizados na tabela 1 a seguir:

Tabela 1. Dados da gestação

	Salina Ácida	Salina Neutra	Controle
Massa basal (g)	230±7	230±9	240±5
Massa DG 15 (g)	297±11	288±17	305±15
Média de número de filhotes/rata	11	11	11
Taxa de sobrevivência filhotes	87,5%	95,23%	100%
Massa dos filhotes (média em g)	6,2*	7,2	6,9

Tabela 1. Dados da gestação. Os dados da pesagem das ratas e dos filhotes foram expressos por média±desvio padrão de média. O número de filhotes foi expresso em média. A taxa de sobrevivência dos filhotes foi expressa em porcentagem. Foram considerados para os cálculos, apenas os dados das ratas parturientes. Massa dos filhotes com diferença significativa do grupo SA contra SN e Ctrl ($p=0,0002$; e $p=0,0145$ respectivamente) Legenda: DG, dia gestacional; g, gramas. *Variação estatística significativa (ANOVA F (2, 75) = 11,09; $P<0,0001$).

5.2 FASE 2 – RESPOSTA DA PROLE

5.2.1 Reflexos Neonatais e Características Físicas

Foram avaliados 13 animais de cada sexo, em cada grupo. Logo, foram 13 machos e 13 fêmeas no grupo salina ácida; 13 machos e 13 fêmeas no grupo salina neutra e 13 machos e 13 fêmeas no grupo controle, resultando em um N total de 78 ratos.

Para o desenvolvimento da prole, avaliamos dois parâmetros: Reflexos neonatais e Desenvolvimento de características físicas:

1) Reflexos sensório-motores: Preensão palmar (PPS); Preensão plantar (PPI); Endireitamento (E); Acomodação de membros inferiores (AMI); Acomodação de membros anteriores pelas vibrissas (APV); Aversão ao precipício (AQ); Marcha (M); Sobressalto auditivo (SA); Postura (P); Geotaxia negativa (GN); Endireitamento em queda livre (EQ).

2) Desenvolvimento de características físicas: Abertura Ocular (AO); Abertura do conduto auditivo (ACA); Irrupção dos incisivos superiores (IIS) e inferiores (III).

5.2.2 Reflexos Sensório-Motores

1) Preensão Palmar

A prole do grupo salina ácida apresentou esse reflexo de forma mais tardia que os grupos neutra e controle, tendo a análise de variância entre os grupos com diferença significativa. ($F(2, 72) = 10,86$; $P < 0,0001$). O pós-teste de Tukey apontou diferença significativa entre os machos salina ácida apresentando esse reflexo mais tardiamente em relação aos machos salina neutra e controle ($p = 0,0016$; e $p = 0,0046$, respectivamente). As fêmeas não apresentaram diferença significativa entre si. Ao avaliar o dimorfismo sexual, notou-se que a variável da sexagem não apresentou diferença ($F(1, 72) = 2,087$; $P = 0,1529$) (Figura 9)

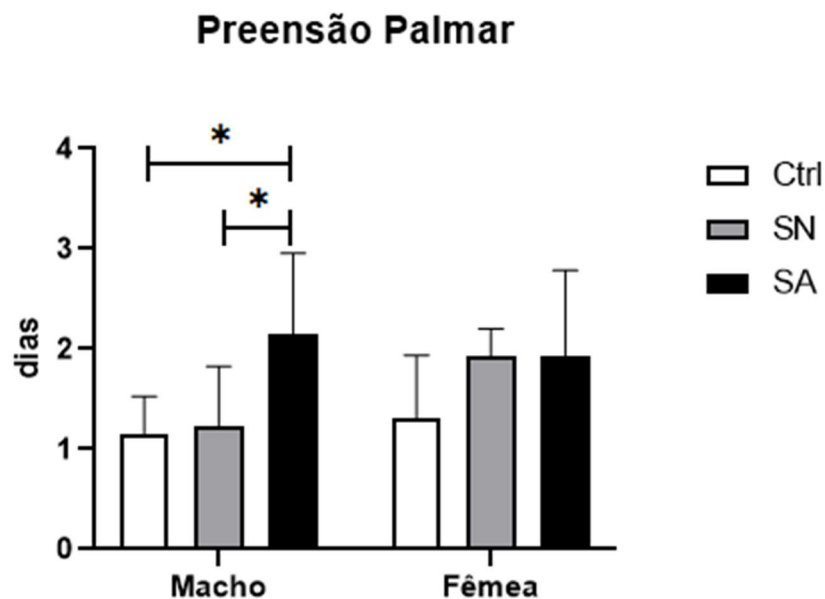


Figura 9. Preensão Palmar. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao aparecimento de uma resposta bem sucedida do reflexo de preensão palmar. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Os valores para ANOVA foram significativos ($p < 0.05$). Ao teste de múltiplas comparações, podemos observar que as diferenças entre os machos SA e SN, contra os machos Ctrl foram significativas. Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle. *Variação estatística significativa ($p < 0,05$).

2) Preensão Plantar

A prole do grupo salina ácida apresentou esse reflexo de forma mais tardia que os grupos neutra e controle, tendo a análise de variância com diferença significativa. ($F(2, 72) = 17,69$; $P < 0,0001$). O pós-teste de Tukey apontou diferença significativa entre os machos salina ácida apresentando esse reflexo mais tardiamente em relação aos machos controle ($p = 0,0018$). As fêmeas salina ácida apresentaram esse reflexo mais tardiamente em relação as fêmeas neutra e controle ($p = 0,0112$; e $p = 0,0007$, respectivamente). Ao avaliar o dimorfismo sexual, notou-se que a variável da sexagem não apresentou diferença significativa ($F(1, 72) = 0,6944$; $P = 0,4074$). (Figura 10)

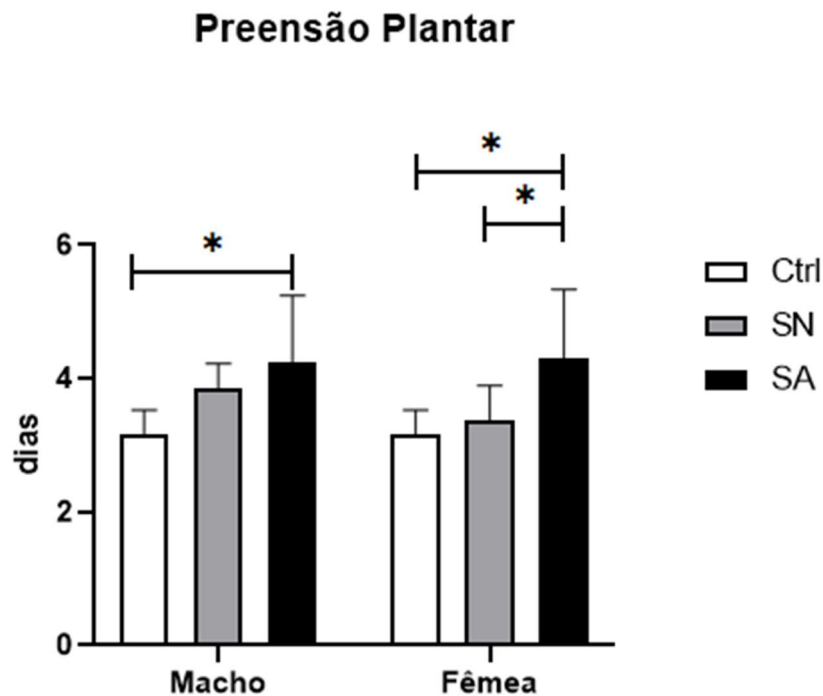


Figura 10. Preensão Plantar. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao aparecimento de uma resposta bem sucedida do reflexo de preensão plantar. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Os valores para ANOVA foram significativos ($p < 0.05$). Ao teste de múltiplas comparações, observamos que as diferenças entre as fêmeas SA, contra as fêmeas SN e Ctrl foram significativas. Os machos SA apresentaram diferença contra os machos Ctrl. Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle. *Variação estatística significativa ($p < 0,05$).

3) Endireitamento

A prole (tanto machos, quanto fêmeas) do grupo salina ácida apresentou esse reflexo de forma mais tardia que os grupos neutra e controle, tendo a análise de variância com diferença significativa. ($F(2, 72) = 19,35$; $P < 0,0001$). O pós-teste de Tukey apontou diferença significativa entre os machos salina ácida apresentando esse reflexo mais tardiamente em relação aos machos salina neutra e controle ($p < 0,0001$; e $p = 0,0092$). As fêmeas salina ácida apresentaram esse reflexo mais tardiamente em relação as fêmeas salina neutra ($p = 0,0171$). Não houve diferença quanto ao dimorfismo sexual ($F(1, 72) = 0,5167$; $P = 0,4746$). (Figura 11)

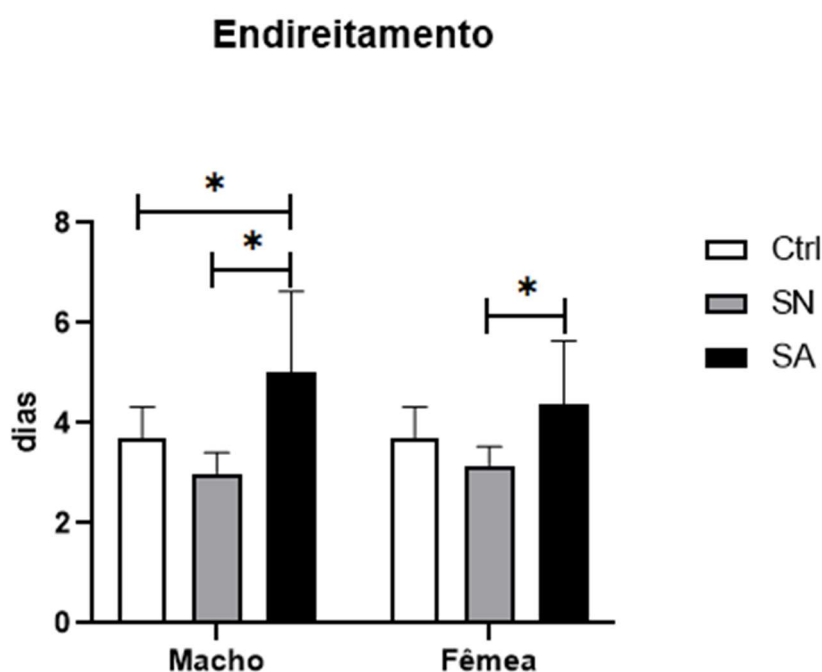


Figura 11. Endireitamento. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao aparecimento de uma resposta bem sucedida do reflexo de endireitamento. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Os valores para ANOVA foram significativos ($p < 0,05$). Ao teste de múltiplas comparações, podemos observar que as diferenças entre os machos SA, contra os machos SN e Ctrl foram significativas. As fêmeas SA também apresentaram diferença contra as fêmeas SN. Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle. *Variação estatística significativa ($p < 0,05$).

4) Acomodação de membros inferiores

A média de aparecimento desse reflexo não diferiu entre os grupos, ou entre os sexos, de forma significativa, ANOVA ($F(2, 72) = 4,391$; $P=0,1059$ e $F(1, 72) = 0,02553$; $P=0,8735$, respectivamente). (Figura 12)

Acomodação de Membros Inferiores

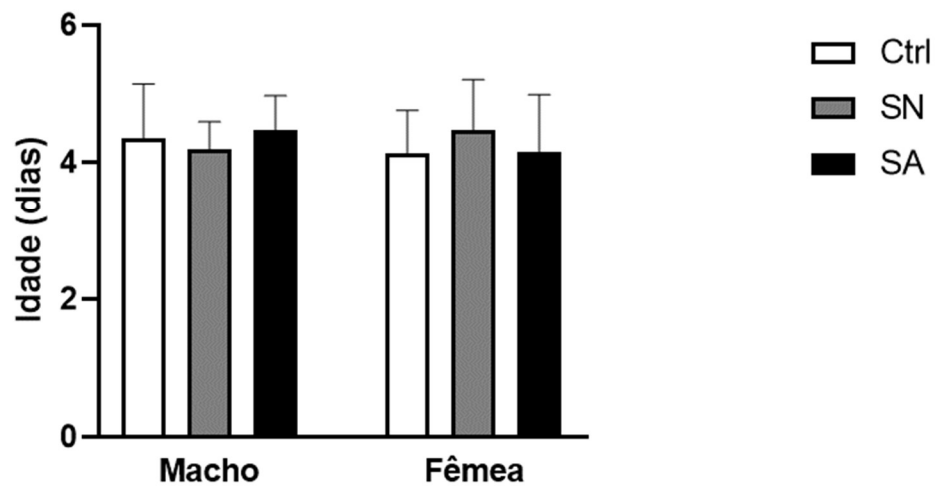


Figura 12. Acomodação de Membros Inferiores. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao aparecimento de uma resposta bem sucedida do reflexo de acomodação de membros inferiores. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA e pós teste de Tukey, tendo resultado não significativo ($p > 0,05$). Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle.

5) Acomodação de membros por vibrissas

A média aparecimento desse reflexo não diferiu entre os grupos, ou entre os sexos, de forma significativa na análise de variância. ($F(2, 72) = 0,7582$; $P=0,4722$ e $F(1, 72) = 0,5217$; $P=0,4724$). (Figura 13)

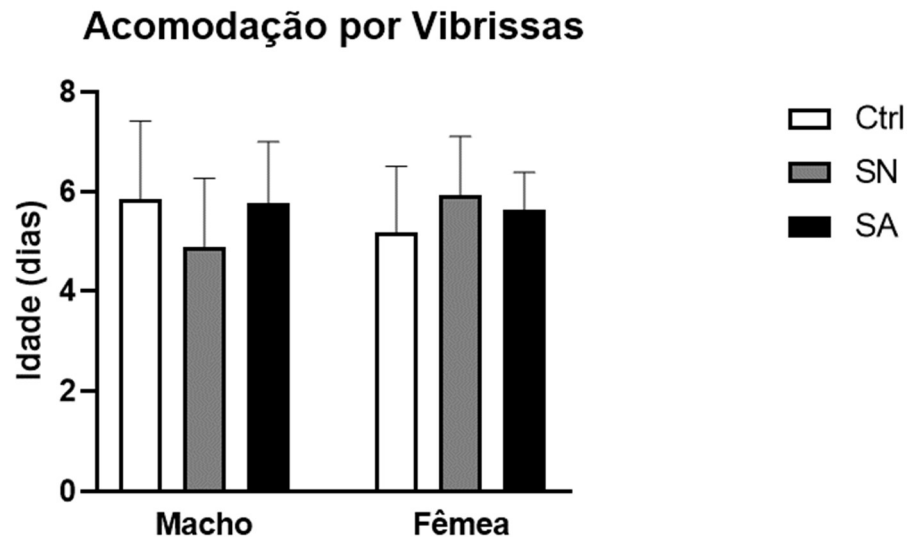


Figura 13. Acomodação de membros por vibrissas. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao aparecimento de uma resposta bem sucedida do reflexo de acomodação por vibrissas. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA e pós teste de Tukey, tendo resultado não significativo ($p > 0,05$). Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle.

6) Aversão ao precipício

A prole do grupo salina ácida apresentaram esse reflexo de forma mais tardia que os grupos neutra e controle, tendo a análise de variância com diferença significativa. ($F(2, 72) = 7,368$; $P=0,0012$). O pós-teste de Tukey apontou diferença significativa entre os machos salina ácida em relação aos machos controle ($p=0,0158$). As fêmeas salina ácida apresentaram esse reflexo mais tardiamente em relação as fêmeas salina neutra e controle ($p=0,0158$; e $p=0,0158$). Quanto a sexagem, não houve diferença significativa ($F(1, 72) = 3,023$; $P=0,0863$) (Figura 14).

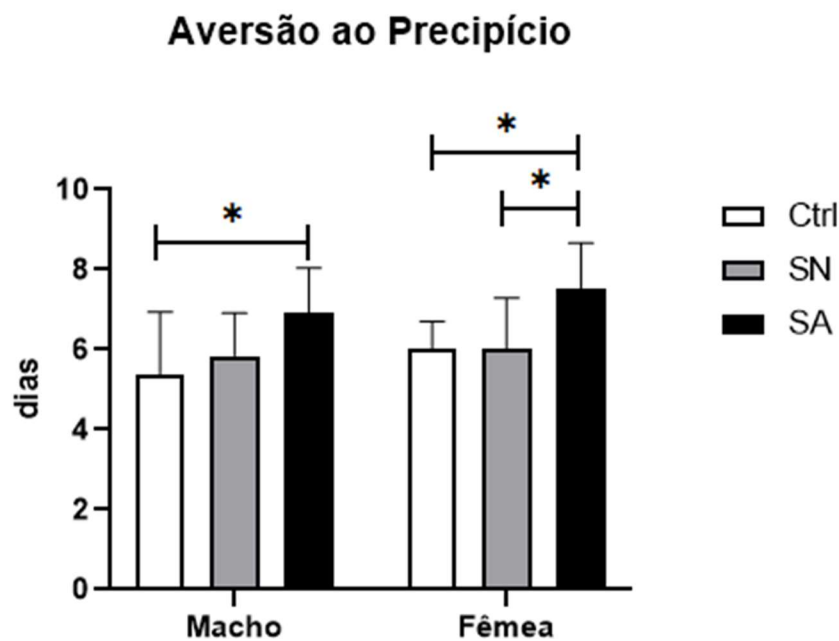


Figura 14. Aversão ao precipício. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao aparecimento de uma resposta bem sucedida do reflexo de aversão ao precipício. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Os valores para ANOVA foram significativos ($p < 0,05$). Ao teste de múltiplas comparações, podemos observar que as diferenças entre os machos SA, contra os machos Ctrl foram significativas. As fêmeas SA também apresentaram diferença contra as fêmeas SN e Ctrl. Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle. *Variação estatística significativa ($p < 0,05$)

7) Marcha

Quanto aos dados referentes à marcha, observamos que a média aparecimento desse reflexo não diferiu entre os grupos ($F(2, 72) = 1,236$; $P=0,02967$) ou entre os sexos ($F(1, 72) = 1,347$; $P=0,2496$) de forma significativa na análise de variância (Figura 15).

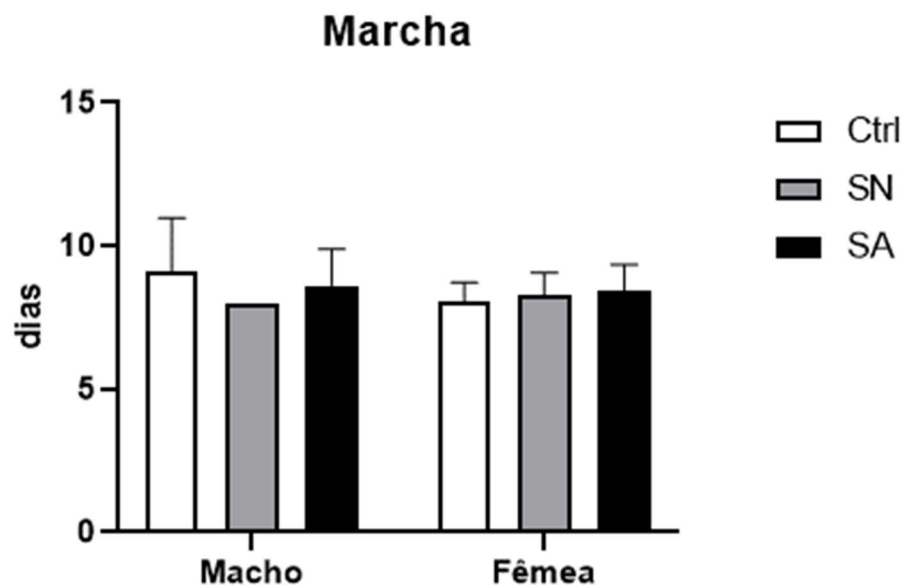


Figura 15. Marcha. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao aparecimento de uma resposta bem sucedida do reflexo de marcha. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA e pós teste de Tukey, tendo resultado não significativo ($p > 0,05$). Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle.

8) Geotaxia Negativa

Os resultados referentes a média aparecimento desse reflexo não diferiu entre os grupos na análise de variância. ($F(2, 72) = 1,410$; $P=0,2508$). Também não diferiu quanto ao sexo ($F(1, 72) = 4,463$; $P= F(1, 72) = 4,463$) (Figura 16)

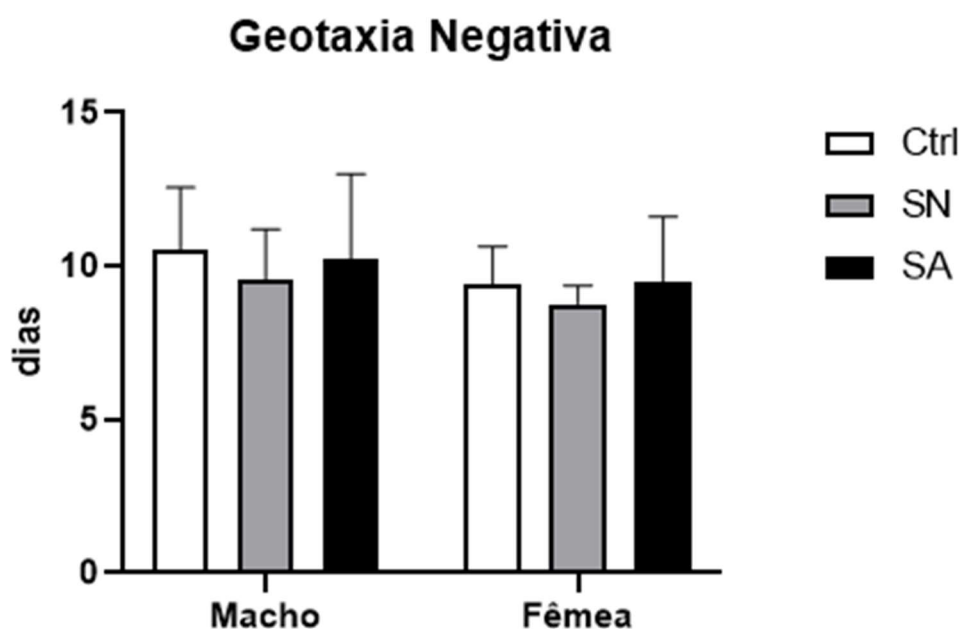


Figura 16. Geotaxia Negativa. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao aparecimento de uma resposta bem sucedida do reflexo de geotaxia negativa. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA e pós teste de Tukey, tendo resultado não significativo ($p > 0,05$). Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle.

9) Postura

Na avaliação do reflexo postural os resultados não diferiram entre os grupos na análise de variância. ($F(2, 72) = 1,910$; $P=0,1556$). Também não diferiu entre os sexos ($F(1, 72) = 3,729$; $P=0,0574$) (Figura 17)

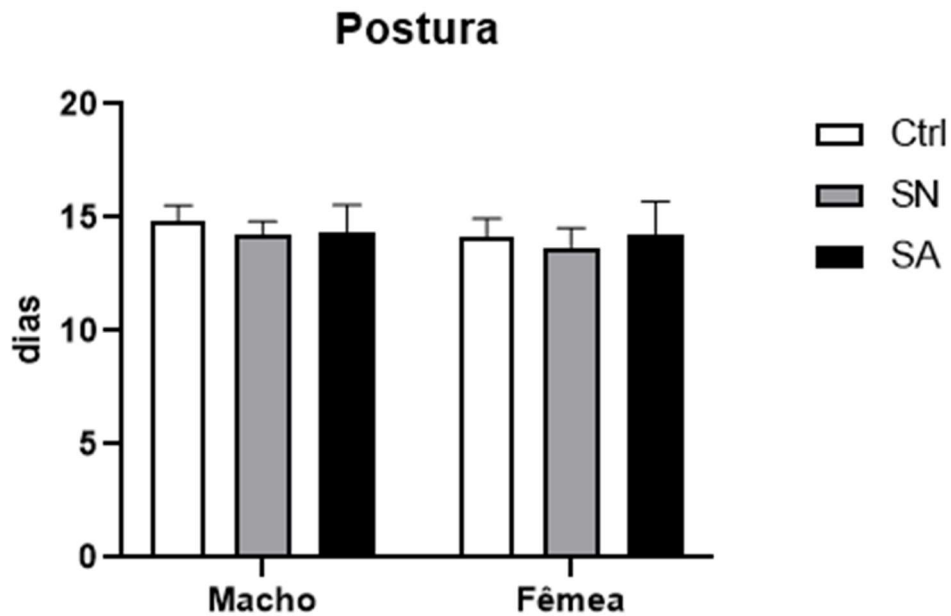


Figura 17. Postura. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao aparecimento de uma resposta bem sucedida do reflexo de postura. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA e pós teste de Tukey, tendo resultado não significativo ($p > 0,05$). Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle.

10) Endireitamento em queda livre

Os machos do grupo salina ácida apresentaram esse reflexo de forma mais tardia que os grupos neutra e controle, tendo a análise de variância com diferença significativa. ($F(2, 72) = 13,79$; $P < 0,0001$). O pós-teste de Tukey apontou diferença significativa entre os machos salina ácida em relação aos machos controle ($p = 0,0004$). Não houve diferença entre os sexos ($F(1, 72) = 0,1451$; $P = 0,7044$). (Figura 18)

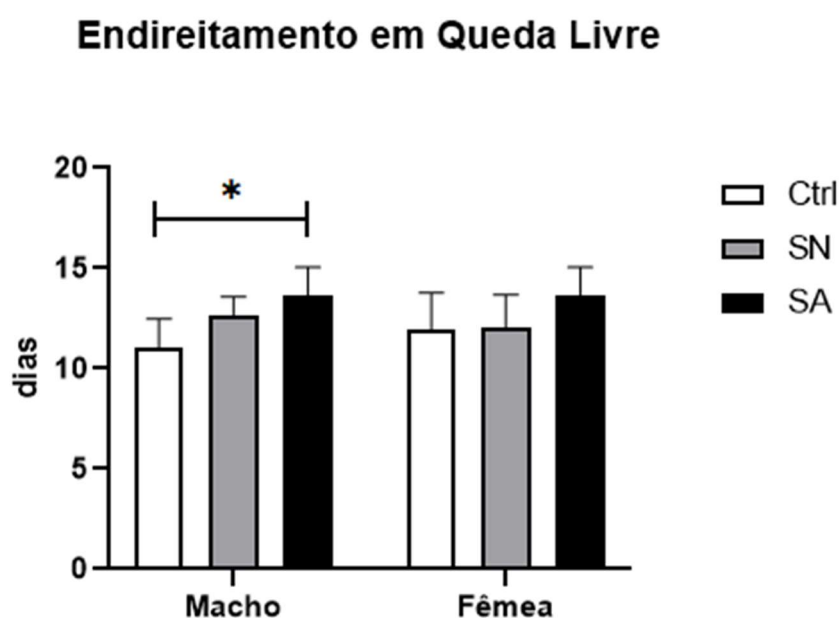


Figura 18. Endireitamento em Queda Livre. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao aparecimento de uma resposta bem sucedida do reflexo de endireitamento em queda livre. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Os valores para ANOVA foram significativos ($p < 0,05$). Ao teste de múltiplas comparações, as diferenças entre os machos SA, contra os machos Ctrl foram significativas. Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle. *Variação estatística significativa ($p < 0,05$).

11) Sobressalto auditivo

A prole (tanto machos, quanto fêmeas) do grupo salina ácida apresentou esse reflexo de forma mais tardia que os grupos neutra e controle, tendo a análise de variância com diferença significativa. ($F(2, 72) = 15,00$; $P < 0,0001$). O pós-teste de Tukey apontou diferença significativa entre os machos salina ácida em relação aos machos salina neutra e controle ($p = 0,0155$; e $p = 0,0155$, respectivamente). As fêmeas salina ácida apresentaram diferença em relação as fêmeas salina neutra e controle ($p = 0,0155$; e $p = 0,0155$, respectivamente). Quanto ao dimorfismo sexual, não houve diferença ($F(1, 72) = 0,000$; $P > 0,9999$) (Figura 19).

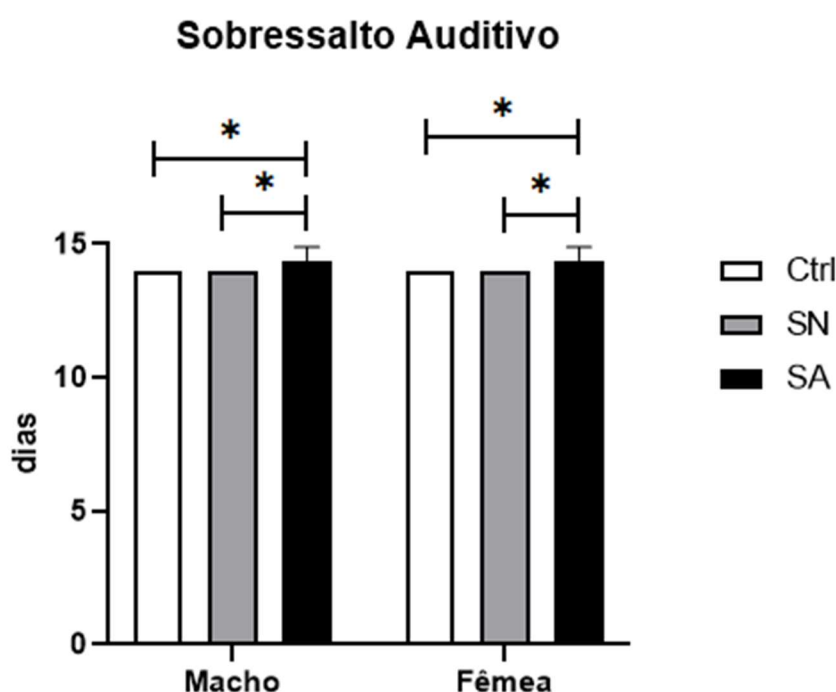


Figura 19. Sobressalto auditivo. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao aparecimento de uma resposta bem sucedida do reflexo de sobressalto auditivo. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Os valores para ANOVA foram significativos ($p < 0,05$). Ao teste de múltiplas comparações, podemos observar que as diferenças entre os machos SA, contra os machos SN e Ctrl foram significativas. As fêmeas SA apresentaram diferença contra as fêmeas SN e Ctrl. Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle. *Variação estatística significativa ($p < 0,05$).

12) Reflexos sensório-motores

Observamos abaixo na figura 20, um gráfico que demonstra a média do aparecimento dos reflexos de todos os ratos, machos e fêmeas, separados apenas por grupo. Em cinco reflexos, o grupo salina ácida teve uma resposta mais tardia quando comparado aos grupos salina neutra e controle. Obtivemos diferença significativa nos reflexos: Preensão palmar (SA vs. Ctrl); Preensão plantar (SA vs. Ctrl); Endireitamento (SA vs. SN; SA vs. Ctrl); Aversão ao precipício (SA vs. Ctrl; SA vs. SN) e Endireitamento em queda livre (SA vs. SN; SA vs. Ctrl).

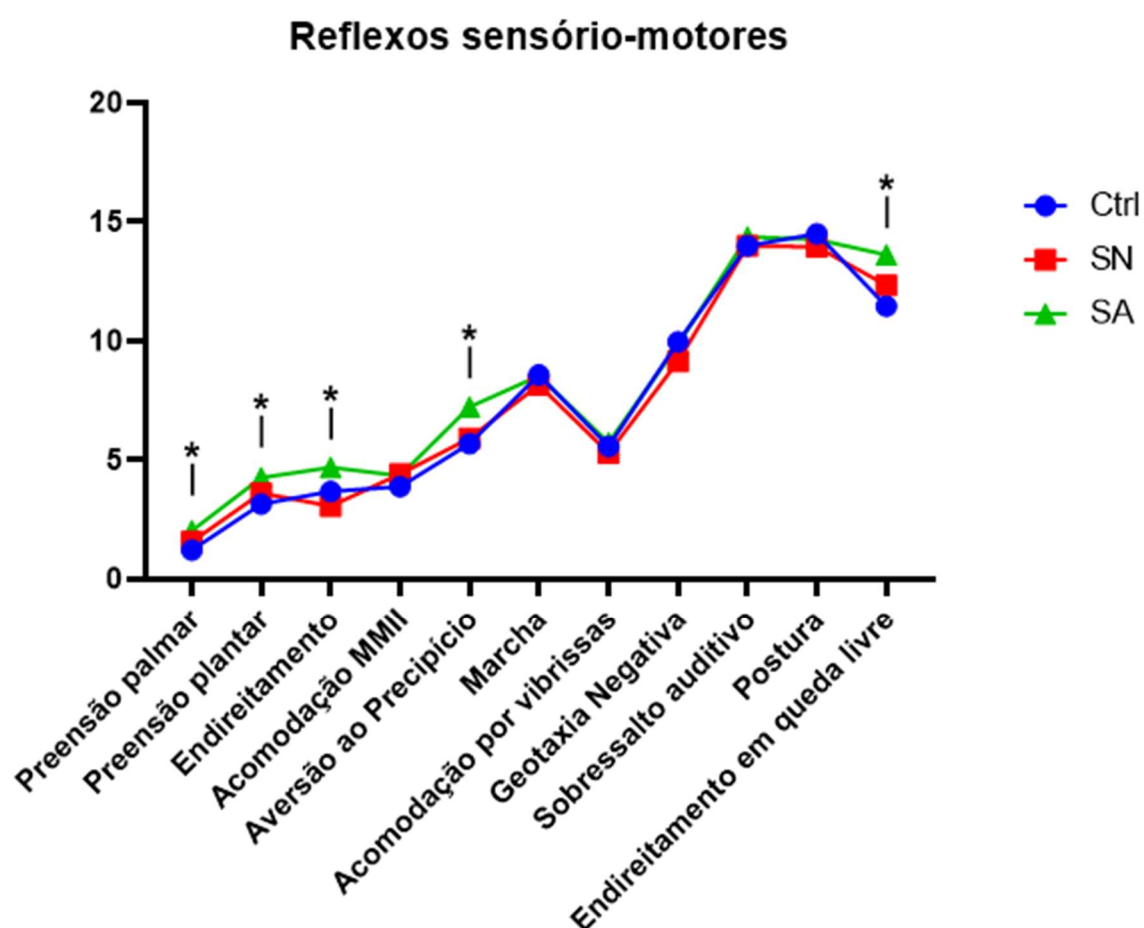


Figura 20. Reflexos sensório-motores. Valores médios de aparecimento dos reflexos sensório-motores de toda a prole, representada em dias. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, analisados por One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os valores para ANOVA foram significativos ($p < 0.05$) para os reflexos de Preensão palmar; Preensão plantar; Endireitamento; Aversão ao precipício e Endireitamento em queda livre. Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle. *Variação estatística significativa ($p < 0,05$).

5.2.3 Desenvolvimento de características físicas

1) Abertura ocular

Os resultados observados para a abertura ocular não diferiram entre os grupos ($F(2, 72) = 2,056$; $P=0,1354$), assim como não houve diferença entre os sexos ($F(1, 72) = 3,078$; $P=0,0836$), na análise de variância. (Figura 21)

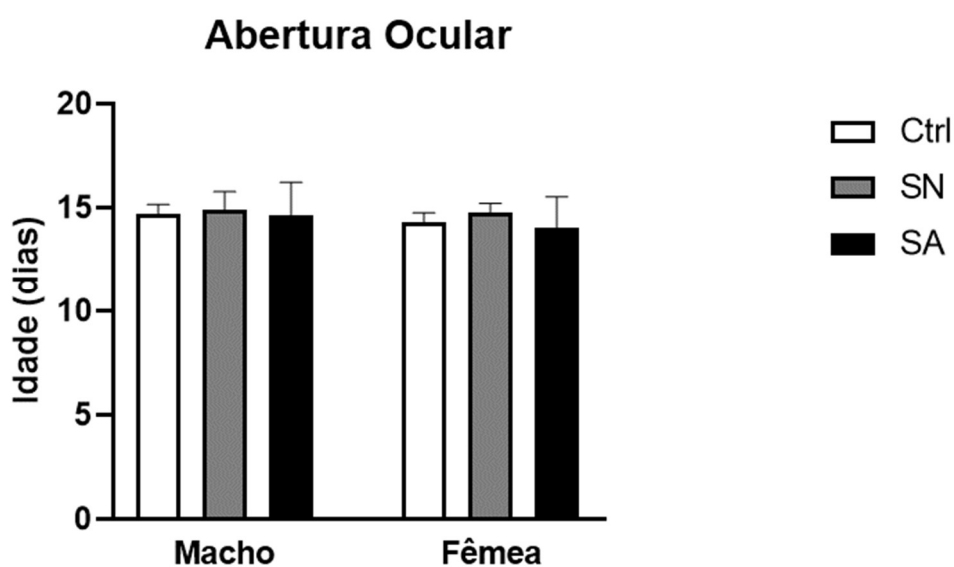


Figura 21. Abertura Ocular. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao dia da abertura ocular. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA e pós teste de Tukey, tendo resultado não significativo ($p > 0,05$). Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle.

2) Abertura do conduto auditivo

Para a análise de abertura do conduto auditivo, os resultados não diferiram entre os grupos na análise de variância ($F(2, 72) = 0,06122$; $P=0,9407$). A variável do sexo não afetou o resultado ($F(1, 72) = 3,000$; $P=0,0875$) (Figura 22).

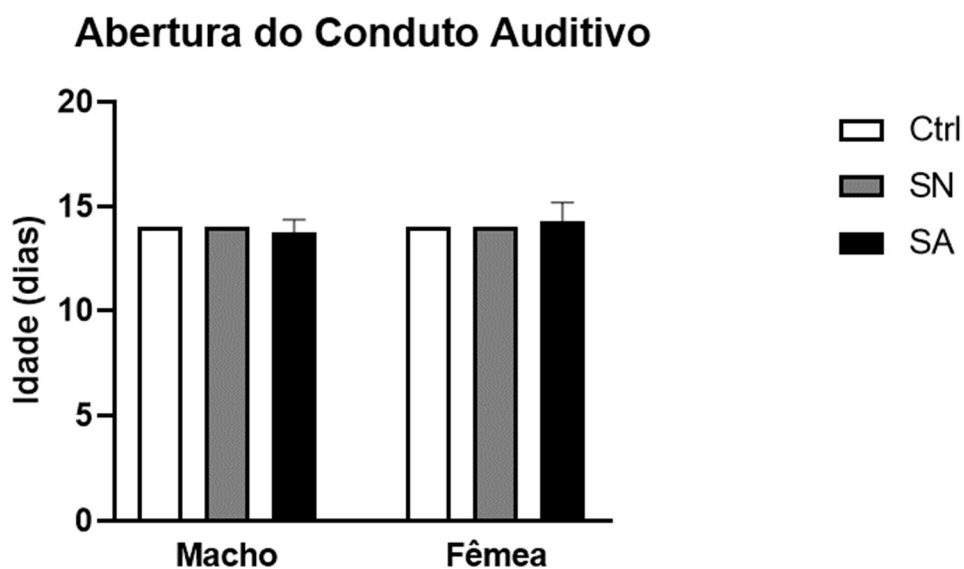


Figura 22. Abertura do conduto auditivo. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao dia da abertura do conduto auditivo. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA e pós teste de Tukey, tendo resultado não significativo ($p > 0,05$). Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle.

3) Irrupção dos incisivos superiores

A avaliação da irrupção dos incisivos superiores, não diferiu entre os grupos na análise de variância. ($F(2, 72) = 2,887$; $P=0,0622$). A variável do sexo não apresentou diferença estatística ($F(1, 72) = 1,218$; $P=0,2734$) (Figura 23)

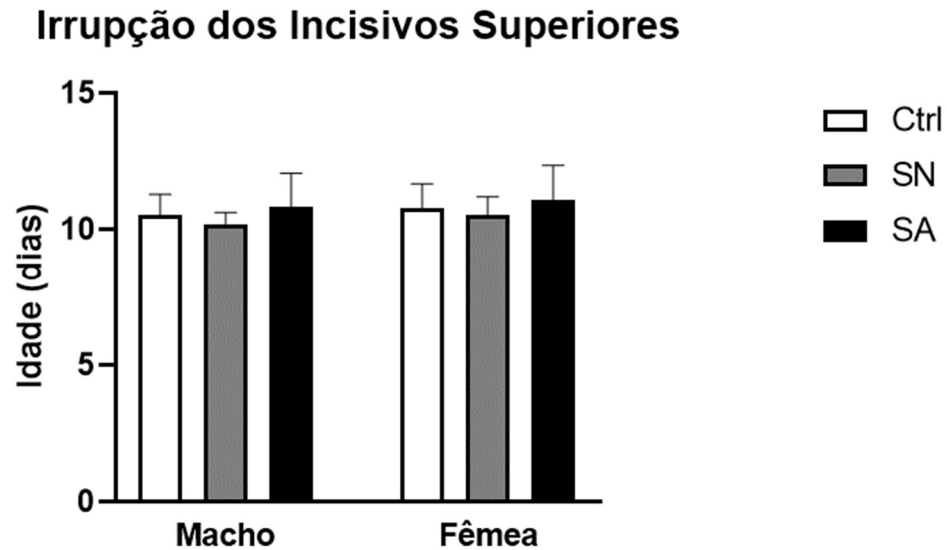


Figura 23. Irrupção dos incisivos superiores. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao dia que foi constatada a irrupção dos incisivos superiores. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA e pós teste de Tukey, tendo resultado não significativo ($p > 0,05$). Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle.

4) Irrupção dos incisivos inferiores

A avaliação da irrupção dos incisivos inferiores não diferiu entre os grupos na análise de variância. ($F(2, 72) = 4,157$; $P=0,0679$). Assim como também não diferiu quanto ao sexo ($F(1, 72) = 0,05381$; $P=0,8172$) (Figura 24)

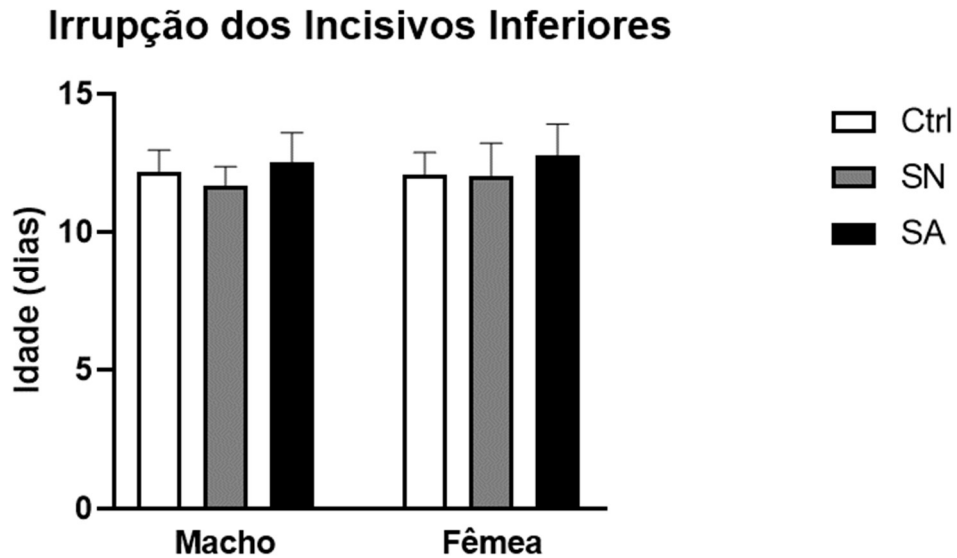


Figura 24. Irrupção dos incisivos inferiores. Valores médios em dias de vida pós-natal (DPN), correspondentes ao dia que foi constatada a irrupção dos incisivos inferiores. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, analisados por Two-way ANOVA e pós teste de Tukey, tendo resultado não significativo ($p > 0,05$). Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle.

5) Características Físicas Totais

É possível observar abaixo na figura 25, um gráfico que demonstra a média do desenvolvimento das características físicas totais, separados apenas por grupo.

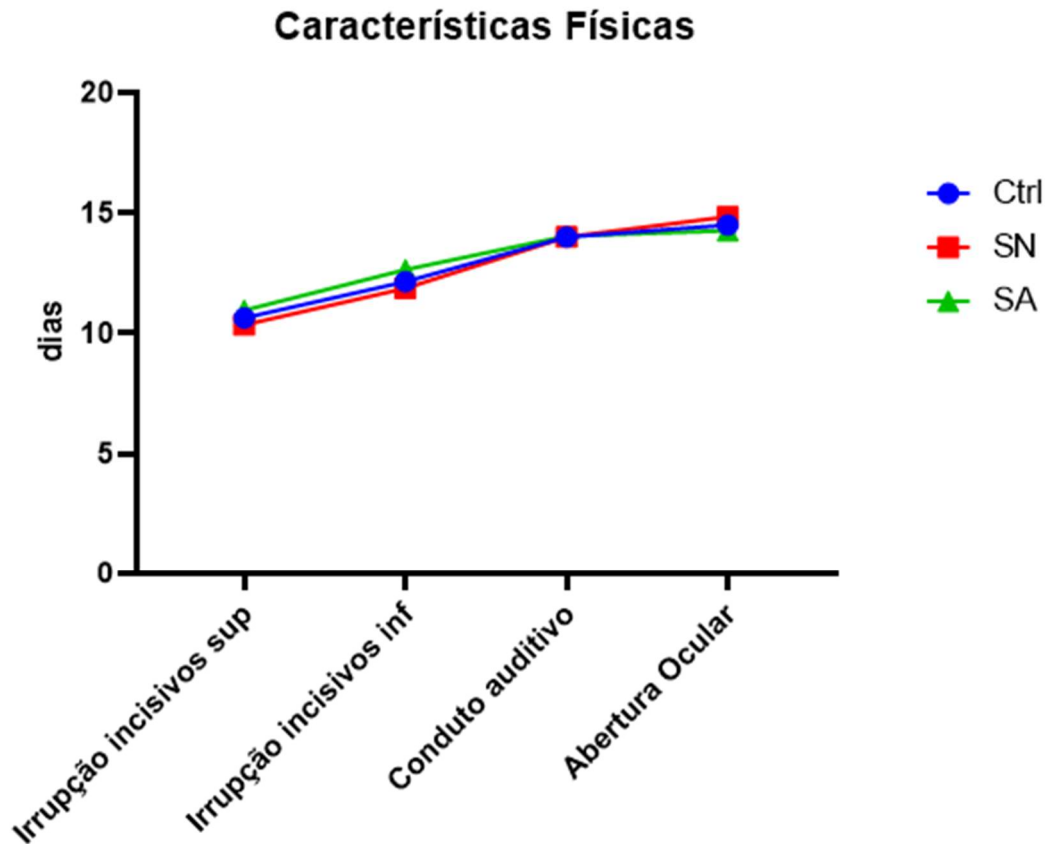


Figura 25. Características físicas totais. Valores médios de aparecimento dos reflexos neonatais de toda a prole, representada em dias. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, analisados por One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os valores para ANOVA não foram significativos ($p > 0.05$). Legenda: SA, salina ácida; SN, salina neutra; Ctrl, controle.

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo, avaliamos a influência da hiperalgesia muscular crônica difusa no processo gestacional e quais alterações ela implica na resposta de reflexos neonatais e de marcos do desenvolvimento da prole. A gravidez de ratos Wistar dura em média 21 dias. A hiperalgesia, através do protocolo de Hiperalgesia Muscular Crônico Difusa dura em média 4 semanas (30 dias). Sendo assim, as fêmeas estiveram durante todo o ciclo gestacional com a hiperalgesia, permitindo com a hipótese de programação fetal, analisar a prole de uma gestação vivenciada com dor crônica.

Como resultados iniciais, observamos que o grupo SA demonstrou uma diferença em relação ao período gestacional, realizando a cópula logo no primeiro dia de união com o macho. Para Silva (2016), a empatia pode ser motivadora de um comportamento pró-social, quando há uma projeção do estado emocional de outrem para si (SILVA, 2016). O comportamento pró-social se refere a ações com a intenção de beneficiar o próximo, mesmo que o agente da ação também se beneficie no processo. Esse termo é amplo e possui diversos subcomponentes como cooperação, conforto, mutualismo, entre outros (SILVA, 2016; SILVA, 2017).

Silva (2017) evidencia que um rato consegue notar o estado de dor do outro, diminuindo o comportamento de competição e luta, enquanto os ratos com dor apresentam mais imobilidade. Nesse estudo o contato social e o toque podem até mesmo promover uma analgesia de curta duração mesmo que eles não tenham tido interação prévia (SILVA, 2017; LI, 2018; COX, 2019). Portanto, no nosso estudo, o resultado de cópula mais rápida pode ter uma relação direta pela percepção dos machos do estado de hiperalgesia das fêmeas e as mesmas estariam mais receptivas à cópula, demonstrando assim uma ação direta de estado de empatia por parte do macho em relação à fêmea, assim como uma maior receptividade da fêmea à cópula e ao toque.

Outro comportamento observado nessas fêmeas, foi a pouca responsividade evidenciada pelos baixos números de distância percorrida no monitor de atividades (figura 8), e o estado frequente de lordose, caracterizado pelo arqueamento da lombar. Segundo Heijkoop (2018) e Bialy, (2019), esse pode ter sido um comportamento interpretado pelo macho como receptividade sexual, enquanto essas respostas da fêmea estavam relacionadas com a hiperalgesia (HEIJKOOP, 2018; BIALY, 2019). A associação da diminuição da reatividade das fêmeas, com a lordose e o comportamento pró-social, podem ter influenciado para que a cópula do grupo salina ácida acontecesse de forma rápida. Em humanos, a fibromialgia é mais prevalente em mulheres, afetando-as em um contexto biopsicossocial, prejudicando a saúde

física, psicológica e sexual, podendo ainda estar associada à dispareunia, diminuição da libido e da lubrificação vaginal. (ROMERO-ALCALÁ, 2019)

No nosso estudo, as ratas do grupo salina ácida pariram com 22 dias de gestação, enquanto as outras ratas pariram com 21 dias, demonstrando uma gesta mais prolongada. Observamos ainda que a gestação do grupo salina ácida apresentou uma maior mortalidade da prole, quando comparada aos grupos salina neutra e controle. O canibalismo de filhotes mortos é comum para absorção de proteínas e para manter o ninho limpo. Foi evidenciado, tanto em estudos clínicos quanto em estudos experimentais, que há relação entre estresse durante a gravidez, restrição de crescimento intrauterino, baixo peso ao nascer e alterações na duração da gestação (LAZINSKI, 2008; BROWN, 2011; GLOVER, 2015; BUSSIÈRES, 2015).

Mulheres que relatam eventos estressantes tem duas vezes mais chances de ter um bebê com baixo peso ao nascer, em comparação com as mulheres que não relataram problemas biopsicossociais (BROWN, 2011). O peso ao nascer e a idade gestacional são os desfechos mais avaliados quando se trata de estresse materno, eles são considerados indicadores precoces do desenvolvimento da saúde da criança (BUSSIÈRES, 2015). As alterações no neurodesenvolvimento são notórias tanto em estudos em animais, quando em humanos expostos a eventos adversos intrauterinos. Lazinski (2008) aborda que foi descoberto em estudos pré-clínicos que ratos filhotes de mães que sofreram estresse apresentam diferenças de desenvolvimento nos núcleos da amígdala, inibição da neurogênese no giro denteado e diminuição do volume do hipocampo. Essas alterações sugerem que esses animais podem estar predispostos a comportamentos relacionados ao medo e ansiedade, além de alteração na plasticidade sináptica prejudicando a aprendizado espacial e a memória, depressão, ansiedade e diminuição da atividade locomotora. Estudos clínicos corroboram com esses achados, pois há a associação entre estresse materno e a diminuição da atividade locomotora, do desenvolvimento da linguagem, problemas com atenção, além de outras alterações comportamentais. (LAZINSKI, 2008) Essas alterações nas estruturas neurológicas e na atividade locomotora, pode afetar comportamento e cognição a longo prazo (GRACE, 2015).

Alguns reflexos são semelhantes tanto em humanos quanto em animais, o que difere é o tempo de aparecimento e desaparecimento dos mesmos. Um bebê pré-termo de 28 a 32 semanas, tem um nível de maturação neurológica de um neonato da prole de ratos de até 7 dias de vida pós-natal (FEATHER-SCHUSSLER, 2016). É descrito em Yager (2017), que prensão palmar e plantar em humanos, são facilitadas por inibição corticoespinhal de áreas motoras não primárias, e o desenvolvimento da motricidade fina (YAGER, 2017; FEATHER-SCHUSSLER,

2016). Nesse sentido, a prole do grupo salina ácida demonstrou dificuldade no desenvolvimento motor fino, para realizar a preensão palmar e plantar de forma efetiva e semelhante com a força que era aplicada pela prole dos grupos neutra e controle (FUTAGI, 2012).

Outro reflexo analisado, prevenção a queda, é utilizado para avaliar a percepção de risco da prole (NAIK, 2015). Tanto esse reflexo, quanto o endireitamento e endireitamento a queda, envolvem a integração e a comunicação entre as fibras aferentes e eferentes no SNC, além de ser fundamental um bom controle motor. O endireitamento, mais especificamente, é utilizado para medir a função motora e a coordenação e exige controle da coluna vertebral. Além disso, o sistema vestibular é necessário para detectar a necessidade de endireitamento e do afastamento do precipício (NAIK, 2015; FEATHER-SCHUSSLER, 2016; YAGER, 2017). O sobressalto auditivo é um reflexo de reação defensiva do indivíduo e avalia a abertura do conduto auditivo, estimulação acústica e as conexões sinápticas no núcleo reticular da ponte caudal. (FEATHER-SCHUSSLER, 2016; YAGER, 2017).

Segundo Soares-Cunha (2018), o estresse pré-natal traz alterações para a prole independente do sexo, tanto macho quanto fêmeas. Foi constatado ainda que essa prole apresentou alterações comportamentais e emocionais quando atingiram a fase de adultos-jovens (2 meses de idade). Foi demonstrado por Cao (2012) que o estresse materno afeta os filhos, sendo notório que crianças apresentavam baixa coordenação bilateral ao precisar fazer movimentações para os dois lados, além de prejuízo na integração da coordenação visual e da motricidade fina ao copiar objetos geométricos. Os escores mais baixos eram de meninas, mostrando também a influência do sexo nessas alterações (CAO, 2012; SOARES-CUNHA, 2018).

Os resultados do nosso estudo demonstram que tanto fêmeas quanto machos podem ser afetados pela exposição ao estresse pré-natal. É importante ressaltar com o resultado do nosso estudo, que especificamente a exposição à hiperalgesia muscular crônica difusa materna, resultou no atraso do aparecimento de alguns reflexos (SOARES-CUNHA, 2018; CAO, 2012)

Quanto aos outros reflexos, e desenvolvimentos de características físicas, os estudos de Kvarik (2016), Feather-Schussler (2016), que avaliavam modelos estressores de diferentes naturezas e seus efeitos na ontogenia da prole, também tiveram alguns resultados que os grupos intervenção e sem intervenção não apresentaram diferença significativa. Eles demonstraram que apesar de nem todos os reflexos e características físicas do grupo experimental que foi induzido com estresse e lesões, diferiam do grupo controle (sem intervenção), ainda assim, as

avaliações que resultaram em diferença significativa, já apontam alterações no neurodesenvolvimento da prole. Cada ausência, exacerbação, aparecimento precoce ou tardio dos reflexos, pode revelar alterações ontogênicas nessa prole. Algumas dessas alterações neurológicas podem aparecer somente quando adultos. Sendo assim, os dados do nosso trabalho reforçam que quando exposto a fatores estressores intraútero, é possível notar que a hiperalgesia muscular crônica difusa leva a alterações no neurodesenvolvimento da prole.

Nosso estudo é de grande relevância, pois, assim como outros fatores estressores, a FM pode ter impactos relevantes a futuras gerações que devem ser acompanhadas de perto quanto ao surgimento de patologias na vida adulta. Como perspectivas futuras, seria interessante dosar o nível de corticosterona das ratas durante a prenhez, assim como realizar uma nova avaliação de comportamento após o parto. É importante também um estudo que avalie a prole até a fase adulta, tanto em resposta comportamental, quanto em interação social e ansiedade, visto que é apontado na literatura que condições adversas intrauterinas podem predispor depressão, ansiedade e doenças crônicas não transmissíveis para a prole. Devem ser realizados outros testes e avaliações, como por exemplo, análise imunológica e histológica, avaliando órgãos quanto ao seu desenvolvimento, além de marcadores bioquímicos, como citocinas pró-inflamatórias.

7. CONCLUSÃO

Mostramos que a exposição ao modelo de hiperalgesia crônica teve impacto desde a gestação aos reflexos observados na prole de ratas wistar. Nosso trabalho demonstra que um fator estressor crônico como a hiperalgesia durante o período gestacional, desde a embriogênese, pode provocar um atraso no aparecimento de reflexos primitivos que exijam neurodesenvolvimento de áreas motoras, como a preensão palmar e plantar. Além disso, os filhotes de mães hiperalgésicas, apresentaram baixo peso ao nascer e maior mortalidade da prole. Enquanto neonatos, não foram observados impactos diferentes dependendo do sexo da prole, é importante que os animais continuem sendo avaliados quanto ao dimorfismo sexual até a fase adulta, buscando possíveis alterações.

REFERÊNCIAS

ALVES, J.E.O.; SILVEIRA, M.D.; VIEIRA, E.M.P.; VIDAL, L.W.M. Mecanismos Fisiopatológicos da Nocicepção e Bases da Analgesia Perioperatória em Pequenos Animais. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 8, n. 1, p. 56-68, jul. 2017.

BATINIC, B.; et al. Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not adolescent rat offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 299, n. 15, p. 72–80, fev. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432815302989>

BENTO-SANTOS A; et al. Critérios para Escolha da Amostra em Experimentos com Ratos Wistar. **RESBCAL**. v. 1, n. 1, p. 1(1): 121-129, jan. 2012. [Acesso em: 10 de junho de 2019]. Disponível em: <http://www.sbcal.org.br/old/upload/arqupload/artigo15-befe4.pdf>

BHARGAVA, J.; HURLEY, J.A. Fibromyalgia. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, jan. 2019. [Acesso em: 15 de maio de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540974/>

BIALY, M.; BOGACKI-RYCHLIK, W.; PRZYBYLSKI, J.; ZERA, T. The Sexual Motivation of Male Rats as a Tool in Animal Models of Human Health Disorders. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v. 13, n. 257, p. 10, nov. 2019.

BISCHOFFA, A.R.; CUNHA, F.S.; MOLLEC, R.D.; MARÓSTICA, P.J.C.; SILVEIRA, P.P. A vontade de se exercitar é programada ainda no útero? Análise do comportamento sedentário e dos benefícios da atividade física em indivíduos com crescimento intrauterino restrito. **J. Pediatr.** (Rio J.), v. 94, n. 6, p. 582-595, dez. 2018.

BRASIL. **Decreto nº 6.899**, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Brasília, DF. Diário Oficial da União; 2009.

BRASIL. **Lei nº 11.794**, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de

animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília, DF. Diário Oficial da União; 2008.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Resolução **Normativa CONCEA** nº 37/2018 - Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Brasília 22 de Fev de 2018. [Acesso em: 12 de junho de 2019]. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf

BROWN, S.J.; YELLAND, J.S.; SUTHERLAND, G.A.; BAGHURST, P.A.; ROBINSON, J.S. Stressful life events, social health issues and low birthweight in an Australian population-based birth cohort: challenges and opportunities in antenatal care. **BMC public health**. v. 11, n. 196, p. 12. 2011.

BUSSIÈRES, E.-L.; TARABULSY, G.M.; PEARSON, J.; TESSIER, R.; FOREST, J.-C.; & GIGUÈRE, Y. Maternal prenatal stress and infant birth weight and gestational age: A meta-analysis of prospective studies. **Developmental Review**. v. 36, p. 179–199.

CARMO, J.C.; PETER, V.M.; GUERRA, M.O. Cronologia do desenvolvimento embrionário e fetal de ratos, conforme a datação do início da prenhez. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 23, p. 5-16, 2004.

CAO, X., LAPLANTE, D.P., BRUNET, A., CIAMPI, A., KING, S. Prenatal maternal stress affects motor function in 5½-year-old children: Project Ice Storm. **Developmental Psychobiology**. v. 56, n. 1, p. 117–125. 2012

CHEN, J.S.; et al. Physiology, Pain. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**. jul. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539789/>

COLLOCA, L.; et al. Neuropathic pain. **Nature reviews Disease primers**. v. 3, n 17002, p. 45. fev. 2016.

COX, S.S., REICHEL, C.M. Rats display empathic behavior independent of the opportunity for social interaction. **Neuropsychopharmacology**, v. 45, p. 1097–1104, nov. 2019.

DESANTANA, J.M.; et al. Definição de dor revisada após quatro décadas. **BrJP [online]**. v. 3, n. 3, p. 197-198. jul. 2020

DESANTANA, J.M.; SLUKA, K.A. Central Mechanisms in the Maintenance of Chronic Widespread Noninflammatory Muscle Pain. **Curr Pain Headache Rep.**, v. 12, n. 5, p. 338–343, Out 2008.

FEATHER-SCHUSSLER, D.N.; FERGUSON, T.S. A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 117, n. e53569, p. 1-12, nov. 2016.

FRAGOSO, J.; et al. Maternal voluntary physical activity attenuates delayed neurodevelopment in malnourished rats. **Experimental Physiology**, v. 102, n. 11, p. 1486-1499, nov. 2017.

FUTAGI, Y.; TORIBE, Y.; SUZUKI, Y. The Grasp Reflex and Moro Reflex in Infants: Hierarchy of Primitive Reflex Responses. **International Journal of Pediatrics**, v. 2012, p. 1-10, jun. 2012.

GENÇ, H.; ATASEVER, M.; DUYUR ÇAKIT, B.; SEVAL, M.; & KOÇ, A. The Effects of Fibromyalgia Syndrome on Physical Function and Psychological Status of Pregnant Females. **Archives of rheumatology**. v. 32, n. 2, p. 129–140, jan. 2017.

GLOVER, V. Prenatal Stress and Its Effects on the Fetus and the Child: Possible Underlying Biological Mechanisms. Em: **Perinatal Programming of Neurodevelopment**. Advances in Neurobiology. v. 10, p. 269–283. Springer, Nova York. 2015. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1372-5_13

GOYAL, D.; LINESAND, S.W.; GOYAL, R. Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. **Journal of Endocrinology**. v. 242, n. 1, p. 105–119, jul. 2019.

GRACE, T.; BULSARA, M.; ROBINSON, M.; HANDS, B. The Impact of Maternal Gestational Stress on Motor Development in Late Childhood and Adolescence: A Longitudinal Study. **Child Development**. v. 87, n. 1, p. 211–220. 2015

GUEST, F.L.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; RAHMOUNE, H.; BAHN, S.; GUEST, P.C. Os efeitos do estresse na função do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal em indivíduos com esquizofrenia. **Rev Psiq Clín.** v. 40, n. 1, p. 20-27, 2013

GUIMARÃES, E.L.; TUDELLA, E. Reflexos primitivos e reações posturais como sinais indicativos de alterações neurosensoriomotoras em bebês de risco. **Pediatrics (São Paulo)**, v. 25, n. ½, p. 28-35, 2003.

HALL, John Edward; GUYTON, Arthur C. Guyton & Hall tratado de fisiologia médica. 13. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2017.

HEIJKOOP, R.; HUIJGENS, P.T.; SNOEREN, E.M.S. Assessment of sexual behavior in rats: The potentials and pitfalls. **Behav Brain Res.** v. 15, n. 352, p. 70-80, out. 2018.

HEINDEL, J.J.; VANDENBERG, L.N. Developmental origins of health and disease: a paradigm for understanding disease cause and prevention. **Current opinion in pediatrics.** v. 27, n. 2, p. 248–253. 2015

HEYMANN, R. E.; et al. Novas diretrizes para o diagnóstico da fibromialgia. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 57, n. 2, p. 467-476, 2017.

HEYMANN, R.E.; et al. Consenso brasileiro do tratamento da fibromialgia. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 1, p. 56-66, 2010. [Acesso em: 15 de maio de 2019]. Disponível em: http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/33266/6189336_353278.pdf

HIGGINS, K.S., et al. Offspring of parents with chronic pain: a systematic review and meta-analysis of pain, health, psychological, and family outcomes. **Pain.** v. 156, n. 11, p. 2256–2266, nov. 2015.

IMAMURA, M.; et al. Concentration of cytokines in patients with osteoarthritis of the knee and fibromyalgia. **Clinical Interventions in Aging.** v. 9 p. 939–944, 2014. [Acesso em: 18 de maio de 2019].

Insight Equipamentos Ltda – EPP. EP 149 Monitor de Atividades – IR. [Acesso em: 22 de outubro de 2019]. Disponível em: <https://insightltda.com.br/produto/ep-149-monitor-de-atividades-ir/>

JENSEN, T.S.; FINNERUP, N.B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. **Lancet Neurol.** v. 13, p. 924–935. 2014

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H; JESSELL, T.M.; SIEGELBAUM, S.A.; HUDSPETH, A.J. Princípios de Neurociências. 5ª ed. Mc Hill. Porto Alegre, 2014.

KERMACK, W.O., MCKENDRICK, A.G., MCKINLAY, P.L. Death-rates in Great Britain and Sweden. Some general regularities and their significance. **Lancet.** p. 698-703. 1934.

KUMAR, A.J. Influência de Gênero no Desenvolvimento Somático e Sensorio Motor de Ratos Wistar Submetidos à Anóxia Neonatal. (Dissertação de mestrado online). **Programa**

de Pós-Graduação em Neurociência e Comportamento. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2017.

KVARIK, T.; et al. Effects of Maternal Stress during Different Periods of Pregnancy on the Early Neurobehavioral Response of Rats. **Journal of Neurology and Neuroscience**, v. 7, n. 2:80, p. 1-8, fev. 2016.

LAZINSKI, M.J.; SHEA, A.K.; STEINER, M. Effects of maternal prenatal stress on offspring development: a commentary. **Arch Womens Ment Health**. v. 11, n. 5-6, p. 363-375, dez. 2008.

LESNAK, J.; SLUKA, K.A. Chronic non-inflammatory muscle pain: central and peripheral mediators. **Current opinion in physiology**, v. 11, p. 67-74, out. 2019.

LI, C-L; et al. Validating Rat Model of Empathy for Pain: Effects of Pain Expressions in Social Partners. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v. 12, n. 242, p. 16, out. 2018.

LINS, B.R.; et al. Prospective analysis of the effects of maternal immune activation on rat cytokines during pregnancy and behavior of the male offspring relevant to schizophrenia. **ENEURO**.0249-18.2018, v. 5, n. 4, jul. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6140112>

LOBATO, J.C.P.; et al. Programação fetal e alterações metabólicas em escolares: metodologia de um estudo caso-controle. **Rev Bras Epidemiol**. v. 19, n. 1, p. 52-62, jan. 2018

MACIEL, L.Y.S.; et al. Electroacupuncture Reduces Hyperalgesia after Injections of Acidic Saline in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med [online]**. 2014; 2014: 485043. [Acesso em: 16 de maio de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3977512/>

MANDY, M.; NYIRENDA, M. Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. **International health**. v. 10, n. 2, p. 66–70. 2018.

MARTINEZ, J.E.; et al. EpiFibro (Registro Brasileiro de Fibromialgia): dados sobre a classificação do ACR e preenchimento dos critérios diagnósticos preliminares e avaliação de seguimento. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 57, n. 2, p. 129-133, 2017.

MELO, I.M.S.G. A deficiência materna em ômega 3 associada a níveis elevados de ácidos graxos saturados em dieta contendo óleo de babaçu afeta o desenvolvimento da progênie:

impacto sobre a ontogênia reflexa e somática. 2020. 71 f. Dissertação (**Mestrado em Morfotecnologia**) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

MESQUITA, A.R.; PÊGO, J.M.; SUMMAVIELLE, T.; MACIEL, P.; ALMEIDA, O.F.X.; SOUSA, N. Neurodevelopment milestone abnormalities in rats exposed to stress in early life. **Neuroscience**, v. 147, n. 4, p. 1022–1033, 2007.

MIRANDA, C.C.V.; SEDA JUNIOR, L.F.; PELLOSO, L.R.C.A. Nova classificação fisiológica das dores: o atual conceito de dor neuropática. **Revista Dor [online]**. v. 17, n. 1, p. 2-4. 2016.

NAIK, A.A.; PATRO, I.K.; PATRO, N. Slow Physical Growth, Delayed Reflex Ontogeny, and Permanent Behavioral as Well as Cognitive Impairments in Rats Following Intra-generational Protein Malnutrition. **Frontiers Neuroscience**, v. 9, n. 446, p. 1-18, dez. 2015.

NASCIMENTO, S.S.; et al. Efficacy and safety of medicinal plants or related natural products for fibromyalgia: A systematic review. **Evid Based Complement Altern Med [online]**, v. 2013, n. 149468, 2013. [Acesso em: 17 de maio de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3687718/>

ODILARA, C.O.; et al. Reflexos Primitivos de Neonatos Nascidos em uma Maternidade no Sul do Brasil. **J. res. fundam. care. Online**, v. 11, n. 3, p. 588-593, 2019.

OLIVEIRA, C.D.R.; MOREIRA, C.Q.; SPINOSA, H.S.; YONAMINE, M. Neurobehavioral, reflexological and physical development of Wistar rat offspring exposed to ayahuasca during pregnancy and lactation. **Revista Brasileira de Farmacognosia [online]**, v. 21, n. 6, p. 1065-1076, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000170>>

PASCUAL, Z.N.; LANGAKER, M.D. Physiology, Pregnancy. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**. Maio 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559304/>

PEDROSO, V.S.P.; SALGADO, J.V.; TEIXEIRA, A.L. Sinais neurológicos sutis: uma revisão. **J. bras. psiquiatr. [online]**, v. 59, n. 3, p. 233-237, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0047-20852010000300010]

RAJA, S.N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **PAIN**, v. 161, n. 9, p 1976-1982, set 2020.

RANZOLINA, A.; et al. Evaluation of cytokines, oxidative stress markers and brain-derived neurotrophic factor in patients with fibromyalgia – A controlled cross-sectional study. **Cytokine**. v. 84, p. 25–28, 2016.

RAVELLI, G.P.; STEIN, Z.A.; SUSSER, M.W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med**. v. 295, p. 349-53. 1976

ROMERO-ALCALÁ, P.; et al. Sexuality in male partners of women with fibromyalgia syndrome: A qualitative study. **PloS one**. v. 14, n. 11, p. 16, nov. 2019.

SAA'D, S.; MANY, A.; JACOB, G.; ABLIN, J.N. High prevalence of fibromyalgia symptoms among healthy full-term pregnant women. **Rheumatol Int**. v. 33, p. 1555–1560, 2013.

SANTOS, D.F.S. Desenvolvimento de um novo modelo de hiperalgesia muscular induzida por contração isométrica sustentada em ratos. (Dissertação de mestrado online). São Paulo: **Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) – UNICAMP**; 2014. [Acesso em: 17 de maio de 2019]. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/244475/1/Santos_DiogoFranciscodaSilvas_M.pdf

SCHOLZ, J.; et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. **Pain**. v. 160, n. 1, p. 53-59. jan. 2019.

SILVA, K.C. Influência da interação social nas respostas motoras de ratos submetidos a um modelo de dor inflamatória e o comportamento pró-social do seu coabitante. 2017. 58 f. Dissertação (**Mestrado em Ciências Fisiológicas**) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2017

SILVA, P.R.R. Empatia e reciprocidade em ratos Wistar: um paradigma para avaliar comportamento pró-social. 2016. 48 f. Dissertação (**Mestrado em Psicobiologia**) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2016.

SILVEIRA, P.P.; PORTELLA, A.K.; GOLDANI, M.Z.; BARBIERI, M.A. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 6, p. 494-504, 2007.

SIRACUSA, R.; PAOLA, R.D.; CUZZOCREA, S.; IMPELLIZZERI, D. Fibromyalgia: Pathogenesis, Mechanisms, Diagnosis and Treatment Options Update. **Int J Mol Sci**. v. 22, n. 8, p. 1-31. abr. 2021

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

SOARES-CUNHA, C.; et al. Mild Prenatal Stress Causes Emotional and Brain Structural Modifications in Rats of Both Sexes. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v. 12, n. 129, p.15, 2018. DOI: 10.3389/fnbeh.2018.00129

SUTHERLAND, S.; BRUNWASSER, S.M. Sex Differences in Vulnerability to Prenatal Stress: A Review of the Recent Literature. **Curr Psychiatry Rep**. v. 20, n. 11, p. 21. set. 2018.

VASCONCELOS, F.H.; ARAUJO, G.C. Prevalência de dor crônica no Brasil: estudo descritivo. **BrJP**, v. 1, n. 2, p. 176-179, jun. 2018. [Acesso em: 17 de maio de 2019]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2595-31922018000200176&script=sci_arttext&tlng=pt

WANG, H.; et al. Age- and gender-dependent impairments of neurobehaviors in mice whose mothers were exposed to lipopolysaccharide during pregnancy. **Toxicology Letters**, v. 192, n. 2, p. 245–251, fev. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427409014854>

YAGER, J.Y.; NGUYEN, A.T.; ARMSTRONG, E.A. Neurodevelopmental Reflex Testing in Neonatal Rat Pups. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 24, n. 122, e55261, 2017.

ZIONI, T.; BUSKILA, D.; ARICHA-TAMIR, B.; WIZNITZER, A.; SHEINER, E. Pregnancy outcome in patients with fibromyalgia syndrome. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 24, n. 11, p. 1325–1328, 2011.

ANEXO A

Certificados do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



Universidade
Federal de
Sergipe

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E IMUNOLÓGICA NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO MODELO DE HIPERALGESIA CRÔNICA DIFUSA", protocolada sob o CEUA nº 8239041219 (ID 000211), sob a responsabilidade de **Patrícia Rodrigues Marques de Souza e equipe; Leandro Marques de Souza; Ana Beatriz da Silva Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 16/03/2020.

We certify that the proposal "BEHAVIORAL AND IMMUNOLOGICAL EVALUATION IN THE RAT OFFSPRING SUBMITTED TO BILATERAL CHRONIC HYPERALGESIA MODEL", utilizing 16 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 8239041219 (ID 000211), under the responsibility of **Patrícia Rodrigues Marques de Souza and team; Leandro Marques de Souza; Ana Beatriz da Silva Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 03/16/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2020** a **05/2021** Área: **Fisiologia**

Origem: **Biotério da Universidade Federal de Sergipe**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **2 a 3 meses**

N: **16**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 250 g**

Local do experimento: Laboratório de Pesquisa em Neurociência

São Cristóvão, 17 de fevereiro de 2021

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe



**Universidade
Federal de
Sergipe**

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

São Cristóvão, 22 de março de 2022
CEUA N 8239041219

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Patrícia Rodrigues Marques De Souza
Área: Fisiologia

Título da proposta: "AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E IMUNOLÓGICA NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO MODELO DE HIPERALGESIA CRÔNICA DIFUSA".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFS (ID 000124)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 28/fevereiro/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Venho solicitar a esse comitê a atualização do número de animais utilizados, e prorrogação do prazo final, do projeto intitulado "AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E IMUNOLÓGICA NA PROLE DE RATAS SUBMETIDAS AO MODELO DE HIPERALGESIA CRÔNICA DIFUSA". O número de animais solicitado quando este projeto foi submetido ao comitê, deve-se ao fato de que tais animais não são o objeto de estudo da pesquisa, o N fornecido pelo Biotério Central é apenas para a indução do modelo de hiperalgesia muscular crônica difusa induzida por salina ácida, mimetizando a Fibromialgia; e então após efetivado o modelo, proceder com o acasalamento programado. A prole desses animais que é o objeto de estudo da presente pesquisa. Porém, pensando na parte estatística, que é o que garante que o modelo de hiperalgesia foi efetivo, devemos seguir o preconizado na literatura e pela criadora do modelo profª Kathleen Sluka, que o número mínimo de animais que essa indução exige, é de seis animais por grupo. (SLUKA, 2013; DOURADO, 2015; SATO, 2020; FREITAS, 2021). O pedido tem como justificativa seguir o que é preconizado na literatura para pesquisas que utilizam o modelo de hiperalgesia muscular crônica difusa induzida por salina ácida, pois apesar da prole desses animais ser o verdadeiro objeto de estudo, precisamos garantir que o modelo foi efetivo nas progenitoras. Diante disso, pedimos que o N de ratos Wistar permitidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais, seja atualizado de 16 animais para 27 animais, sendo seis fêmeas por grupo (salina ácida, salina neutra e controle) totalizando dezoito, e nove machos para fazer a cobertura dessas fêmeas (um macho para duas fêmeas). O pedido de prorrogação do prazo de execução tem como justificativa as limitações geradas durante a pandemia do SARS-CoV2, fato que interrompeu, impossibilitou e comprometeu a realização de etapas importantes do projeto. A prorrogação do prazo será fundamental para a conclusão das análises finais da pesquisa, seguindo sempre as exigências apropriadas, visto que já está marcada a qualificação de mestrado da minha aluna e pesquisadora executante, Ana Beatriz da Silva Oliveira. Peço a prorrogação da execução final deste projeto referido anteriormente, com novo prazo final para maio de 2022. DOURADO, S.S.F. Efeito do enriquecimento ambiental, associado ou não a atividade física, nas funções nociceptiva, ambulação e controle motor em modelo animal de dor crônica muscular difusa. 2015. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2015. FREITAS, C.E.P. Estudo da ação da glândula adrenal no desenvolvimento da hiperalgesia muscular crônica difusa. 2021. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2021. SATO, K.L.; SANADA, L.S.; SILVA, M.; OKUBO, R.; SLUKA, K.A. Transcutaneous electrical nerve stimulation, acupuncture, and spinal cord stimulation on neuropathic, inflammatory and, non-inflammatory pain in rat models. The Korean journal of pain, v. 33, n. 2, p. 121-130, 2020. PMID: 32235012; PMCID: PMC7136295. SLUKA, K.A.; O'DONNELL, J.M.; DANIELSON, J.; RASMUSSEN, L.A. Regular physical activity prevents development of chronic pain and activation of central neurons. Journal of applied physiology, v. 114, n. 6, p. 725-33, 2013. PMID: 23271699; PMCID: PMC3615604."

Comentário da CEUA: "APROVADO - As justificativas são pertinentes para a execução do projeto."

Prof. Dr. Josemar Sena Batista
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Sergipe