



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**PAPEL DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA REGULAÇÃO DA MASSA
MUSCULAR E HIPERALGESIA EM UM MODELO MURINO DE FIBROMIALGIA**

RAQUEL PRADO DA SILVA

**SÃO CRISTÓVÃO
2023**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**PAPEL DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA REGULAÇÃO DA MASSA
MUSCULAR E HIPERALGESIA EM UM MODELO MURINO DE FIBROMIALGIA**

RAQUEL PRADO DA SILVA

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.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Lustrino Borges

SÃO CRISTÓVÃO

2023

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S586p Silva, Raquel Prado da
Papel do sistema nervoso simpático na regulação da massa muscular e hiperalgesia em um modelo murino de fibromialgia / Raquel Prado da Silva ; orientador Danilo Lustrino Borges.– São Cristóvão, SE, 2023.
69 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2023.

1. Fibromialgia. 2. Sistema nervoso simpático. 3. Músculos esqueléticos. 4. Hiperalgesia. 5. Proteólise. I. Borges, Danilo Lustrino, orient. II. Título.

CDU 612:616.74-009.7

RAQUEL PRADO DA SILVA

PAPEL DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA REGULAÇÃO DA MASSA MUSCULAR E HIPERALGESIA EM UM MODELO MURINO DE FIBROMIALGIA

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.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Lustrino Borges (DFS/UFS)

Dra. Flávia Aparecida Graça (St Jude Children's Research Hospital, EUA)

Dra. Natália Lauterbach Ennes da Silva (FMRP/USP)

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria Antônia, que acompanhou de perto cada passo dessa minha caminhada, vivenciou as diversas emoções do percurso, apoiou-me sempre que eu precisava de suporte, é meu exemplo de superação e fé, além de ser minha maior incentivadora.

À minha avó, Assunção, que apesar de sua escassa instrução acadêmica, de fato é muito sábia, minha fonte de inspiração, sempre se preocupava comigo e se emocionava quando eu compartilhava a superação de um novo desafio, oferecendo-me muito amor e carinho.

Eu as amo abundantemente!

AGRADECIMENTOS

A Deus que pela sua infinita bondade e misericórdia renovadas diariamente, me sustenta diante dos desafios enfrentados, por me conduzir no melhor caminho, por suprir minhas necessidades e ser meu firme alicerce. Sou grata por ter me dado a capacidade de concluir esta etapa, dando-me entendimento e sabedoria sempre que preciso e por ser minha fortaleza em todos os momentos, pois estou certa que se não fosse o Senhor, eu não teria chegado até aqui.

Ao Dr. Danilo Lustrino por ter me dado a oportunidade de ser sua orientada, por receber seus valiosos ensinamentos, pela incomparável dedicação em todas as preciosas orientações, por compartilhar o seu rico conhecimento científico e pela preocupação com a minha formação científica. Sou grata, também, pela paciência que teve comigo, por toda ajuda concedida durante os experimentos e nas atividades de bancada no Laboratório, além de, literalmente, pegar na minha mão quando era necessário para que eu desempenhasse a técnica da melhor maneira possível. Além do mais, sempre tinha um comentário hilário em meio à rotina de trabalho (risos). Foram momentos impagáveis. Finalizo esta jornada feliz pelo caminho trilhado e honrada por ter usufruído da sua orientação!!!

Aos professores Dr. Enilton Aparecido Camargo por partilhar de forma tão leve e marcante conhecimentos científicos significativos durante a ministração das aulas e Dra. Patrícia Rodrigues Marques de Souza por evidenciar a importância da formação acadêmica para além da pesquisa científica a fim de ser um professor de alta qualidade e compartilhar suas valiosas experiências em sala de aula. Vocês fizeram uma diferença memorável na minha formação acadêmica, admiro-os bastante!

Ao professor Dr. Daniel Badauê Passos Júnior (Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, DFS/UFS) pelo acolhimento no Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental para realizarmos os experimentos deste estudo.

Aos professores e colaboradores Dra. Josimari DeSantana, Dra. Sandra Lauton (DFS/UFS), Dr. Enilton Camargo (DFS/UFS) e Dra. Roberta Pereira Miranda Fernandes (DFS/UFS) pelo auxílio no fornecimento de material e espaço em seus laboratórios para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente à Tamiris Carvalho e equipe pela ajuda.

Aos professores Dr. Fabrício Nunes Macedo (DFS/UFS) e Dra. Jullyana de Souza Siqueira Quintans (DFS/UFS) pelos valiosos aprendizados recebidos para o estágio de docência e pelas importantes conversas que tivemos nessa caminhada.

A todo o corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PROCFIS) da Universidade Federal de Sergipe.

Aos funcionários do PROCFIS, em especial ao secretário Luís César por ser tão solícito em nos ajudar quando necessário. E aos funcionários do DFS/UFS, especialmente, Ninha e Edivânia por tornar nossa rotina mais leve e agradável.

Aos professores Dr. José Ronaldo (DFS/UFS), Dr. Dawit Gonçalves (UFMG), Dra. Flávia Graça (St Jude Children's Research Hospital, EUA) e Dra. Natália Lauterbach Ennes da Silva (FMRP/USP) pelas valiosas contribuições nas Bancas de Qualificação e Defesa deste trabalho.

Ao Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM) da Universidade Federal de Sergipe pelo suporte às análises dos nossos experimentos, especialmente à Dra. Roberta Menezes Santos por todo auxílio.

Aos colegas de laboratório e companheiros de trabalho: Daniely Messias, Tatiane Oliveira e João da Cruz pelos bons momentos de aprendizado e conversas proveitosas juntos, auxílio no desenvolvimento desta pesquisa e ajuda na execução dos experimentos. Sou grata, também, aos alunos de Iniciação Científica Lucas e, especialmente, Enrique que sempre muito prestativo, auxiliava nos dias de trabalho e pelas conversas agradáveis. Além de agradecer à Hevely dos Anjos que mesmo pouco juntas, foram momentos proveitosos entre idas e vindas ao laboratório. Aprendi muito com vocês!

Agradeço especialmente à minha amiga Tatiane, que além de ser uma grande incentivadora para eu persistir em ingressar na pós-graduação, tornava os momentos no laboratório mais agradáveis com seu jeito divertido de ser. Guardo com muito carinho as boas risadas, longas conversas e reflexões ao longo dessa jornada. Você é mais que uma amiga, é uma irmã que Deus me deu há quase 20 anos para a vida!

Aos pós-graduandos do PROCFIS pelo companheirismo durante os desafios nas disciplinas cursadas e pelos momentos agradáveis de conversas além das salas de aula mesmo em meio à rotina corrida de experimentos no laboratório.

À minha amada mãe Maria Antônia por seu cuidado comigo em meio à correria do dia a dia, pelo acolhimento que me dava sempre que precisei, pela

paciência e compreensão nos meus momentos de dificuldades durante essa jornada. Agradeço por sempre tentar, e na maioria das vezes conseguir, me arrancar sorrisos para relaxar quando me via tensa, por todos os lanchinhos e chás que me dava quando eu passava horas estudando no quarto e pelos abraços revigorantes que buscava no intervalo dos estudos em casa. Além disso, agradeço pelos momentos de confidências, pelos conselhos recebidos e, também, quando celebrávamos minhas pequenas conquistas na pesquisa. Tudo isso fez total diferença favorável nessa caminhada. Sou grata por tanto amor, cuidado e dedicação. Obrigada por acreditar no meu futuro. O meu sucesso é o seu sucesso!!!

À minha família, especialmente, ao meu irmão Daniel pelo apoio em todos os momentos, por torcer pelo meu sucesso, por tanto amor e cuidado comigo desde os meus primeiros dias de vida, você é muito importante para mim; às minhas tias e tios pelo suporte e incentivo de sempre; pai, avós, primas e primos. Vocês são fundamentais em minha vida, sou grata por me impulsionar, celebrar cada vitória alcançada e serem verdadeiros intercessores na minha vida! Sou grata a Deus por tê-los em minha vida! Amo imensamente cada um de vocês!!!

Às minhas amigas-irmã: Raíssa, por sempre compartilhar momentos bons e difíceis da minha caminhada, sempre ter uma palavra de ânimo quando preciso, por sempre me encorajar e ser um exemplo de fé e perseverança; Daiane, que, apesar de 1.000km de distância, é sempre presente em minha vida, nossas horas de conversas e “cines” à distância são um alento para mim, você sempre acreditou na minha capacidade, mesmo quando desacreditei. Vocês são a definição de “amigo mais chegado que irmão” (Provérbios 18:24), amo-as profundamente!!!

Aos amigos, irmãos em Cristo e Pastores da Primeira Igreja Batista de Aracaju, minha segunda casa, pela intercessão, apoio e incentivo recebidos. Sou grata por ter essa Casa de Deus como um lar para refúgio e renovação de ânimo. É privilégio fazer parte da família de Deus com vocês, isso é essencial em minha vida!!!

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) com concessão de bolsa para desenvolvimento e realização dos experimentos desta dissertação.

EPÍGRAFE

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito.” Martin Luther King Jr.

RESUMO

Papel do sistema nervoso simpático na regulação da massa muscular e hiperalgesia em um modelo murino de fibromialgia, Raquel Prado da Silva, Mestrado em Ciências Fisiológicas, UFS, São Cristóvão, 2023. A fibromialgia (FM) caracteriza-se, principalmente, por sintomas como dor musculoesquelética crônica generalizada, além de ser observada perda de força e massa muscular. Adicionalmente também foi descrito que pacientes com FM apresentam alterações na atividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS), o qual é conhecido por regular mecanismos nociceptivos e a plasticidade muscular, no entanto o papel do SNS na regulação da hiperalgesia e massa muscular esquelética durante a FM não é bem conhecido. Assim, neste estudo avaliamos indiretamente a atividade simpática por meio da quantificação das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, e da sinalização adrenérgica em músculos *soleus* de ratas submetidas a modelo de FM induzida pela dupla injeção intramuscular de salina ácida. Observou-se que após 7 dias da indução da FM houve hiperalgesia difusa, confirmada pelas diminuições no limiar de retirada das patas e reduções na massa e na força muscular que foram associadas a atenuação da sinalização adrenérgica mensurada pelo conteúdo de proteínas fosforiladas pela quinase dependente de AMPc (PKA) e de suas proteínas-alvo. A partir destes resultados, demonstrou-se que o tratamento com clenbuterol (agonista dos receptores β_2 -adrenérgicos) atenuou a hiperalgesia e atrofia muscular em animais FM. Para confirmar que a diminuição na liberação de catecolaminas não era específica do modelo de hiperalgesia induzida pela injeção de salina ácida, realizou-se um segundo protocolo experimental de FM através da administração intramuscular de carragenina. Como esperado, a carragenina induziu diminuição do limiar de retirada da pata e da concentração plasmática de adrenalina, embora não tenha induzido atrofia muscular. Uma vez que ambos os modelos de FM utilizados neste estudo foram capazes de reduzir a secreção catecolaminérgica adrenal, postulou-se que a depleção de adrenalina através da remoção bilateral da medula das glândulas adrenais (ADM), poderia mimetizar os sintomas da FM. De fato, a ADM induziu hiperalgesia mecânica e aumentou a proteólise muscular em animais mantidos em condições basais. Em conjunto, os resultados demonstram que o SNS está envolvido no controle da nocicepção e da plasticidade muscular em modelo experimental de FM e dão subsídios para estudos clínicos objetivando tratar pacientes FM.

DESCRITORES: Fibromialgia; sistema nervoso simpático; músculo esquelético; proteólise; hiperalgesia.

ABSTRACT

Role of the sympathetic nervous system in the regulation of muscle mass and hyperalgesia in a murine model of fibromyalgia, Raquel Prado da Silva, São Cristóvão, 2023. Fibromyalgia (FM) is primarily characterized by symptoms such as chronic generalized musculoskeletal pain, along with loss of strength and muscle mass. Furthermore, alterations in Sympathetic Nervous System (SNS) activity have been described in FM patients, which is known to regulate nociceptive mechanisms and muscle plasticity. However, the role of the SNS in the regulation of hyperalgesia and skeletal muscle mass during FM is not well understood. Therefore, in this study, we indirectly evaluated sympathetic activity by quantifying catecholamines, adrenaline and noradrenaline, as well as adrenergic signaling in the soleus muscles of female rats subjected to an FM model induced by double intramuscular injection of acid saline. It was observed that after 7 days of FM induction, there was diffuse hyperalgesia, confirmed by a decrease in the paw withdrawal threshold, and reductions in muscle mass and strength, which were associated with attenuation of adrenergic signaling measured by the content of phosphorylated proteins by the cAMP-dependent kinase (PKA) and its target proteins. Based on these results, it was demonstrated that treatment with clenbuterol (β 2-adrenergic receptor agonist) attenuated hyperalgesia and muscle atrophy in FM animals. To confirm that the decrease in catecholamine release was not specific to the acid saline injection-induced hyperalgesia model, a second experimental FM protocol was conducted with intramuscular administration of carrageenan. As expected, carrageenan induced a decrease in paw withdrawal threshold and plasma adrenaline concentration, although it did not induce muscle atrophy. Since both FM models used in this study were able to reduce adrenal catecholaminergic secretion, it was postulated that adrenaline depletion through bilateral removal of adrenal medulla (ADM) could mimic FM symptoms. Indeed, ADM induced mechanical hyperalgesia and increased muscle proteolysis in animals maintained under basal conditions. Taken together, the results demonstrate that the SNS is involved in the control of nociception and muscle plasticity in an experimental model of FM and support clinical studies aimed at treating FM patients.

KEYWORDS: Fibromyalgia; sympathetic nervous system; skeletal muscle; proteolysis; hyperalgesia.

RESUMO VOLTADO PARA A SOCIEDADE

Papel do sistema nervoso simpático na regulação da massa muscular e hiperalgesia em um modelo murino de fibromialgia, Raquel Prado da Silva, Mestrado em Ciências Fisiológicas, UFS, São Cristóvão, 2023. A fibromialgia (FM) é uma síndrome que se caracteriza, principalmente, por dor em várias partes do corpo e que se mantém por longos períodos fazendo com que os indivíduos sintam fraqueza ao realizar pequenas tarefas e parece estar associada ao fato que os pacientes também perdem massa muscular. Além disso, diversos estudos demonstraram que há também alteração na atividade de um componente do nosso sistema nervoso que é responsável por regular funções corporais que são tipicamente involuntárias, como o batimento do coração, a movimentação do estômago etc., por isso, esta porção do sistema nervoso é chamada de involuntária e mais especificamente de Sistema Nervoso Simpático (SNS). Assim, neste estudo procuramos tentar entender a relação entre o desenvolvimento da dor e da perda de massa muscular utilizando um modelo animal de FM e o possível papel do SNS na regulação destes parâmetros. Demonstramos que os animais com FM realmente desenvolvem dor generalizada e apresentaram atrofia muscular, além disso, eles também possuem menor atividade do SNS. Desta forma, nós tratamos os animais FM com um medicamento que potencializa a ação do SNS e observamos que eles sentiram menos dor e deixaram de perder força e massa muscular. Para confirmar o envolvimento do SNS na regulação destas funções corporais, foi realizado um novo experimento onde animais saudáveis foram submetidos à uma cirurgia para remoção de um dos componentes do SNS e após alguns dias eles foram avaliados. Observou-se que os animais saudáveis quando perdem parte do SNS também sentem mais dor e desenvolvem atrofia muscular, indicando que este sistema está envolvido na instalação e/ou manutenção da FM e que abordagens terapêuticas que aumentem a atividade do SNS, talvez, no futuro possam ser utilizadas para tratar pacientes com FM.

DESCRITORES: Fibromialgia; Disautonomias Primárias; Dor Musculoesquelética; Músculo Esquelético; Proteólise.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC** Enzima Adenilato ciclase
- ADM** Remoção bilateral da medula da adrenal
- AMPc** Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- ANOVA** Análise de variância
- AR** Receptores Adrenérgicos
- CB** Clenbuterol
- CEUA** Comissão de Ética no Uso de Animais
- CLAE** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- COMT** Catecol-o-metiltransferase
- CONCEA** Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- cPKA** Subunidade catalítica α da PKA
- CREB** Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
- DN** Dor Neuropática
- DRG** Gânglio da Raíz Dorsal
- EDL** Músculo extensor digital longo
- FM** Fibromialgia
- GPCR** Receptores Acoplados à Proteína G
- HRP** *Horseradish peroxidase*
- HSL** Lipase Hormônio Sensível
- LANBAC** Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental
- MuRF1** *Muscle RING Finger – 1*
- PAGE** Eletroforese em gel de poliacrilamida
- PCR** Reação em cadeia da polimerase
- PKA** Proteína quinase dependente de AMPc
- PKB** Proteína quinase B ou AKT
- RIPA** Tampão para ensaio de radioimunoprecipitação
- RpI39** Proteína ribossomal L39
- rpm** Rotações por minuto
- RT** Transcrição Reversa
- SDS** Dodecilsulfato de sódio

SIK-1 Quinase induzida por sal do tipo 1

SNA Sistema Nervoso Autônomo

SNE Sistema Nervoso Entérico

SNP Sistema Nervoso Parassimpático

SNS Sistema Nervoso Autônomo Simpático

TBST Tampão Tris-salina-Tween

TCA Ácido tricloroacético

VFC Variabilidade da frequência cardíaca

β2-AR Receptores β2-adrenérgicos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aparelho analgesímetro digital utilizado na mensuração do limiar mecânico de retirada da pata	14
Figura 2. Aparelho RotaRod digital utilizado na mensuração da coordenação motora.	15
Figura 3. Aparelho Grip Strenght Meter utilizado na mensuração da força muscular.	16
Figura 4. Representação temporal do modelo de hiperalgesia mecânica através da dupla injeção intramuscular unilateral de 50µL de solução NaCl 0,9% (pH 4,0) em ratas.	20
Figura 5. Representação temporal do efeito do Clenbuterol (CB, 3mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹ ; s.c.) na hiperalgesia mecânica e perda de massa muscular induzida pela dupla injeção intramuscular unilateral de 50µL de solução NaCl 0,9% (pH 4,0) em ratas.	21
Figura 6. Representação temporal do modelo de hiperalgesia mecânica através da dupla injeção intramuscular unilateral de 50µL de solução 3% de λ-Carragenina diluída em NaCl 0,9% em ratas.	22
Figura 7. Representação temporal da avaliação da participação da adrenalina circulante na regulação da hiperalgesia mecânica e massa muscular em ratas mantidas em condições basais.	23
Figura 8. Efeito da dupla injeção intramuscular de salina ácida no desenvolvimento de hiperalgesia mecânica difusa na pata ipsilateral (em g e convertida a 100% do Controle, em a) e contralateral (em g e convertida a 100% do Controle, em b), na força (em g.kg ⁻¹ massa corporal e convertida a 100% do Controle, em c), coordenação motora (em segundos, em d), massa muscular (em mg.100g ⁻¹ massa corporal e convertida a 100% do Controle, em e) e na degradação proteica (em nmol de tirosina.mg músculo ⁻¹ .2h ⁻¹ e convertida a 100% do Controle, em f) de músculos soleus de ratas. Em e , foram contabilizados os valores dos músculos ipsilateral e contralateral. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média. De a-d , os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) de duas vias com os fatores fibromialgia e tempo e posteriormente submetidos ao teste de Bonferroni. Em e-f , os dados foram analisados através de teste t de Student. *p<0,05 vs. Controle (n=5/ grupo).....	25

Figura 9. Efeito da indução da hiperalgesia muscular crônica difusa na concentração plasmática de adrenalina (em ng.mL^{-1} ; $n=5-6$ / grupo; em **a**), no conteúdo de noradrenalina (em ng.g músculo; $n=5-6$, em **b**), na expressão gênica do $\beta 2$ -receptor adrenérgico ($\beta 2$ -AR), da subunidade catalítica α da proteína quinase A (PKA), das isoformas 7 e 9 da adenilato ciclase (AC) e da quinase induzida por sal do tipo 1 (SIK-1) ($n=4-5$ / grupo, em **c**) e no conteúdo proteico do $\beta 2$ -AR, dos substratos fosforilados pela PKA, da p^{Ser660} -Lipase hormônio sensível (HSL) e de p^{Ser133} - proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB), ($n=4-5$ / grupo, em **d**) em músculos soleus de animais normais e submetidos ao modelo de fibromialgia. Em **e**, imagens representativas dos *blottings*. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos ao teste t de Student. * $p < 0,05$ vs. Controle.27

Figura 10. Efeito do tratamento com Clembuterol (CB, $3\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; s.c.) por três dias no limiar de retirada da pata ipsilateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **a**) e contralateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **b**), na força (em g.kg^{-1} massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **c**), massa muscular (em mg.100g^{-1} massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **d**), na degradação proteica (em $\text{nmol de tirosina.mg músculo}^{-1}.\text{2h}^{-1}$ e convertida a 100% do Controle e na sinalização $\beta 2$ -adrenérgica (**e**) de músculos *soleus* de ratas previamente submetidas à dupla injeção intramuscular de $50\mu\text{L}$ de solução NaCl 0,9% neutra (Controle) ou ácida (pH 4,0; Fibromialgia = FM). Em **c**, foram contabilizados os valores dos músculos ipsilateral e contralateral. Em **f**, os *blottings* representativos ($n=3/\text{grupo}$). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média e analisados através de análise de variância (ANOVA) de duas vias com os fatores fibromialgia e CB e posteriormente submetidos ao teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs. Controle e # $p < 0,05$ vs. FM ($n=5-6$ / grupo).29

Figura 11. Efeito da dupla injeção intramuscular de $50\mu\text{L}$ de λ -carragenina (3% em NaCl 0,9%) ou de salina (Controle) no limiar de retirada da pata ipsilateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **a**) e contralateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **b**), na força (em g.kg^{-1} massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **c**), na coordenação motora (em segundos, em **d**), na massa muscular (em mg.100g^{-1} massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **e**), na degradação proteica em *soleus* (em $\text{nmol de tirosina.mg músculo}^{-1}.\text{2h}^{-1}$ e convertida a 100% do Controle, em **f**), na concentração plasmática de adrenalina (em ng.mL^{-1} , em **g**) e no

conteúdo de noradrenalina em *soleus* (em ng.g^{-1} , em **h**) de ratas. Em **e**, foram contabilizados os valores dos músculos ipsilateral e contralateral. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média e analisados através de análise de variância (ANOVA) de duas vias com os fatores tempo e carragenina e posteriormente submetidos ao teste de Bonferroni (em **a-d**) ou ao teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs. Controle e # $p < 0,05$ vs. carragenina (n=5-6/ grupo).....31

Figura 12. Efeito da adrenodemedulação (ADM, remoção bilateral da medula da adrenal) por sete dias no limiar de retirada da pata ipsilateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **a**) e contralateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **b**), na massa muscular (em mg.100g^{-1} massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **c**) e na degradação proteica (em $\text{nmol de tirosina.mg músculo}^{-1}.\text{2h}^{-1}$ e convertida a 100% do Controle, em **d**) de músculos *soleus* de ratas mantidas em condições basais. Em **c**, foram contabilizados os valores dos músculos ipsilateral e contralateral. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média e analisados através de análise de variância (ANOVA) de duas vias com os fatores ADM e tempo e posteriormente submetidos ao teste de Bonferroni (em **a e b**) ou ao teste *t* de Student (em **c e d**). * $p < 0,05$ vs. Controle e # $p < 0,05$ vs. FM (n=5-6/ grupo).....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados no estudo.....	17
Tabela 2. Anticorpos primários e secundários utilizados no estudo.....	18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1. Alterações autonômicas durante a fibromialgia	2
2.2. Papel SNS na regulação da hiperalgesia	5
2.3. Papel SNS na regulação da massa muscular esquelética.....	6
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo Geral	9
3.2. Objetivos Específicos.....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1. Animais	10
4.1.1. Escolha dos animais	10
4.2. Modelos Experimentais.....	11
4.2.1. Hiperalgesia Crônica Difusa	11
4.2.2. Tratamento com Clenbuterol	12
4.2.3. Cirurgia de Adrenodemedulação.....	12
4.3. Avaliações comportamentais	13
4.3.1. Limiar Mecânico de retirada da pata	13
4.3.2. Coordenação motora.....	14
4.3.3. Força muscular.....	15
4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa	16
4.5. Extração, dosagem e análise do conteúdo proteico através de <i>Western blotting</i>	17
4.6. Procedimentos experimentais para análise da proteólise em músculos esqueléticos de ratas.....	18
4.7. Determinação do conteúdo de catecolaminas plasmática e muscular.....	19
4.8. Delineamento experimental	20
4.8.1. Caracterização da sinalização adrenérgica em modelo de FM em ratas.	20
4.8.2. Efeito da estimulação β 2-adrenérgica na regulação da hiperalgesia e massa muscular em um modelo de FM em ratas.	21
4.8.3. Caracterização da nocicepção, do metabolismo proteico muscular e liberação de catecolaminas em um modelo de hiperalgesia induzido pela injeção intramuscular de carragenina.	22

4.8.4. Avaliação da participação da adrenalina circulante no controle da hiperalgesia e massa muscular de ratas.....	23
4.9. Análise estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Caracterização da sinalização adrenérgica em modelo de FM em ratas.....	24
5.2. Efeito da estimulação β 2-adrenérgica na regulação da hiperalgesia e massa muscular em um modelo de FM em ratas.....	28
5.3. Caracterização da nocicepção, do metabolismo proteico muscular e liberação de catecolaminas em um modelo de hiperalgesia induzido pela injeção intramuscular de carragenina.	30
5.4. Avaliação da participação da adrenalina circulante no controle da hiperalgesia e massa muscular de ratas.....	32
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE	65
ANEXO.....	69

1. INTRODUÇÃO

A fibromialgia (FM) é uma síndrome caracterizada principalmente pela dor crônica generalizada que pode levar a uma redução da capacidade física e qualidade de vida dos pacientes sendo uma das principais causas de consultas médicas relacionadas a dores musculoesqueléticas, além de ser considerada um problema de saúde pública. Alguns estudos apontam a prevalência mundial da doença entre 1% a 8%, sendo maior nos pacientes do sexo feminino 3:1, com faixa etária entre 35 e 44 anos de idade (JUNIOR; GOLDENFUM; FÁVARO SIENA, 2012; MARQUES *et al.*, 2017). Já no território brasileiro, esses dados atingem aproximadamente 2,5% e podem chegar a 10% em alguns países europeus (FORSETH, 1997; JUNIOR; GOLDENFUM; FÁVARO SIENA, 2012; SENNA *et al.*, 2004).

A ocorrência desta doença provoca diversos sinais clínicos, como por exemplo rigidez e fadiga muscular, fazendo com que o indivíduo diminua a capacidade de realizar atividades diárias consideradas simples (LATORRE-ROMÁN *et al.*, 2015). Estudos clínicos (KALYAN-RAMAN *et al.*, 1984; RUGGIERO; MANGANELLI; SANTORO, 2018; YUNUS *et al.*, 1986; YUNUS; KALYAN-RAMAN, 1989) e experimentais (BONATERRA *et al.*, 2016; FAVERO *et al.*, 2019) sugeriram que além das alterações funcionais musculoesqueléticas observadas durante a FM, há também perda de massa muscular, o que condiz com a ideia de que a FM é uma desordem de caráter musculoesquelética (LE GOFF, 2006). Uma vez que o tamanho da fibra muscular é determinado pela quantidade de proteínas intracelulares (KETTELHUT; WING; GOLDBERG, 1988; SANDRI, 2008) não é improvável que as alterações na estrutura muscular durante a FM sejam decorrentes de uma elevação no *turnover* proteico. De fato, Bonaterra *et al.*, (2016) demonstraram diminuição da área de secção transversa muscular em camundongos submetidos a um modelo de FM através da exposição alternada à ambiente frio que foi associada com maior expressão de genes relacionados à atrofia, isto é, atrogenes, nos músculos dos animais fibromiálgicos, indicando uma elevação no catabolismo proteico. Embora seja bem estabelecido que a inibição da expressão dos atrogenes possa prevenir a perda de massa muscular em diversas condições atroficas (BODINE *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2001), ainda não estão disponíveis medicamentos que possam ser utilizados para este fim.

No entanto, tem sido amplamente demonstrado que alguns mediadores endógenos podem atenuar a expressão dos atrogenes em condições atroficas

(KETTELHUT; WING; GOLDBERG, 1988; RYALL; CHURCH; LYNCH, 2010). Entre eles, pode-se citar o Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNS), que por meio das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, e dos receptores β 2-adrenérgicos (β 2-AR) é capaz de diminuir a perda de massa muscular, pelo menos em parte, através da inibição dos atrogenes e da proteólise proteossomal (GONÇALVES *et al.*, 2012; GRAÇA *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2014). Embora ainda controverso, diversos estudos demonstraram que a atividade simpática está alterada em indivíduos com FM (MARTÍNEZ-LAVÍN, 2012; MARTÍNEZ-LAVÍN; HERMOSILLO, 2000; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2014; PETZKE; CLAUW, 2000), no entanto, a participação do SNS na regulação da massa muscular durante a FM ainda é totalmente desconhecida.

Adicionalmente, as alterações autonômicas descritas em pacientes fibromiálgicos também indicam que o SNS é capaz de regular mecanismos nociceptivos (JÄNIG; HÄBLER, 2000; SCHLERETH; BIRKLEIN, 2008). Uma vez que boa parte destes estudos usaram variáveis indiretas para avaliar a atividade simpática, o que poderia justificar os resultados conflitantes encontrados na literatura, a descrição da funcionalidade do SNS em um modelo animal de FM pode fornecer subsídios para compreensão da fisiopatologia da doença. Desta forma, o principal objetivo deste estudo é avaliar “Papel do Sistema Nervoso Simpático na Regulação da Massa Muscular e Hiperálgia em um Modelo Murino de Fibromialgia”.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Alterações autonômicas durante a fibromialgia

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) ou neurovegetativo é responsável por regular funções fundamentais para o organismo, como a pressão arterial, frequência cardíaca, respiração e temperatura, as quais foram por muito tempo consideradas estar sob controle unicamente involuntário, e por isso, o SNA também foi chamado de Sistema Nervoso Involuntário (GUO *et al.*, 2022; TANG *et al.*, 2009). Morfofisiologicamente, ele possui três divisões principais: o sistema nervoso entérico (SNE), sistema nervoso parassimpático (SNP) e o SNS (GIBBINS, 2013).

Enquanto os SNE e SNP apresentam ações limitadas às estruturas por eles inervadas, o SNS possui ação mais difusa, uma vez que além do componente neural também apresenta um componente hormonal, os quais liberam principalmente

noradrenalina no tecido-alvo e adrenalina na corrente sanguínea, respectivamente (JÄNIG, 2013). Estas moléculas sinalizadoras, também chamadas de catecolaminas, devido a presença de um grupamento amina e de um anel catecol em suas composições químicas, irão atuar em receptores α e/ou β -adrenérgicos (AR) para produzirem suas respostas fisiológicas (EISENHOFER; KOPIN; GOLDSTEIN, 2004). Embora todos os AR sejam receptores acoplados à proteína G (GPCR), sabe-se que classicamente os α -AR estão acoplados à G α i ou G α q, enquanto os β -AR à G α s (JIANG *et al.*, 2022). Desta forma, a estimulação dos β -AR culminará na ativação da enzima adenilato ciclase (AC) com consequente produção de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) que ao se ligar às subunidades regulatórias da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), liberará suas subunidades catalíticas que poderão fosforilar diversas proteínas-alvo, entre elas, a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) e assim produzindo a resposta tecidual às catecolaminas (LYNCH; RYALL, 2008), especialmente em situações de “luta ou fuga”, por exemplo, após a exposição a estímulos estressores (ARSLAN, 2022; JÄNIG, 2013; NOVAK, 2019).

Em situações de estresse, a resposta pode se tornar acentuada e provocar doenças que, em alguns casos, estão associadas ao desenvolvimento de dor crônica (CHROUSOS, 1992), surgindo o pressuposto de que a ativação anormal da atividade simpática influenciaria na patogênese da dor crônica. Essa suspeita baseia-se também em vários estudos sobre a dor constantemente associados com sintomas de alteração autonômica (DADABHOY *et al.*, 2008; MARTÍNEZ-LAVÍN, 2012). Devido a hiperativação simpática e/ou disfunção parassimpática, o corpo não reage corretamente a fatores estressores, podendo desencadear problemas de sono, fadiga, intolerância ao exercício, entre outros sintomas relacionados (MARTÍNEZ-LAVÍN *et al.*, 1997; MEEUS *et al.*, 2013; MENDEZ *et al.*, 2006; SISTO *et al.*, 1995).

Partindo da premissa que dores crônicas poderiam alterar o *status* autonômico, BENGTSSON & BENGTSSON (1988) descreveram a relação entre SNA e a FM. Neste trabalho, os autores relataram atenuação na dor durante o repouso e no número de *tender points*, através do bloqueio do gânglio estrelado com bupivacaína (anestésico de longa duração) ou com administração de guanetidina (inibidor da liberação neural de noradrenalina) e propuseram que alterações na atividade simpática em alguns pacientes poderiam contribuir na patogênese da FM.

Corroborando estes dados, também foi observado que os pacientes com FM, em repouso, apresentaram aumento da frequência cardíaca e redução da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (MEEUS *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012; STAUD, 2008).

Em contrapartida, resultados conflitantes foram demonstrados em relação ao padrão de alteração do SNA. Grande parte destes estudos observou que a atividade simpática estava aumentada e a parassimpática reduzida em pacientes com FM em comparação com pacientes saudáveis (FURLAN *et al.*, 2005; MEEUS *et al.*, 2013). O predomínio simpático na FM também foi fundamentado pelos dados de comparações lineares entre os índices de atividade do SNS com a intensidade da dor e outros sintomas da FM (MARTÍNEZ-LAVÍN; HERMOSILLO, 2000; ZAMUNÉR *et al.*, 2015). Esta disfunção do SNA ou “disautonomia” parece desempenhar um papel considerável na fisiopatologia da FM, apesar de ainda não estar claro se essa alteração é a causa ou o efeito da hiperalgesia (JACOMINI; SILVA, 2007). Com fundamento na hipótese da hiperatividade simpática, a FM foi incluída como uma síndrome de Dor Neuropática (DN) mantida simpaticamente (MARTINEZ-LAVIN, 2004). No entanto, estudos realizados no século XX utilizando teste de estimulação auditiva e teste pressor nas mãos sob estímulo à 10°C e 4°C, evidenciaram respostas vasoconstritoras menores em pacientes com FM do que em controles normais, indicando atividade simpática menor ou aumento do tônus colinérgico em pacientes com a doença (QIAO; VAERØY; MØRKRID, 1991; VAERØY *et al.*, 1989a). Além disso, níveis reduzidos de condutância de pele em pacientes com FM apontaram níveis mais baixos de sudorese. Considerando que a sudorese é regulada por terminais simpáticos, isso demonstra influências tônicas diminuídas do SNS (REYES DEL PASO; DE LA COBA, 2020).

É importante mencionar que os trabalhos citados acima utilizaram medidas indiretas para avaliação da função autonômica simpática em indivíduos com FM, o que pode, pelo menos parcialmente, justificar os diferentes resultados obtidos. Embora estes estudos sejam muito importantes, pois oferecem dados obtidos com protocolos não invasivos que podem ser aplicados mais facilmente na clínica, postula-se que a utilização de modelos animais pode subsidiar informações mais detalhadas e controladas que ajudarão na compreensão do papel do SNS na hiperalgesia durante a FM.

2.2. Papel SNS na regulação da hiperalgesia

Diversos estudos avaliando os mecanismos da regulação da dor endógena na FM geraram algumas informações sobre a função simpática nesta condição (MARTÍNEZ-LAVÍN, 2012, 2021; PETZKE; CLAUW, 2000). Um estudo piloto com 20 pacientes com FM, 20 pacientes com artrite reumatoide e 20 controles saudáveis comparou a dor evocada por noradrenalina entre esses grupos. Verificou-se que a resposta aumentada à dor foi de 80% dos pacientes com FM, 30% nos pacientes com artrite e 30% nos controles. Por isso, conclui-se que nos indivíduos com FM há dor evocada por noradrenalina, respaldando, assim, o princípio de que a FM pode ser uma síndrome com dor simpaticamente mediada ou simpaticamente mantida (MARTINEZ-LAVIN *et al.*, 2002). Estes dados foram corroborados por estudos genéticos que demonstraram correlação positiva entre a presença de polimorfismos no gene que codifica a enzima catecol-o-metiltransferase (COMT), responsável por degradar as catecolaminas, com a maior intensidade de dor em pacientes com FM (PARK *et al.*, 2016; VARGAS-ALARCÓN *et al.*, 2007). De fato, pacientes com polimorfismos no gene da COMT e tratados com propranolol, um bloqueador não seletivo dos β -AR, apresentaram melhora na percepção de dor (TCHIVILEVA *et al.*, 2010).

ZAMUNÉR *et al.* (2015) também demonstraram que a maior atividade simpática, mensurada pela atividade elétrica do nervo peroneal, foi diretamente relacionada com a intensidade de dor em indivíduos fibromiálgicos. Resultados experimentais obtidos por OLIVEIRA *et al.* (2012) indicaram que a presença da dor crônica generalizada estava associada a um aumento significativo na atividade simpática cardíaca em ratos submetidos a um modelo de fibromialgia através da administração intramuscular de salina ácida, sugerindo um aumento do risco de doenças cardiovasculares em pacientes com dor crônica, os quais corroboram dados obtidos em humanos (COHEN *et al.*, 2001).

Contudo, ao contrário do que boa parte da literatura tem reportado em relação a atividade simpática e a hiperalgesia desenvolvida, por exemplo, em indivíduos com FM, sabe-se que o SNS pode induzir analgesia através de pelo menos dois mecanismos diferentes. Um deles é exercido através de um controle tônico de projeções aferentes espinhais no corno dorsal da medula espinhal por vias descendentes originárias de neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos no tronco

cerebral (HODGE *et al.*, 1981; MILLAN, 2002), que parece não funcionar corretamente em indivíduos com FM (KOSEK; EKHOLM; HANSSON, 1996; KOSEK; HANSSON, 1997; LAUTENSCHLÄGER *et al.*, 2015). Um segundo mecanismo é o bloqueio da atividade de neurônios aferentes primários através da liberação de opioides endógenos (BINDER *et al.*, 2004).

Embora os mecanismos pelos quais o SNS modula as respostas nociceptivas estejam longe de serem totalmente compreendidos, CAXARIA *et al.* (2023) elegantemente demonstraram que o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica em um modelo animal de fibromialgia é dependente da migração de neutrófilos para o gânglio da raiz dorsal (DRG). Adicionalmente, neutrófilos expressam β 2-AR (BARNES, 1999; DE COUPADE *et al.*, 2004; JOHNSON, 2002) e a estimulação destes receptores foi capaz de atenuar a ativação e migração destes leucócitos (NICHOLLS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2016). Desta forma, uma vez que diferentes trabalhos reportaram que a atividade simpática é menor em pacientes com FM (GISKE *et al.*, 2008; KOSEK; KADETOFF, 2010; QIAO; VAERØY; MØRKRID, 1991; VAERØY *et al.*, 1989b), é possível que a menor estimulação dos β 2-AR possa permitir a migração dos neutrófilos para o DGR e ativação de neurônios sensoriais culminando na hiperalgesia observada nestes pacientes.

2.3. Papel SNS na regulação da massa muscular esquelética

Além da dor musculoesquelética crônica e difusa, diversos sinais clínicos são manifestados por indivíduos com FM, entre eles pode-se citar aqueles relacionados às alterações da função muscular, como por exemplo a fadiga e fraqueza que acometem este tecido (BONATERRA *et al.*, 2016; FAVERO *et al.*, 2019; KALYAN-RAMAN *et al.*, 1984; RUGGIERO; MANGANELLI; SANTORO, 2018; YUNUS *et al.*, 1986; YUNUS; KALYAN-RAMAN, 1989), fazendo com que a FM seja caracterizada como uma desordem de caráter musculoesquelética (LE GOFF, 2006). Não obstante, as alterações funcionais observadas em músculos de pacientes com FM, análises histológicas e ultraestruturais também demonstraram menor conteúdo de mitocôndrias, lesão miofibrilar, acumulação anormal de glicogênio e atrofia de fibras tipo II (KALYAN-RAMAN *et al.*, 1984; YUNUS *et al.*, 1986). Estes estudos clínicos foram suportados por estudos experimentais utilizando modelos animais de FM que

corroboraram a atrofia muscular descrita inicialmente (BONATERRA *et al.*, 2016; FAVERO *et al.*, 2017, 2019).

Enquanto os mediadores endógenos das alterações estruturais e funcionais musculoesqueléticas não foram descritos durante a FM, aventou-se neste estudo, que a atividade simpática alterada poderia contribuir, pelo menos parcialmente, para a atrofia muscular observada em pacientes fibromiálgicos. Esta hipótese é suportada nos diversos trabalhos que demonstraram que a atividade do SNS está aumentada (MARTÍNEZ-LAVÍN; HERMOSILLO, 2000; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2014; ZAMUNÉR *et al.*, 2015) ou mesmo diminuída (QIAO; VAERØY; MØRKRID, 1991; REYES DEL PASO; DE LA COBA, 2020; VAERØY *et al.*, 1989a) em indivíduos fibromiálgicos. Considerando que o SNS tem papel anabólico e anti-catabólico no metabolismo de proteínas musculares e desta forma é capaz de induzir hipertrofia ou diminuir a atrofia muscular (GONÇALVES *et al.*, 2012; NAVEGANTES *et al.*, 2000; RYALL; CHURCH; LYNCH, 2010; RYALL; LYNCH, 2008) é possível especular que enquanto o aumento na atividade simpática observada durante a FM possa atenuar a perda de massa muscular, a sua diminuição poderia facilitar a atrofia descrita nestes pacientes. No entanto, a contribuição do SNS na manutenção da plasticidade musculoesquelética durante a FM não é conhecida.

Grande parte do que se sabe sobre o efeito protetor do SNS na massa muscular vem de estudos utilizando agonistas de β 2-AR (GONÇALVES *et al.*, 2012; RYALL; LYNCH, 2008; SATO *et al.*, 2012; TONGE *et al.*, 2010), uma vez que estes são os receptores adrenérgicos mais expressos na musculatura esquelética (LYNCH; RYALL, 2008). A estimulação deste receptor culmina com a produção do segundo-mensageiro AMPc, com consequente ativação da PKA e inibição da proteólise muscular (GONÇALVES *et al.*, 2012; NAVEGANTES *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2014). De fato, diversos estudos têm demonstrado que o AMPc é capaz de inibir as proteólises Ca^{2+} -dependente (NAVEGANTES *et al.*, 2000), proteossomal (SILVEIRA *et al.*, 2014) e lisossomal (MACHADO *et al.*, 2019), provavelmente através de mecanismos dependentes da PKA ou mesmo, através de uma sinalização intracelular cruzada com a proteína quinase B (PKB ou AKT) (BAVIERA *et al.*, 2010).

GRAÇA *et al.* (2013) discutiram como a depleção de adrenalina pode agravar a proteólise durante o jejum em músculos esqueléticos de contração rápida. Neste trabalho, os autores demonstraram que a remoção bilateral da medula da adrenal

(ADM) aumentou a proteólise proteossomal e a expressão dos atrogenes, MurF1 e atrogina-1 em músculos extensores digital longo (EDL), sendo este efeito bloqueado pela incubação de músculos obtidos de animais ADM com adrenalina. Similarmente ao descrito em animais jejuados, BONATERRA *et al.* (2016) observaram que músculos de animais submetidos a um modelo de FM apresentaram atrofia e aumento da expressão de MuRF-1 e atrogina-1. Estes genes também estão elevados em músculos de animais senescentes corroborando a redução progressiva da força e da massa muscular secundária ao envelhecimento, isto é, sarcopenia (CLAVEL *et al.*, 2006) e podem, pelo menos parcialmente, justificar o desenvolvimento precoce de sarcopenia em paciente fibromiálgicos em relação aos controles saudáveis (KAPUCZINSKI *et al.*, 2022). Interessantemente, a atividade simpática está diminuída durante o envelhecimento (DELBONO, 2003; DELBONO *et al.*, 2021; RODRIGUES *et al.*, 2021) e o tratamento com agonistas β 2-adrenérgicos é capaz de prevenir a atrofia muscular desenvolvida durante a senescência (CONTE *et al.*, 2012; RYALL; SCHERTZER; LYNCH, 2007). Se o aparecimento precoce de sarcopenia em indivíduos com FM é decorrente da menor atividade simpática ainda é uma questão desconhecida e que merece atenção já que sendo ela importante para a manutenção da saúde muscular, poder-se-ia sugerir que a manipulação terapêutica do SNS seria uma estratégia promissora para prevenir e tratar a sarcopenia e outras condições que afetam a função e estrutura muscular durante a FM.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a participação do Sistema Nervoso Simpático na regulação da massa muscular e hiperalgesia mecânica em um modelo murino de fibromialgia induzido por meio da administração intramuscular de solução de salina ácida (pH 4,0).

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar as possíveis alterações nas concentrações plasmáticas e musculares de catecolaminas e na sinalização adrenérgica durante o desenvolvimento da hiperalgesia crônica muscular difusa através de um modelo murino de fibromialgia induzido por meio da administração intramuscular de solução de salina ácida (pH 4,0).
- Avaliar o efeito da administração de um agonista seletivo de β_2 -AR na hiperalgesia crônica difusa e na perda de massa muscular em um modelo murino de fibromialgia induzido por meio da administração intramuscular de solução de salina ácida (pH 4,0).
- Avaliar a participação de adrenalina no desenvolvimento da hiperalgesia crônica difusa e na perda de massa muscular em animais normais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

No presente estudo foram utilizadas ratas da linhagem *Wistar* com cerca de 50-60g de massa corpórea, cedidas pelo biotério da Universidade Federal de Sergipe. Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental (LANBAC), receberam ração balanceada (NUVILAB® CR1, Nuvital, Colombo, Brasil) para roedores e água *ad libitum*, em ambiente com ciclos claro-escuro de 12 horas (ciclo claro: 6h00 às 18h00), sob temperatura média de 25°C.

A realização dos experimentos ocorreu no período diurno. Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de deslocamento cervical ou por decapitação sem prévia anestesia, respeitando as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e tomando os devidos cuidados para minimizar desconforto e dor. Justifica-se a utilização desse método sem anestesia devido os vários sistemas que controlam o metabolismo de proteínas musculares, entre eles o SNS, serem inibidos durante a anestesia podendo produzir um resultado falso negativo (HALTER; PFLUG, 1980; WOOD, 1994).

Ademais, os animais que foram utilizados neste projeto tinham massa corporal inicial de 50-60g chegando a 100-120g no final do experimento, uma vez que a legislação permite tais procedimentos de eutanásia para animais de até 150g. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFS) registrados com o número 5673050522 (Anexo 1) seguindo as recomendações da Lei Arouca (Lei nº 11.794/2008).

4.1.1. Escolha dos animais

Levando em consideração que o procedimento de incubação exige músculos com pequena espessura para permitir a difusão adequada de metabólitos e oxigênio, a utilização de animais juvenis é extremamente necessária já que nos experimentos *ex vivo* os músculos necessitam ser aerados com uma mistura de O₂ e CO₂. Por isso, a utilização de músculos obtidos de animais com porte maior prejudicaria a difusão dos gases e dos nutrientes incluídos no meio de incubação (BAVIERA *et al.*, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2012). A utilização de animais fêmeas para a realização desta pesquisa fundamenta-se na prevalência mundial da doença ser em indivíduos do sexo

feminino (CAKIRBAY *et al.*, 2006; GRANADOS *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2017). Além disso, vale destacar que as fêmeas utilizadas eram pré-púberes, a fim de evitar que a oscilação hormonal do ciclo estral pudesse causar alguma interferência no estudo.

Além disso, utilizou-se músculos *soleus* nas análises descritas abaixo, uma vez que experimentos pilotos conduzidos no LANBAC desta Universidade, apontaram que este tipo muscular apresenta atrofia após sete dias de indução da FM.

4.2. Modelos Experimentais

4.2.1. Hiperalgisia Crônica Difusa

Em estudos anteriores de indução de hiperalgisia crônica difusa o volume de injeção intramuscular de salina ácida foi de 20 μ L em camundongos (SHARMA *et al.*, 2009) e 100 μ L em ratos (SLUKA; KALRA; MOORE, 2001). Considerando que os animais aqui utilizados foram menores, realizou-se experimento preliminar com corante azul de bromofenol para determinar o volume máximo de fluido que poderia ser injetado no músculo gastrocnêmio de uma rata jovem e permanecer contido no tecido muscular. A partir de então, ao observar que o volume de 100 μ L provocou extravasamento de líquido no músculo, utilizou-se 50 μ L de salina ácida para indução do modelo murino de fibromialgia.

Antes da primeira injeção para indução de FM, os animais foram previamente anestesiados com isoflurano por via inalatória e receberam 50 μ L de solução ácida de NaCl 0,9% (pH 4,0) administrada unilateralmente no músculo gastrocnêmio da pata esquerda no dia 0 e no dia 05. Vale destacar que em estudos anteriores mostrou-se que injeções de salina ácida separadas por 2 a 5 dias são suficientes para reduzir bilateralmente o limiar mecânico de retirada da pata traseira por até 4 semanas e assim produzindo uma hiperalgisia generalizada e de longa duração cujas características assemelham-se a indivíduos com fibromialgia (DESANTANA; DA CRUZ; SLUKA, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012; SLUKA; CLAUW, 2016). Já os animais do grupo controle receberam injeção intramuscular unilateral de solução NaCl 0,9% com pH neutro no músculo gastrocnêmio da pata esquerda em ambos os tempos. A administração da injeção ocorreu sempre no período matutino.

De forma semelhante, um segundo protocolo de indução de hiperalgisia mecânica foi executado, no entanto, ao invés da injeção de salina ácida, 50 μ L de uma

solução a 3% de λ -carragenina (Sigma-Aldrich, código 22049) diluída em salina fisiológica foi injetada unilateralmente no músculo gastrocnêmio esquerdo nos dias 0 e 5 (CAXARIA *et al.*, 2023). Os animais do grupo controle receberam volumes iguais de solução de NaCl 0,9%.

4.2.2. Tratamento com Clembuterol

Os animais foram alocados em grupos Controle e FM e após 4 dias de indução da hiperalgesia, estes grupos foram subdivididos em tratados com salina ou tratados com clembuterol (CB; $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, s.c.), já que experimentos prévios conduzidos no LANBAC demonstraram que após 3 dias de indução da FM ainda não há perda de massa muscular, porém a hiperalgesia mecânica já estava estabelecida. O CB é um agonista seletivo de β 2-AR e foi utilizado uma vez que estes representam os receptores adrenérgicos mais expressos na musculatura esquelética (JENSEN *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 1991; LYNCH; RYALL, 2008), ademais esta dose de CB demonstrou inibir a degradação proteica muscular em animais jejuados (GONÇALVES *et al.*, 2009) e desnervados (GONÇALVES *et al.*, 2012). Os animais do grupo controle foram tratados com salina fisiológica também por via subcutânea com volume similar aos animais tratados com CB pelo mesmo período após indução da FM. A realização do tratamento ocorreu sempre no período matutino. Após 30 minutos da última injeção de salina ou CB, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e no 12º foram submetidos à eutanásia para coleta dos músculos para avaliação da proteólise total e sinalização adrenérgica.

4.2.3. Cirurgia de Adrenodemedulação

A cirurgia de ADM, ou seja, remoção bilateral da medula das glândulas adrenais, foi realizada 07 dias antes dos experimentos *ex vivo* e comportamentais. Para isso, no dia da cirurgia as ratas foram anestesiadas com uma mistura de quetamina, $85\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e xilazina, $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p. Após a realização da tricotomia no dorso dos animais, foram feitas duas incisões paralelas à coluna vertebral imediatamente abaixo da última costela. Após a visualização das glândulas adrenais, estas foram pinçadas pela gordura perirrenal e levemente cortadas com auxílio de uma pequena lâmina de bisturi. Em seguida, as glândulas foram suavemente pressionadas com auxílio de uma pinça pequena e somente a medula foi removida

para então, a glândula ser devolvida à cavidade abdominal. Ao final da cirurgia, os animais foram suturados com fio de nylon 4-0 e foi realizada a limpeza da ferida operatória com álcool iodado para prevenir infecções secundárias (GRAÇA *et al.*, 2013; MANFREDI *et al.*, 2019).

De forma semelhante, os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento, à exceção da remoção da medula das glândulas adrenais. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram tratados por via intramuscular com o analgésico não opioide, flunexim-meglumine ($2,5\text{mg.kg}^{-1}$) e acompanhados nos dias subsequentes. Os animais foram deixados para se recuperar da anestesia durante 1 hora antes de serem devolvidos ao seu ambiente normal.

4.3. Avaliações comportamentais

4.3.1. Limiar Mecânico de retirada da pata

Inicialmente, os animais foram adequadamente aclimatados nos aparelhos de avaliação do limiar de retirada da pata (que corresponde a hiperalgesia mecânica) durante 3 dias por 30 minutos, no ambiente da experimentação. Passado esse período, antes de realizar a primeira injeção de salina ácida, foi realizada a mensuração dos valores basais de hiperalgesia mecânica, através do teste utilizando o analgesímetro digital (Von Frey, Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), que consiste em um transdutor de pressão adaptado por meio de um cabo a um contador digital com capacidade do transdutor de 0,1 a 1000g que registra a pressão (grama/força) aplicada pelo experimentador, que não tinha conhecimento sobre o tratamento que cada animal havia sido submetido. Na manhã da avaliação comportamental, os animais foram alocados em caixas transparentes sobre uma superfície de metal vasada, a ponta do transdutor foi encostada na superfície plantar da pata traseira do animal até que ele realizasse o movimento de retirada da pata mediante o estímulo mecânico (DESANTANA; DA CRUZ; SLUKA, 2013; GOPALKRISHNAN; SLUKA, 2000; SOUSA *et al.*, 2015).

Para realização da avaliação, o estímulo foi aplicado por 5 vezes em ambas as patas traseiras de cada animal até que ele realizasse o movimento de retirada da pata. As avaliações transcorreram nos dias 0, 5, 6 e 12 (após 7 dias da indução) (SLUKA *et al.*, 1999). A **Figura 1** ilustra o analgesímetro digital e as caixas onde os animais foram mantidos durante as avaliações similares aqueles usados neste trabalho.



Figura 1. Aparelho analgesímetro digital utilizado na mensuração do limiar mecânico de retirada da pata. Disponível em: <https://www.insightltda.com.br/produto/eff-302-analgesimetro-digital-von-frey-acessorios/>. Acesso: 17/05/2023 às 12h52.

4.3.2. Coordenação motora

A coordenação motora das ratas foi avaliada por meio do RotaRod (AVS®, São Carlos, SP, Brasil), conforme apresentado na **Figura 2**. O equipamento utilizado para medir estas variáveis é motorizado, utilizando aceleração progressiva, variante de 0 a 50 rotações por minuto (rpm). O aparelho utilizado avalia a capacidade de um animal equilibrar-se sobre uma haste rotativa, pois à medida em que a velocidade aumenta, torna-se mais difícil manter-se em equilíbrio. Sendo assim, o período de latência para cair da haste rotativa é usado como indicativo de coordenação motora e de equilíbrio (CARTER; MORTON; DUNNETT, 2001).

Primeiramente, os animais foram aclimatados durante três dias seguidos com o aparelho a 0 e 5 rpm (CARTER; MORTON; DUNNETT, 2001). As avaliações ocorreram nos dias 0 (antes da indução do modelo de hiperalgesia), 6 (24h após a segunda injeção de salina ácida) e 12 (7 dias após a segunda injeção de salina ácida). Nos dias em que aconteceram as avaliações, os animais foram submetidos ao RotaRod em funcionamento, a uma velocidade constante de 10 rpm registrando-se o tempo máximo que cada animal se manteve sobre o equipamento; sendo que, após o animal cair do equipamento, por desequilíbrio ou qualquer outro fator, esperava-se,

peelo menos 1 minutos para que ele fosse recolocado até cinco vezes no aparelho e o maior tempo de permanência foi considerado.



Figura 2. Aparelho RotaRod digital utilizado na mensuração da coordenação motora. Disponível em: <https://www.avsprojetos.com.br/product-page/rotarod>. Acesso: 17/05/2023 às 12h52.

4.3.3. Força muscular

Para avaliar a força muscular foi realizado o teste por meio do *Grip Strenght Meter* (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), conforme observado na **Figura 3**. O equipamento possui um sensor de força com capacidade de até 5 Kg de força de tração com grade de aço-inox acoplada. No momento da avaliação, o animal foi posicionado pelo avaliador de forma que as patas traseiras do animal permaneceram em contato com a grade do aparelho, na qual o animal segurou-a naturalmente enquanto sua cauda foi suavemente puxada para trás na direção do examinador. Nesta avaliação, as patas dianteiras eram mantidas suspensas pelo examinador. A força máxima da preensão antes da liberação da preensão foi registrada sendo cada sessão composta por 5 tentativas. Por consequência, o sensor efetuava a mediação da força em (g) que o animal exerceu ao agarrar a grade com as patas traseiras. Foram realizadas cinco mensurações em cada animal e obtida a sua média em função da massa corporal do animal (RUIZ *et al.*, 2022; SLUKA; KALRA; MOORE, 2001; WANG *et al.*, 2008).



Figura 3. Aparelho *Grip Strength Meter* utilizado na mensuração da força muscular. Disponível em: <https://www.insightltda.com.br/produto/eff-305-grip-strenght-meter-ratos-e-camundongos/>. Acesso: 17/05/2023 às 13h08.

4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa

O RNA das amostras foi extraído pelo método do Trizol™ (TRizol™ Reagent, código 15596018; Invitrogen, EUA) e quantificado por densidade óptica em espectrofotômetro (260nm). Após tratamento de 1µg de RNA total com DNase (Amplification Grade, código 18068015, Invitrogen, EUA), o cDNA foi sintetizado utilizando o kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, código 4368813, Applied Biosystems, EUA) em um volume de 10µL contendo 1µL MultiScribe™ Reverse Transcriptase (RT), 2µL de do tampão da RT, 0,8µL de dNTP Mix (100 mM), 2µL de RT Random Primers e 4,2µL H₂O autoclavada. Posteriormente, as amostras foram aquecidas à 25°C por 10 minutos, então à 37°C por 120 minutos e por fim, a 85°C por 5 minutos. Os cDNAs foram posteriormente submetidos ao PCR em tempo real utilizando-se o kit Power SYBR™ Green PCR Master Mix (nº 4367659, Applied Biosystems, EUA) com sequências de primers específicos conforme especificado na **Tabela 1**. Os resultados foram adquiridos em sistema de detecção CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, EUA) com os seguintes parâmetros: 95°C (10 minutos), seguido de 40 ciclos de 95°C (15 segundos) e 60°C (1 minuto), seguido pelo ciclo de dissociação para verificação de um produto através de análise pela curva *melting*. Para a análise do RNAm, o nível relativo da expressão do gene foi calculado em referência à expressão do Rpl39 na amostra, utilizando-se o método do ciclo *threshold* (Ct).

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados no estudo.

Primers	Sequência
β 2-AR (Receptor β 2-adrenérgico)	Forward: CAGGCCTATGCTATCGCTTC Reverse: TGCCCTCGGATTTGTCTATC
PKAc (subunidade catalítica α da PKA)	Forward: AATGGGAGACCCCTTCTCAG Reverse: TCCCACTTTCCTTGTGCTTC
AC 7 (Adenilato ciclase, isoforma 7)	Forward: TGGCTCTCTATGTGCTGGTG Reverse: TCTCCAAGGAGTCCCACATC
AC 9 (Adenilato ciclase, isoforma 9)	Forward: TGGGATCCATCTGTTTGTCA Reverse: CCTCTCCTTCAGGGCTTTCT
SIK-1 (Quinase induzida por sal do tipo 1)	Forward: TGCTCCAGTTACAGCACCAC Reverse: AGTGGGATTCCAGACACGAG
Rpl39 (Proteína ribossomal L39)	Forward: CAAAATCGCCCTATTCCTCA Reverse: AGACCCAGCTTCGTTCTCCT

4.5. Extração, dosagem e análise do conteúdo proteico através de *Western blotting*

Previamente, os músculos foram coletados e homogeneizados no *TissueLyser* II por 3 minutos a uma frequência de 25 agitações/s em tampão RIPA (Tampão para ensaio de radioimunoprecipitação) contendo inibidores de proteases ($5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de aprotinina, $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de leupeptina e 1mM de PMSF) e de fosfatases (10,09 mM de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 100 mM de NaF; 10,28 mM de Na_3VO_4). O homogenato foi centrifugado a 15.000 rpm à 4°C, e o sobrenadante foi separado e diluído 200X em água Milli-Q para a dosagem de proteínas por meio do método de LOWRY *et al.* (1951). Posteriormente, uma alíquota do sobrenadante foi diluída em volume igual de tampão Laemmli (125mM de Tris, 4% de dodecil sulfato de sódio, 20% de glicerol, 100mM de ditiotreitol e 3mg de azul de bromofenol, pH 6,8), aquecida à 70°C por 5 minutos e submetidos a eletroforese em gel de SDS-PAGE. A eletro-transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (poro de 0,45 μm , código SC- 3724, Santa Cruz Biotechnology, EUA) foi realizada a 400mA em sistema de transferência semi-seco por 30min. Após o bloqueio com leite desnatado 5%, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos e posteriormente com anticorpo

secundário conjugado com peroxidase (HRP), conforme apresentado na **Tabela 2**. Em seguida, as membranas foram lavadas em solução TBST (20 mM Tris + 160 mM NaCl e 0,1% Tween 20) para remover o excesso de anticorpo secundário. A revelação foi realizada após incubação das membranas com reagente amplificador de quimioluminescência (Tris 1 M, pH 8,5; 250 mM de luminol; 90 mM de ácido p-coumárico; 0,3% peróxido de hidrogênio) no aparelho iBright Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A análise quantitativa dos *blots* foi realizada através de quantificação da intensidade das bandas através de densitometria por meio do *software* iBright Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, EUA). Logo após serem quantificados, os valores foram corrigidos pela densitometria da β -actina, proteína utilizada como controle de carregamento. Seguidamente, os resultados foram comparados com os respectivos grupos controles.

Tabela 2. Anticorpos primário e secundários utilizados no estudo.

Anticorpo	Código – Marca	Diluição
β 2 Adrenergic Receptor antibody	ab69598 – Abcam	1:500
Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrate	#9621 - Cell Signaling	1:1000
Phospho-HSL (Ser660)	#45804 - Cell Signaling	1:1000
pSer133-CREB	#9198 - Cell Signaling	1:500
Total CREB	#9197 - Cell Signaling	1:1000
β Actin Anticorpo (C-2)	sc-8432 - Santa Cruz	1:1000
Goat anti-Mouse Secondary Antibody	31430 – Invitrogen	1:3000
Goat anti-Rabbit Secondary Antibody	31460 – Invitrogen	1:2000

4.6. Procedimentos experimentais para análise da proteólise em músculos esqueléticos de ratas

A preparação de músculos isolados dos animais foi utilizada para avaliar o metabolismo de proteínas *ex vivo*. Na manhã do experimento, os animais foram pesados e eutanasiados por deslocamento cervical ou decapitação coletando-se cuidadosamente os músculos soleus. Posteriormente, os músculos foram pesados em balança eletrônica digital, fixados por meio dos seus tendões em suportes de alumínio, mantendo-os no comprimento aproximado de repouso, incubados em tampão Krebs Ringer bicarbonato (0,120M de NaCl; 0,015M de NaHCO₃; 4,828mM de KCl; 1,2mM

de MgSO₄; 1,212mM de KH₂PO₄; 2,4mM de CaCl₂ - pH 7,4) e aerados com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂). Estas condições permitem que todas as fibras musculares estejam na mesma condição nutricional, evitando-se o comprometimento das fibras musculares centrais. Esta preparação garante a manutenção dos níveis intracelulares de ATP, fosfocreatina e glicogênio, reproduzindo *ex vivo* o estado energético *in vivo* do músculo, tornando este ensaio viável por até 9 horas de incubação para o estudo do metabolismo proteico (COSTA *et al.*, 2021; KETTELHUT; WING; GOLDBERG, 1988).

Os músculos foram incubados por 1 hora em banho-maria à 37°C (pré-incubação), sob agitação constante, a fim de estabelecer o equilíbrio da velocidade de liberação da tirosina para o meio de incubação. Após a pré-incubação, os meios foram renovados e incubados com o mesmo meio por 2 horas. Após o período de incubação, 1mL do meio foi coletado e adicionado a 0,25mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% para a determinação da tirosina liberada. A degradação de proteínas musculares *ex vivo* foi estimada pela liberação de tirosina no meio de incubação na presença de ciclohexamida, um inibidor de síntese proteica. Este aminoácido é usado como referência para avaliação do metabolismo de proteínas, uma vez que não é metabolizado e nem sintetizado novamente pela célula muscular, além de ser facilmente dosado e com grande sensibilidade pelo método fluorimétrico (WAALKES; UDENFRIEND, 1957). De tal modo que a concentração de tirosina presente no meio de incubação reflete diretamente a velocidade de degradação de proteínas totais pela célula muscular esquelética.

4.7. Determinação do conteúdo de catecolaminas plasmática e muscular

No dia da coleta dos músculos, os animais foram eutanasiados por decapitação e o sangue foi coletado em tubos heparinizados. Logo após, o sangue foi centrifugado para obtenção do plasma. Enquanto os músculos foram imediatamente congelados a -80°C, 50mg de Na₂S₂O₅ foi adicionado a 500μL do plasma para posterior armazenamento à -80°C. Posteriormente, as amostras foram processadas para dosagem de catecolaminas através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo Shimadzu equipado com uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS II (Sigma-Aldrich, Alemanha), acoplado a um detector

eletroquímico modelo L-ESD-6A e a um polígrafo modelo C-R5A (GAROFALO *et al.*, 1996; KHAN *et al.*, 2016).

4.8. Delineamento experimental

4.8.1. Caracterização da sinalização adrenérgica em modelo de FM em ratas.

Primeiro, para confirmar a validação do modelo de hiperalgesia crônica difusa através da injeção intramuscular dupla unilateral de 50µL de solução de salina ácida, foram formados dois grupos: Controle e Fibromialgia que receberam salina fisiológica neutra (Controle) e ácida (FM), respectivamente. Assim, no dia 0 os animais foram submetidos às análises comportamentais para confirmar a ausência de hiperalgesia endógena e posteriormente tratados com salina neutra e ácida. Este mesmo protocolo foi repetido no dia 05. Vinte e quatro horas após a segunda injeção de salina, os testes comportamentais foram novamente realizados para confirmar a instalação do modelo. Após sete dias da segunda injeção de salina, as análises comportamentais foram realizadas (hiperalgesia mecânica, força e coordenação motora) e posteriormente os animais foram submetidos à eutanásia para coleta do plasma (dosagem de adrenalina) e dos músculos *soleus* ipsilateral (dosagem de noradrenalina) e contralateral (avaliação da sinalização adrenérgica por meio de RT-PCR). Posteriormente, este experimento foi repetido e os músculos *soleus* de ambas as patas foram coletados para avaliação da proteólise total (ipsilateral) e da sinalização adrenérgica por meio do *western blotting* (contralateral). Representação da linha temporal experimental está apresentada na **Figura 4**.

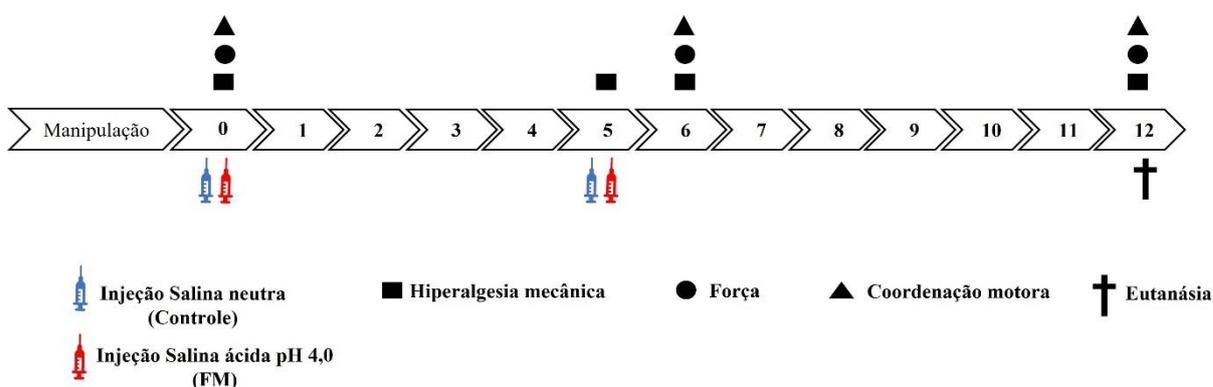


Figura 4. Representação temporal do modelo de hiperalgesia mecânica através da dupla injeção intramuscular unilateral de 50µL de solução NaCl 0,9% (pH 4,0) em ratas.

4.8.2. Efeito da estimulação β 2-adrenérgica na regulação da hiperalgesia e massa muscular em um modelo de FM em ratas.

Após a confirmação que protocolo de FM adaptado neste estudo induziu hiperalgesia difusa e crônica e adicionalmente, a perda de massa muscular, um novo experimento foi realizado de forma similar ao descrito anteriormente. No entanto, após quatro dias de indução da FM, isto é, no dia 9, os grupos controle e FM foram subdivididos e tratados com salina ou CB ($3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, sc) até um dia antes da eutanásia. É importante mencionar que experimentos prévios realizados no LANBAC demonstraram que até 3 dias de FM não há perda de massa muscular, por isso, o tratamento com CB foi iniciado após este tempo (dados não publicados). Desta forma, foram formados 4 grupos: Controle (sem indução da hiperalgesia e tratado com salina por via s.c.); FM (com indução da hiperalgesia e tratado com salina por via s.c.); CB (sem indução da hiperalgesia e tratado com CB por via s.c.) e FM+CB (com indução da hiperalgesia e tratado com CB por via s.c.). Então, no 12º dia, foram realizadas as análises comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia e os músculos *soleus* ipsilateral (proteólise total) e contralateral (*western blotting*) foram coletados. Representação da linha temporal experimental está apresentada na **Figura 5**.

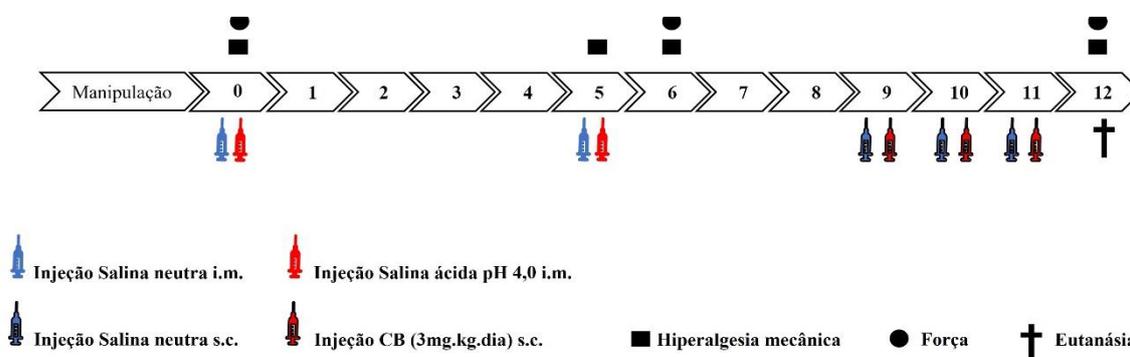


Figura 5. Representação temporal do efeito do Clembuterol (CB, $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$; s.c.) na hiperalgesia mecânica e perda de massa muscular induzida pela dupla injeção intramuscular unilateral de $50\mu\text{L}$ de solução NaCl 0,9% (pH 4,0) em ratas.

4.8.3. Caracterização da nocicepção, do metabolismo proteico muscular e liberação de catecolaminas em um modelo de hiperalgesia induzido pela injeção intramuscular de carragenina.

Para avaliar se as possíveis alterações autonômicas decorrentes da administração intramuscular de salina ácida são específicas deste modelo de FM ou se são características do desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, um segundo protocolo foi utilizado. Similarmente ao modelo da salina ácida, os animais foram aclimatados no laboratório e nos aparelhos para avaliações comportamentais por pelo menos três dias. No dia 0 foram então realizados os testes de hiperalgesia mecânica (limiar de retirada da pata), de força (*grip test*) e de coordenação motora (rotarod) e posteriormente os animais foram divididos em dois grupos: i) Controle, que recebeu uma injeção no músculo gastrocnêmio esquerdo de 50µL da solução de NaCl 0,9% e ii) Carragenina, onde a λ-carragenina (3%, diluída em solução de NaCl 0,9%) foi injetada no mesmo local e no mesmo volume nestes animais, conforme protocolo adaptado de (CAXARIA *et al.*, 2023; RADHAKRISHNAN; MOORE; SLUKA, 2003). No dia 5, novamente os animais foram submetidos aos testes comportamentais e em sequência, receberam a segunda injeção intramuscular de 50µL de NaCl 0,9% (Controle) ou 3% de λ-carragenina (Carragenina). No dia 6, a hiperalgesia foi confirmada e os animais foram acompanhados até o 12º, quando realizaram as análises comportamentais para em sequência serem submetidos à eutanásia para coleta dos músculos *soleus* ipsilateral (proteólise) e contralateral (dosagem de noradrenalina) e o plasma (dosagem de adrenalina). Um resumo deste protocolo está apresentado na **Figura 6**.

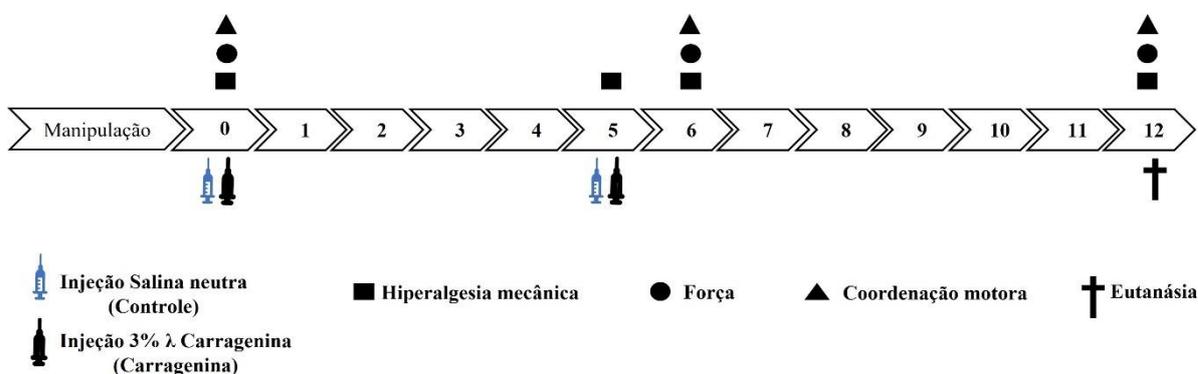


Figura 6. Representação temporal do modelo de hiperalgesia mecânica através da dupla injeção intramuscular unilateral de 50µL de solução 3% de λ-Carragenina diluída em NaCl 0,9% em ratas.

4.8.4. Avaliação da participação da adrenalina circulante no controle da hiperalgesia e massa muscular de ratas.

Previamente os animais foram aclimatados por três dias com o analgesímetro digital e então no dia 0 a hiperalgesia mecânica foi avaliada e posteriormente, sob condições basais, os animais foram divididos em dois grupos: Controle (ou falso-operado, isto é, SHAM) e um grupo ADM (remoção bilateral da medula da adrenal). Após recuperação da cirurgia, os animais foram alocados em suas respectivas caixas e acompanhados até o 7º dia para novamente serem submetidos ao teste de Von Frey e em seguida, à eutanásia para coleta dos músculos *soleus* para avaliação da proteólise total conforme apresentado na **Figura 7**.

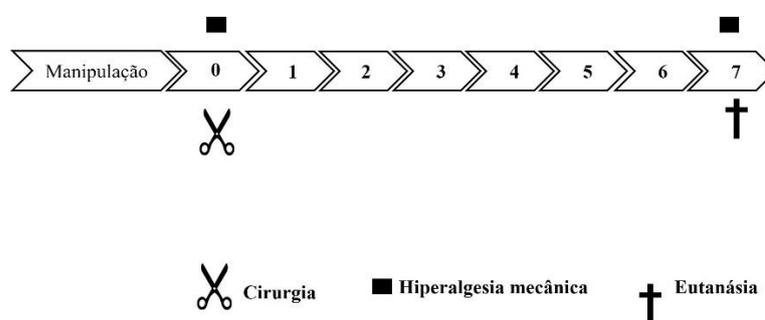


Figura 7. Representação temporal da avaliação da participação da adrenalina circulante na regulação da hiperalgesia mecânica e massa muscular em ratas mantidas em condições basais.

4.9. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, os resultados foram submetidos ao teste *t* de *Student* ou à análise de variância (ANOVA) de duas vias (fator 1= Fibromialgia ou adrenodemedulação, fator 2: Tempo ou tratamento com CB) seguido de pós teste de Bonferroni, quando necessário. O nível de significância aceito foi de 5% (i.e., $p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da sinalização adrenérgica em modelo de FM em ratas.

Para validar o modelo de indução de FM através da injeção intramuscular de salina ácida, inicialmente foi avaliado o limiar de retirada da pata ipsilateral e contralateral das ratas até o 12º dia de experimento. Conforme pode ser observado na **Figura 8a**, houve redução no limiar de retirada da pata de aproximadamente 39% e 47% um (dia 6) e sete (dia 12) dias, respectivamente, após a segunda injeção de salina ácida em relação aos animais do grupo Controle na pata ipsilateral. Resultados similares foram observados na pata contralateral (**Figura 8b**), confirmando o caráter difuso da dor descrita inicialmente neste modelo. Adicionalmente, o grupo FM apresentou redução da força avaliada pelo *Grip strenght test* somente no 12º dia de experimento (~34% vs. Controle, **Figura 8c**), no entanto, não houve diferença entre os grupos no teste de coordenação motora em nenhum dos tempos avaliados (**Figura 8d**). A redução da força exercida pelas patas posteriores foi associada com diminuição da massa dos músculos *soleus* (~8% vs. Controle, **Figura 8e**), que pode ser justificada, pelo menos parcialmente, pelo aumento na taxa de degradação proteica total neste tecido (~36% vs. Controle, **Figura 8f**).

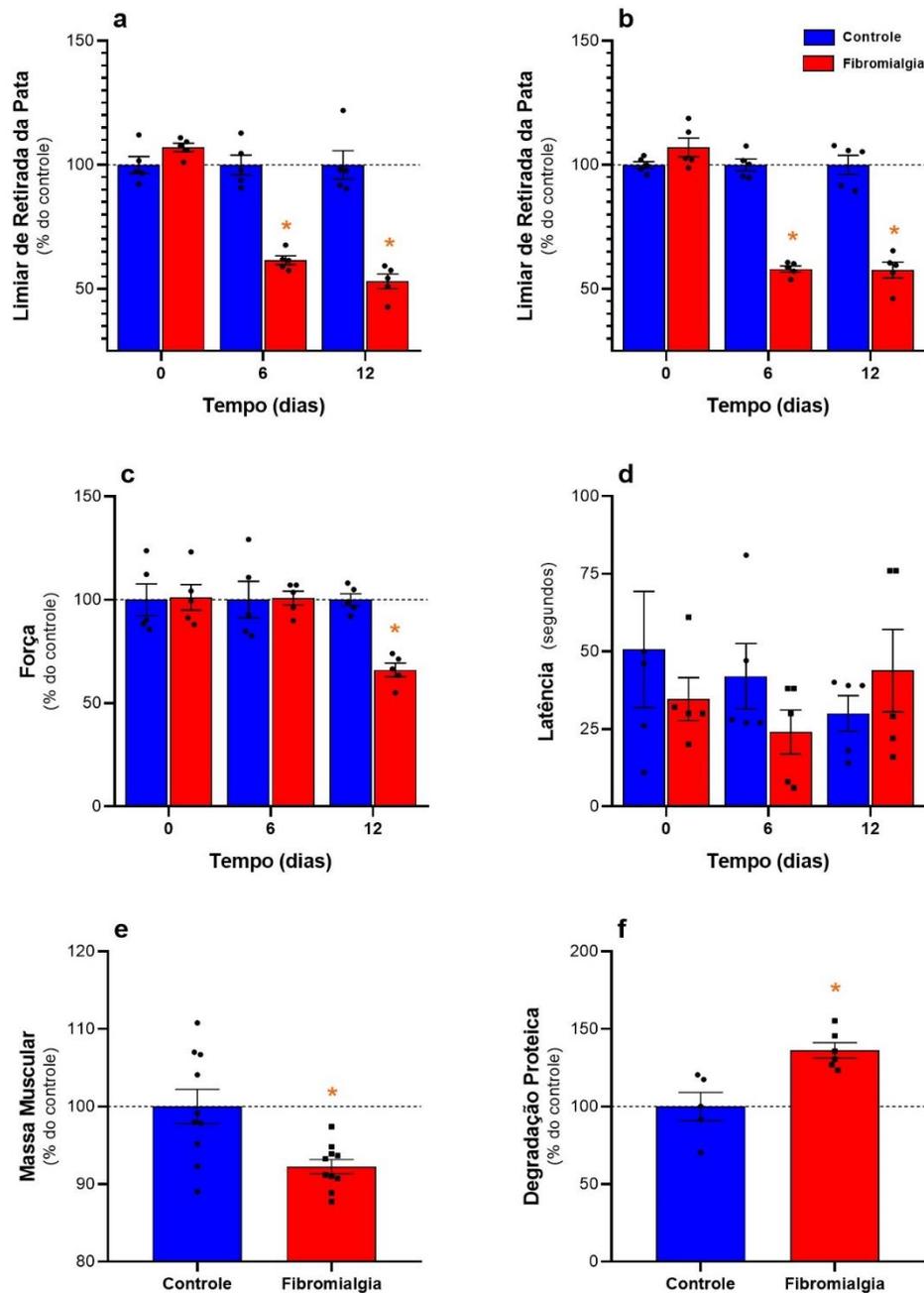


Figura 8. Efeito da dupla injeção intramuscular de salina ácida no desenvolvimento de hiperalgesia mecânica difusa na pata ipsilateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **a**) e contralateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **b**), na força (em $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **c**), coordenação motora (em segundos, em **d**), massa muscular (em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **e**) e na degradação proteica (em nmol de tirosina. mg músculo $^{-1}\cdot 2\text{h}^{-1}$ e convertida a 100% do Controle, em **f**) de músculos *soleus* de ratas. Em **e**, foram contabilizados os valores dos músculos ipsilateral e contralateral. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. De **a-d**, os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) de duas vias com os fatores fibromialgia e tempo e posteriormente submetidos ao teste de Bonferroni. Em **e-f**, os dados foram analisados através de teste *t* de Student. * $p < 0,05$ vs. Controle ($n=5$ / grupo).

Após a validação do modelo de hiperalgesia e da perda de massa muscular, o plasma e músculos *soleus* dos animais foram coletados para avaliação do conteúdo de catecolaminas através da técnica de CLAE e da sinalização adrenérgica. Os resultados demonstraram que o grupo FM apresentou redução de aproximadamente 33% na concentração plasmática de adrenalina ($11,584 \pm 2,023 \text{ ng.mL}^{-1}$ vs. $17,428 \pm 0,874 \text{ ng.mL}^{-1}$, n=5-6/ grupo) e de ~32% de noradrenalina muscular ($55,708 \pm 5,098 \text{ ng.g}^{-1}$ vs. $82,247 \pm 6,459 \text{ ng.g}^{-1}$, n=5-6/ grupo) em relação ao grupo Controle (**Figura 9a-b**). Posteriormente, a sinalização adrenérgica foi avaliada por meio da quantificação do conteúdo de RNAm dos genes que codificam o $\beta 2\text{-ar}$, a subunidade catalítica α da PKA (*cPka*), das isoformas 7 e 9 da adenilato ciclase (*Ac*) e de um dos alvos-diretos de CREB, isto é, quinase induzida por sal do tipo 1 (*Sik-1*). Os resultados apresentados na **Figura 9c** indicam não haver diferença na expressão em nenhum dos genes avaliados entres os grupos Controle e FM. No entanto, o conteúdo das proteínas fosforiladas pela PKA foi diminuído pela FM (~22% vs. Controle), sendo este resultado confirmado pela quantificação do conteúdo da lipase hormônio sensível (HSL) em um sítio de fosforilação específico da PKA, isto é, Serina⁶⁶⁰, que apresentou redução também de aproximadamente ~22% vs. Controle e do conteúdo de p^{Ser133}-CREB (~26% vs. Controle), embora a expressão proteica do $\beta 2\text{-AR}$ não tenha sido alterada entre os grupos (**Figura 9d-e**).

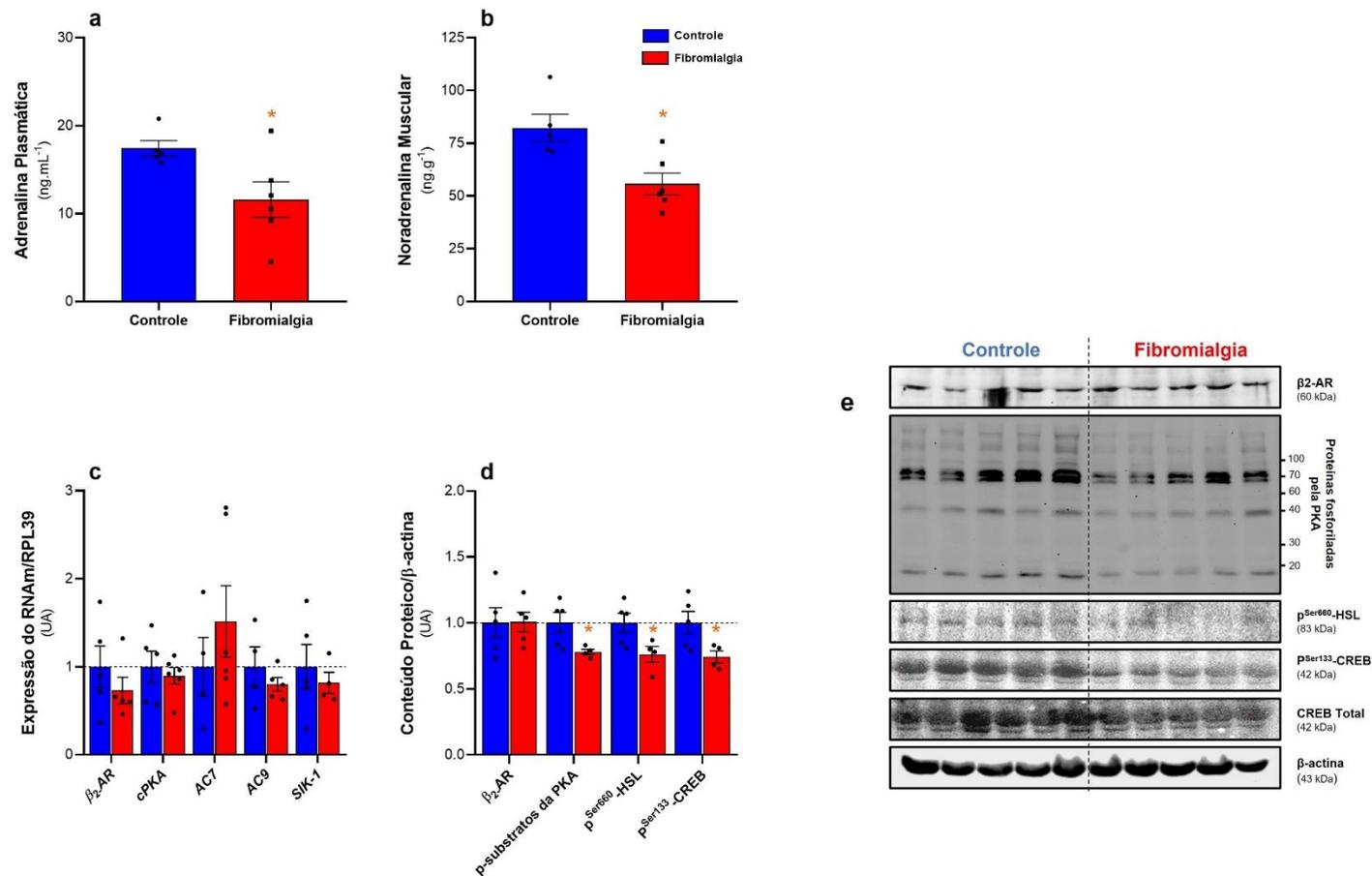


Figura 9. Efeito da indução da hiperalgesia muscular crônica difusa na concentração plasmática de adrenalina (em ng.mL⁻¹; n=5-6/ grupo; em **a**), no conteúdo de noradrenalina (em ng.g músculo; n=5-6, em **b**), na expressão gênica do β_2 -receptor adrenérgico (β_2 -AR), da subunidade catalítica α da proteína quinase A (PKA), das isoformas 7 e 9 da adenilato ciclase (AC) e da quinase induzida por sal do tipo 1 (SIK-1) (n=4-5/ grupo, em **c**) e no conteúdo proteico do β_2 -AR, dos substratos fosforilados pela PKA, da p^{Ser660}-Lipase hormônio sensível (HSL) e de p^{Ser133}- proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB), (n=4-5/ grupo, em **d**) em músculos *soleus* de animais normais e submetidos ao modelo de fibromialgia. Em **e**, imagens representativas dos *blottings*. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos ao teste *t* de *Student*. *p<0,05 vs. Controle.

5.2. Efeito da estimulação β 2-adrenérgica na regulação da hiperalgesia e massa muscular em um modelo de FM em ratas.

Como esperado, os animais do grupo FM apresentaram redução de aproximadamente 33% e 41% no limiar de retirada da pata ipsilateral em relação aos Controles, após 1 (dia 6) e 7 dias (dia 12) de indução da hiperalgesia muscular, respectivamente (**Figura 10a**). Interessantemente, o tratamento com CB que foi iniciado após o dia 8, atenuou este processo em cerca de ~17% em relação ao grupo FM. Resultados similares foram observados na pata contralateral (**Figura 10b**) e na avaliação da força executada pelos membros posteriores (**Figura 10c**).

Enquanto o tratamento com CB em animais normais não produziu qualquer alteração na hiperalgesia mecânica ipsilateral e contralateral, houve elevação na força de aproximadamente 52% (**Figura 10c**) que foi associado a um aumento na massa muscular de ~27% (**Figura 10d**) e diminuição da degradação proteica (~12%; $p=0,0772$; **Figura 10e**) em relação ao grupo Controle. Por outro lado, o tratamento com CB em animais FM atenuou a perda de força em ~30% e completamente aboliu a perda de massa e a elevação na proteólise em músculos *soleus* em relação ao grupo FM.

Os resultados descritos acima, foram associados com redução da sinalização adrenérgica avaliada pela diminuição no conteúdo de substratos fosforilados pela PKA (~22%), de p^{Ser660} -HSL (~49%) e de p^{Ser133} -CREB (~18%) nos animais com FM em relação ao Grupo Controle. Adicionalmente, o tratamento com CB reestabeleceu a sinalização adrenérgica nos animais com FM (**Figura 10f-g**).

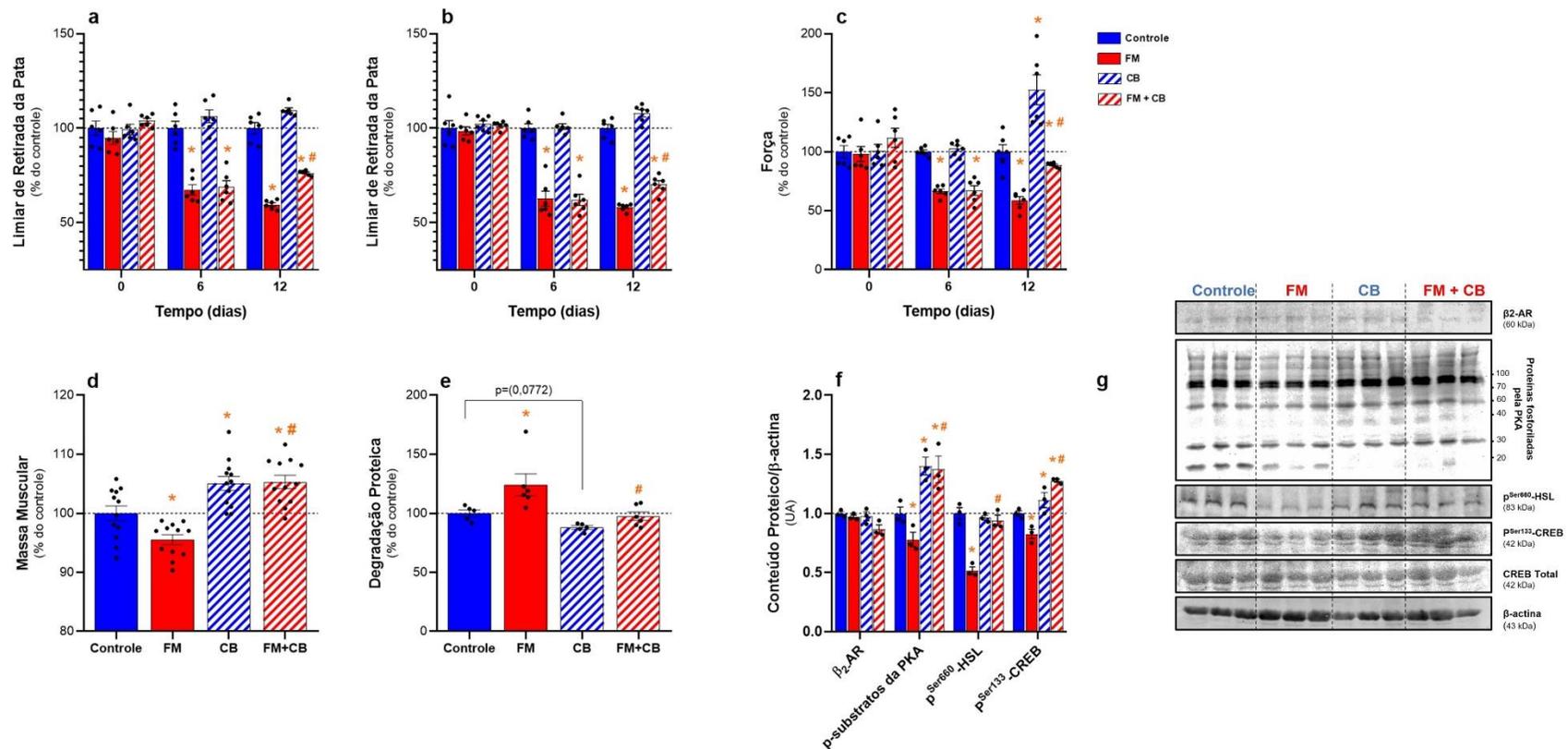


Figura 10. Efeito do tratamento com clenbuterol (CB, $3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$; s.c.) por três dias no limiar de retirada da pata ipsilateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **a**) e contralateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **b**), na força (em $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **c**), massa muscular (em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **d**), na degradação proteica (em nmol de tirosina. mg músculo $^{-1}\cdot 2\text{h}^{-1}$ e convertida a 100% do Controle e na sinalização $\beta 2$ -adrenérgica (**e**) de músculos *soleus* de ratos previamente submetidos à dupla injeção intramuscular de $50\mu\text{L}$ de solução NaCl 0,9% neutra (Controle) ou ácida (pH 4,0; Fibromialgia = FM). Em **c**, foram contabilizados os valores dos músculos ipsilateral e contralateral. Em **f**, os *blottings* representativos ($n=3/\text{grupo}$). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média e analisados através de análise de variância (ANOVA) de duas vias com os fatores fibromialgia e CB e posteriormente submetidos ao teste de Bonferroni. * $p<0,05$ vs. Controle e # $p<0,05$ vs. FM ($n=5-6/\text{grupo}$).

5.3. Caracterização da nocicepção, do metabolismo proteico muscular e liberação de catecolaminas em um modelo de hiperalgesia induzido pela injeção intramuscular de carragenina.

Como esperado, a dupla injeção de carragenina induziu uma diminuição no limiar de retirada da pata ipsilateral de ~38% e ~44% em relação ao Controle, após 1 (dia 6) dia e 7 dias (dia 12), respectivamente (**Figura 11a**). Resultados similares foram observados na pata contralateral (**Figura 11b**), confirmando o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica. Adicionalmente, houve redução da força em aproximadamente 45 e 40% executada pelos membros inferiores no dia 6 e 12, respectivamente (**Figura 11c**). Por outro lado, não houve alteração na coordenação motora (**Figura 11d**), na massa muscular (**Figura 11e**), e na taxa de degradação proteica total em *soleus* (**Figura 11f**), nos animais com indução do modelo de FM através da administração de carragenina em comparação aos Controle. Contudo, neste modelo também observou-se redução na concentração plasmática de adrenalina ($10,374 \pm 1,300 \text{ ng.mL}^{-1}$ vs. $15,280 \pm 1,213 \text{ ng.mL}^{-1}$, $n=5/\text{grupo}$) nos animais submetidos à injeção de carragenina em relação ao grupo Controle (**Figura 11g**), embora o conteúdo de noradrenalina no músculo *soleus* não tenha sido alterado neste modelo de hiperalgesia mecânica (**Figura 11h**).

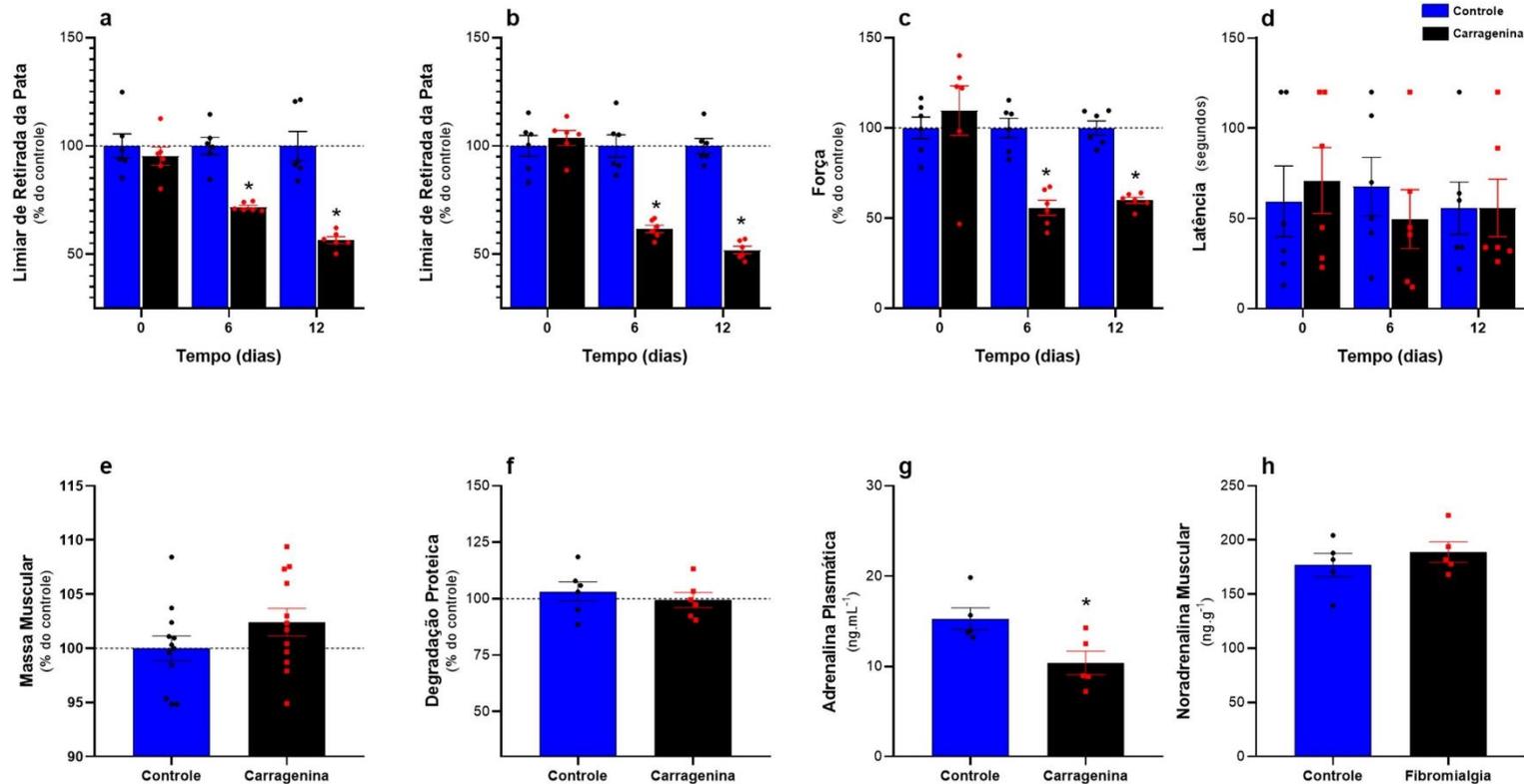


Figura 11. Efeito da dupla injeção intramuscular de 50µL de λ-carragenina (3% em NaCl 0,9%) ou de salina (Controle) no limiar de retirada da pata ipsilateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **a**) e contralateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **b**), na força (em g.kg⁻¹ massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **c**), na coordenação motora (em segundos, em **d**), na massa muscular (em mg.100g⁻¹ massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **e**), na degradação proteica em *soleus* (em nmol de tirosina.mg músculo⁻¹.2h⁻¹ e convertida a 100% do Controle, em **f**), na concentração plasmática de adrenalina (em ng.mL⁻¹, em **g**) e no conteúdo de noradrenalina em *soleus* (em ng.g⁻¹, em **h**) de ratas. Em **e**, foram contabilizados os valores dos músculos ipsilateral e contralateral. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média e analisados através de análise de variância (ANOVA) de duas vias com os fatores tempo e carragenina e posteriormente submetidos ao teste de Bonferroni (em **a-d**) ou ao teste *t* de Student. *p<0,05 vs. Controle e #p<0,05 vs. carragenina (n=5-6/ grupo).

5.4. Avaliação da participação da adrenalina circulante no controle da hiperalgesia e massa muscular de ratas.

Considerando que as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) se apresentaram alteradas nos animais do grupo FM nos experimentos anteriores; além do que, esses animais apresentaram menor capacidade de força muscular, maior hiperalgesia mecânica, maior perda de massa muscular e maior degradação proteica comparados aos animais do grupo Controle. Então, decidiu-se investigar se em animais normais, após a realização da ADM e, portanto, depleção da adrenalina circulante (GRAÇA *et al.*, 2013; MANFREDI *et al.*, 2019), seriam mimetizados os mesmos parâmetros que os animais fibromiálgicos.

Assim foi avaliado o efeito da ADM no desenvolvimento da hiperalgesia crônica difusa ipsilateral e contralateral, na perda massa muscular e proteólise total em músculos *soleus*. Como pode ser observado na **Figura 12a-b**, os animais do grupo ADM apresentaram maior hiperalgesia mecânica mensurada pelo limiar de retirada da pata direita (aqui referida como ipsilateral) de aproximadamente 11% quando comparados os animais do grupo Controle, sete dias após a cirurgia. Embora tenha sido observado um aumento na hiperalgesia mecânica na pata contralateral de ~13% sete dias após a ADM, este resultado não foi significativamente diferente do Controle ($p=0,0688$, $n=6$ /grupo). Além disso, o grupo ADM perdeu mais massa muscular (~93%, **Figura 12c**), que foi associada a maior degradação proteica quando comparados aos animais do grupo Controle (~26%, **Figura 12d**).

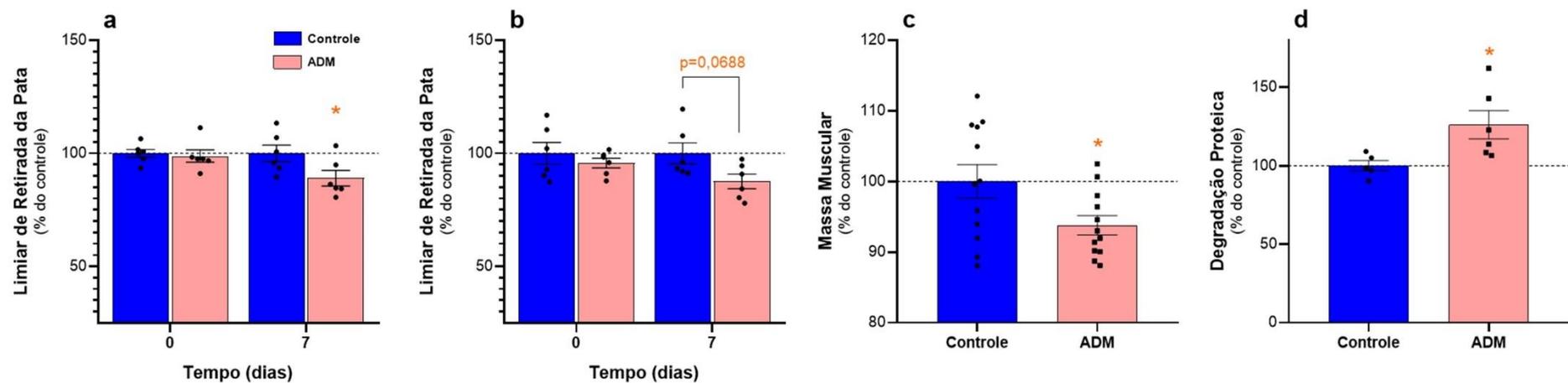


Figura 12. Efeito da adrenodemedulação (ADM, remoção bilateral da medula da adrenal) por sete dias no limiar de retirada da pata ipsilateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **a**) e contralateral (em g e convertida a 100% do Controle, em **b**), na massa muscular (em $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ massa corporal e convertida a 100% do Controle, em **c**) e na degradação proteica (em nmol de tirosina. mg músculo $^{-1} \cdot 2\text{h}^{-1}$ e convertida a 100% do Controle, em **d**) de músculos *soleus* de ratas mantidas em condições basais. Em **c**, foram contabilizados os valores dos músculos ipsilateral e contralateral. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média e analisados através de análise de variância (ANOVA) de duas vias com os fatores ADM e tempo e posteriormente submetidos ao teste de Bonferroni (em **a** e **b**) ou ao teste *t* de Student (em **c** e **d**). * $p < 0,05$ vs. Controle e # $p < 0,05$ vs. FM (n=5-6/ grupo).

6. DISCUSSÃO

A fisiopatologia da FM ainda não possui uma causa definida, porém, sabe-se que o SNS parece estar envolvido em parte no desenvolvimento desta doença. Considerando que a hiperalgesia, perda de massa e de força muscular são alguns dos sintomas apresentados por indivíduos com FM, procurou-se neste estudo investigar a participação do SNS nesses processos utilizando um modelo animal com indução de dor crônica generalizada, por meio da dupla injeção intramuscular unilateral de solução ácida de NaCl (pH 4,0) (DESANTANA; DA CRUZ; SLUKA, 2013). Este modelo murino de FM é mantido, em grande parte, por mecanismos dependentes de alterações na atividade do Sistema Nervoso Central (SNC) e mimetiza condições fisiológicas apresentadas por indivíduos com FM, devido pouco dano no tecido muscular, disautonomia cardiovascular e prejuízo no processamento nociceptivo central (BRUM *et al.*, 2022). A administração de salina ácida com intervalo entre 2 e 5 dias é capaz de diminuir o limiar mecânico de retirada das patas em roedores e a hiperalgesia pode perdurar por até 4 semanas de forma generalizada e de longa duração, esses fatos mimetizam o que acontece em pacientes fibromiálgicos (DESANTANA; DA CRUZ; SLUKA, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012; SLUKA; CLAUW, 2016). Além do que, a hiperalgesia induzida por este modelo de dor crônica consegue ser revertida por tratamento medicamentoso à base de anti-hiperalgésicos frequentemente utilizados na clínica (BRUM *et al.*, 2022).

Vale salientar que este modelo é uma abordagem de dor não inflamatória que afeta o sistema musculoesquelético e consiste em duas injeções de solução salina ácida administradas unilateralmente no músculo gastrocnêmio, com um intervalo de tempo entre elas. A primeira injeção provoca rápida e transitória hiperalgesia em ambas as patas traseiras, preparando os nociceptores para a segunda injeção, que causa hiperalgesia mecânica disseminada persistente por até quatro semanas (BRUM *et al.*, 2022).

Embora não se saiba exatamente quais mecanismos estão envolvidos no aumento da excitabilidade de vias nociceptivas centrais após a administração de solução ácida de NaCl (pH 4,0), apontamos pelo menos duas hipóteses, com base em estudos disponíveis na literatura: 1) ativação de vias neuronais por meio de citocinas pró-inflamatórias e 2) modulação neural envolvendo canais iônicos sensíveis à diminuição do pH local.

Para a primeiro pressuposto, vale considerar que citocinas liberadas por células imunes possuem papel importante no desenvolvimento da dor (LITTLEJOHN, 2015; LITTLEJOHN; GUYMER, 2018). Estudos mostram que após injeções de solução salina em camundongos machos e ratas, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-6 aumentam agudamente no tecido muscular, sugerindo sua participação na resposta inflamatória e possivelmente na geração da dor (REZENDE *et al.*, 2019; SUTTON; OPP, 2015). No entanto, essa expressão aumentada das citocinas pró-inflamatórias citadas não se resume somente em tecidos periféricos, mas atuam também em regiões centrais a exemplo do hipocampo de ratos após administrações intramusculares de salina com pH ácido (ABD-ELLATIEF; MOHAMED; KOTB, 2018), indicando assim possível processo de inflamação neural.

Numa outra conjectura, os canais iônicos sensíveis a ácidos (ASIC) desempenham um papel crucial na modulação neural no SNC e na dor associada à acidose tecidual no sistema periférico, sendo os principais sensores de ácido envolvidos na dor muscular provocada por acidose (BIRDSONG *et al.*, 2010; IMMKE; MCCLESKEY, 2001; REIMERS *et al.*, 2017). Sabe-se que existem pelo menos quatro genes que codificam seis subtipos na família de canais iônicos ASIC, incluindo ASIC1a (WALDMANN *et al.*, 1997b), ASIC1b (CHEN *et al.*, 1998) e ASIC3 (WALDMANN *et al.*, 1997a). O papel do ASIC3 na dor relacionada à acidose tecidual foi amplamente estudado em vários modelos animais (HSU *et al.*, 2019; LIN; SUN; CHEN, 2015; WU *et al.*, 2012), incluindo a hiperalgesia mecânica induzida por ácido muscular (SLUKA *et al.*, 2003). Apesar do ASIC1b ser expresso especialmente em neurônios sensoriais periféricos (LIN; SUN; CHEN, 2015), seu entendimento ainda é limitado em comparação com outros subtipos de ASIC, tanto em relação à expressão, função e contribuição específica para a dor relacionada à acidose tecidual (DIOCHOT *et al.*, 2012, 2016; LIN; SUN; CHEN, 2015). Neste sentido, o estudo de Chang *et al.*, (2019) utilizando animais nocautes para ASIC1b demonstraram que este canal iônico é fundamental para indução e manutenção da hiperalgesia mecânica crônica em um modelo de FM em camundongos induzida pela administração intramuscular de salina ácida.

Em nossos resultados, como esperado, após 7 dias da indução da FM houve uma generalização da algesia, demonstrada pela redução no limiar de retirada de ambas as patas traseiras nos animais FM comparados aos controles. Este evento

equipara-se a estudos pregressos (SLUKA; KALRA; MOORE, 2001) com outros modelos de FM em ratos (NASU; TAGUCHI; MIZUMURA, 2010) ou camundongos (NISHIYORI *et al.*, 2011) em que os autores constataram que o limiar de retirada da pata apresentou-se reduzido após os animais serem submetidos ao estresse por frio repetido.

Em nossos resultados, observou-se que após 7 dias da indução da dor crônica generalizada em ratas, apesar de não haver diferença significativa na coordenação motora entre os grupos FM e controle, houve redução na massa e na força muscular, efeitos estes associados, ao menos parcialmente, pela evidência de aumento na proteólise nos músculos *soleus*. Estes resultados estão de acordo com estudo anterior que ao tratar camundongos fêmeas com imunoglobulinas (IgG) de pacientes fibromiálgicos, percebeu-se entre outros achados importantes, presença de hipersensibilidade dolorosa e redução de força muscular (GOEBEL *et al.*, 2021). SUAREZ-ROCA *et al.* (2006) também observaram redução no desempenho da força muscular em ratos induzidos à hiperalgesia através da fadiga desenvolvida pelo estresse produzido pela natação repetida; além de achados semelhantes em modelos com camundongos (GREGORY *et al.*, 2013; YOKOYAMA *et al.*, 2007).

No que diz respeito ao desempenho muscular em pacientes fibromiálgicos, diversos estudos já relataram *déficit* na força muscular, especialmente em mulheres com FM em comparação aos controles (GÓES *et al.*, 2012; LARSSON *et al.*, 2018; MAQUET *et al.*, 2002; OKUMUS *et al.*, 2006; PANTON *et al.*, 2006; PEDRO ÁNGEL *et al.*, 2012; SALAFFI; FARAH; DI CARLO, 2020), respaldando, assim, a contribuição positiva dos nossos resultados. Ademais, podem, pelo menos parcialmente, serem justificados pelas alterações na estrutura da fibra muscular que apresentam atrofia e necrose (BENGTSSON; HENRIKSSON; LARSSON, 1986; KALYAN-RAMAN *et al.*, 1984), deposição atípica de glicogênio (YUNUS *et al.*, 1986) e mitocôndrias anormais em tamanho, forma e localização (KALYAN-RAMAN *et al.*, 1984; YUNUS *et al.*, 1986) em biópsias dos pacientes FM. Não obstante, as alterações morfométricas e histoquímicas observadas nestes estudos são tipicamente reguladas pelo SNS uma vez que além de induzir aumento da biogênese e capacidade mitocondrial (WU *et al.*, 1999) o que, *per si*, pode justificar as ações catabólicas no metabolismo de carboidratos (HERRIN; MEEK, 1931), produz também efeitos hipertróficos na

musculatura esquelética (RYALL; CHURCH; LYNCH, 2010). Desta forma, o conteúdo de catecolaminas plasmático e muscular foi também mensurado neste modelo de FM.

Verificou-se redução tanto da concentração plasmática de adrenalina quanto de noradrenalina muscular nos animais do grupo FM em relação ao controle que foi associada à diminuição da sinalização adrenérgica muscular identificada pelo menor conteúdo de proteínas fosforiladas pela PKA, incluindo a HSL e CREB. Estes dados estão em conformidade com achados prévios em pacientes humanos onde foi sugerido que a atividade simpática está diminuída nestes indivíduos (QIAO; VAERØY; MØRKRID, 1991; REYES DEL PASO; DE LA COBA, 2020; VAERØY *et al.*, 1989a). Adicionalmente, o tratamento com CB, um agonista seletivo de β 2-AR, durante três dias a partir do dia 9 do experimento em animais FM atenuou a hiperalgesia mecânica e a perda de massa muscular nas ratas, indicando que ambos os processos estão sob controle neuro-hormonal mediado pelo SNS. Paradoxalmente, LIGHT *et al.*, (2009) reportaram melhora da sensibilidade dolorosa em pacientes FM tratados com propranolol, um bloqueador não seletivo de β -AR, embora estes mesmos autores tenham descrito que a concentração plasmática de adrenalina estava menor nestes indivíduos e o tratamento com propranolol restabeleceu este parâmetro. Um aspecto importante que deve ser mencionado é que o propranolol também é considerado um antagonista não específico de receptores para serotonina (5-HT) do tipo 1 (MAURA; ROCCATAGLIATA; RAITERI, 1986) e que a injeção intramuscular desta amina produz hiperalgesia (ERNBERG; LUNDEBERG; KOPP, 2000), assim é possível que o efeito do propranolol seja decorrente de sua ação em receptores sensoriais localizados no músculo. No entanto, em nosso estudo, a ativação farmacológica dos β 2-AR também reestabeleceu a diminuída sinalização adrenérgica em *soleus* induzida pela injeção de salina ácida, o que pode justificar a atenuação da atrofia e diminuição da proteólise muscular, já que os resultados indicam elevação na atividade da PKA nos músculos dos animais do grupo FM tratados com CB. De fato, diversos estudos demonstraram que esta quinase está envolvida na redução da degradação proteica muscular através da inibição das vias proteolíticas Ca^{2+} - dependente (MACHADO *et al.*, 2016), autofágica/lisossomal (GONÇALVES *et al.*, 2012) e proteassomal (GONÇALVES *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2014).

Apesar de não termos avaliado a contribuição da sinalização adrenérgica muscular no desenvolvimento da hiperalgesia, MANJAVACHI *et al.*, (2010)

demonstraram que a inibição farmacológica da PKA através da injeção intramuscular de KT-5720 atenuou a diminuição do limiar de retirada da pata em um modelo de FM produzida pela IL-6 em camundongos. HOEGGER-BEMENT; SLUKA (2003) também demonstraram que a inibição intratecal da AC ou da PKA após 1 dia da segunda injeção de salina ácida diminuiu a hiperalgesia mecânica e o conteúdo de p^{Ser133}-CREB na medula espinhal de ratos, porém 1 semana após, não houve efeito de nenhuma das drogas testadas, assim como o conteúdo de p^{Ser133}-CREB foi normalizado nos animais FM, indicando que a via de sinalização do AMPc/PKA/CREB central não está envolvida na “manutenção” da hiperalgesia. Desta forma, é possível que o tratamento com CB realizado em nosso estudo, que foi iniciado 4 dias após a instalação da hiperalgesia, contribua com a ativação da via do AMPc/PKA e com a atenuação da proteólise muscular, e que adicionalmente, possa aumentar o limiar nociceptivo através de mecanismos centrais, uma vez que esta droga é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (GEYER; FRAMPTON, 1988) e poderia atuar em vias noradrenérgicas que sabidamente estão envolvidas na diminuição da dor como previamente demonstrado (BROCHET *et al.*, 1986; YALCIN *et al.*, 2010). Ademais, não se pode descartar que mecanismos periféricos também possam estar envolvidos no controle da dor exercido pelo CB nos animais FM, uma vez que recentemente foi demonstrado que a migração de neutrófilos para o DRG é um mecanismo essencial para o desenvolvimento da hiperalgesia durante a FM (CAXARIA *et al.*, 2023). Estes leucócitos expressam β 2-AR (BARNES, 1999; DE COUPADE *et al.*, 2004; JOHNSON, 2002) e a estimulação destes receptores é capaz de atenuar a ativação e migração destes leucócitos (NICHOLLS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2016). Contudo, uma limitação de nosso estudo, a qual pretende-se brevemente ser respondida, é se a migração de neutrófilos para o DRG em animais submetidos ao modelo de FM é controlada por mecanismos catecolaminérgicos. Não obstante, se o exercício físico é uma das abordagens terapêuticas não farmacológicas mais utilizadas para tratar indivíduos FM (ROOKS; SILVERMAN; KANTROWITZ, 2002; SIECZKOWSKA *et al.*, 2020) e que sabidamente eleva a atividade simpática (JEŽOVÁ *et al.*, 1985; PEDERSEN *et al.*, 1988; ZOUHAL *et al.*, 2008) e atenua a perda de massa muscular em diferentes condições atroficas (MACEDO *et al.*, 2014; MASCHER *et al.*, 2008; THEILEN; KUNKEL; TYAGI, 2017), poder-se-ia especular que a transmissão

catecolaminérgica está diminuída nestes pacientes, como reportado em nosso estudo, utilizando um modelo animal.

Para corroborar que os achados observados neste estudo são característicos da dor musculoesquelética crônica difusa e não específica da injeção de salina ácida, foi realizado um segundo modelo de hiperalgesia induzido pela administração intramuscular de carragenina, o qual tem sido amplamente usado para mimetizar a FM em modelos animais (CAXARIA *et al.*, 2023; RADHAKRISHNAN; MOORE; SLUKA, 2003; SLUKA *et al.*, 1999; SLUKA; RASMUSSEN, 2010). Como esperado, a carragenina aumentou a hiperalgesia mecânica e diminuiu a força muscular, contudo não houve alteração na massa e na proteólise total em músculos *soleus* demonstrando que este modelo de FM produz características fenotípicas diferentes daquelas observadas nos animais que receberam salina ácida, pelo menos no tempo avaliado, isto é, 7 dias após a segunda administração de carragenina. Embora também não tenha ocorrido diminuição no conteúdo de noradrenalina muscular, houve redução na concentração plasmática de adrenalina, indicando que a diminuição da secreção catecolaminérgica adrenal parece ser um dos mecanismos associados ao desenvolvimento da hiperalgesia em ambos os modelos de FM, a qual é corroborada pelos nossos dados que demonstraram que animais em condições basais submetidos à ADM por sete dias apresentaram menor limiar de retirada das patas do que os controles.

NAVEGANTES *et al.* (1999) relataram que a redução tanto de adrenalina como de noradrenalina pelo tratamento com guanetidina, uma droga que bloqueia a liberação catecolaminérgica periféricamente (PICKLO, 1997) induziu elevação aguda na degradação de proteínas musculares, o que se assemelha aos resultados obtidos em nosso estudo utilizando salina ácida e aqueles utilizando reserpina, uma droga que inibe a liberação catecolaminérgica hormonal (ERÄNKÆ; HOPUSU, 1958) e neural (MUSCHOLL; VOGT, 1958), que é utilizada para indução de hiperalgesia mecânica simulando condições de FM (BRUM *et al.*, 2022; DESANTANA; DA CRUZ; SLUKA, 2013; NAGAKURA *et al.*, 2009) e causa atrofia muscular (FAVERO *et al.*, 2017, 2019). Para o nosso conhecimento, não há dados avaliando as possíveis alterações nociceptivas após bloqueio sistêmico do SNS utilizando guanetidina, contudo, o bloqueio regional do gânglio simpático estrelado através de anestésicos locais ou guanetidina reduziu a dor em pacientes FM e desta forma, os autores reportaram que

tal efeito seria decorrente de uma melhora na microcirculação (BENGTSSON; BENGTSSON, 1988). Baseando nos resultados obtidos em nosso estudo utilizando o modelo de salina ácida com aqueles produzidos pela administração periférica de reserpina, pode-se sugerir que a depleção generalizada de ambas as catecolaminas deve potencializar a perda de massa muscular e hiperalgesia durante a FM, visto que a diminuição da secreção de adrenalina produzida pela injeção de carragenina somente foi associada à hiperalgesia. Assim, não podemos descartar duas possibilidades, a primeira é que a atividade simpática possa estar sendo modulada diferentemente aos diversos tecidos corporais (FOLKOW *et al.*, 1983; MANCIA *et al.*, 1983) durante o desenvolvimento da hiperalgesia e segundo, que a diminuição da liberação de catecolaminas observada em nosso estudo possa ser compensada por um aumento na sensibilidade adrenérgica em períodos mais tardios da FM. De fato, SILVEIRA *et al.* (2014), demonstraram que a simpatectomia cirúrgica através da remoção dos gânglios simpáticos L2/L3 causou uma redução de cerca de 85% no conteúdo de noradrenalina em *soleus* de ratos e elevou a atividade da AC, o conteúdo de AMPc e reduziu a proteólise total neste tecido. Tomadas em conjunto, as duas possibilidades aventadas poderiam, pelo menos parcialmente, justificar os achados clínicos que demonstraram melhora na percepção da dor em pacientes FM tratados com propranolol (LIGHT *et al.*, 2009) ou guanetidina (BENGTSSON; BENGTSSON, 1988).

Em uma tentativa de mimetizar a menor concentração plasmática de adrenalina observada nos animais hiperálgicos seja pela injeção de salina ácida ou carragenina, ratas em condições basais foram submetidas à cirurgia ADM. Foi constatado que, em comparação ao grupo controle, a ADM aumentou a hiperalgesia na pata ipsilateral (considerada a pata direita) dos animais após 7 dias da cirurgia, embora na pata contralateral esse processo não foi estatisticamente significativo ($p=0,068$), indicando que o SNS pode estar envolvido inclusive na instalação da FM. Além disso, a ADM reduziu a massa muscular possivelmente devido maior proteólise neste tecido. Por outro lado, enquanto GRAÇA *et al.* (2013) e MANFREDI *et al.* (2017) não observaram aumento na proteólise em *soleus* de ratos submetidos à ADM por 10 dias, NAVEGANTES *et al.* (2001) demonstraram que após 2 dias de ADM a proteólise esteve elevada neste mesmo tipo muscular, assim é possível que haja um efeito temporal da depleção de adrenalina na degradação proteica uma vez que nossos

dados também demonstraram que após 7 dias de ADM houve perda de massa muscular nestes animais.

Em suma, os nossos resultados conjuntamente indicam a ocorrência de diminuição da atividade do SNS em dois diferentes modelos animais de FM que foi associada ao desenvolvimento da hiperalgesia e da atrofia muscular esquelética. Estes resultados são reforçados por dados clínicos que demonstraram menor concentração de adrenalina plasmática em pacientes FM (LIGHT *et al.*, 2009), na reprodução experimental da FM em animais tratados com reserpina (NAGAKURA *et al.*, 2009) ou submetidos à ADM e na atenuação da hiperalgesia (ROOKS; SILVERMAN; KANTROWITZ, 2002) e perda muscular (MACEDO *et al.*, 2014) em protocolos que aumentam a sinalização simpática, como o exercício físico (ZOUHAL *et al.*, 2008) ou como reportado aqui, o tratamento com β 2-agonistas.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- a) Há atenuação da atividade simpática durante o desenvolvimento da hiperalgesia induzida pela injeção intramuscular de salina ácida ou carragenina;
- b) O tratamento com CB atenua a hiperalgesia e perda de massa muscular induzida pela injeção intramuscular de salina ácida;
- c) A depleção de adrenalina circulante, através da remoção bilateral da medula da adrenal, mimetiza a hiperalgesia e elevação da proteólise produzida pela injeção intramuscular de salina ácida, indicando que este hormônio possa estar envolvido na instalação da FM experimental.

Em suma, os dados demonstram que a diminuição da atividade do SNS está envolvida no desenvolvimento da hiperalgesia e atrofia muscular durante a FM experimental, uma vez que ratas em condições basais submetidas a um modelo cirúrgico de depleção catecolaminérgica apresentaram sinais similares aos animais FM, enquanto ratas FM tratadas com um simpatomimético tiveram atenuação destes parâmetros.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELLATIEF, R. B.; MOHAMED, H. K.; KOTB, H. I. Reactive Astrogliosis in an Experimental Model of Fibromyalgia: Effect of Dexmedetomidine. **Cells Tissues Organs**, v. 205, n. 2, p. 105–119, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000488757>
- ARSLAN, D. Interactions Between The Painful Disorders and The Autonomic Nervous System. **Ağrı - The Journal of The Turkish Society of Algology**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.14744/agri.2021.43078>
- BARNES, P. J. Effect of β agonists on inflammatory cells☆☆☆. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, n. 2, p. S10–S17, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70269-1](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70269-1)
- BAVIERA, A. M.; ZANON, N. M.; NAVEGANTES, L. C. C.; KETTELHUT, I. C. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 315, n. 1–2, p. 104–112, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.09.028>
- BENGTSSON, A.; BENGTSSON, M. Regional sympathetic blockade in primary fibromyalgia. **Pain**, v. 33, n. 2, p. 161–167, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90086-3](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90086-3)
- BENGTSSON, A.; HENRIKSSON, K.-G.; LARSSON, Jör. Muscle Biopsy in Primary Fibromyalgia: Light-Microscopical and Histochemical Findings. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 15, n. 1, p. 1–6, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/03009748609092661>
- BINDER, W.; MOUSA, S. A.; SITTE, N.; KAISER, M.; STEIN, C.; SCHAFFER, M. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 92–100, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03459.x>
- BIRDSONG, W. T.; FIERRO, L.; WILLIAMS, F. G.; SPELTA, V.; NAVES, L. A.; KNOWLES, M.; MARSH-HAFFNER, J.; ADELMAN, J. P.; ALMERS, W.; ELDE, R. P.; MCCLESKEY, E. W. Sensing Muscle Ischemia: Coincident Detection of Acid and ATP via Interplay of Two Ion Channels. **Neuron**, v. 68, n. 4, p. 739–749, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.029>

- BODINE, S. C. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5547, p. 1704–1708, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1065874>
- BONATERRA, G. A.; THEN, H.; OEZEL, L.; SCHWARZBACH, H.; OCKER, M.; THIEME, K.; DI FAZIO, P.; KINSCHERF, R. Morphological Alterations in Gastrocnemius and Soleus Muscles in Male and Female Mice in a Fibromyalgia Model. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151116, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151116>
- BROCHET, D.; MIC[◆], J.-A.; MARTIN, P.; SIMON, P. Antinociceptive activity of beta-adrenoceptor agonists in the hot plate test in mice. **Psychopharmacology**, v. 88, n. 4, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00178520>
- BRUM, E. S.; BECKER, G.; FIALHO, M. F. P.; OLIVEIRA, S. M. Animal models of fibromyalgia: What is the best choice? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 230, p. 107959, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107959>
- CAKIRBAY, H.; CEBI, A.; CEBI, E.; KARKUCAK, M.; CAPKIN, E. Risk factors of fibromyalgia in Turkish women. **The Pain Clinic**, v. 18, n. 3, p. 251–257, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1163/156856906778026211>
- CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor Coordination and Balance in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 15, n. 1, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0812s15>
- CAXARIA, S. *et al.* Neutrophils infiltrate sensory ganglia and mediate chronic widespread pain in fibromyalgia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 17, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2211631120>
- CHANG, C.-T.; FONG, S. W.; LEE, C.-H.; CHUANG, Y.-C.; LIN, S.-H.; CHEN, C.-C. Involvement of Acid-Sensing Ion Channel 1b in the Development of Acid-Induced Chronic Muscle Pain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01247>
- CHEN, C.-C.; ENGLAND, S.; AKOPIAN, A. N.; WOOD, J. N. A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 17, p. 10240–10245, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10240>

- CHROUSOS, G. P. The Concepts of Stress and Stress System Disorders. **JAMA**, v. 267, n. 9, p. 1244, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.1992.03480090092034>
- CLAVEL, S.; COLDEFY, A.-S.; KURKDJIAN, E.; SALLES, J.; MARGARITIS, I.; DERIJARD, B. Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 10, p. 794–801, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.07.005>
- COHEN, H.; NEUMANN, L.; ALHOSSHLE, A.; KOTLER, M.; ABU-SHAKRA, M.; BUSKILA, D. Abnormal sympathovagal balance in men with fibromyalgia. **The Journal of rheumatology**, v. 28, n. 3, p. 581–9, 2001. Disponível em: <https://doi.org/11296963>
- CONTE, T. C.; SILVA, L. H.; SILVA, M. T.; HIRABARA, S. M.; OLIVEIRA, A. C.; CURI, R.; MORISCOT, A. S.; AOKI, M. S.; MIYABARA, E. H. The 2-Adrenoceptor Agonist Formoterol Improves Structural and Functional Regenerative Capacity of Skeletal Muscles From Aged Rat at the Early Stages of Postinjury. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 67A, n. 5, p. 443–455, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/gerona/glr195>
- COSTA, D. M. *et al.* Oxytocin induces anti-catabolic and anabolic effects on protein metabolism in the female rat oxidative skeletal muscle. **Life Sciences**, v. 279, n. April, p. 119665, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119665>
- DADABHOY, D.; CROFFORD, L. J.; SPAETH, M.; RUSSELL, I. J.; CLAUW, D. J. Biology and therapy of fibromyalgia. Evidence-based biomarkers for fibromyalgia syndrome. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, n. 4, p. 211, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/ar2443>
- DE COUPADE, C.; GEAR, R. W.; DAZIN, P. F.; SROUSSI, H. Y.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. β 2 -Adrenergic receptor regulation of human neutrophil function is sexually dimorphic. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, n. 8, p. 1033–1041, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705972>
- DELBONO, O. Neural control of aging skeletal muscle. **Ageing Cell**, v. 2, n. 1, p. 21–29, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2003.00011.x>

- DELBONO, O.; RODRIGUES, A. C. Z.; BONILLA, H. J.; MESSI, M. L. The emerging role of the sympathetic nervous system in skeletal muscle motor innervation and sarcopenia. **Ageing Research Reviews**, v. 67, p. 101305, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101305>
- DESANTANA, J. M.; DA CRUZ, K. M.; SLUKA, K. A. Animal models of fibromyalgia. **Arthritis Research & Therapy**, v. 15, n. 6, p. 222, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/ar4402>
- DIOCHOT, S.; ALLOUI, A.; RODRIGUES, P.; DAUVOIS, M.; FRIEND, V.; AISSOUNI, Y.; ESCHALIER, A.; LINGUEGLIA, E.; BARON, A. Analgesic effects of mambalgin peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain. **Pain**, v. 157, n. 3, p. 552–559, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000397>
- DIOCHOT, S.; BARON, A.; SALINAS, M.; DOUGUET, D.; SCARZELLO, S.; DABERT-GAY, A.-S.; DEBAYLE, D.; FRIEND, V.; ALLOUI, A.; LAZDUNSKI, M.; LINGUEGLIA, E. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. **Nature**, v. 490, n. 7421, p. 552–555, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11494>
- EISENHOFER, G.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D. S. Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 331–349, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.56.3.1>
- ERÄNKÆ, O.; HOPUSU, V. Effect of reserpine on the histochemistry and content of adrenaline and noradrenaline in the adrenal medulla of the rat and the mouse. **Endocrinology**, v. 62, n. 1, p. 15–23, 1958. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/endo-62-1-15>
- ERNBERG, M.; LUNDEBERG, T.; KOPP, S. Effect of propranolol and granisetron on experimentally induced pain and allodynia/hyperalgesia by intramuscular injection of serotonin into the human masseter muscle. **Pain**, v. 84, n. 2, p. 339–346, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(99\)00221-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00221-3)
- FAVERO, G.; BONOMINI, F.; FRANCO, C.; REZZANI, R. Mitochondrial Dysfunction in Skeletal Muscle of a Fibromyalgia Model: The Potential Benefits of Melatonin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 765,

2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20030765>
- FAVERO, G.; TRAPLETTI, V.; BONOMINI, F.; STACCHIOTTI, A.; LAVAZZA, A.; RODELLA, L.; REZZANI, R. Oral Supplementation of Melatonin Protects against Fibromyalgia-Related Skeletal Muscle Alterations in Reserpine-Induced Myalgia Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1389, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18071389>
- FOLKOW, B.; DI BONA, G. F.; HJEMDAHL, P.; TORÉN, P. H.; WALLIN, B. G. Measurements of plasma norepinephrine concentrations in human primary hypertension. A word of caution on their applicability for assessing neurogenic contributions. **Hypertension**, v. 5, n. 4, p. 399–403, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.5.4.399>
- FORSETH, K. A population study of the incidence of fibromyalgia among women aged 26- 55 yr. **Rheumatology**, v. 36, n. 12, p. 1318–1323, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/36.12.1318>
- FURLAN, R.; COLOMBO, S.; PEREGO, F.; ATZENI, F.; DIANA, A.; BARBIC, F.; PORTA, A.; PACE, F.; MALLIANI, A.; SARZI-PUTTINI, P. Abnormalities of cardiovascular neural control and reduced orthostatic tolerance in patients with primary fibromyalgia. **The Journal of rheumatology**, v. 32, n. 9, p. 1787–93, 2005.
- GAROFALO, M. A. R.; KETTELHUT, I. C.; ROSELINO, J. S.; MIGLIORINI, R. H. Effect of acute cold exposure on norepinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 60, n. 3, p. 206–208, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(96\)00037-9](https://doi.org/10.1016/0165-1838(96)00037-9)
- GEYER, M. A.; FRAMPTON, S. F. Peripheral mediation of effects of clenbuterol on locomotor and investigatory behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 30, n. 2, p. 417–420, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(88\)80002-9](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(88)80002-9)
- GIBBINS, I. Functional organization of autonomic neural pathways. **Organogenesis**, v. 9, n. 3, p. 169–175, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/org.25126>
- GISKE, L.; VØLLESTAD, N. K.; MENGSHOEL, A. M.; JENSEN, J.; KNARDAHL, S.; RØE, C. Attenuated adrenergic responses to exercise in women with fibromyalgia - A controlled study. **European Journal of Pain**, v. 12, n. 3, p. 351–360, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2007.07.007>

- GOEBEL, A. *et al.* Passive transfer of fibromyalgia symptoms from patients to mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI144201>
- GÓES, S. M.; LEITE, N.; SHAY, B. L.; HOMANN, D.; STEFANELLO, J. M. F.; RODACKI, A. L. F. Functional capacity, muscle strength and falls in women with fibromyalgia. **Clinical Biomechanics**, v. 27, n. 6, p. 578–583, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2011.12.009>
- GOMES, M. D.; LECKER, S. H.; JAGOE, R. T.; NAVON, A.; GOLDBERG, A. L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 25, p. 14440–14445, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.251541198>
- GONÇALVES, D. A. P. *et al.* Mechanisms Involved in 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate-Mediated Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System in Skeletal Muscle. **Endocrinology**, v. 150, n. 12, p. 5395–5404, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2009-0428>
- GONÇALVES, D. A. P.; SILVEIRA, W. A.; LIRA, E. C.; GRAÇA, F. A.; PAULA-GOMES, S.; ZANON, N. M.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. C. Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, p. 123–133, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00188.2011.-Although>
- GOPALKRISHNAN, P.; SLUKA, K. A. Effect of varying frequency, intensity, and pulse duration of transcutaneous electrical nerve stimulation on primary hyperalgesia in inflamed rats. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 81, n. 7, p. 984–990, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/apmr.2000.5576>
- GRAÇA, F. a; GONÇALVES, D. a P.; SILVEIRA, W. A.; LIRA, E. C.; CHAVES, V. E.; ZANON, N. M.; GARÓFALO, M. A. R.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. C. Epinephrine depletion exacerbates the fasting-induced protein breakdown in fast-twitch skeletal muscles. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 12, p. E1483–E1494, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00267.2013>

- GRANADOS, Y.; CEDEÑO, L.; ROSILLO, C.; BERBIN, S.; AZOCAR, M.; MOLINA, M. E.; LARA, O.; SANCHEZ, G.; PELÁEZ-BALLESTAS, I. Prevalence of musculoskeletal disorders and rheumatic diseases in an urban community in Monagas State, Venezuela: a COPCORD study. **Clinical Rheumatology**, v. 34, n. 5, p. 871–877, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10067-014-2689-9>
- GREGORY, N. S.; GIBSON-CORLEY, K.; FREY-LAW, L.; SLUKA, K. A. Fatigue-enhanced hyperalgesia in response to muscle insult: Induction and development occur in a sex-dependent manner. **Pain**, v. 154, n. 12, p. 2668–2676, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.047>
- GUO, X.; WANG, M.; WANG, X.; GUO, M.; XUE, T.; WANG, Z.; LI, H.; XU, T.; HE, B.; CUI, D.; TONG, S. Progressive increase of high-frequency EEG oscillations during meditation is associated with its trait effects on heart rate and proteomics: a study on the Tibetan Buddhist. **Cerebral Cortex**, v. 32, n. 18, p. 3865–3877, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab453>
- HALTER, J. B.; PFLUG, A. E. Effects of anesthesia and surgical stress on insulin secretion in man. **Metabolism**, v. 29, n. 11, p. 1124–1127, 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(80\)90021-9](https://doi.org/10.1016/0026-0495(80)90021-9)
- HERRIN, R. C.; MEEK, W. J. Influence of the sympathetics on muscle glycogen. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 97, n. 1, p. 57–65, 1931. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1931.97.1.57>
- HODGE, C. J.; APKARIAN, A. V.; STEVENS, R.; VOGELSANG, G.; WISNICKI, H. J. Locus coeruleus modulation of dorsal horn unit responses to cutaneous stimulation. **Brain Research**, v. 204, n. 2, p. 415–420, 1981. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90600-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90600-4)
- HOEGER-BEMENT, M. K.; SLUKA, K. A. Phosphorylation of CREB and Mechanical Hyperalgesia Is Reversed by Blockade of the cAMP Pathway in a Time-Dependent Manner after Repeated Intramuscular Acid Injections. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 13, p. 5437–5445, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05437.2003>
- HSU, W.-H.; LEE, C.-H.; CHAO, Y.-M.; KUO, C.-H.; KU, W.-C.; CHEN, C.-C.; LIN, Y.-L. ASIC3-dependent metabolomics profiling of serum and urine in a mouse model of fibromyalgia. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12123, 2019.

- Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48315-w>
- IMMKE, D. C.; MCCLESKEY, E. W. ASIC3: A Lactic Acid Sensor for Cardiac Pain. **The Scientific World JOURNAL**, v. 1, p. 510–512, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.254>
- JACOMINI, L. C. L.; SILVA, N. A. da. Disautonomia: um conceito emergente na síndrome da fibromialgia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 5, p. 354–361, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0482-50042007000500010>
- JÄNIG, W. The Autonomic Nervous System. *In: Neurosciences - From Molecule to Behavior: a university textbook*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 179–211. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-10769-6_10
- JÄNIG, W.; HÄBLER, H.-J. Sympathetic nervous system: contribution to chronic pain. *In: [S. l.: s. n.]*. p. 451–468. *E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)80003-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)80003-5)
- JENSEN, J.; BRENNESVIK, E. O.; BERGERSEN, H.; OSELAND, H.; JEBENS, E.; BRØRS, O. Quantitative determination of cell surface beta-adrenoceptors in different rat skeletal muscles. **Pflügers Archiv: European journal of physiology**, v. 444, n. 1–2, p. 213–9, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0793-1>
- JEŽOVÁ, D.; VIGAŠ, M.; TATÁR, P.; KVETŇANSKÝ, R.; NAZAR, K.; KACIUBA-UŠCILKO, H.; KOZLOWSKI, S. Plasma testosterone and catecholamine responses to physical exercise of different intensities in men. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 54, n. 1, p. 62–66, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00426300>
- JIANG, H.; GALTES, D.; WANG, J.; ROCKMAN, H. A. G protein-coupled receptor signaling: transducers and effectors. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 323, n. 3, p. C731–C748, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00210.2022>
- JOHNSON, M. Effects of β_2 -agonists on resident and infiltrating inflammatory cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 6, p. S282–S290, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/mai.2002.129430>
- JUNIOR, M. H.; GOLDENFUM, M. A.; FÁVARO SIENA, C. A. Fibromialgia: aspectos

- clínicos e ocupacionais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 358–365, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000300018>
- KALYAN-RAMAN, U. P.; KALYAN-RAMAN, K.; YUNUS, M. B.; MASI, A. T. Muscle pathology in primary fibromyalgia syndrome: a light microscopic, histochemical and ultrastructural study. **The Journal of rheumatology**, v. 11, n. 6, p. 808–13, 1984. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6596430>
- KAPUCZINSKI, A.; SOYFOO, M. S.; DE BREUCKER, S.; MARGAUX, J. Assessment of sarcopenia in patients with fibromyalgia. **Rheumatology International**, v. 42, n. 2, p. 279–284, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00296-021-04973-6>
- KETTELHUT, I. C.; WING, S. S.; GOLDBERG, A. L. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. **Diabetes / Metabolism Reviews**, v. 4, n. 8, p. 751–772, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dmr.5610040805>
- KHAN, M. M. *et al.* Sympathetic innervation controls homeostasis of neuromuscular junctions in health and disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 3, p. 746–750, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1524272113>
- KIM, Y. S.; SAINZ, R. D.; MOLENAAR, P.; SUMMERS, R. J. Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. **Biochemical pharmacology**, v. 42, n. 9, p. 1783–9, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1681810>
- KOSEK, E.; EKHOLM, J.; HANSSON, P. Modulation of pressure pain thresholds during and following isometric contraction in patients with fibromyalgia and in healthy controls. **Pain**, v. 64, n. 3, p. 415–423, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)00112-3](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00112-3)
- KOSEK, E.; HANSSON, P. Modulatory influence on somatosensory perception from vibration and heterotopic noxious conditioning stimulation (HNCS) in fibromyalgia patients and healthy subjects. **Pain**, v. 70, n. 1, p. 41–51, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(96\)03295-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(96)03295-2)
- KOSEK, E.; KADETOFF, D. Evidence of reduced sympatho-adrenal and hypothalamic-pituitary activity during static muscular work in patients with fibromyalgia. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 42, n. 8, p. 765–772,

2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2340/16501977-0597>
- LARSSON, A.; PALSTAM, A.; BJERSING, J.; LÖFGREN, M.; ERNBERG, M.; KOSEK, E.; GERDLE, B.; MANNERKORPI, K. Controlled, cross-sectional, multi-center study of physical capacity and associated factors in women with fibromyalgia. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 19, n. 1, p. 121, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12891-018-2047-1>
- LATORRE-ROMÁN, P. Á.; SEGURA-JIMÉNEZ, V.; APARICIO, V. A.; SANTOS E CAMPOS, M. A.; GARCÍA-PINILLOS, F.; HERRADOR-COLMENERO, M.; ÁLVAREZ-GALLARDO, I. C.; DELGADO-FERNÁNDEZ, M. Ageing influence in the evolution of strength and muscle mass in women with fibromyalgia: the al-Ándalus project. **Rheumatology International**, v. 35, n. 7, p. 1243–1250, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00296-015-3213-5>
- LAUTENSCHLÄGER, G.; THIEME, K.; MALINOWSKI, R.; MELLER, T.; KAPS, M.; KRÄMER, H. P28. Sympathetic activity in patients with fibromyalgia – A microneurographic study. **Clinical Neurophysiology**, v. 126, n. 8, p. e110–e111, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2015.04.166>
- LE GOFF, P. Is fibromyalgia a muscle disorder? **Joint Bone Spine**, v. 73, n. 3, p. 239–242, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2005.03.022>
- LIGHT, K. C.; BRAGDON, E. E.; GREWEN, K. M.; BROWNLEY, K. A.; GIRDLER, S. S.; MAIXNER, W. Adrenergic Dysregulation and Pain With and Without Acute Beta-Blockade in Women With Fibromyalgia and Temporomandibular Disorder. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 5, p. 542–552, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.12.006>
- LIN, S.-H.; SUN, W.-H.; CHEN, C.-C. Genetic exploration of the role of acid-sensing ion channels. **Neuropharmacology**, v. 94, p. 99–118, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.011>
- LITTLEJOHN, G. Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 11, p. 639–648, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.100>
- LITTLEJOHN, G.; GUYMER, E. Neurogenic inflammation in fibromyalgia. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 3, p. 291–300, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0672-2>
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. L.; RANDALL, R. Protein measurement

- with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- LYNCH, G. S.; RYALL, J. G. Role of β -Adrenoceptor Signaling in Skeletal Muscle: Implications for Muscle Wasting and Disease. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 729–767, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2007>.
- MACEDO, A. G.; KRUG, A. L. O.; HERRERA, N. A.; ZAGO, A. S.; RUSH, J. W. E.; AMARAL, S. L. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, p. 357–364, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.010>
- MACHADO, J.; MANFREDI, L. H.; SILVEIRA, W. A.; GONÇALVES, D. A. P.; LUSTRINO, D.; ZANON, N. M.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. Calcitonin gene-related peptide inhibits autophagic-lysosomal proteolysis through cAMP/PKA signaling in rat skeletal muscles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 72, p. 40–50, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.12.011>
- MACHADO, J.; SILVEIRA, W. A.; GONÇALVES, D. A.; SCHAVINSKI, A. Z.; KHAN, M. M.; ZANON, N. M.; DIAZ, M. B.; RUDOLF, R.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. α -Calcitonin gene-related peptide inhibits autophagy and calpain systems and maintains the stability of neuromuscular junction in denervated muscles. **Molecular Metabolism**, v. 28, p. 91–106, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.06.024>
- MANCIA, G.; FERRARI, A.; GREGORINI, L.; LEONETTI, G.; PARATI, G.; PICOTTI, G. B.; RAVAZZANI, C.; ZANCHETTI, A. Plasma Catecholamines do Not Invariably Reflect Sympathetically Induced Changes in Blood Pressure in Man. **Clinical Science**, v. 65, n. 3, p. 227–235, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/cs0650227>
- MANFREDI, L. H.; LUSTRINO, D.; MACHADO, J.; SILVEIRA, W. A.; ZANON, N. M.; NAVEGANTES, L. C.; KETTELHUT, I. C. Adrenodemedullation activates the Ca^{2+} -dependent proteolysis in soleus muscles from rats exposed to cold. **Journal of Applied Physiology**, v. 122, n. 2, p. 317–326, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jap.00000.2017>

- em: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00198.2016>
- MANFREDI, L. H.; LISTRINO, D.; MACHADO, J.; SILVEIRA, W. A.; ZANON, N. M.; NAVEGANTES, L. C.; KETTELHUT, I. C. Adrenomedullation activates the Ca²⁺-dependent proteolysis in soleus muscles from rats exposed to cold. p. 317–326, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00198.2016>
- MANJAVACHI, M. N.; MOTTA, E. M.; MAROTTA, D. M.; LEITE, D. F. P.; CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 345–355, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.07.018>
- MAQUET, D.; CROISIER, J.-L.; RENARD, C.; CRIELAARD, J.-M. Muscle performance in patients with fibromyalgia. **Joint Bone Spine**, v. 69, n. 3, p. 293–299, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1297-319X\(02\)00373-1](https://doi.org/10.1016/S1297-319X(02)00373-1)
- MARQUES, A. P.; SANTO, A. de S. do E.; BERSSANETI, A. A.; MATSUTANI, L. A.; YUAN, S. L. K. Prevalence of fibromyalgia: literature review update. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 57, n. 4, p. 356–363, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2017.01.005>
- MARTINEZ-LAVIN, M. Fibromyalgia as a sympathetically maintained pain syndrome. **Current Pain and Headache Reports**, v. 8, n. 5, p. 385–389, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11916-996-0012-4>
- MARTÍNEZ-LAVÍN, M. Fibromyalgia: When Distress Becomes (Un)sympathetic Pain. **Pain Research and Treatment**, v. 2012, p. 1–6, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/981565>
- MARTÍNEZ-LAVÍN, M. Fibromyalgia in women: somatisation or stress-evoked, sex-dimorphic neuropathic pain? **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 39, n. 2, p. 422–425, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.55563/clinexprheumatol/0c7d6v>
- MARTÍNEZ-LAVÍN, M.; HERMOSILLO, A. G. Autonomic nervous system dysfunction may explain the multisystem features of fibromyalgia. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 29, n. 4, p. 197–199, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0049-0172\(00\)80008-6](https://doi.org/10.1016/S0049-0172(00)80008-6)
- MARTÍNEZ-LAVÍN, M.; HERMOSILLO, A. G.; MENDOZA, C.; ORTIZ, R.; CAJIGAS,

- J. C.; PINEDA, C.; NAVA, A.; VALLEJO, M. Orthostatic sympathetic derangement in subjects with fibromyalgia. **The Journal of rheumatology**, v. 24, n. 4, p. 714–8, 1997.
- MARTINEZ-LAVIN, M.; VIDAL, M.; BARBOSA, R.-E.; PINEDA, C.; CASANOVA, J.-M.; NAVA, A. Norepinephrine-evoked pain in fibromyalgia. A randomized pilot study ISCRTN70707830. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 3, n. 1, p. 2, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2474-3-2>
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.-A.; MORA, T.; VARGAS, A.; FUENTES-INIESTRA, M.; MARTÍNEZ-LAVÍN, M. Sympathetic Nervous System Dysfunction in Fibromyalgia, Chronic Fatigue Syndrome, Irritable Bowel Syndrome, and Interstitial Cystitis. **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 3, p. 146–150, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/RHU.0000000000000089>
- MASCHER, H.; TANNERSTEDT, J.; BRINK-ELFEGOUN, T.; EKBLÖM, B.; GUSTAFSSON, T.; BLOMSTRAND, E. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 294, n. 1, p. E43–E51, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00504.2007>
- MAURA, G.; ROCCATAGLIATA, E.; RAITERI, M. Serotonin autoreceptor in rat hippocampus: Pharmacological characterization as a subtype of the 5-HT1 receptor. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 334, n. 4, p. 323–326, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00569364>
- MEEUS, M.; GOUBERT, D.; DE BACKER, F.; STRUYF, F.; HERMANS, L.; COPPIETERS, I.; DE WANDELE, I.; DA SILVA, H.; CALDERS, P. Heart rate variability in patients with fibromyalgia and patients with chronic fatigue syndrome: A systematic review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 2, p. 279–287, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2013.03.004>
- MENDEZ, M.; BIANCHI, A. M.; VILLANTIERI, O.; CERUTTI, S. Time-varying Analysis of the Heart Rate Variability during REM and Non REM Sleep Stages. *In: 2006, 2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. : IEEE, 2006. p. 3576–3579. Disponível em:

<https://doi.org/10.1109/IEMBS.2006.260067>

- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00009-6)
- MUSCHOLL, E.; VOGT, M. The action of reserpine on the peripheral sympathetic system. **The Journal of Physiology**, v. 141, n. 1, p. 132–155, 1958. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1958.sp005961>
- NAGAKURA, Y.; OE, T.; AOKI, T.; MATSUOKA, N. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. **Pain**, v. 146, n. 1, p. 26–33, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.05.024>
- NASU, T.; TAGUCHI, T.; MIZUMURA, K. Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. **European Journal of Pain**, v. 14, n. 3, p. 236–244, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.05.009>
- NAVEGANTES, L. C. C.; RESANO, N. M. Z.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, Í. C. Catecholamines inhibit Ca²⁺-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through β 2 -adrenoceptors and cAMP. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 281, n. 3, p. E449–E454, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.281.3.E449>
- NAVEGANTES, L. C.; RESANO, N. M.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 279, n. 3, p. E663–E668, 2000.
- NICHOLLS, A. J.; WEN, S. W.; HALL, P.; HICKEY, M. J.; WONG, C. H. Y. Activation of the sympathetic nervous system modulates neutrophil function. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, n. 2, p. 295–309, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0517-194RR>
- NISHIYORI, M.; UCHIDA, H.; NAGAI, J.; ARAKI, K.; MUKAE, T.; KISHIOKA, S.; UEDA, H. Permanent Relief from Intermittent Cold Stress-Induced Fibromyalgia-Like Abnormal Pain by Repeated Intrathecal Administration of Antidepressants. **Molecular Pain**, v. 7, p. 1744-8069-7–69, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-69>

- NOVAK, P. Autonomic Disorders. **The American Journal of Medicine**, v. 132, n. 4, p. 420–436, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.09.027>
- OKUMUS, M.; GOKOGLU, F.; KOCAOGLU, S.; CECELI, E.; YORGANCIOGLU, Z. R. Muscle performance in patients with fibromyalgia. **Singapore medical journal**, v. 47, n. 9, p. 752–6, 2006.
- OLIVEIRA, L. R.; DE MELO, V. U.; MACEDO, F. N.; BARRETO, A. S.; BADAUE-PASSOS, D.; VIANA DOS SANTOS, M. R.; DIAS, D. P. M.; SLUKA, K. A.; DESANTANA, J. M.; SANTANA-FILHO, V. J. Induction of chronic non-inflammatory widespread pain increases cardiac sympathetic modulation in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 167, n. 1–2, p. 45–49, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2011.12.004>
- PANTON, L. B.; KINGSLEY, J. D.; TOOLE, T.; CRESS, M. E.; ABBOUD, G.; SIRITHIENTHAD, P.; MATHIS, R.; MCMILLAN, V. A Comparison of Physical Functional Performance and Strength in Women With Fibromyalgia, Age- and Weight-Matched Controls, and Older Women Who Are Healthy. **Physical Therapy**, v. 86, n. 11, p. 1479–1488, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.2522/ptj.20050320>
- PARK, D. J. *et al.* Association between catechol-O-methyl transferase gene polymorphisms and fibromyalgia in a Korean population: A case-control study. **European Journal of Pain**, v. 20, n. 7, p. 1131–1139, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ejp.837>
- PEDERSEN, B. K. *et al.* Modulation of Natural Killer Cell Activity in Peripheral Blood by Physical Exercise. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 27, n. 6, p. 673–678, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1988.tb02400.x>
- PEDRO ÁNGEL, L. R.; CAMPOS, M. A. S. e; MEJÍA MEZA, J. A.; DELGADO FERNÁNDEZ, M.; HEREDIA, J. M. Análise das capacidades físicas de mulheres com fibromialgia segundo o nível de gravidade da enfermidade. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 18, n. 5, p. 308–312, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-86922012000500005>
- PETZKE, F.; CLAUW, D. J. Sympathetic nervous system function in fibromyalgia. **Current Rheumatology Reports**, v. 2, n. 2, p. 116–123, 2000. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s11926-000-0051-5>

- PICKLO, M. J. Methods of sympathetic degeneration and alteration. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 62, n. 3, p. 111–125, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(96\)00121-X](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(96)00121-X)
- QIAO, Z. G.; VAERØY, H.; MØRKRID, L. Electrodermal and microcirculatory activity in patients with fibromyalgia during baseline, acoustic stimulation and cold pressor tests. **The Journal of rheumatology**, v. 18, n. 9, p. 1383–9, 1991.
- RADHAKRISHNAN, R.; MOORE, S. A.; SLUKA, K. A. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. **Pain**, v. 104, n. 3, p. 567–577, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(03\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(03)00114-3)
- REIMERS, C.; LEE, C.-H.; KALBACHER, H.; TIAN, Y.; HUNG, C.-H.; SCHMIDT, A.; PROKOP, L.; KAUFERSTEIN, S.; MEBS, D.; CHEN, C.-C.; GRÜNDER, S. Identification of a cono-RFamide from the venom of *Conus textile* that targets ASIC3 and enhances muscle pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1616232114>
- REYES DEL PASO, G. A.; DE LA COBA, P. Reduced activity, reactivity and functionality of the sympathetic nervous system in fibromyalgia: An electrodermal study. **PLOS ONE**, v. 15, n. 10, p. e0241154, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241154>
- REZENDE, R. M.; GOUVEIA PELÚZIO, M. do C.; DE JESUS SILVA, F.; DELLA LUCIA, E. M.; SILVA CAMPOS FAVARATO, L.; STAMPINI DUARTE MARTINO, H.; NATALI, A. J. Does aerobic exercise associated with tryptophan supplementation attenuates hyperalgesia and inflammation in female rats with experimental fibromyalgia? **PLOS ONE**, v. 14, n. 2, p. e0211824, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211824>
- RODRIGUES, A. C. Z.; WANG, Z.; MESSI, M. L.; BONILLA, H. J.; LIU, L.; FREEMAN, W. M.; DELBONO, O. Heart and neural crest derivative 2-induced preservation of sympathetic neurons attenuates sarcopenia with aging. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 12, n. 1, p. 91–108, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12644>
- ROOKS, D. S.; SILVERMAN, C. B.; KANTROWITZ, F. G. The effects of progressive

- strength training and aerobic exercise on muscle strength and cardiovascular fitness in women with fibromyalgia: A pilot study. **Arthritis & Rheumatism**, v. 47, n. 1, p. 22–28, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/art1.10180>
- RUGGIERO, L.; MANGANELLI, F.; SANTORO, L. Muscle pain syndromes and fibromyalgia: the role of muscle biopsy. **Current Opinion in Supportive & Palliative Care**, v. 12, n. 3, p. 382–387, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000355>
- RUIZ, A.; BENUCCI, S.; DUTHALER, U.; BACHMANN, C.; FRANCHINI, M.; NOREEN, F.; PIETRANGELO, L.; PROTASI, F.; TREVES, S.; ZORZATO, F. Improvement of muscle strength in a mouse model for congenital myopathy treated with HDAC and DNA methyltransferase inhibitors. **eLife**, v. 11, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.73718>
- RYALL, J. G.; CHURCH, J. E.; LYNCH, G. S. Novel role for β -adrenergic signalling in skeletal muscle growth, development and regeneration. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 3, p. 397–401, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05312.x>
- RYALL, J. G.; LYNCH, G. S. The potential and the pitfalls of β -adrenoceptor agonists for the management of skeletal muscle wasting. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 120, n. 3, p. 219–232, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.06.003>
- RYALL, J. G.; SCHERTZER, J. D.; LYNCH, G. S. Attenuation of Age-Related Muscle Wasting and Weakness in Rats After Formoterol Treatment: Therapeutic Implications for Sarcopenia. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 62, n. 8, p. 813–823, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/gerona/62.8.813>
- SALAFFI, F.; FARAH, S.; DI CARLO, M. Force-time curve features of handgrip strength in fibromyalgia syndrome. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3372, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60227-8>
- SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 23, p. 160–170, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2007>
- SATO, S.; SHIRATO, K.; KIZAKI, T.; OHNO, H.; TACHIYASHIKI, K.; IMAIZUMI, K. Effects of β 2-agonists and exercise on β 2-adrenergic receptor signaling in

- skeletal muscles. **The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine**, v. 1, n. 1, p. 139–144, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.7600/jpfsm.1.139>
- SCHLERETH, T.; BIRKLEIN, F. The Sympathetic Nervous System and Pain. **NeuroMolecular Medicine**, v. 10, n. 3, p. 141–147, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12017-007-8018-6>
- SENNA, E. R.; DE BARROS, A. L. P.; SILVA, E. O.; COSTA, I. F.; PEREIRA, L. V. B.; CICONELLI, R. M.; FERRAZ, M. B. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The Journal of rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594–7, 2004. Disponível em: <https://doi.org/14994410>
- SHARMA, N. K.; RYALS, J. M.; LIU, H.; LIU, W.; WRIGHT, D. E. Acidic Saline-Induced Primary and Secondary Mechanical Hyperalgesia in Mice. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 12, p. 1231–1241, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.04.014>
- SIECZKOWSKA, S. M.; VILARINO, G. T.; DE SOUZA, L. C.; ANDRADE, A. Does physical exercise improve quality of life in patients with fibromyalgia? **Irish Journal of Medical Science (1971 -)**, v. 189, n. 1, p. 341–347, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11845-019-02038-z>
- SILVA, R. L.; CASTANHEIRA, F. V.; FIGUEIREDO, J. G.; BASSI, G. S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; CUNHA, T. M.; KANASHIRO, A. Pharmacological Beta-Adrenergic Receptor Activation Attenuates Neutrophil Recruitment by a Mechanism Dependent on Nicotinic Receptor and the Spleen. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1405–1413, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0372-9>
- SILVEIRA, W. A.; GONÇALVES, D. A.; GRAÇA, F. A.; ANDRADE-LOPES, A. L.; BERGANTIN, L. B.; ZANON, N. M.; GODINHO, R. O.; KETTELHUT, I. C.; NAVEGANTES, L. C. C. C. Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 1, p. 11–19, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01055.2013>
- SISTO, S. A.; TAPP, W.; DRASTAL, S.; BERGEN, M.; DEMASI, I.; CORDERO, D.; NATELSON, B. Vagal tone is reduced during paced breathing in patients with the chronic fatigue syndrome. **Clinical Autonomic Research**, v. 5, n. 3, p. 139–143, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01826195>

- SLUKA, K. A.; CLAUW, D. J. Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. **Neuroscience**, v. 338, p. 114–129, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.006>
- SLUKA, K. A.; DEACON, M.; STIBAL, A.; STRISSEL, S.; TERPSTRA, A. Spinal blockade of opioid receptors prevents the analgesia produced by TENS in arthritic rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 289, n. 2, p. 840–6, 1999.
- 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, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1097-4598\(200101\)24:1<37::AID-MUS4>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-4598(200101)24:1<37::AID-MUS4>3.0.CO;2-8)
- SLUKA, K. A.; PRICE, M. P.; BREESE, N. M.; STUCKY, C. L.; WEMMIE, J. A.; WELSH, M. J. Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. **Pain**, v. 106, n. 3, p. 229–239, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(03\)00269-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(03)00269-0)
- SLUKA, K. A.; RASMUSSEN, L. A. Fatiguing exercise enhances hyperalgesia to muscle inflammation. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 188–197, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.07.001>
- SOUSA, T.; DE OLIVEIRA, F.; COSTA, D. C.; SOUTO, N. R.; DESANTANA, J. (323) Effects of peripheral joint mobilization on nociception and motor activity in experimental model of musculoskeletal pain. **The Journal of Pain**, v. 16, n. 4, p. S56, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2015.01.241>
- STAUD, R. Heart rate variability as a biomarker of fibromyalgia syndrome. **Future Rheumatology**, v. 3, n. 5, p. 475–483, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/17460816.3.5.475>
- SUAREZ-ROCA, H.; QUINTERO, L.; ARCAYA, J. L.; MAIXNER, W.; RAO, S. G. Stress-induced muscle and cutaneous hyperalgesia: Differential effect of milnacipran. **Physiology & Behavior**, v. 88, n. 1–2, p. 82–87, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.03.010>
- SUTTON, B. C.; OPP, M. R. Acute increases in intramuscular inflammatory cytokines are necessary for the development of mechanical hypersensitivity in a mouse model of musculoskeletal sensitization. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 44, p. 213–220, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.009>

- TANG, Y.-Y. *et al.* Central and autonomic nervous system interaction is altered by short-term meditation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 22, p. 8865–8870, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0904031106>
- TCHIVILEVA, I. E.; LIM, P. F.; SMITH, S. B.; SLADE, G. D.; DIATCHENKO, L.; MCLEAN, S. A.; MAIXNER, W. Effect of catechol-O-methyltransferase polymorphism on response to propranolol therapy in chronic musculoskeletal pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover pilot study. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 20, n. 4, p. 239–248, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328337f9ab>
- THEILEN, N. T.; KUNKEL, G. H.; TYAGI, S. C. The Role of Exercise and TFAM in Preventing Skeletal Muscle Atrophy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 9, p. 2348–2358, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.25737>
- TONGE, D. P.; JONES, S. W.; PARR, T.; BARDSLEY, R.; DOHERTY, M.; MACIEWICZ, R. A. β 2-Adrenergic agonist-induced hypertrophy of the quadriceps skeletal muscle does not modulate disease severity in the rodent meniscectomy model of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 4, p. 555–562, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.11.014>
- VAERØY, H.; QIAO, Z. G.; MØRKRID, L.; FØRRE, O. Altered sympathetic nervous system response in patients with fibromyalgia (fibrositis syndrome). **The Journal of rheumatology**, v. 16, n. 11, p. 1460–5, 1989 a.
- VAERØY, H.; QIAO, Z. G.; MØRKRID, L.; FØRRE, O. Altered sympathetic nervous system response in patients with fibromyalgia (fibrositis syndrome). **The Journal of rheumatology**, v. 16, n. 11, p. 1460–5, 1989 b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2689647>
- VARGAS-ALARCÓN, G. *et al.* Catechol-O-methyltransferase gene haplotypes in Mexican and Spanish patients with fibromyalgia. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 5, p. R110, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/ar2316>
- WAALKES, T. P.; UDENFRIEND, S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. **The Journal of laboratory and clinical**

- medicine**, v. 50, n. 5, p. 733–736, 1957.
- WALDMANN, R.; BASSILANA, F.; DE WEILLE, J.; CHAMPIGNY, G.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M. Molecular Cloning of a Non-inactivating Proton-gated Na⁺ Channel Specific for Sensory Neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 34, p. 20975–20978, 1997 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.20975>
- WALDMANN, R.; CHAMPIGNY, G.; BASSILANA, F.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. **Nature**, v. 386, n. 6621, p. 173–177, 1997 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/386173a0>
- WANG, H.; SORENSON, E. J.; SPINNER, R. J.; WINDEBANK, A. J. Electrophysiologic findings and grip strength after nerve injuries in the rat forelimb. **Muscle & Nerve**, v. 38, n. 4, p. 1254–1265, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mus.20971>
- WOOD, M. Effect of General Anesthesia on Modulation of Sympathetic Nervous System Function. *In: [S. l.: s. n.]*. p. 449–458. *E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60634-1](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60634-1)
- WU, W.-L.; CHENG, C.-F.; SUN, W.-H.; WONG, C.-W.; CHEN, C.-C. Targeting ASIC3 for pain, anxiety, and insulin resistance. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 134, n. 2, p. 127–138, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.12.009>
- WU, Z.; PUIGSERVER, P.; ANDERSSON, U.; ZHANG, C.; ADELMANT, G.; MOOTHA, V.; TROY, A.; CINTI, S.; LOWELL, B.; SCARPULLA, R. C.; SPIEGELMAN, B. M. Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. **Cell**, v. 98, n. 1, p. 115–124, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80611-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80611-X)
- YALCIN, I.; TESSIER, L.-H.; PETIT-DEMOULIÈRE, N.; WALTISPERGER, E.; HEIN, L.; FREUND-MERCIER, M.-J.; BARROT, M. Chronic treatment with agonists of β 2-adrenergic receptors in neuropathic pain. **Experimental Neurology**, v. 221, n. 1, p. 115–121, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.10.008>
- YOKOYAMA, T.; LISI, T. L.; MOORE, S. A.; SLUKA, K. A. Muscle Fatigue Increases the Probability of Developing Hyperalgesia in Mice. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 9, p. 692–699, 2007. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jpain.2007.05.008>

YUNUS, M. B.; KALYAN-RAMAN, U. P. Muscle biopsy findings in primary fibromyalgia and other forms of nonarticular rheumatism. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 15, n. 1, p. 115–34, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2644673>

YUNUS, M. B.; KALYAN-RAMAN, U. P.; KALYAN-RAMAN, K.; MASI, A. T. Pathologic changes in muscle in primary fibromyalgia syndrome. **The American Journal of Medicine**, v. 81, n. 3, p. 38–42, 1986. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90872-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90872-7)

ZAMUNÉR, A. R.; BARBIC, F.; DIPOLA, F.; BULGHERONI, M.; DIANA, A.; ATZENI, F.; MARCHI, A.; SARZI-PUTTINI, P.; PORTA, A.; FURLAN, R. Relationship between sympathetic activity and pain intensity in fibromyalgia. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 33, n. 1 Suppl 88, p. S53-7, 2015.

ZOUHAL, H.; JACOB, C.; DELAMARCHE, P.; GRATAS-DELAMARCHE, A. Catecholamines and the Effects of Exercise, Training and Gender. **Sports Medicine**, v. 38, n. 5, p. 401–423, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/00007256-200838050-00004>

APÊNDICE

Material para divulgação da pesquisa nas redes sociais do PROCFIS/UFS



PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Título do trabalho:

**PAPEL DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO NA
REGULAÇÃO DA MASSA MUSCULAR E HIPERALGESIA
EM UM MODELO MURINO DE FIBROMIALGIA**

**Discente: Raquel Prado da Silva
Orientador: Dr. Danilo Lustrino**

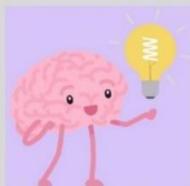


Proposta:

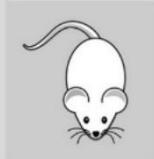
Avaliar a participação do Sistema Nervoso Simpático na regulação da massa muscular e hiperalgesia mecânica em um modelo murino de fibromialgia induzido pela administração intramuscular de solução salina ácida.

FIBROMIALGIA

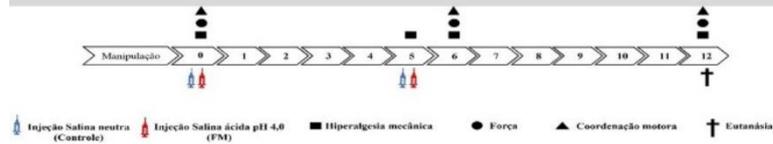
Vários estudos clínicos observaram aumento da hiperalgesia, perda de massa muscular e alteração na atividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS) em pessoas com Fibromialgia...



Então, procuramos entender a relação entre o desenvolvimento da dor e da atrofia muscular utilizando um modelo animal de fibromialgia e investigamos o possível papel do SNS na regulação destes parâmetros.



Administramos duas injeções de salina ácida via intramuscular e unilateral nas ratas para indução de um modelo de fibromialgia experimental



Realizamos avaliações de:

✓ hiperalgesia mecânica; →



✓ coordenação motora; →



✓ e força muscular. →



OS ANIMAIS COM INDUÇÃO DA FIBROMIALGIA APRESENTARAM:

→ Redução do limiar de retirada da pata (aumento da hiperalgesia mecânica).

→ Diminuição da força muscular, mas sem alteração na coordenação motora.

→ Redução da massa muscular e aumento da degradação de proteínas musculares.

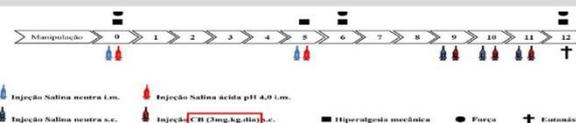
→ Diminuição na concentração plasmática de adrenalina e de noradrenalina muscular.

O modelo de indução de fibromialgia nas ratas está confirmado já que estes parâmetros são similares em indivíduos fibromiálgicos, ratificando a alteração do SNS durante a Fibromialgia.

Já que observamos diminuição da atividade simpática nos animais com fibromialgia, decidimos avaliar se a estimulação deste sistema era capaz de atenuar a dor e a atrofia muscular nestes animais.



De forma similar ao protocolo anterior, administramos duas injeções de salina ácida para indução da fibromialgia e tratamos os animais com Clombuterol (CB, um medicamento com ação similar à adrenalina e noradrenalina).

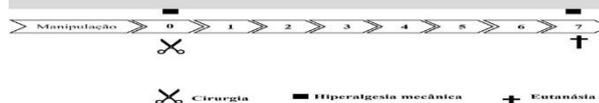


OS ANIMAIS FIBROMIÁLGICOS TRATADOS COM CB APRESENTARAM:

- Redução da hiperalgesia mecânica e aumento na força muscular.
- Aumento da massa muscular e redução da degradação de proteínas musculares.



Para investigar a participação da adrenalina plasmática no desenvolvimento dos sinais clínicos descritos anteriormente (hiperalgesia e atrofia muscular), animais normais foram submetidos à cirurgia de adrenalectomia (ADM), para depleção da adrenalina circulante.



OS ANIMAIS ADM APRESENTARAM:

- Redução do limiar de retirada de pata (aumento da hiperalgesia mecânica).
- Redução da massa muscular e aumento da degradação proteínas musculares.

Os animais adm manifestaram vários sintomas de indivíduos fibromiálgicos, indicando que a diminuição da concentração plasmática de adrenalina está envolvida, pelo menos parcialmente, no desenvolvimento da fibromialgia.



PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Em síntese, nosso estudo ajudou a esclarecer que a redução da atividade do SNS em modelo animal de fibromialgia está associada a hiperalgesia e atrofia muscular esquelética. Além disso, indicam que possíveis abordagens terapêuticas que aumentam a atividade do SNS, no futuro, possam ser utilizadas para tratar pacientes com fibromialgia.

<http://www.posgraduacao.ufs.br/procfis>

ANEXO



**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “ REGULAÇÃO DA MASSA MUSCULAR ESQUELÉTICA EM UM MODELO MURINO DE FIBROMIALGIA” registrada no sistema CEUA com o nº **5673050522**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Danilo Lustrino Borges** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 25/11/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 12/2022 Término: 12/2025
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos
Nº de animais	276
Peso/Idade	50 a 60 g / 22 a 24 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério da Universidade Federal de Sergipe

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSEMAR SENA BATISTA
Data: 06/12/2022 16:51:58-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária “Prof. Aloísio de Campos”
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606