



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

SOLANO SÁVIO FIGUEIREDO DOURADO

**EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL,
ASSOCIADO OU NÃO A ATIVIDADE FÍSICA, NAS
FUNÇÕES NOCICEPTIVA, AMBULAÇÃO E CONTROLE
MOTOR EM MODELO ANIMAL DE DOR CRÔNICA
MUSCULAR DIFUSA**

SÃO CRISTÓVÃO

2015

SOLANO SÁVIO FIGUEIREDO DOURADO

**EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL,
ASSOCIADO OU NÃO A ATIVIDADE FÍSICA, NAS
FUNÇÕES NOCICEPTIVA, AMBULAÇÃO E CONTROLE
MOTOR EM MODELO ANIMAL DE DOR CRÔNICA
MUSCULAR DIFUSA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josimari Melo de Santana

SÃO CRISTÓVÃO

2015

D739e Dourado, Solano Sávio Figueiredo.
Efeito do enriquecimento ambiental, associado ou não a atividade física, nas funções nociceptiva, ambulação e controle motor em modelo animal de dor crônica muscular difusa / Solano Sávio Figueiredo Dourado; orientador Josimari Melo de Santana. – São Cristóvão, 2015.
56 f.:il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas)–
Universidade Federal de Sergipe, 2015.

1. Fibromialgia. 2. Dor crônica. 3. Exercícios físicos. I. Santana, Josimari Melo de, orient. II. Título.

CDU 616.8-009.7

SOLANO SÁVIO FIGUEIREDO DOURADO

**EFEITO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL,
ASSOCIADO OU NÃO A ATIVIDADE FÍSICA, NAS
FUNÇÕES NOCICEPTIVA, AMBULAÇÃO E CONTROLE
MOTOR EM MODELO ANIMAL DE DOR CRÔNICA
MUSCULAR DIFUSA**

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.

Presidente da banca: Prof.^a Dr^a Josimari Melo de Santana

1º Examinador: Prof.^o Dr^o Eduardo Seixas Prado

2º Examinador: Prof.^o Dr^o Luis Felipe Souza da Silva

À minha mãe, Lirany, por todos os adjetivos que não cabem nestas linhas. Pelo amor e cuidado que me fizeram e farão escolher este caminho. Sou grato e honrado por ser seu filho e agradecer já não contempla tamanho mérito, seu mérito mãe, no zelo e compromisso de uma força inabalável e uma resistência qual devo sempre referenciá-la. Te amo demais, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À minha guerreira mãe (Lirany) que numa vida de intensas dificuldades, escolheu se firmar no suor do trabalho emancipador, na esperança por dias melhores, no sentimento de ética, no caráter, no amor, no cuidado, no compromisso e no respeito. Reafirmo-me na tua contemplação, no seu/nosso/meu sorriso. É muito mais sua que minha essa conquista, te amo demais.

Ao meu “**paidrasto**” (Epitácio), pelo amor construído, pelo exemplo de responsabilidade, sinceridade e de lealdade aos rumos mais dignos de uma vida plena. Sou muito do reflexo da tua presença em nossas vidas, o meu sincero e eterno agradecimento que não cabe em nenhuma palavra. Eu te amo muito.

Às minhas irmãs maravilhosas, (Tábata, Jordânia e Nina). Somos parceiros de vida, e juntos, nas vias potentes de um sentimento altero me firmo e me reconheço na partilha que atinge cada sorriso ou cada lágrima. Amo vocês.

A meu cunhado Israel, pelo cuidado, compromisso e seriedade que o acompanha e tanto soma em nossa família.

A Pedro, Joaquim e Victor Gabriel. Presentes encantadores que alimentam minh'alma e me traz gosto de vida. Titio/padrinho ama muito vocês.

Ao meu amor escolha, Juliana, que me faz mais capaz, mais disposto, mais realizado, mais contemplado, mais firme, uma pulsão renovadora e fincada de emoção, que faz deste encontro, o mais lindo da minha vida. Amo-te muito minha flor.

Aos meus avós, Firmício (*in memorian*) e Francisca, símbolos luta, de resistência, de caráter, de amor e de coletividade. Um neto que honra de ter um “FIGUEIREDO” no nome e que assim como na mente e na alma, sempre os trarei comigo.

Ao meu querido pai (Herculano), aos meus avós (Flora e Osiel) e todos os meus familiares paternos.

A todos tios Rei, Lindô, Hermes, Flores, Bena, Zé (*in memorian*), Lau, Dida, Fia, Nice, assim cada um com sua parcela, com a sua singularidade, são grandezas que agem diretamente nas possibilidades e na realização deste projeto, como parte de mim e de tudo que seja significativa. Amo vocês, assim como todos os primos e primas.

Aos muitos amigos, pela completude de bons encontros, em especial Cléber, Thassya, Acácia, Iargo, Roberto, Carla, Marcus, Amanda e Adle. Sentir vocês me faz sentir bem comigo, com tudo que prezo para uma vida plena, coletiva e cheia de sabor. Pela parceria, pelo cuidado, pelas aventuras, pelas realizações e pelo afeto genuíno.

Ao LAPENE, pela seriedade e pelo compromisso ético nos rumos da ciência, num ambiente de trabalho sempre potente e muito receptivo. Mais especificamente aos que tive a honra de trabalhar mais de perto: Fernanda, Diogo, Thiago, Lucas, Felipe.

À minha querida Orientadora Josimari, pela parceria, pelo cuidado da orientação que transcende as vias formais da academia e atinge a complexidade da vida.

Ao GELC, meu grupo eterno de pesquisa e de vivência. A significação que foi possível me deu uma escuta e uma postura mais efetiva para a vida.

À minha querida Rosana, orientadora, parceira, amiga, conselheira, exemplo de ética e de compromisso com a formação. Serei eternamente grato, assim, me orgulha muito ser uma de suas “meninas”. Da tua presença, dias melhores, sorrisos leves, trabalho significativo, emancipador e motivador, e assim, reverberações esplêndidas são construídas.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, mais especificamente ao Prof^o Daniel Badaue, Prof^o Enilton Camargo e a Renivan Souza, pelo cuidado e empenho no bom funcionamento do programa.

Aos professores Luis Felipe e Eduardo Seixas por aceitarem o convite em compor a banca de avaliação deste trabalho, por compartilharem e acrescentarem às nossas indagações.

A todos vocês, o mérito, o sabor e a partilha desse momento “nosso”.

RESUMO

A fibromialgia é uma síndrome complexa, com etiologia indefinida, caracterizada pela presença de dor musculoesquelética crônica generalizada, tendo, como uma das principais comorbidades, a redução do desempenho físico/funcional. O tratamento farmacológico da fibromialgia apresenta efetividade limitada, tornando importante a utilização de terapias não farmacológicas, destacando-se a atividade física (AF), terapia cognitivo-comportamental e técnicas distratoras. A qualificação do ambiente e a AF tem sido associadas ao tratamento de doenças que aumentam a atividade nociceptiva periférica e central. Assim, o presente estudo propõe a investigação do enriquecimento ambiental (EA), técnica baseada em estimulação física, sensorial e cognitiva, e indução à atividade física (AF) voluntária como recursos para prevenção da fibromialgia em um modelo experimental. Para isso, 24 ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: (1) EA, (2) AF, (3) EA + AF e (4) controle, mantidos nesses protocolos por 4 semanas. Após este período, foi induzida dor muscular crônica difusa através de dupla injeção de salina ácida no músculo gastrocnêmio esquerdo. Foram avaliados o limiar mecânico de retirada da pata (von Frey eletrônico), limiar térmico (Hot Plate), atividade neuromuscular (Rota Rod), ambulação (nº de quadrantes) através do Campo Aberto, em seis momentos: basal, após a 1ª, 2ª, 3ª e 4ª semanas e 24 horas após indução do modelo de dor crônica difusa. Os animais mantidos com enriquecimento ambiental e atividade física (EA+AF) apresentaram aumento significativo do limiar mecânico e da latência térmica a partir da terceira ($P<0,001$) e segunda ($P<0,002$) semanas, respectivamente, quando comparado aos outros grupos. Esse aumento se manteve no momento pós-indução, enquanto nos outros grupos houve uma redução significativa ($P<0,02$), sugerindo o desenvolvimento de hiperalgesia. Já no teste motor, o grupo EA+AF apresentou aumento significativo na atividade neuromuscular a partir da primeira semana quando comparado aos outros grupos ($P<0,01$), mantendo esse aumento mesmo após a indução, enquanto nos outros grupos houve uma redução significativa ($P<0,02$). No Campo Aberto, houve aumento significativo na ambulação total no grupo EA+AF a partir da 1ª semana ($P<0,01$) em comparação aos demais grupos. Esses resultados sugerem a associação entre o enriquecimento ambiental e a atividade física como uma estratégia preventiva da dor musculoesquelética crônica e otimização do controle motor em um modelo de dor crônica muscular difusa.

Descritores: Fibromialgia, Dor, Hiperalgesia, Ambiente Enriquecido, Atividade Física.

ABSTRACT

Fibromyalgia is a complex syndrome with unknown etiology, characterized by the presence of chronic widespread musculoskeletal pain, having the reduction of the physical/ functional performance as a major comorbidity. Pharmacological treatment of fibromyalgia presents limited effectiveness, making it important to use non-pharmacological therapies, such as physical activity, cognitive behavioral therapy and distracting techniques. The qualification of the environment and the AF has been associated with the treatment of conditions that increase the peripheral and central nociceptive activity. This study proposes the investigation of environmental enrichment (EE), a technique based on physical, sensory and cognitive stimulation, and physical activity (PA) as strategies for fibromyalgia prevention. To this end, 24 male Wistar rats were divided into five intervention groups: 1) EE, 2) PA, 3) EE + PA and 4) control, where they were maintained for 4 weeks. After this time, was diffuse chronic muscle pain induced by two injections of acidic saline in the left gastrocnemius muscle. We evaluated the mechanical paw withdrawal threshold (von Frey electronic), temperature threshold (Hot Plate), neuromuscular activity (Rod Route), ambulation (number of quadrants) through the Open Field in six stages: basal after the 1st, 2nd, 3rd and 4th weeks and 24 hours after induction of diffuse chronic pain model. The animals kept with environmental enrichment and physical activity (EE + PF) showed a significant increase in mechanical and thermal thresholds after the third ($P<0.001$) and second ($P<0002$) weeks, respectively, when compared to the other groups. This increase remained at the post-induction assessment, while the other groups showed a significant decrease ($P<0.01$), suggesting the development of hyperalgesia. In the engine testing, EA + FA group showed a significant increase in neuromuscular activity from the first week compared to the other groups ($P<0.01$), keeping the increase even after induction, while in the other groups there was a significant decrease in performance ($P<0.01$), whereas in other groups, there was a significant reduction in weight gain ($P<0.01$). In the Open Field, a significant increase in the total ambulation in AE + AF group from the 1st week ($P<0.01$) compared to the other groups. These results suggest an association between environmental enrichment and physical activity as a preventive strategy for chronic musculoskeletal pain and optimization of motor control in a model of diffuse chronic muscle pain.

Keywords: Fibromyalgia, Pain, Hyperalgesia, Enriched Environment, Physical Activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Grupos de estudo (Arquivo LAPENE)
- Figura 2** Von Frey Eletrônico (Arquivo LAPENE).
- Figura 3** Hot Plate (Imagem demonstrativa).
- Figura 4** Rota Rod (Arquivo LAPENE).
- Figura 5** Campo Aberto (Imagem demonstrativa).
- Figura 6** Delineamento experimental.
- Figura 7** Limiar mecânico de retirada da pata.
- Figura 8** Latência térmica.
- Figura 9** Atividade neuromuscular.
- Figura 10** Ambulação total (nº de quadrantes).
- Figura 11** Ambulação periférica (nº de quadrantes).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Colégio Americano de Reumatologia
AF	Atividade Física
AMP_c	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol -propiónico
ANOVA	Análise de variância
ASIC	Canais Iônicos Sensíveis a Ácidos
BBB	Basso, Beatie and Beresnahan
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CGRP	Peptídeo regulador do gene da calcitonina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTRL	Controle
D	Dia
EA	Enriquecimento Ambiental
EUA	Estados Unidos da América
FM	Fibromialgia
GABA	Ácido gama aminobutírico
NMDA	N-metil-D-aspártico
NGF	Nerve Grow Factor
OFT	Open Field Test
p	Nível de significância
RPM	Rotações por Minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TSH	Tirotropina
5- HT	Serotonina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 ASPECTOS TEÓRICOS	5
3.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA FIBROMIALGIA	5
3.2 FISIOPATOLOGIA DA FIBROMIALGIA	7
3.3 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	10
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 ANIMAIS	15
4.2 INDUÇÃO DA DOR MUSCULAR CRÔNICA DIFUSA	15
4.3 GRUPOS DE ESTUDO	15
4.4 MÉTODOS DE MENSURAÇÃO	16
4.4.1 Avaliação Nociceptiva	17
4.4.1.1 Mensuração da Sensibilidade Mecânica Cutânea	17
4.4.1.2 Mensuração Da Hiperalgisia Térmica	18
4.4.2 Avaliação da Função Motora	18
4.4.2.1 Teste de Equilíbrio	18
4.4.2.2 Campo Aberto	19
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
5 RESULTADOS	22
5.1 SENSIBILIDADE MECÂNICA CUTÂNEA	22
5.2 HIPERALGESIA TÉRMICA	22
5.3 ATIVIDADE NEUROMUSCULAR	23
5.4 AMBULAÇÃO	24
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1 - INTRODUÇÃO

A fibromialgia (FM), considerada uma síndrome de dor crônica, com etiologia indefinida, se caracteriza pela presença de dor (não inflamatória) músculo-esquelética generalizada em consequência a vários fatores que sensibilizam o sistema nervoso central (SNC). Outra característica da fibromialgia é a presença de pontos dolorosos sensíveis à palpação muscular (*tender-points*). Demais sintomas comuns nesta doença são distúrbio do sono, aumento do estresse oxidativo, rigidez dos músculos e das articulações, dentre outros que reduzem a qualidade de vida de indivíduos afetados, que varia de 1% a 4% da população geral em países industrializados (BUSCH et al., 2011; CHUNG et al., 2009; CORDEIRO et al., 2010).

As hipóteses elaboradas na discussão da fisiopatologia da dor crônica generalizada apontam a disfunção muscular, a somatização temporal, hipersensibilização central e déficit nos sistemas endógenos que modulam a dor como os principais fatores envolvidos. Outras hipóteses apontam que estes pacientes apresentam um aumento nas concentrações de substância P e fator de crescimento neuronal, além da redução nos níveis de serotonina, o que conduz a potencialização da sensibilidade central e a redução da inibição central (DESANTANA e SLUKA, 2008; GIOVENGO et al., 1999; JULIEN et al., 2005).

A dor crônica, descrita acima, potencializa o risco de sintomas de ansiedade e depressão, como comorbidades. Assim, na Fibromialgia (FM), ansiedade e depressão são transtornos comuns e potencialmente severos, podendo atingir até 80% dos fibromiálgicos (WHITE et al., 2002; FIETTA e MANGANELLI, 2007; BOYER et al., 2009).

Neste contexto, a FM deve ser discutida em sua complexidade e heterogeneidade, de modo que se articulem à disfunção na modulação da dor, outras comorbidades secundárias. Desta forma, a compreensão mais afetiva da FM evidencia a necessidade da problematização de aspectos psicossociais, integrados à avaliação da dor. Estes aspectos estão presentes na correlação entre a redução do desempenho físico/funcional, intensidade de dor, saúde geral, redução da funcionalidade emocional, diminuição da interação social e os transtornos de ansiedade e depressão nos casos de FM (BERBER et al., 2005; SANTOS et al., 2011).

Assim, o tratamento da FM deve assumir uma caracterização clínica complexa, numa abordagem multidisciplinar que pode articular aspectos farmacológicos e não farmacológicos (HEYMANN et al., 2010; CARVILLE et al., 2008; BUCKHARDT et al., 2005).

A terapia farmacológica para a FM busca, de modo geral, reduzir a ação de neurotransmissores estimulantes, como o glutamato (gabapentinoides) e potencializar a ação de neurotransmissores que inibem o sistema nervoso central, como noradrenalina, serotonina e ácido gama-aminobutírico (compostos tricíclicos e inibidores da receptação da serotonina e da noradrenalina) (DANIEL e CLAUW et al., 2014; WIFFEN, et al., 2013). Vale ressaltar que a terapia farmacológica para a FM atende efetivamente a uma pequena parcela da população afetada e os estudos mostram que falta evidência científica que possibilite respostas pragmáticas fundamentais, sobre qual fármaco deve ser priorizado, para qual paciente e em que ordem esses medicamentos devem ser administrados (DANIEL e CLAUW et al., 2014; WIFFEN, et al., 2013; HARRIS, 2010; HARRIS et al., 2013; KROENKE, KREBS e BAIR, 2009).

Já as terapias não farmacológicas (terapia educacional ou terapia cognitivo-comportamental, hidroterapia, estimulação por correntes elétricas e exercício físico) têm, como principal objetivo, os benefícios no desempenho funcional dos pacientes com FM (DANIEL e CLAUW et al., 2014; WILLIAMS et al., 2002). Em muitas situações, a terapia não farmacológica é mais efetiva que a terapia farmacológica. Vale ressaltar que existem limitações quanto a implementação das terapias não farmacológicas na prática clínica, como a falta de acesso, adesão e aderência dos pacientes aos procedimentos utilizados, além da falta de evidência dos estudos e baixo rigor metodológico, que limita a inclusão de pesquisas na discussão do tratamento da FM (DANIEL e CLAUW et al., 2014; WILLIAMS et al., 2002; GOLDENBERG et al., 2004; MIST et al., 2013).

Dentre os recursos não farmacológicos, a atividade física representa uma proposta capaz de reduzir vários sintomas na FM como intensidade de dor, ansiedade/depressão, distúrbios do sono, fadiga muscular, redução de pontos dolorosos. Em conjunto, a atividade física pode agir beneficiando os pacientes que apresentam redução no desempenho funcional, correlacionada a fatores psicossociais, trazendo benefícios à qualidade de vida. Vale ressaltar que ainda não existe, na literatura pesquisada, uma padronização que especifique a proposta (tipo

de atividade, intensidade e frequência de utilização) aos possíveis resultados (ASSIS, et al, 2003; VALIM, et al, 2003; VALIM, 2006).

Neste contexto, dada a complexidade fisiopatológica e a heterogeneidade da população afetada, faz-se necessário ampliar as possibilidades de tratamento para FM, visto que ainda não existe um procedimento terapêutico que atenda, efetivamente, todas as necessidades dos pacientes. Ainda faltam evidências que justifiquem as diferentes respostas (ou ausência de respostas) dos pacientes às diferentes terapias propostas para o manejo da dor e para os demais sintomas da FM.

Existem, na literatura, modelos animais que buscam mimetizar a fibromialgia, respaldados em suas manifestações fisiopatológicas. Um dos modelos reproduz a dor crônica muscular, baseado no pressuposto de que a redução do pH aumenta a atividade dos nociceptores e produz uma resposta dolorosa em humanos. Deste modo, utiliza-se uma dupla injeção de solução ácida no músculo gastrocnêmio capaz de produzir hiperalgesia no local ou próximo da região da infusão, assim como em regiões mais distantes (LAW et al., 2008; DESANTANA e SLUKA, 2008).

Ao pensarmos a fisiopatologia da FM (aspectos sensoriais, funcionais e psicossociais) e as possibilidades de trabalho com animais (modelos que mimetizam a FM), apresentamos o enriquecimento ambiental (EA) neste trabalho reiterando a necessidade de ampliação de possibilidades terapêuticas na FM. Trata-se de um termo muito utilizado em pesquisas com animais que propõe um aumento na estimulação dos aspectos físico e social (atividades física, sensorial e cognitiva). O EA tem mostrado evidências significativas, enquanto ferramenta neuroprotetora, apresentando benefícios no desempenho motor, na aprendizagem, na neuroplasticidade e na modulação sensorial. Vale ressaltar que não foram encontradas pesquisas que apontem a utilização do EA em modelos animais de FM (HENDRIKSEN et al., 2010; VACHON et al., 2013; ROJAS, 2011).

A nossa hipótese é que o EA associado à AF promova efeito profilático na função nociceptiva, na ambulação e controle motor no modelo animal de dor crônica difusa.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Investigar os efeitos profiláticos do enriquecimento ambiental, associado ou não à atividade física, nas funções nociceptiva, ambulação e controle motor em modelo animal de dor crônica muscular difusa.

2.2 - Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental em um modelo animal de dor muscular crônica difusa, no(a):

- sensibilidade mecânica cutânea;
- sensibilidade térmica;
- equilíbrio dinâmico;
- deslocamento voluntário;
- Verificar se o possível efeito antinociceptivo provocado pelo enriquecimento ambiental associado à atividade física varia em função do tempo de exposição;
- Comparar os efeitos do enriquecimento ambiental com e sem indução de atividade física voluntária.

3 - ASPECTOS TEÓRICOS

3.1 Caracterização Clínica da Fibromialgia

A FM está presente em, aproximadamente, 1% a 4% da população geral em países industrializados, sendo caracterizada, principalmente, por dor generalizada, e muitas vezes acompanhada de fadiga crônica, problemas de memória e distúrbios do sono. Além dos sintomas já mencionados, os pacientes com FM apresentam susceptibilidade a um histórico de ansiedade, depressão, cefaleia, dismenorreia, disfunção de articulação temporo-mandibular, distúrbios gastrintestinais, cistite intersticial, endometriose e outras síndromes de dor localizadas, principalmente dores nas costas e no pescoço (BUSCH et al., 2011; CHUNG et al., 2009; CORDEIRO et al., 2010).

Os pacientes com FM apresentam redução da qualidade de vida em função das comorbidades associadas ao quadro doloroso. Neste sentido, esta se configura uma população frequente na busca por serviços médicos, de diagnóstico e por terapias analgésicas. Estima-se que, nos EUA, sejam gastos 9.573 US\$ para cada paciente com FM, por ano. O que torna o debate ainda mais significativo, no que tange à busca por procedimentos mais efetivos para o diagnóstico e tratamento, reduzindo gastos desnecessários com exames complementares e medicamentos ineficazes (BERGER et al., 2007; ANNEMANS et al., 2008; HEYMANN et al., 2010).

Os critérios para o diagnóstico da FM foram estabelecidos em 1990, pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR). De início, a dor crônica generalizada e a mensuração dos *tender points* foram colocadas como critérios fundamentais no diagnóstico da FM. Estes critérios foram e continuam úteis para a definição de um grupo padrão para fins acadêmicos e clínicos, porém, por estes critérios não é possível compreender o espectro mais amplo ou natureza complexa e heterogênea da FM (GUYMER e LITTLEJOHN, 2013).

Em 2010, o ACR publicou novos critérios que devem ser considerados para o diagnóstico da FM. Somam-se aos critérios clássicos: presença e severidade para alterações cognitivas, distúrbios de humor, distúrbios de sono, fadiga e número de sintomas somáticos. Ao publicar estes novos critérios, os autores reconheceram que os sintomas da FM podem variar consideravelmente ao longo do tempo e ainda foi possível estabelecer parâmetros de classificação para a gravidade da síndrome. Os

critérios atuais não utilizam os *tender points*, no entanto, contemplam sintomas mais amplos, para além das funções motoras, se tornando mais eficazes na elaboração diagnóstica (WOLFE, et al., 2010; HELFENSTEIN JR et al., 2012).

Na prática clínica, a FM deve ser investigada em pacientes que apresentam dor multifocal, sem lesão ou processo inflamatório. Na maioria dos casos, a dor músculo-esquelética generalizada continua como a característica mais proeminente. Devido à amplificação das vias de modulação da dor, a dor pode ocorrer em qualquer lugar. Consequentemente, dores de cabeça crônicas, dor de garganta, dor visceral e hipersensibilização são muito comuns em pacientes fibromiálgicos (DANIEL e CLAUW, 2014).

Embora alguns dos sintomas da FM possuam baixa acurácia clínica para a determinação diagnóstica, como critérios diferenciais, apresentam alta prevalência. Os distúrbios do sono, por exemplo, podem acometer até 100% da população afetada e possuem uma caracterização variada, desde a indução do sono e despertares até a sensação do sono considerado não restaurador. Como consequência, as alterações no sono resultam em cansaço, déficits cognitivos e aumento da propensão para distúrbios psiquiátricos (HELFENSTEIN JR et al., 2012; COTE e MOLDOFSKY, 1997).

Visto a complexidade da FM, torna-se reducionista analisar os sintomas de dor sem considerar o perfil psicológico dos pacientes fibromiálgicos. Estudos apontam que estes pacientes apresentam altos índices de depressão, apresentam perfil de autocrítica exacerbado e perfeccionismo. Essas características devem ser tomadas em sua amplitude já que resultam na potencialização de todos os sintomas e limitam as possibilidades de tratamento e enfrentamento diante da FM (HELFENSTEIN JR et al., 2012; NORDAHL e STILES, 2007; RAPHAEL et al., 2004).

No que tange ao diagnóstico diferencial, nenhum exame laboratorial específico foi elaborado. Avaliação laboratorial básica, não como prova diagnóstica, pode incluir hemograma completo, bioquímica sérica de rotina, níveis de tirotrópina (TSH), proteína C-reativa e vitamina D, taxa de sedimentação de eritrócitos. Estudos sorológicos, como antinuclear de anticorpos e ensaios de fator reumatóide não são indicados, exceto em situações nas quais existam sinais e sintomas de doença autoimune (DANIEL e CLAUW, 2014).

Uma vez que outros distúrbios da dor são excluídos e todas as fontes de dor periféricas são tratadas, embora ainda haja controvérsias, o diagnóstico de FM pode

ser realizado. Existem questionamentos se a determinação do diagnóstico pode prejudicar o tratamento, outros estudos apontam que o diagnóstico é um fator que potencializa o tratamento, o que evidencia as características da heterogeneidade da população (WHITE, et al., 2002; ANNEMANS et al., 2008; DANIEL e CLAUW, 2014).

3.2 Fisiopatologia da Fibromialgia

A fisiopatologia da FM ainda se configura enquanto campo de conhecimento fundamental. Deste modo, dada a complexidade e a relevância da temática, torna-se necessária uma problematização mais efetiva no que tange à investigação dos mecanismos fisiopatológicos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de novos tratamentos ou ferramentas profiláticas.

A etiologia da FM ainda é desconhecida, porém, vale ressaltar que já existem trabalhos que apresentam os sistemas que estão alterados nos casos de FM. A dor crônica generalizada é o principal sintoma da FM, assim, os trabalhos que se propõe a discutir a fisiopatologia da FM apontam à disfunção dos sistemas endógenos que modulam a dor, disfunções no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e disfunções musculares (DESANTANA, et al, 2013; DESANTANA e SLUKA, 2008).

As alterações fisiopatológicas na FM apresentam uma série de sistemas orgânicos comprometidos. No que tange a modulação da dor destaca-se o aumento do NGF e da substância P e a redução da serotonina, o que leva ao aumento da excitação e à redução da inibição do SNC. Ainda enquanto resposta neurológica à dor, existe uma ampliação central aumentada e uma redução na inibição central. No eixo HPA, existem alterações na regulação do hormônio do crescimento e na resposta de cortisol (DESANTANA, et al, 2013; DESANTANA e SLUKA, 2008; SLUKA, 2009).

As disfunções na modulação central da dor na FM são caracterizadas pela redução dos limiares mecânicos, somatização temporal na estimulação térmica e mecânica, aumento das áreas de dor referida após infusão muscular de solução salina hipertônica (DESANTANA, et al, 2013; DESANTANA e SLUKA, 2008; STAUD, et al, 2001). A infusão de salina ácida (solução tamponada) no musculo tibial anterior produz dor no local da infusão e dor referida em outras regiões do corpo, produzindo hiperalgesia primária e secundária em humanos (DESANTANA e SLUKA, 2008; FREY et al., 2008).

Desta forma, a indução da hiperalgesia envolve mecanismos periféricos, espinhais e supra espinhais. Faz-se necessário a ativação de canais iônicos sensíveis a ácidos (ASIC3) nos músculos aferentes (SKYBA et al., 2005). Vale ressaltar que a indução da hiperalgesia mecânica e térmica envolve mecanismos subjacentes distintos. Para a hiperalgesia térmica são ativados receptores P2Y1 e TRPV1 e já na hiperalgesia mecânica são ativados receptores P2X e ASICs (DESANTANA et al, 2013; SEO et al, 2011).

Pensando os mecanismos centrais, torna-se necessário destacar o envolvimento do tronco encefálico e do córtex para a indução da hiperalgesia. Pensando o tronco encefálico, mais especificamente a porção rostroventromedial do bulbo, durante a segunda injeção ácida ocorre uma potencialização da liberação de neurotransmissores excitatórios que aumentam a estimulação nociceptiva. Assim, a liberação de neurotransmissores excitatórios é um fator fundamental para o desenvolvimento da hiperalgesia (DASILVA et al., 2010).

Embora existam alguns estudos de imagens que apontam evidências a áreas corticais envolvidas disfunção do processamento das informações nociceptivas na FM, ainda não existem informações precisas de quais regiões estariam sendo responsável por este mecanismo (DESANTANA et al., 2013).

A FM pode ser discutida como um estado de dor centralizada que se manifesta em diferentes regiões do corpo. O termo "centralizada" refere-se ao sistema nervoso central, à amplificação ocasionada pelos sistemas que modulam dor. A caracterização do SNC não implica que as aferências nociceptivas periféricas estarão desconsideradas para os pacientes com FM, mas sim que estes pacientes sentem mais dor do que seria normalmente esperado com base no grau de entrada nociceptiva (WILLIAMS e CLAUW, 2009; WOOLF, 2013; DANIEL e CLAUW, 2014).

A caracterização da dor é definida por uma variedade de fatores, incluindo os níveis de neurotransmissores que facilitam a transmissão da dor, ou aqueles que reduzem a transmissão da dor. Esses fatores centrais, também podem estar relacionados à fadiga, memória, humor e distúrbios do sono, já que estes mesmos neurotransmissores que transmitem dor e sensibilidade também exercem ações no controle do sono, humor, memória e estado de alerta (PHILLIPS e CLAUW, 2013; DANIEL e CLAUW, 2014).

A sensibilidade difusa em pacientes com FM objetivou a elaboração de estudos com neuroimagem, pensando a estrutura funcional e biológica dos cérebros

destes pacientes. Nestes estudos pode-se identificar uma base biológica para a dor na FM, resultado da síndrome de amplificação. Estudos de imagem por ressonância magnética funcional do cérebro mostra a ativação cerebral nas áreas de processamento da dor, para estímulo com leve pressão ou estímulos térmicos, que não são referidos como dor para pacientes sem FM (GRACELY et al., 2002; DANIEL e CLAUW, 2014; COOK et al., 2004).

Existem avanços na compreensão do processo fisiopatológico da dor crônica na FM. As principais hipóteses para este processo discutem a disfunção muscular, a sensibilização dos neurônios que transmitem dor (sensibilização central) e o déficit nos sistemas que modulam a dor (EL-METWALLY et al., 2009).

Um estudo realizado na Suécia, com pacientes fibromiálgicos, com o objetivo de descrever a morfologia muscular e os aspectos químicos e fisiológicos, a fim de compreender a origem dos sintomas mais proeminentes da fibromialgia: dor muscular, fadiga muscular e rigidez muscular. Os estudos apresentam alterações da microcirculação, dano mitocondrial e a redução do teor de fosfatos. Desta forma, pode haver um estado de deficiência de energia no músculo dos pacientes com FM. A avaliação da dor reforça a ideia de que há uma origem nociceptiva. Nesta hipótese, uma condição de hipóxia muscular constante, pode ser uma possível causa de dor na FM (BENGTSSON e HENRIKSSON, 1989).

Embora os indivíduos com síndrome da FM relatem consistentemente dor generalizada, faltam evidências de anomalias estruturais ou outras fontes de estimulação crônica de aferentes de dor. Sem provas convincentes para anormalidades do tecido periféricos em pacientes com FM, parece provável que o processo fisiopatológico seja central, como é o caso de muitas condições de dor crônica. Neste sentido, a somação temporal da dor deve ser considerada, já que a percepção sensorial térmica é relatada de magnitude maior em sujeitos com FM, comparado a controle, sem FM (STAUD e RODRIGUEZ, 2006).

Em 2005 foi apresentado um trabalho que discutiu os sistemas inibidores endógenos na FM. Estímulos térmicos foram realizados com somação espacial, com uma sessão ascendente e outra descendente (escala analógica de dor). Para indivíduos saudáveis a dor foi relatada de menor intensidade. Os autores atribuem a este rebaixamento da curva de percepção, o recrutamento total de sistemas inibitórios no início da sessão descendente, em oposição a um recrutamento gradual durante a sessão ascendente. Os resultados suportam a hipótese que existe um

déficit sistemas inibidores endógenos na fibromialgia (JULIEN et al., 2005).

3.3 Enriquecimento Ambiental

O conjunto de ferramentas não farmacológicas utilizadas no tratamento da FM apresentam uma variedade significativa de propostas, entre as quais se inserem atividade física, estimulação por corrente elétrica, hidroterapia e terapia cognitivo comportamental, entre outras. Estas propostas são utilizadas com um intuito direcionado à redução da transmissão nociceptiva associado a benefícios funcionais, afetivo-motivacionais, que agem na qualidade de vida dos pacientes (DANIEL et al., 2011; MIST et al., 2013).

As terapias não farmacológicas devem ser melhor investigadas no tratamento da FM, dada ausência de evidencia científica significativa e a complexidade fisiopatológica dos mecanismos envolvidos, que não permitem a utilização de um procedimento único, enquanto ideal. Neste sentido, as possibilidades de tratamento da FM devem discutir aspectos afetivo-motivacionais, desempenho funcional e mecanismos de modulação nociceptiva, ao passo que evidencia a necessidade da contemplação mais ampla, que atenda à contingência bio-psico-social (ABLIN et al., 2013).

Pensar possibilidades de tratamento para a fibromialgia, enquanto um processo patológico complexo com inter-relações neurofisiológicas evidencia a necessidade de expandirmos o constructo teórico que discute as estratégias neuroprotetoras. Dentre tais estratégias, apresentaremos, neste trabalho, as ferramentas que compõem o enriquecimento ambiental.

É pertinente apontar que a especificidade do desenvolvimento neurológico, a formação e a maturação neuronal, estão ligadas à estimulação ambiental. Neste sentido, discute-se a correlação positiva entre fatores neurais morfológicos (densidade e peso do cérebro) e fatores neurofuncionais, como número de sinapses, com a amplitude e diversificação da estimulação ambiental. De tal modo, a complexidade do desenvolvimento neurológico estaria intimamente relacionada com a complexidade do ambiente (CRUZ e LANDEIRA-FERNADEZ, 2007).

A evolução estático-motora humana é condicionada por padrões genéticos e por estímulos ambientais (FLEHMIG, 1987). Neste sentido, o desenvolvimento motor provém de uma adaptação efetiva aos estímulos do ambiente externo, de modo que se entrelaçam fatores psicológicos, ambientais e fisiológicos. Dada a constatação

anterior, é pertinente destacar que os estímulos ambientais têm sido amplamente utilizados pelos profissionais da saúde enquanto aliados nos processos de reabilitação neurofuncional (TECKLIN, 2002).

O ambiente considerado enriquecido, em termos de estimulação externa, possui um conjunto de atividades que visam reverter as condições tediosas e estressantes que os animais em cativeiro estão condicionados, pois o ambiente que não fornece estimulação adequada reduz a complexidade à medida que aumenta a previsibilidade das situações. Desta forma, essas atividades (ambiente enriquecido) atendem a uma demanda psicológica e etológica dos animais (PEREIRA et al., 2009).

Tipicamente o enriquecimento ambiental é composto por estímulos que propõem atividade física, testes de aprendizagem, interação social e experiências sensoriais simultaneamente (PEREIRA et al., 2007). Nestas condições, o ambiente possibilita, a nível celular, o aumento da plasticidade neuronal, da neurogênese e da sinaptogênese (DUMAN et al., 2008; PRAAG et al., 2005), da ramificação dendrítica (SINGHAL et al., 2014), de alterações nas concentrações de BDNF (HENDRIKSEN et al., 2010; VACHON et al., 2013).

Os efeitos neurobiológicos do ambiente enriquecido são apresentados no trabalho de Fernández-Teruel et al. (2002), destacando o aumento da atividade de acetilcolinesterase em regiões corticais e subcorticais; aumento da expressão hipocampal para receptores 5 HT1A; redução de receptores β -adrenérgicos ligados ao acúmulo de AMP_c no hipocampo; aumento da expressão hipocampal para fatores de crescimento neural (NGF); aumento do potencial de excitação pós-sináptico no giro denteado; aumento da proteína cinase C no hipocampo; aumento do conteúdo de RNA no cérebro e alterações morfológicas como o aumento na ramificação dendrítica e na densidade neuronal.

Sale et al. (2014) realizaram uma revisão com o objetivo de analisar a influência exercida pelo ambiente externo nos processos de plasticidade cerebral, com atenção especial para os mecanismos celulares e moleculares subjacentes, analisando, inicialmente, os trabalhos realizados com modelos animais para que seja possível deslocar a reflexão para os trabalhos realizados com seres humanos. Os autores discutem a capacidade do enriquecimento ambiental e do exercício físico para fortalecerem a plasticidade do cérebro adulto e reconhecem o crescente conhecimento disponível sobre os efeitos desencadeados pelas condições de vida

sobre os processos fisiológicos e patológicos no envelhecimento cerebral.

Em outra revisão, que aborda a mesma temática, autores descrevem a influência do ambiente enriquecido na neurogênese e o impacto do ambiente enriquecido no cérebro danificado, bem como as possibilidades de utilização do paradigma do ambiente enriquecido para a reabilitação neurológica (KOMLEVA et al., 2013). Os mecanismos moleculares da transmissão sináptica, que possuem correlação com o desempenho das funções cognitivas, são o possível alvo para a ação de fatores ambientais no cérebro sob condições fisiopatológicas. Existem avanços na compreensão dos mecanismos que mediam os efeitos do ambiente enriquecido no cérebro, mas ainda há muitas questões não resolvidas na neuroquímica e neurobiologia desse fenômeno. Assim, a neuroplasticidade induzida pelo ambiente enriquecido é um mecanismo fundamental para o desenvolvimento e recuperação das funções cerebrais e abre novas perspectivas em neurofarmacologia e reabilitação neurológica (ALWIS e RAJAN, 2014; KOMLEVA et al., 2013).

Vanchon et al. (2013) apresentaram um estudo que tinha como objetivo avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental num modelo animal de dor neuropática crônica. Neste estudo, os autores mensuraram hipersensibilidades mecânica e térmica, coordenação motora, comportamentos como ansiedade e depressão e expressão de neuropeptídeos pró-nociceptivos (substância P e peptídeo regulador do gene da calcitonina - CGRP). Como resultado, o enriquecimento ambiental atenuou as hipersensibilidades mecânica e térmica, bem como diminuiu as concentrações de substância P e de CGRP, mas não promoveu efeitos antidepressivos ou ansiolíticos nos animais neuropáticos.

Gabriel et al. (2010) também discutiram o enriquecimento ambiental, tendo como objetivo a comparação entre os efeitos do enriquecimento social (aumento da interação social) e físico (condições estruturais) na dor inflamatória. Para tal, utilizaram um modelo animal de inflamação induzida por carragenina no joelho de ratos. Neste estudo, os aspectos físicos e sociais do ambiente se mostraram envolvidos na redução da duração da hiperalgesia inflamatória, embora o enriquecimento físico (sem indução de atividade física) apresentou um efeito mais significativo. Vale ressaltar que os efeitos do ambiente enriquecido tiveram uma relação de interdependência entre os aspectos sociais e físicos.

Em outro estudo, avaliou-se o efeito da dor crônica na neurogênese do hipocampo induzida pelo enriquecimento ambiental. Neste estudo, foi reproduzido

um modelo de dor neuropática e os animais foram distribuídos em ambiente enriquecido e em ambiente padrão (sem enriquecimento ambiental) por quatro semanas. O estudo revelou que, sob estas condições, a indução da neurogênese foi suprimida nos animais com dor crônica neuropática. Estes resultados sugerem que a dor crônica tem efeitos moduladores danosos, como estresse, na neurogênese do hipocampo (TERADA et al., 2008).

Algumas propostas tentam explicar, a nível molecular, os efeitos do enriquecimento ambiental nos mecanismos nociceptivos. Como mencionado anteriormente, estudos apontam níveis elevados de BDNF no SNC após enriquecimento ambiental ou exercício físico. Além de estimular a neurogênese, o BDNF modula os níveis cerebrais e medulares de neuropeptídeos envolvidos na regulação da nocicepção, incluindo peptídeos opióides endógenos e substância P. A neuroplasticidade condicionada pelos BDNF medeia os efeitos antinociceptivos, de modo que a concentração de substância P e de CGRP é expressivamente reduzida em animais com ambiente enriquecido (MARLATT et al., 2012; VANCHON et al., 2013; SIUCIAK et al., 1995).

Como informado anteriormente, o ambiente enriquecido apresenta componentes de estimulação social e física. Neste sentido, é pertinente destacar que estudos clínicos sugerem que o exercício diminui os sintomas de dor em pacientes com dor crônica. Embora a intensidade da atividade física varie entre os estudos, o aumento da atividade física reduz a intensidade de dor em uma ampla variedade de condições clínicas dolorosas, nas quais se incluem lombalgia, osteoartrite e fibromialgia (SMITH e GRIMMER-SOMERS, 2010; CHATZITHEODOROU et al., 2007).

A atividade física também aparece no estudo de Bement e Sluka (2005), que tinha como objetivo determinar os efeitos de exercícios de baixa intensidade na dor crônica muscular difusa e o potencial de ativação do sistema opióide endógeno. Como resultado, a atividade física de baixa intensidade aumentou o limiar de hiperalgesia mecânica através da ativação do sistema opióide endógeno, o que pôde ser evidenciado pela utilização de naloxona (antagonista opióide) que atenuou os efeitos anti-hiperalgésicos da atividade física de baixa intensidade.

Os efeitos possíveis no trabalho que utiliza as ferramentas do EA associado à atividade são amplos e podem ser transferidos às investigações clínico terapêuticas, visto que esses efeitos variam desde os aspectos

comportamentais/gerais (aprendizagem, memória, massa corpórea, depressão, ansiedade) a aspectos neuroquímicos (atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, níveis de dopamina, acetilcolina, noradrenalina, serotonina, GABA, glutamato, corticosterona, hormônio adrenocorticotrópico, opióides, BDNF, NGF) (SIMPSON e KELLY, 2011).

Os estudos experimentais que discutem as reverberações do enriquecimento ambiental têm aumentado, o que viabiliza a ampliação da aplicabilidade clínico/científica de tal procedimento. Deste modo, os questionamentos que se apresentam tornam possível a transfiguração da efetividade terapêutica do enriquecimento ambiental, à investigação dos efeitos nas funções nociceptiva, controle motor e ansiedade em um modelo animal de dor crônica muscular difusa.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram incluídos neste estudo 24 ratos *Wistar* machos, com dois meses de idade, pesando 250-350 g (Biotério da Universidade Federal de Sergipe), após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal desta Universidade (CEPA/UFS, protocolo nº 39/2010). Os animais foram mantidos num ciclo claro-escuro de 12 h, e todos os testes foram feitos durante o ciclo claro. Temperatura em 22°C, comida e água estiveram disponíveis para os animais *ad libitum*. Todos os procedimentos utilizados estiveram em consonância com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 Indução da dor muscular crônica difusa

Para mimetizar a dor crônica muscular difusa foi utilizado o modelo animal que propõe a aplicação de duas injeções de solução de salina ácida (pH 4,0; 100 µL para cada injeção), administradas com intervalo de cinco dias, sendo aplicadas no músculo gastrocnêmio esquerdo dos ratos. Os animais foram anestesiados com isoflurano vaporizado (2% - 4%). Este é um modelo de dor muscular não-inflamatória capaz de produzir hiperalgesia duradoura sem danos significativos do tecido muscular (BEMENT e SLUKA, 2005).

4.3 Grupos de estudo

O tamanho da amostra foi determinado com base em estudos previamente publicados na área, os quais investigavam efeitos antinociceptivos do enriquecimento ambiental (VACHON et al., 2013; GABRIEL et al, 2010).

Os animais foram distribuídos em 4 grupos de estudo (n=6 por grupo): 1. ambiente enriquecido sem atividade física (AE); 2. ambiente enriquecido com atividade física (AE+AF); 3. atividade física (AF). 4. controle (CTRL), animais mantidos na caixa padrão.

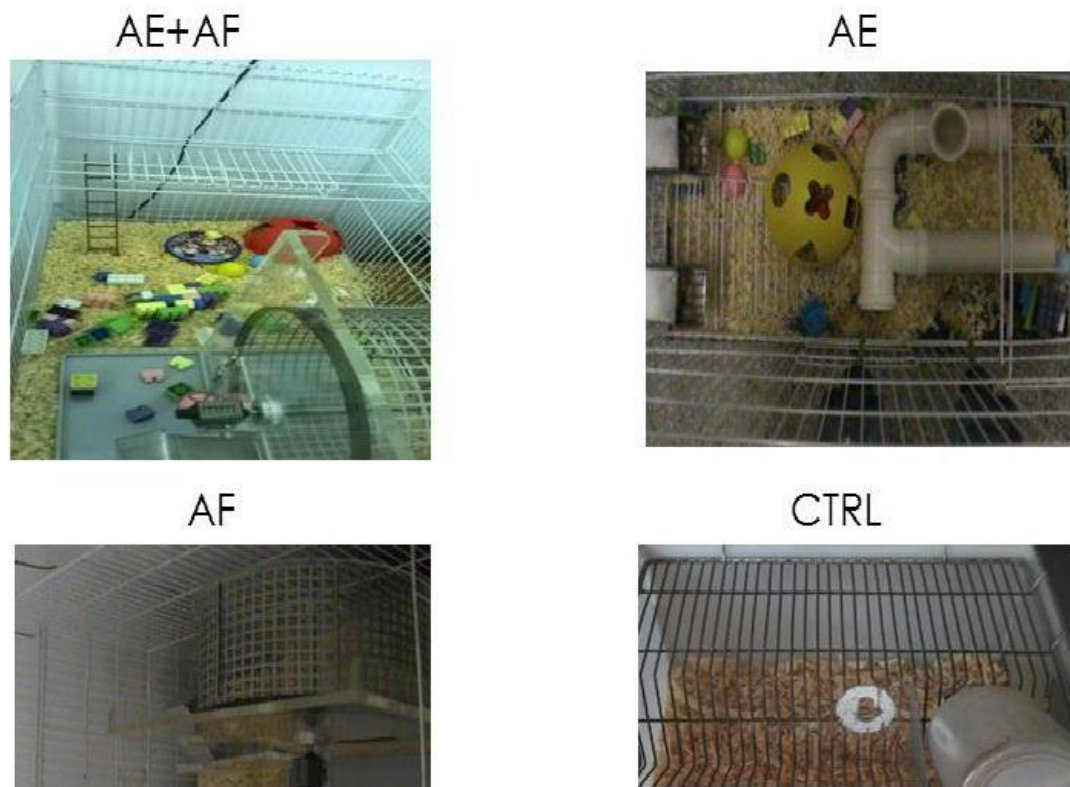


Figura 1. Grupos de estudo (Arquivo LAPENE).

No grupo AE foram realizadas modificações estruturais no ambiente físico, aumentando a área de exploração (100 cm x 40 cm x 60 cm) e inserindo: chocalhos, tubos, abrigos, escadas, objetos de madeira mastigáveis e piso superior na gaiola. O grupo AE+AF recebeu, além das modificações estruturais, uma roda de atividade física. O grupo AF recebeu uma roda atividade, ampliação da área exploração (100 cm x 40 cm x 60 cm) e nenhum objeto externo. E o grupo CTRL permaneceu nas caixas padrão (30X20X23 cm), sem nenhuma modificação.

4.4 Métodos de Mensuração

Aclimação

Os animais foram aclimatados para os testes comportamentais por dois dias consecutivos antes do início de cada experimento. Para o teste de sensibilidade mecânica cutânea os animais foram colocados no aparato de avaliação (cubículos transparentes) por 20 minutos e foram realizadas estimulações na superfície plantar das patas traseiras dos animais. Para avaliação da sensibilidade térmica, os animais foram aclimatados no aparato de avaliação por 5 minutos, sem estimulação térmica.

Para a avaliação do equilíbrio dinâmico, os animais foram aclimatados no aparato de avaliação em uma rotação baixa (5 rpm), repetindo em três tentativas, em intervalos de cinco minutos.

4.4.1 Avaliação Nociceptiva

4.4.1.1 Mensuração da Sensibilidade Mecânica Cutânea

Para a avaliação do limiar mecânico de retirada da pata, foi utilizado o Von Frey eletrônico (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) aplicado diretamente nas patas traseiras. Inicialmente, os animais foram aclimatados nas suas caixas por 20 minutos na sala de comportamento. Na sequência, os animais foram colocados em cubículos transparentes sobre uma superfície de metal vasada e aclimatados novamente por 30 minutos.

O Von Frey foi aplicado em duplicata, na superfície plantar de ambas as patas traseiras até que o animal manifestasse o comportamento de retirar a pata mediante o estímulo. A menor força na qual o animal retirasse a pata de uma das duas aplicações foi registrada como limiar mecânico de retirada da pata, e interpretada como hiperalgesia mecânica secundária (cutânea). Esse método tem mostrado extrema confiabilidade estatística (SLUKA et al., 1999).



Figura 2. Von Frey Eletrônico (Arquivo LAPENE).

4.4.1.2 Mensuração da Hiperalgisia Térmica

Para mensurar a hiperalgisia térmica, foi utilizado o Hot Plate (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), o qual consiste de uma superfície aquecida e um tubo de acrílico aberto para confinar os animais na superfície aquecida. Neste teste, a temperatura foi fixada em 50°C. Os animais foram colocados separadamente na superfície aquecida do aparelho, e o intervalo de tempo (em segundos) entre a colocação do animal e a manifestação do comportamento de pular ou lamber as patas traseiras foi registrado através de um cronômetro como a latência de resposta do animal (LUSZCZKI e FLOREK-LUSZCZKI, 2012).



Figura 3. Hot Plate (imagem demonstrativa).

4.4.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA

4.4.2.1 Teste de Equilíbrio

O equilíbrio foi avaliado por meio do Rota Rod (AVS®, São Carlos, SP, Brasil), um equipamento utilizado para medir atividade motora e alterações de

equilíbrio e coordenação neuromuscular. Este equipamento é motorizado com aceleração progressiva e variável de 0 a 20 rpm. Os animais foram colocados no Rota-rod a uma velocidade de 15 rotações por minuto (rpm) e o tempo máximo de manutenção do equilíbrio foi registrado, ou quando o animal permaneceu por 120 segundos, aumentou-se a velocidade a 18 rpm e registrou-se a latência de até 150 segundos. Uma sessão com três tentativas foi realizada. Foi considerado o maior valor entre as três tentativas (SLUKA, KALRA e MOORE, 2001).

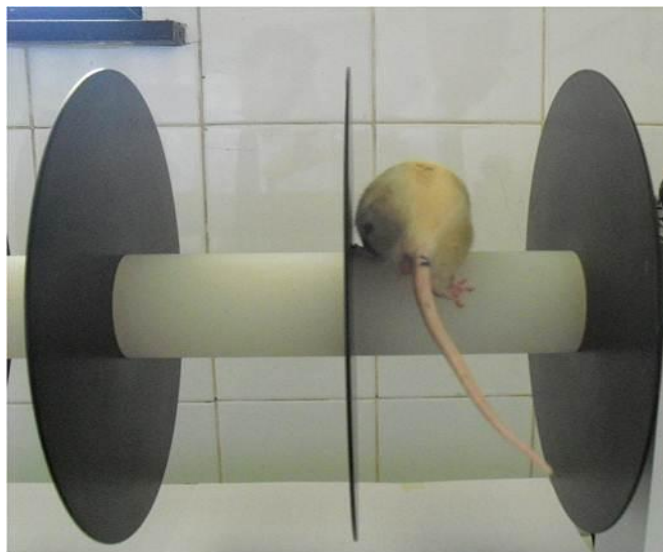


Figura 4. Rota Rod (Arquivo LAPENE).

4.4.2.2 Campo Aberto

Para mensurar a atividade locomotora, foi utilizado o Open Field Test (OPT, Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Este teste fornece medidas simultâneas de locomoção, exploração e ansiedade (CHEN et al., 2009). O aparato consiste de uma base circular de madeira (40 cm de diâmetro) envolta de uma parede circular de polipropileno (50 cm de altura), sendo o topo aberto. A base da arena está dividida em 12 quadrantes. Para registro da locomoção, foi utilizado um contador manual, sendo avaliada a locomoção periférica (número de entradas com as quatro patas próximo a parede do aparato), ambulação total (locomoção periférica e central). Todos esses parâmetros foram contabilizados após colocação do rato no quadrante central do aparato. Todos as sessões experimentais foram filmados durante 5

minutos (WALSH e CUMIINGS, 1976).



Figura 5. Campo Aberto (imagem demonstrativa).

4.5 Delineamento experimental

As etapas seguidas na realização deste trabalho estão descritas na linha do tempo (figura 6). As atividades foram iniciadas com o processo de aclimatação dos animais (D-1). Dois dias após (D1), foi realizada a primeira etapa da avaliação comportamental basal (sensibilidade mecânica cutânea, hiperalgesia térmica e equilíbrio dinâmico) e, no D2, foi realizada a segunda etapa da avaliação comportamental basal (campo aberto e monitor de atividades). Logo em seguida, os animais foram alocados aleatoriamente nos diferentes grupos de estudo e mantidos por quatro semanas. No D9, foi realizada a primeira etapa da 1ª reavaliação comportamental e, no D10, a segunda etapa da 1ª reavaliação comportamental. No D16, foi realizada a primeira etapa da 2ª reavaliação comportamental e, no D17, a segunda etapa da 2ª reavaliação. No D23, foi realizada a primeira etapa da 3ª reavaliação comportamental e, no D24, a segunda etapa da 3ª reavaliação. No D30, foi realizada a primeira etapa da 4ª reavaliação comportamental e, no D31, a segunda etapa da 4ª reavaliação. No D32, foi administrada a primeira injeção de salina ácida nos animais. No D37, foi aplicada a segunda injeção de salina ácida. No

dia 38, foi realizada a primeira etapa da 5ª reavaliação e, no D39, a segunda etapa da 5ª reavaliação (após indução do modelo de dor crônica muscular difusa).

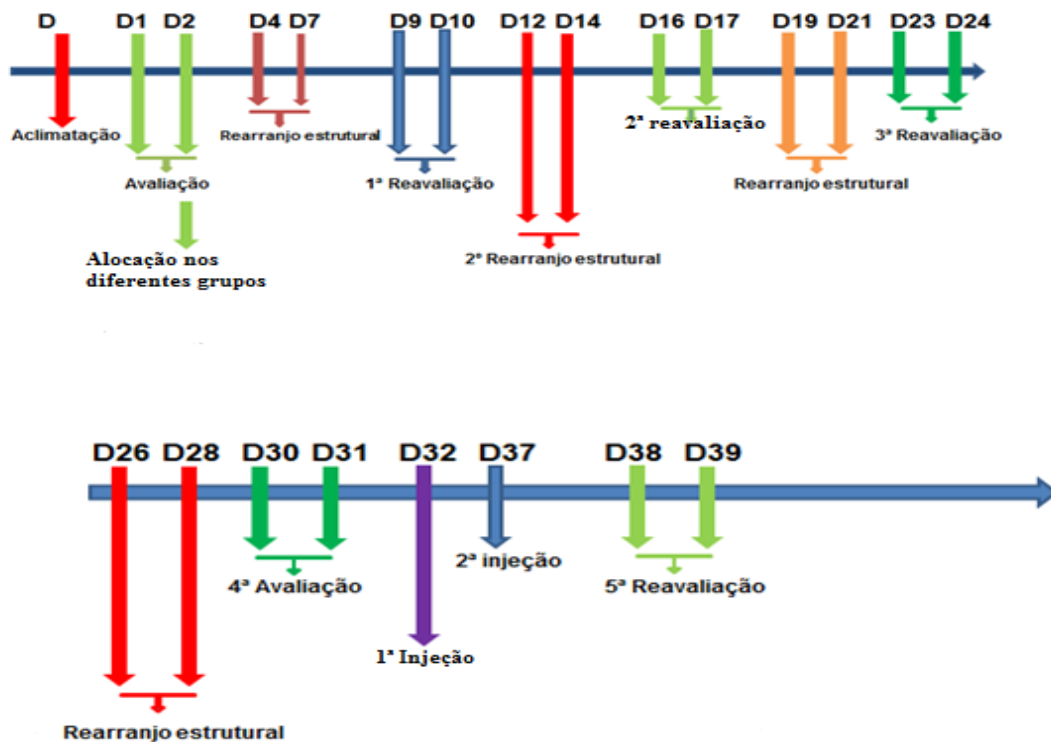


Figura 6. Delineamento experimental.

4.6 Análise estatística

Para a análise dos dados não paramétricos, serão utilizados os testes de Kruskal-Wallis, o teste de Friedman e o teste de Tukey, para analisar diferenças entre grupos nos testes de limiar mecânico e térmico. O teste ANOVA de duas vias e o teste de Bonferroni serão utilizados para avaliar amostras de dados paramétricos dependentes a cada momento de avaliação (antes e após da lesão), comparando diferenças entre os grupos. Valor de $P < 0,05$ será considerado estatisticamente significativo.

5 - RESULTADOS

5.1 Sensibilidade mecânica cutânea

A partir da terceira reavaliação o limiar mecânico de retirada de pata no grupo AE+AF foi significativamente maior que os demais grupos. Assim como na quarta e quinta reavaliações (pós indução). Vale ressaltar que mesmo após a indução do modelo de dor crônica muscular difusa, o grupo AE+AF manteve o aumento do limiar mecânico de retirada, e os demais grupos apresentaram redução significativa do limiar de retirada da pata quando comparado ao grupo e AE+AF e também quando comparado às demais reavaliações anteriores no mesmo grupo, o que sugere o desenvolvimento de hiperalgesia.

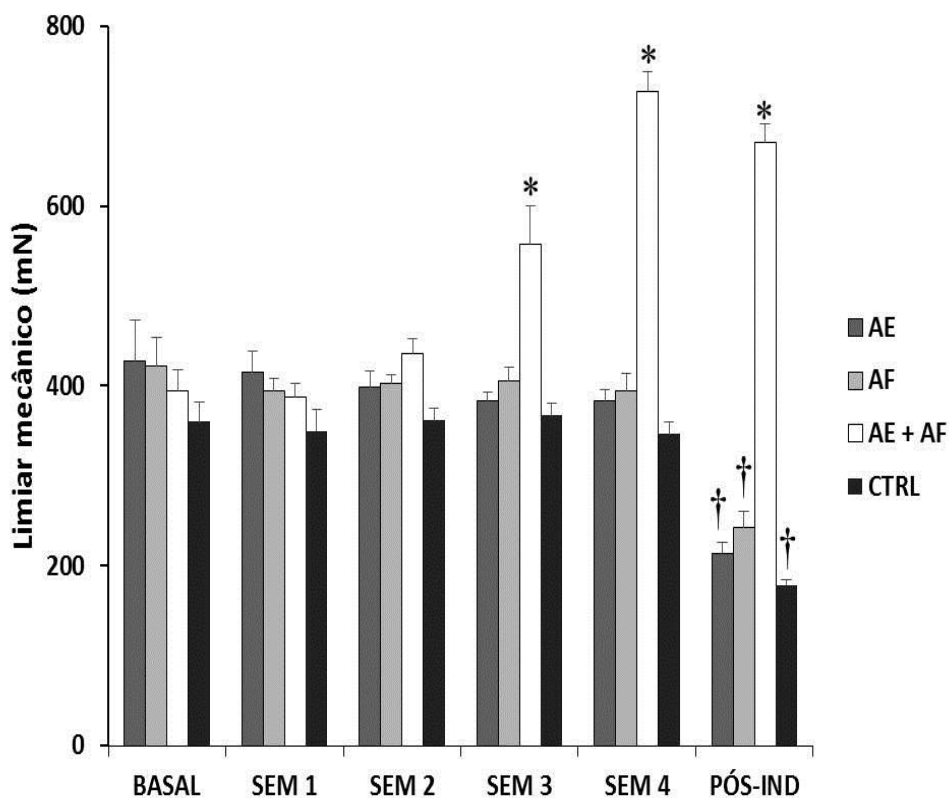


Figura 7. Limiar mecânico de retirada da pata (mN) nos grupos AE, AE+AF, AF e CTRL, na avaliação basal e 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a semanas. * $P < 0,001$ Quando comparado aos demais grupos (one way anova). † $P < 0,01$ Quando comparado ao grupo AE+AF e às avaliações anteriores (teste T pareado).

5.2 Hiperalgesia Térmica

A latência térmica mostrou-se significativamente maior no grupo AE+AF, quando comparado aos demais grupos, a partir da segunda reavaliação, aumento

que se manteve na 3^a, 4^a e 5^a semanas. Vale ressaltar que os demais grupos apresentaram redução da latência térmica na 5^a reavaliação (após indução do modelo de crônica muscular difusa) quando comparado ao grupo AE+AF e também quando comparado às demais reavaliações anteriores no mesmo grupo, o que sugere o desenvolvimento de hiperalgesia térmica.

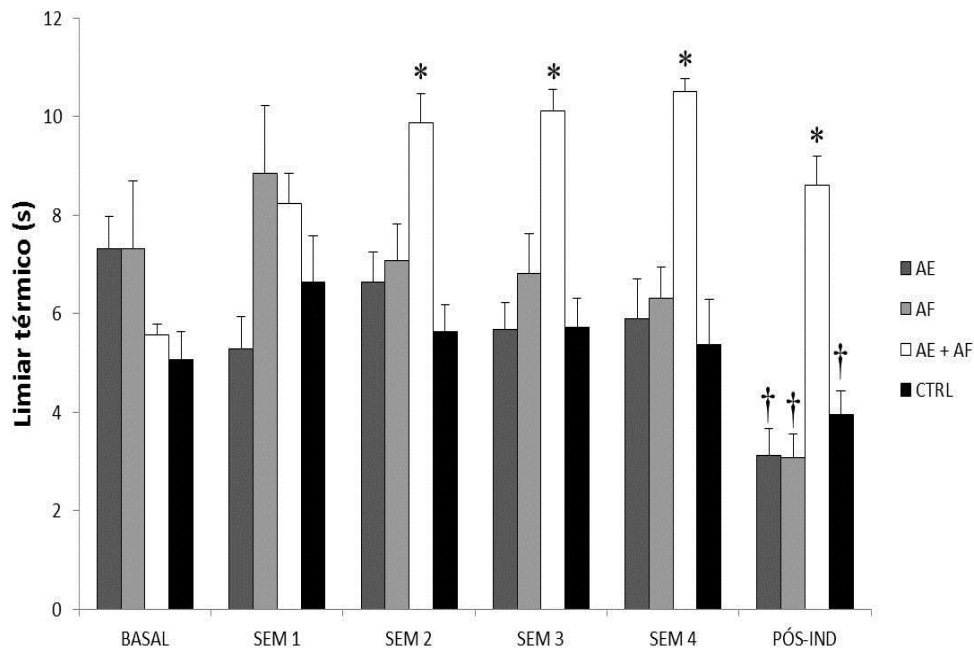


Figura 8. Latência térmica (s) dos grupos AE, AF, AE+AF e CTRL, na avaliação basal e nas 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a semanas. * $P < 0,001$ Quando comparado aos demais grupos (Anova monocaudal). † $P < 0,003$ Quando comparado ao grupo AE+AF e às avaliações anteriores (teste T pareado).

5.3 Atividade Neuromuscular

A atividade neuromuscular apresentou aumento significativo no grupo AE+AF quando comparado aos demais a partir da 1^a reavaliação, aumento que se manteve nas demais reavaliações. Os demais grupos apresentaram redução significativa da atividade neuromuscular quando comparados ao grupo AE+AF na 5^a reavaliação (após indução do modelo de do crônica), e quando comparado ao mesmo grupo nas reavaliações anteriores.

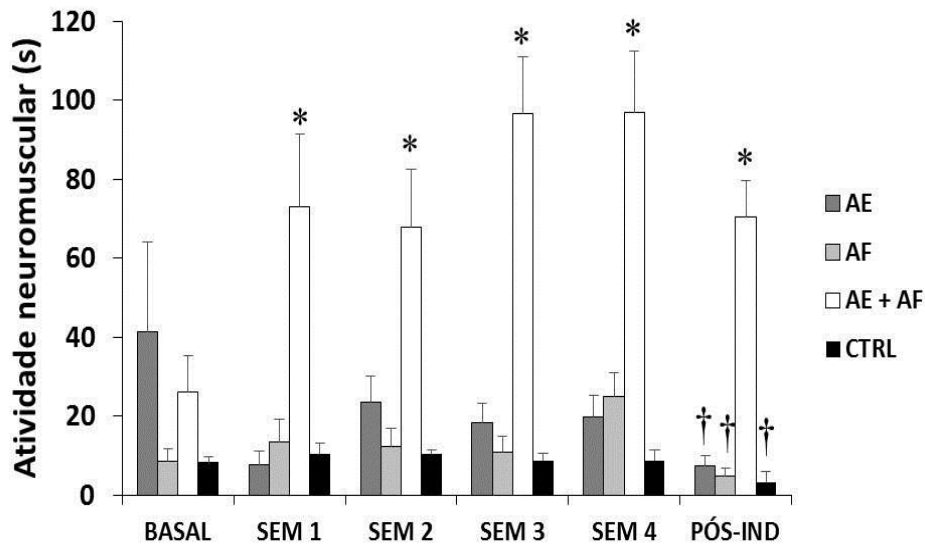


Figura 9. Atividade neuromuscular (s) nos grupos AE, AF, AE+AF e CTRL, na avaliação basal e nas 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a semanas. *P<0,01 Quando comparado aos demais grupos (Anova monocaudal). †P<0,01 Quando comparado ao grupo AE+AF e às avaliações anteriores (teste T pareado).

5.4 Ambulação

As análises no teste de campo aberto apontaram um aumento significativo do número de quadrantes na ambulação total (central e periférica) do grupo AE+AF, quando comparados aos demais grupos a partir da 1^a semana. Este aumento se manteve em todas as avaliações posteriores, mesmo após a indução do modelo de dor crônica muscular difusa.

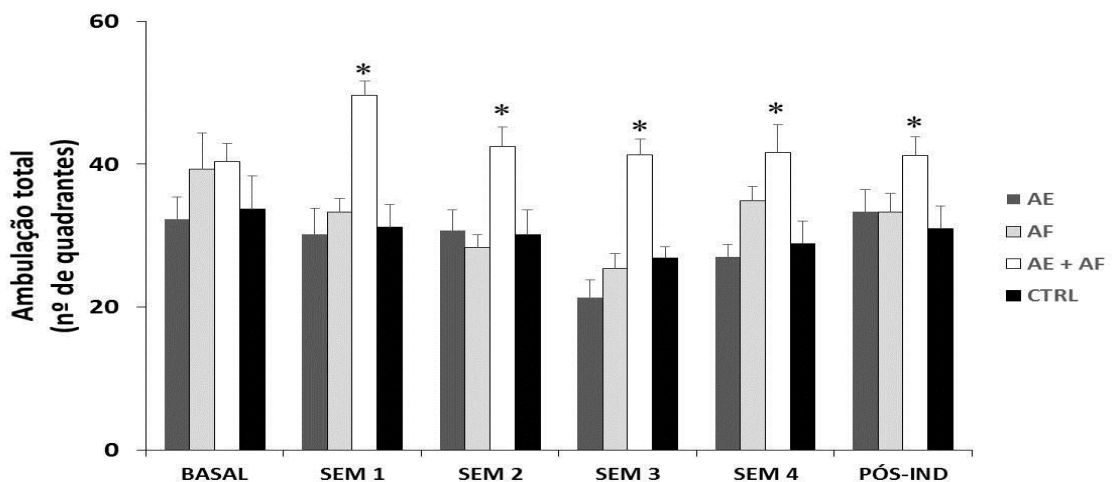


Figura 10 - Ambulação total (nº de quadrantes) nos grupos AE, AF, AE+AF e CTRL, na avaliação basal e nas 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a semanas. *P<0,01 Quando comparado aos demais grupos (Anova monocaudal). Não houve diferença significativa entre o momento pós-indução e as avaliações anteriores (teste T pareado).

Ainda no teste de campo aberto, houve aumento significativo do número de quadrantes na ambulação periférica do grupo AE+AF, quando comparados aos demais grupos a partir da 1ª semana. Esse aumento se manteve em todas as avaliações posteriores, mesmo após a indução do modelo de dor crônica muscular difusa.

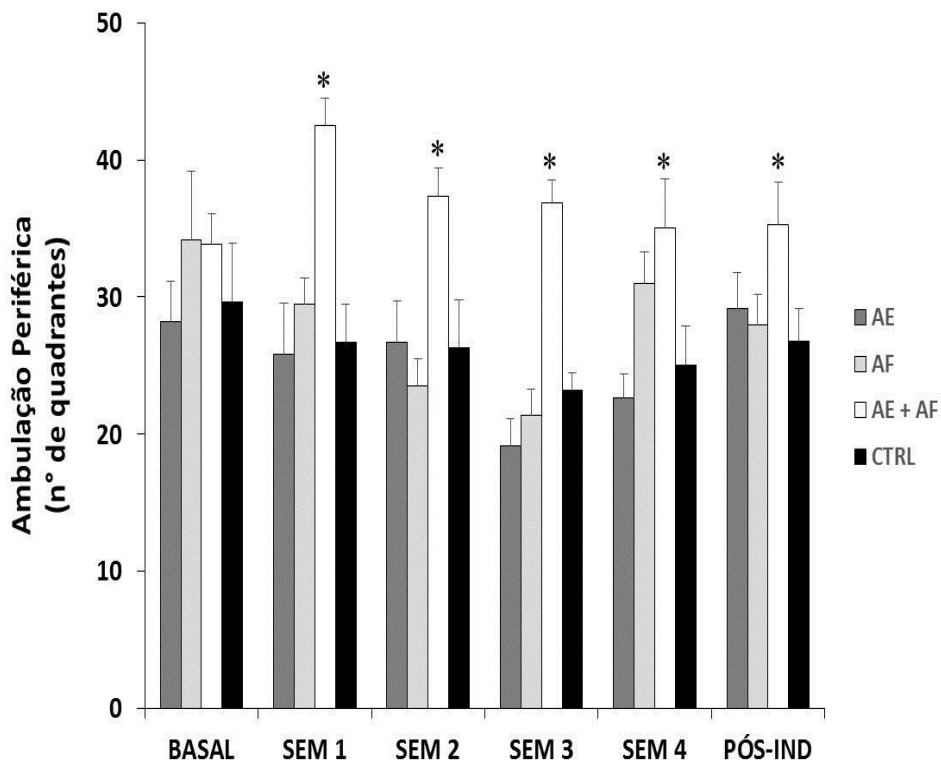


Figura 11 - Ambulação periférica (nº de quadrantes) nos grupos AE, AF, AE+AF e CTRL, na avaliação basal e nas 1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª semana. * $P < 0,01$ Quando comparado aos demais grupos (Anova monocaudal). Não houve diferença significativa entre o momento pós-indução e as avaliações anteriores (teste T pareado).

6 - DISCUSSÃO

A associação entre enriquecimento ambiental e atividade física preveniu o desenvolvimento das hiperalgias mecânica e térmica causadas pelo modelo de dor crônica muscular difusa quando aplicados por quatro semanas consecutivas antes da indução do modelo nociceptivo. Além disso, houve otimização do controle motor e aumento da atividade exploratória dos animais. Ainda são poucos os estudos que investigam os efeitos do ambiente enriquecido em modelos animais de dor, mais especificamente no modelo investigado neste estudo. Para nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que problematizou os efeitos da atividade física e do ambiente enriquecido, enquanto ferramentas combinadas para a prevenção do desenvolvimento de hiperalgia cutânea (mecânica e térmica).

Após 4 semanas consecutivas de exposição combinada ao ambiente enriquecido e atividade física, observou-se prevenção do desenvolvimento da hiperalgia mecânica, resposta que seria esperada após injeção dupla de salina ácida. Porém, os animais tratados de forma individual apenas com enriquecimento ambiental ou atividade física apresentaram hiperalgia mecânica 24 horas após a segunda injeção de salina ácida, sugerindo que o efeito antinociceptivo foi atribuído à aplicação simultânea das duas formas de intervenção.

Embora não haja estudo prévio na literatura pesquisada investigando o efeito da combinação de ambiente enriquecido e atividade física no modelo de dor muscular difusa, Gabriel et al. (2009) analisaram o efeito da estimulação física e social em um modelo animal de dor inflamatória. Similarmente aos nossos achados, os autores mostraram redução da hiperalgia mecânica após quatro semanas de enriquecimento ambiental. Além disso, verificou-se diminuição da duração total do estado de hiperalgia (Gabriel et al., 2009). Vale ressaltar que de modo distinto a este protocolo, no nosso estudo, os animais foram expostos à intervenção combinada antes do procedimento para indução da hiperalgia, sugerindo um potencial efeito antinociceptivo profilático. Ademais, o estudo de Pham et al. (2010) também utilizou a exposição ao ambiente enriquecido fisicamente e socialmente antes de cirurgia abdominal (manipulação cecal), revelando que o ambiente enriquecido foi efetivo na redução do uso de drogas antinociceptivas considerando que ocorreu diminuição da autoadministração de analgésico durante a recuperação pós-operatória (PHAM et al., 2010).

No estudo de Gabriel et al. (2009), foram testadas quatro condições de habitação para ratos (enriquecimento físico, enriquecimento social, enriquecimento social e físico, e habitação padrão). Cabe ressaltar que houve redução da hiperalgesia mecânica tanto nos animais exclusivamente tratados com enriquecimento físico (tamanho de gaiolas, inserção de objetos, túneis) quanto com enriquecimento social (aumento do número de animais nas gaiolas). A antihiperalgesia foi ainda mais pronunciada quando realizada a associação entre aspectos físicos e sociais, numa relação de interdependência mútua, sugerindo que esse efeito se deve ao aumento da atividade física e à redução dos níveis de estresse concomitantemente (Gabriel et al., 2009). No presente estudo, houve diminuição da hiperalgesia mecânica e térmica apenas nos animais que foram tratados com ambiente enriquecido e atividade física, o que pode ser justificado por uma possível redução dos níveis de estresse em função do aumento da atividade cognitiva/distração e da atividade física.

Em um modelo de dor neuropática com camundongos, Vachon et al. (2013) promoveram aumento da área de exploração, inserção de objetos lúdicos e mastigáveis, túneis e roda de atividade, observando redução da hiperalgesia mecânica somente após dois meses de exposição ao protocolo de ambiente enriquecido associado à atividade física. Os resultados do presente estudo evidenciaram que o tempo de 4 semanas foi suficiente para prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia. Além de ser um efeito profilático, o menor tempo de exposição requerido para promoção do efeito antinociceptivo possivelmente seja atribuído aos diferentes modelos experimentais, com afecção de tecidos de origem diversos. Vale ressaltar que os tratamentos aplicados à dor neuropática possuem maior duração de tempo (ARAKAWA et al., 2015; HALL et al., 2013).

Gabriel et al. (2009) e Vachon et al. (2013) também evidenciaram redução da hiperalgesia térmica após exposição ao ambiente enriquecido (fisicamente e socialmente). Alterações no ambiente de habitação também foram utilizadas no estudo de Tall (2009), que mostrou diminuição da hiperalgesia térmica, quatro semanas após desenvolvimento de um modelo de dor inflamatória. Vale ressaltar que, neste mesmo estudo, não houve alteração da hiperalgesia mecânica que fora desenvolvida, diferentemente do estudo de Gabriel et al. (2009). Ambos os estudos utilizaram modelo de dor inflamatória, porém, no estudo de Tall (2009), não houve

aumento da área de exploração/habitação dos animais, apenas inserção de objetos, fato que pode justificar a diferença nos resultados.

Alterações ambientais também foram efetivas na redução da sensibilidade térmica (orofacial) de ratos (ROSSI e NEUBERT, 2008). Neste estudo, foram aplicados estímulos térmicos de 2°C a 48°C, sendo que a tolerância térmica foi maior nos animais alocados no ambiente enriquecido nos testes com estímulos quentes (48°C), não apresentando diferenças para os estímulos frios. Os autores deste trabalho sugerem que os efeitos do ambiente enriquecido na sensibilidade térmica sejam evidenciados em função da redução dos níveis de estresse. O nosso estudo corrobora os resultados citados no estudo acima, visto que houve redução da hiperalgesia térmica e que as condições de habitação desenvolvidas podem justificar redução dos níveis de estresse em função do aumento da atividade cognitiva/distração e da atividade física.

A íntima relação entre estresse e função nociceptiva tem sido reportada na literatura (BLACKBURN-MUNRO, 2001). Em ratos, estudos prévios mostraram que o estresse crônico aumenta a resposta nociceptiva (KING et al., 2003; GAMEIRO et al., 2005; GAMEIRO et al., 2006).

Em um ensaio clínico, pacientes com fibromialgia foram submetidos a um tratamento multidisciplinar baseado no aumento das atividades física aeróbica e cognitiva, que resultou na redução dos pontos dolorosos, aumento da capacidade aeróbica e redução dos níveis de cortisol salivar (BONIFAZI et al., 2006).

Considerando-se a complexidade fisiopatológica da fibromialgia associada a manifestações clínicas diversas co-existentes, tais como dor, fadiga muscular, ansiedade e depressão, faz-se necessário investigar estratégias de intervenção de maior espectro que permitam tratar mais de um sintoma simultaneamente. Desta forma, reiteramos a utilização do ambiente enriquecido (aumento da atividade cognitiva/distração, aumento da atividade sensorial, aumento da interação social) associado à atividade física, no que tange a multifatorialidade e multidimensionalidade no acometimento de diferentes sistemas orgânicos nos pacientes com fibromialgia.

No que tange ao componente motor, observou-se, neste estudo, otimização do equilíbrio dinâmico no rota rod no grupo tratado com enriquecimento ambiental e indução à atividade física voluntária, mesmo após indução do modelo de dor crônica muscular difusa. Contrariamente aos nossos achados, Vachon et al. (2013) e Rojas

(2011) mostraram que o ambiente enriquecido não reduziu o comprometimento motor através da melhora no equilíbrio dinâmico, após desenvolvimento dos modelos de dor neuropática e hipóxia-isquemia, respectivamente.

BERROCAL et al. (2007), em modelo de dor neuropática, também examinaram os efeitos do ambiente enriquecido na função motora por meio da escala BBB. Neste estudo, o ambiente enriquecido foi efetivo na recuperação do comprometimento motor, após lesão na medula espinhal. Após 12 semanas de exposição ao ambiente enriquecido, a escala BBB sinalizou recuperação dos comprometimentos motor o que sugere a utilização do ambiente enriquecido na otimização do controle motor em disfunções sensoriais.

Lankhorst et al., (2001) também desenvolveram um estudo após lesão medular, utilizando o ambiente enriquecido para a recuperação do controle motor. Neste estudo, além das ferramentas convencionais do ambiente enriquecido (objetos e roda de atividade), os animais foram estimulados ao aumento da atividade física colocando água e ração em lados opostos da gaiola. Os resultados mostram que a exposição ao ambiente enriquecido melhora a recuperação da atividade locomotora grossa e fina, mensurada pela escala BBB. Em nosso estudo, a associação do ambiente enriquecido à atividade física foi efetiva na prevenção do comprometimento motor e na otimização do controle motor em um modelo de dor crônica muscular. Especula-se que tais efeitos possam ser justificados pelo aumento de atividade proprioceptiva nos mecanismos neuromusculares, em função de atividades consideradas acrobáticas e possíveis no ambiente enriquecido associado à atividade física (superação obstáculos, piso superior, escadas, movimento coordenado de membros anteriores e posteriores).

É necessário discutir que os dados do nosso estudo para o equilíbrio dinâmico nos revelam, curiosamente, latências muito reduzidas em todos os grupos na avaliação basal e somente o grupo que associou ambiente enriquecido à atividade física foi efetivo na otimização do controle mesmo após a indução do modelo de dor crônica muscular difusa. Os valores reduzidos na avaliação basal podem ser justificados em função da velocidade utilizada no aparato Rota rod, e assim, em valores abaixo de 15 rpm pode resultar em permanências mais longas. Porém, ainda não é clara a discussão que envolve o enriquecimento ambiental ao equilíbrio dinâmico de animais, mais especificamente à linhagem e idade desses animais.

A exposição de animais a ambiente enriquecido também tem sido utilizada para aumentar o comportamento exploratório (ZIMMERMANN et al., 2001). No teste de campo aberto, os nossos achados indicaram aumento da locomoção dos animais submetidos ao ambiente enriquecido e à atividade física, mesmo após indução do modelo de dor crônica muscular difusa.

Simonetti et al. (2009) evidenciaram aumento da atividade locomotora de animais expostos ao ambiente enriquecido imediatamente após o nascimento. Os autores discutem o aumento da locomoção em função do aumento da motivação e melhor processamento das informações espaciais (ambas em função da ativação de receptores dopaminérgicos), e, similarmente aos nossos achados, a exposição ao ambiente enriquecido foi efetiva no aumento da locomoção. Cabe destacar que nosso estudo (exposição por quatro semanas) foi realizado com animais de dois meses de idade e o estudo de Simonetti et al. (2009) foi realizado com animais imediatamente após o nascimento.

O efeito da exposição ao ambiente enriquecido associado à atividade física na atividade locomotora também foi avaliada no trabalho de Vachon et al. (2013), que não apresentou diferenças entre os animais expostos ao ambiente enriquecido ou ao ambiente padrão. Diferentemente dos nossos achados, o estudo de Vachon et al. (2013) foi realizado com camundongos submetidos a um modelo de dor neuropática (afecção do nervo ciático), já em nosso estudo, discutimos o aumento da locomoção em ratos com dois meses de idade expostos ao ambiente enriquecido e à atividade física como ferramenta preventiva ao modelo de dor crônica muscular difusa.

Vale ressaltar que, ao analisar os dados obtidos no teste campo aberto de animais submetidos ao ambiente enriquecido, deve-se atentar à complexidade e duração das condições de enriquecimento, idade e linhagem dos animais (ELLIOT e GRUNBERG, 2005). Neste sentido, destaca-se que se trata do primeiro estudo desenvolvido pelo nosso grupo, o que pode influenciar na complexidade das condições de enriquecimento, fazendo-se necessário investigar estas mesmas variáveis em diferentes condições (tempo maior de exposição ao ambiente enriquecido e animais em diferentes idades).

No tratamento clínico da fibromialgia, técnicas que trabalham o componente da distração devem ser consideradas, já que existem publicações que relacionam a presença de distúrbios cognitivos na fibromialgia à alta intensidade de percepção da dor (BAUDIC et al., 2013; VELDHUIJZEN et al., 2012).

Martinsen et al. (2014) mostraram aumento do limiar de dor por pressão em pacientes com fibromialgia durante a aplicação de uma técnica cognitiva baseada em distração. Adicionalmente, a inibição da dor ocorreu independentemente do tipo de atividade cognitiva ofertada aos sujeitos, sendo esta a primeira evidência que os pacientes com fibromialgia podem inibir a percepção da dor através da distração. Há inibição normal da dor durante o teste de analgesia induzida por distração em pacientes com fibromialgia. As dificuldades cognitivas vistas em fibromiálgicos, representada por tempos de reação mais longos, foram relacionadas à reduzida ativação do núcleo caudado e hipocampo, o que afetou os mecanismos de aprendizado cognitivo em pacientes com fibromialgia.

O ambiente enriquecido também pode agir no funcionamento de neurotransmissores fundamentais às variáveis investigadas neste trabalho (RASMUSON et al, 1998) aponta que o enriquecimento ambiental pode aumentar a expressão de receptores serotoninérgicos. Brenes et al. (2008) apontam níveis aumentados de serotonina (hipocampo e córtex frontal) em animais submetidos ao enriquecimento ambiental. A atividade serotoninérgica também foi aumentada no hipocampo associado positivamente à atividade física (natação) e negativamente à imobilidade (BRENES et al., 2009). Isso sugere um possível efeito antinociceptivo promovido pela combinação terapêutica do enriquecimento ambiental e da atividade física realizada no presente estudo.

A transmissão glutamatérgica é fundamental ao desenvolvimento do modelo de dor animal reproduzido neste estudo (DESANTANA et al., 2013). Deste modo, torna-se pertinente discutir as reverberações do ambiente enriquecido no funcionamento do glutamato. Algumas publicações indicam aumento da atividade de receptores glutamatérgicos (NMDA e AMPA) no hipocampo de animais submetidos ao enriquecimento ambiental (ANDIN et al., 2007; LEE et al., 2003). Porém, não foram encontrados, na literatura pesquisada, estudos com modelos animais de dor que discutissem o possível efeito glutamatérgico do enriquecimento ambiental, principalmente na região rostroventromedial do bulbo.

O aumento da atividade glutamatérgica sugere o aumento da capacidade cognitiva e de memória (ANDIN et al., 2007; LEE et al., 2003), fatores que também podem agir na prevenção da fibromialgia. Desta forma, a prevenção do desenvolvimento da hiperalgesia no presente estudo pode ser justificada pela

alteração no sistema glutamatérgico, no que tange ao aumento da atividade cognitiva/distração.

O possível efeito do enriquecimento ambiental no funcionamento opióide ainda não está totalmente compreendido (SIMPSON e KELLY, 2010), porém Smith et al. (2003) apresentaram o aumento da sensibilidade opióide para receptores Mu e nenhum efeito para receptores Kappa de animais submetidos ao ambiente enriquecido. Outros trabalhos revelam que o ambiente enriquecido aumenta o efeito antinociceptivo de fármacos opióides (SMITH et al., 2004; SMITH et al., 2005).

Estas alterações na sensibilidade opióide podem ser mediadas por modificações nos receptores mu-opióides, porém, alterações na densidade do receptor, na sensibilidade do receptor, ou mecanismos de sinalização adaptados ainda não estão compreendidos (SIMPSON e KELLY, 2010). Assim, especula-se que o efeito antinociceptivo apontado em nosso trabalho na antihiperálgia mecânica e térmica pode ser justificado pela ativação do sistema opióide, como foi mostrado no trabalho de Bement e Sluka (2005) através de um programa de exercícios aeróbicos de baixa intensidade aplicado no mesmo modelo de dor crônica muscular difusa.

Embora a etiologia da FM seja desconhecida, existem fatores que são associados ao início da doença, considerados de risco à FM, tais como eventos traumáticos, distúrbios de estresse, infecções virais (NEUMANN E BUSKILA, 2003), predisposição genética (ARNOLD et al, 2004), obesidade e redução do condicionamento físico (MORK et al., 2010). Deste modo, percebe-se que, dentre os fatores citados, benefícios funcionais como redução do estresse e aumento do condicionamento físico podem ser propiciados pelas ferramentas que compõem o enriquecimento ambiental bem como pela atividade física regular. Assim, os benefícios funcionais e os efeitos apontados no presente estudo podem estar vinculados à redução da predisposição à fibromialgia e, assim, prevenindo o desenvolvimento de dor crônica muscular difusa, não somente na função nociceptiva, mas também na otimização do controle motor e no aumento da ambulação.

As condições de enriquecimento ambiental trabalhadas neste estudo foram utilizadas de forma isolada ou combinada (ambiente enriquecido e a indução da atividade física voluntária). Deste modo, especula-se a possibilidade de efeito antinociceptivo sinérgico entre enriquecimento ambiental e atividade física para a

prevenção do desenvolvimento da hiperalgesia mecânica e térmica, uma vez que apenas a combinação simultânea evitou a redução do limiar mecânico e manteve a latência térmica aumentada 24 hs após injeção de salina ácida. Em contrapartida, quando essas estratégias foram administradas individualmente, os animais se tornaram hiperalgésicos 24 hs após injeção intramuscular de salina ácida.

O conceito de sinergismo pode ser utilizado nesta discussão para explicar o efeito combinado das ferramentas (enriquecimento ambiental e atividade física voluntária) que agiram no mesmo sentido por potencialização dos efeitos das ferramentas separadamente (PALMISANO et al., 2014). Desta forma, a prevenção da hiperalgesia mecânica e térmica e a otimização do controle motor sugerem efeito sinérgico, visto que os efeitos apresentados pela combinação do ambiente enriquecido com a atividade física voluntária são potencialmente superiores ao efeito das mesmas estratégias quando administradas separadamente.

A atividade física (conceito que se estende a uma tipologia extensa de exercícios físicos) é uma ferramenta terapêutica comumente utilizada no tratamento da fibromialgia (MIST et al., 2013), porém, como atividade física voluntária, de modo isolado, não apresentou, no presente estudo, efeito profilático ao desenvolvimento do modelo de dor crônica muscular difusa. Vale ressaltar que ainda não existe uma padronização do tipo exercício físico para a fibromialgia, e que a associação com outras ferramentas (a exemplo, enriquecimento ambiental) pode ser uma alternativa efetiva no manejo das manifestações da fibromialgia, visto que se trata de uma doença cuja fisiopatologia é complexa e afeta mais de um órgão/sistema (CLAUW, 2014), possibilitando um efeito sinérgico ao ampliar as possibilidades de tratamento.

No mesmo modelo experimental de dor muscular difusa, estudos previamente publicados mostraram reversão da hiperalgesia mecânica através de exercícios aeróbicos de baixa intensidade (BEMENT E SLUKA, 2005; SHARMA, et al., 2010). No estudo de Bement e Sluka (2005), foi aplicado um treinamento com exercícios físicos em esteira motorizada numa velocidade lenta (3 m/mim), por 5 minutos. Já no estudo de Sharma (2010), o treinamento foi realizado em esteira motorizada em velocidades alternadas (13,14,15 e 16m/mim), à medida em se aumentava a velocidade também aumentava o tempo de treinamento (30, 40 e 45 minutos). Em nosso estudo, somente a indução à atividade física voluntária não foi suficiente para a reversão das hiperalgesias mecânica e térmica, embora não se trate de um treinamento sistemático para exercícios físicos como nos trabalhos de Bement e

Sluka (2005) e Sharma et al.,(2010).

A qualificação do ambiente tem sido associada ao tratamento de doenças que aumentam a atividade nociceptiva periférica e central. Estudos apontam que o enriquecimento ambiental pode tratar disfunções sensoriais e reduzir quadros de hipersensibilidade (GABRIEL et al, 2011; VANCHON et al., 2013). Porém, ainda se faz necessária uma investigação mais ampla sobre os mecanismos de modulação antinociceptiva do enriquecimento ambiental associado à atividade física, tendo como objetivo descrever e correlacionar os possíveis efeitos antinociceptivos às vias de modulação da dor, à associação de propostas, à idade de entrada dos animais no ambiente enriquecido, a quantidade de tempo de exposição ao ambiente enriquecido e à atividade física, os possíveis neurotransmissores envolvidos e as áreas encefálicas ativadas pelo ambiente enriquecido associado à atividade física.

7 - CONCLUSÃO

O ambiente enriquecido associado à atividade física voluntária possui potencial profilático na função nociceptiva, no controle motor e na ambulação em um modelo de dor crônica muscular difusa.

REFERÊNCIAS:

ABLIN, J. N. “Fibromyalgia syndrome-novel therapeutic targets”. *Maturitas*, v. 75, n. 4, p. 335-40, Aug. 2013.

ALWIS D. S., RAJAN R. (2013). “Environmental enrichment causes a global potentiation of neuronal responses across stimulus complexity and lamina of sensory cortex”. *Front. Cell. Neurosci.* 7:12410.3389/fncel.2013.00124.

ANDIN J, et al. “Influence of environmental enrichment on steady-state mRNA levels for EAAC1, AMPA1 and NMDA2A receptor subunits in rat hippocampus”. *Brain Res* 2007;1174:18–27.

ANNEMANS L, et al. “Health economic consequences related to the diagnosis of fibromyalgia syndrome”. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 895–902.

ARAKAWA, A, et al. “An Investigation of Factors Contributing to Higher Levels of Placebo Response in Clinical Trials in Neuropathic Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis”. *Clin Drug Investig.* 2015 Jan 6. [Epub ahead of print].

ARNOLD, L.M., et al. “Family Study of Fibromyalgia”. *Arthritis & Rheumatism* 2004 Mar; 50(3):944-52.

BAUDIC, S., et al. (2013). “Unilateral repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex does not affect cognition in patients with fibromyalgia”. *Journal of psychiatric research* 47(1):72-7.

BEMENT, M, K; SLUKA, K, A. “Low-intensity exercise reverses chronic muscle pain in the rat in a naloxone-dependent manner”. *Arch Phys Med Rehabil.* 2005 Sep;86(9):1736-40.

BERBER J, S, S, et al. “Prevalência de depressão e sua relação com a qualidade de vida em pacientes com síndrome da fibromialgia”. *Rev Bras Reumatol.* 2005;45(2):47-54.

BERROCAL, Y., et al. “Social and environmental enrichment improves sensory and motor recovery after severe contusive spinal cord injury in the rat”. *J Neurotrauma* 2007;24:1761–72

BLACKBURN-MUNRO G., BLACKBURN-MUNRO R. “Pain in the brain: are hormones to blame?” *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14:20-27. 2001.

BONIFAZI, M., et al. “Changes in salivary cortisol and corticosteroid receptor-alpha mRNA expression following a 3-week multidisciplinary treatment program in patients with fibromyalgia”. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:1076–86.

BURGHARDT, P.R., et al. “The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats”. *Brain Res.* 2004;1019:84-96.

BOYER AL, et al.. "Comparing fibromyalgia patients from primary care and rheumatology settings: clinical and psychosocial features." *Rheum Int.* 2009;29(10):1151-60.

BRENES J, C, et al. "Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum". *Pharmacol Biochem Behav* 2008;89:85–93.

BRENES J, C, et al. "A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats". *Behav Brain Res* 2009;197:125–37.

BUSCH, A, J. et al. "Exercise Therapy for Fibromyalgia". *Curr Pain Headache Rep.* 2011. 15:358–367. DOI 10.1007/s11916-011-0214-2.

CARVILLE S, F, et al. "EULAR evidence-based recommendations for the management of fibromyalgia syndrome". *Ann Rheum Dis.* 2008; 67(4):536-41.

CHATZITHEODOROU, D., et al. "A pilot study of the effects of high-intensity aerobic exercise versus passive interventions on pain, disability, psychological strain, and serum cortisol concentrations in people with chronic low back pain". *Phys Ther.* 2007; 87:304–312.

CHEN B, et al. "Severe blood-brain barrier disruption and surrounding tissue injury". *Stroke.* 2009. 40:e666 – e674.

CHUNG, C, et al. "Oxidative stress in fibromyalgia and its relationship to symptoms". *Clin Rheumatol.* 2009 Apr;28(4):435-8. doi: 10.1007/s10067-008-1072-0.

CLAUW D, J, et al. "The dilemma of medical marijuana use by rheumatology patients". *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2014.

CORDERO, M. et al. "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in fibromyalgia". *Neuro Endocrinol Lett.* 2010;31(2):169-73.

COTE K, A; MOLDOFSKY, H. "Sleep, daytime symptoms, and cognitive performance in patients with fibromyalgia". *J Rheumatol.* 1997;24:2014-23.

COOK D, B, et al. "Functional imaging of pain in patients with primary fibromyalgia". *J Rheumatol.* 2004. 31:364–78.

CRUZ, A. P. M; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. (2007). "Por uma psicologia baseada em um cérebro em transformação". In J. Landeira-Fernandez, e M. T. A. Silva (Eds.). *Intersecções entre Neurociência e Psicologia* (pp. 1-15). Rio de Janeiro: Editora MedBook.

DANIEL, J, et al. "The Science of Fibromyalgia". *Mayo Clin Proc.* 2011;86(9):907-911.

DANIEL, J; CLAUW, M, D. "Fibromyalgia: A Clinical Review". *JAMA*. 2014;311(15):1547-1555. doi:10.1001/jama.2014.3266.

DASILVA L, F, et al. "Activation of NMDA Receptors in the Brainstem, Rostral Ventromedial Medulla, and Nucleus Reticularis Gigantocellularis Mediates Mechanical Hyperalgesia Produced by Repeated Intramuscular Injections of Acidic Saline in Rats". *J Pain* 2010, 11:378–387.

DESANTANA, J, M; SLUKA, K, A. "Central Mechanisms in the Maintenance of Chronic Widespread Noninflammatory Muscle Pain". *Current Pain and Headache Reports* 2008, 12:338–343

DESANTANA, J, M, et al. "Animal models of fibromyalgia". *Arthritis Research & Therapy* 2013, 15:222 doi:10.1186/ar4402.

DUMAN, C. H., et al. "Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice". 2008. *Brain Res.* 1199, 148–158. doi: 10.1016/j.brainres.2007.12.047.

ELLIOTT, B.M.; GRUNBERG, N.E. "Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague–Dawley rats". *Behav Brain Res.* 165:187–96, 2005.

EL-METWALLY, A, et al. "Evidence for the efficacy of complementary and alternative medicines in the management of rheumatoid arthritis: a systematic review". *Rheumatology* 2011;50:16721683 doi:10.1093/rheumatology/ker119.

FERNANDEZ-TERUEL, A. et al. "Early-life handling stimulation and environmental enrichment Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms?" *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 73 (2002) 233 – 245.

FIETTA, P, e MANGANELLI, P. "Fibromyalgia and psychiatric disorders". *Acta Biomed.* 2007;78(2):88-95.

FLEHMIG, I. "Desenvolvimento normal e seus desvios no lactente – diagnóstico e tratamento precoce do nascimento até o 18º mês". Rio de Janeiro, 1987.

FREY L, L, A, et al. "Acidic buffer induced muscle pain evokes referred pain and mechanical hyperalgesia in humans". *Pain* 2008, 140:254–264.

GABRIEL, et al. "Enriched environment and the recovery from inflammatory pain: Social versus physical aspects and their interaction". *Behavioural Brain Research* 208 (2010) 90–95.

GAMEIRO, G.H., et al. "Nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress". *Physiol Behav*, v.87, p.643–649, 2006.

GIOVENGO S, L, et al. "Increased concentrations of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia". *J Rheumatol*. 1999; 26(7):1564–9.

GOLDENBERG D, L, et al. "Management of fibromyalgia syndrome". *JAMA*. 2004;292(19):2388-2395.

GRACEY R, H, et al. 2004. "Pain catastrophizing and neural responses to pain among persons with fibromyalgia". *Brain*, 127(Pt 4):835–43.

GUYMER, E; LITTLEJOHN, G. "Fibromyalgia". *Aust Fam Physician*. 2013 Oct;42(10):690-4.

HALL, G.C. et al. "An observational descriptive study of the epidemiology and treatment of neuropathic pain in a UK general population". *BMC Family Practice*, v.14, n.28, 2013.

HARRIS R, E. "Elevated excitatory neurotransmitter levels in the fibromyalgia brain". *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):141.

HARRIS R, E. et al. "Pregabalin rectifies aberrant brain chemistry, connectivity, and functional response in chronic pain patients". *Anesthesiology*. 2013;119(6):1453-1464.

HELFENSTEIN JR, M, et al. "Fibromialgia: aspectos clínicos e ocupacionais". *Rev. Assoc. Med. Bras*. vol.58 no.3 São Paulo May/June 2012.

HENDRIKSEN H, et al. "Environmental enrichment induces behavioral recovery and enhanced hippocampal cell proliferation in an antidepressant-resistant animal model for PTSD". *PLoS One*. 2010. 5: e11943. doi: 10.1371/journal.pone.0011943.

HENRIKSSON, K, G. "Muscle pain in neuromuscular disorders and primary fibromyalgia". *Neurologija*. 1989;38(3):213-21.

HEYMANN, R, E. et al. "Brazilian consensus on the treatment of fibromyalgia". *Bras J Rheumatol*. 2010;50(1):56-66.

HOLDCRAFT L, C. et al. "Complementary and alternative medicine in fibromyalgia and related syndromes". *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2003; 17(4):667-83.

JULIEN N, et al. "Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition". *Pain*. 2005; 114(1–2):295–302.

KING, C.D., et al. "Differential effects of stress on escape and reflex responses to nociceptive thermal stimuli in the rat". *Brain Res*, v.987, p.214-222, 2003.

KOMLEVA, I. K., et al. "Changes in structural and functional plasticity of the brain induced by environmental enrichment". *Vestnik Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk*. 2014.

KROENKE K, et al. "Pharmacotherapy of chronic pain: a synthesis of recommendations from systematic reviews". *Gen Hosp Psychiatry*. 2009;31(3):206-219.

LANKHORST A.J., et al. "Effects of enriched housing on functional recovery after spinal cord contusive injury in the adult rat". *J Neurotrauma* 2001;18:203–15.

LEE E, H, et al. "Enrichment enhances the expression of *sgk*, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation". *Eur J Neurosci*. 2003;18:2842–52.

LUSZCZKI, J, J; FLOREK-LUSZCZKI, M."Influence of N-hydroxymethyl-p-isopropoxyphenylsuccinimide on the anticonvulsant action of different classical antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock-induced seizure model". *Epilepsy Res*. 2012 Jun;100(1-2):27-36. doi: 10.1016/j.eplesyres.2012.01.003.

MARLATT, M.W. et al. "Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis and BDNF levels in female mice". *Dev Neurobiol*. 2012. doi:10.1002/dneu.22009.

MARTINSEN, S. "Fibromyalgia Patients Had Normal Distraction Related Pain Inhibition but Cognitive Impairment Reflected in Caudate Nucleus and Hippocampus during the Stroop Color Word Test". 2014. . *PLoS ONE* 9(10): e108637. doi:10.1371/journal.pone.

MIST, S. et al. "A randomized controlled trial of 8-form Tai chi improves symptoms and functional mobility in fibromyalgia patients". *BMC Complementary and Alternative Medicine*. v.12 (supl.1), jun. 2012.

MORK, P.J., VASSELJEN, O., NILSEN, T.I. "Association between physical exercise, body mass index, and risk of fibromyalgia: longitudinal data from the Norwegian NordTrøndelag health study". *Arthr Care Res (Hoboken)*, v.62, n.5, p.61-617, 2010.

NEUMANN L, BUSKILA D. "Epidemiologia da Fibromialgia". *Curr Dor Dor de Cabeça Rep* 2003; 7 (5): 362-368.

NORDAHL, H, M; STILES, T, C. "Personality styles in patients with fibromyalgia, major depression and healthy controls". *Annals of General Psychiatry* 2007, 6:9 doi:10.1186/1744-859X-6-9.

PALMISANO, G. et al. "A Novel Method for the Simultaneous Enrichment, Identification, and Quantification of Phosphopeptides and Sialylated Glycopeptides

Applied to a Temporal Profile of Mouse Brain Development". *Mol Cell Proteomics*. Nov 2014; 11(11): 1191–1202.

PEREIRA L, O. et al. "Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat". *Neurobiology of Learning and Memory*. 2007. (87) 101–108.

PEREIRA, L, O. et al. "Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia–ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex". *Brain Research* 1247 (2009) 188 – 195.

PHAM, et al. V. "Housing environment influences the need for pain relief during postoperative recovery in mice". *Physiol Behav* 2010, 99:663–668.

PHILLIPS K, CLAUW D, J. "Central pain mechanisms in the rheumatic diseases: future directions". *Arthritis Rheum*. 2013;65(2):291-302.

RAPHAEL, K, G, et al. "Convergence of results regarding fibromyalgia and depression as part of the same spectrum of disorders". 2004. *Pain* - 112 - Issue 3 - p 410 doi: 10.1016/j.pain.2004.09.023.

RASMUSON S, et al. "Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus". *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;53:285–90.

ROJAS, J, J, et al. "Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat". *Exp Neurol*. 2013, Mar; 241:25-33. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.11.026. Epub 2012 Dec 6.

ROSSI HL, NEUBERT JK. "Effects of environmental enrichment on thermal sensitivity in an operant orofacial pain assay". *Behav Brain Res* 2008;187:478–82.

SALE, A., et al. "Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy". *Physiological Reviews* (2014) 94: 189-234.

SANTOS, E, B. et al. "Avaliação dos sintomas de ansiedade e depressão em fibromiálgicos". *Rev Esc Enferm USP*, 2012; 46(3):590-6.

SIMPSON J; KELLY J, P. "The impact of environmental enrichment in laboratoryrats – behavioural and neurochemical aspects". *Behavioural Brain Research*. 2011; 222:246–64.

SINGHAL, G. et al. "Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment". *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014. 8 (97).

SIUCIAK, J.A., et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *The Journal of neuroscience*. 1995. 15: 7929–7939.

SKYBA D, A, et al. “Effects of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptor antagonists on the development and maintenance of hyperalgesia induced by repeated intramuscular injection of acidic saline”. *Pain* 2002, 98:69–78.

SHARMA, U. et al. “Recent advances in the chemistry of phthalimide analogues and their therapeutic potential”. *Mini Rev Med Chem*, v. 10, n. 8, p. 678-704, Jul 2010.

SIMPSON J, KELLY JP: “The impact of environmental enrichment in laboratory rats—behavioural and neurochemical aspects”. *Behav Brain Res* 2011, 222:246–264.

SLUKA, K, A, et al. “Spinal Blockade of Opioid Receptors Prevents the Analgesia Produced by TENS in Arthritic Rats”. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999. 289 (2): 840–46.

SLUKA, K. A, et al. 2001. “Unilateral Intramuscular Injections of Acidic Saline Produce a Bilateral, Long-Lasting Hyperalgesia”. *Muscle & Nerve* 24 (1): 37–46. doi:10.1002/1097-4598(200101)24:1<37::AID-MUS4>3.0.CO;2-8.

SLUKA, K, A. “Is it possible to develop an animal model of fibromyalgia?” *Pain*. 2009 November ; 146(1-2): 3–4. doi:10.1016/j.pain.2009.07.032.

SMITH MA, MCCLEAN JM, BRYANT PA. “Sensitivity to the effects of a kappa opioid in rats with free access to exercise wheels: differential effects across behavioral measures”. *Pharmacol Biochem Behav* 2004, 77:49–57.

SMITH, M.A., et al. “Social and environmental influences on opioid sensitivity in rats: importance of an opioid's relative efficacy at the mu-receptor”. *Psychopharmacology* 2005, 181:27–37.

SMITH, C; GRIMMER-SOMERS, K. “The treatment effect of exercise programmes for chronic low back pain”. *J Eval Clin Pract*. 2010 Jun;16(3):484-91. doi: 10.1111/j.1365-2753.2009.01174.x.

STAUD R, et al. “Abnormal sensitization and temporal summation of second pain (wind-up) in patients with fibromyalgia syndrome”. *Pain* 001;91:165–75.

STAUD R; RODRIGUEZ M, E. “Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome”. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006 Feb;2(2):90-8.

TALL, J. M. “Housing supplementation decreases the magnitude of inflammation-induced nociception in rats”. *Behavioural Brain Research* 197 (2009) 230–233.

TERADA, M., et al. "Suppression of enriched environment-induced neurogenesis in a rodent model of neuropathic pain". *Neuroscience Letters* 440 (2008) 314–318.

VACHON, et al. "Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain". *Behavioral and Brain Functions* 2013, 9:22

VALIM V, et al. "Aerobic fitness effects in fibromyalgia". *J Rheumatol.* 2003;30(5):1060-9.

VALIM, V. "Benefícios dos exercícios físicos na fibromialgia". *Rev Bras Reumatol.* 2006;46(1):49-55.

VELDHUIJZEN DS, SONDAAL SF, OOSTERMAN JM. (2012). "Intact cognitive inhibition in patients with fibromyalgia but evidence of declined processing speed". *Journal of Pain* 13(5):507-15.

WALSH, R.N; CUMMINGS, R.A. "The open field test: a critical review". *Psychol. Bull.*, 83 (1976) 482–504.

WHITE K, P. et al. "Chronic widespread musculoskeletal pain with or without fibromyalgia: Psychological distress in a representative community adult sample". *J Rheumatol.* 2002;29(3):588-94.

WIFFEN P, J. et al. "Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia - an overview of Cochrane reviews". *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Nov 11;11:CD010567. doi: 10.1002/14651858.CD010567.pub2.

WILLIAMS D, A, et al. "Improving physical functional status in patients with fibromyalgia: a brief cognitive behavioral intervention". *J Rheumatol.* 2002;29(6):1280-1286.

WILLIAMS D,A, et al. "Internet-enhanced management of fibromyalgia: a randomized controlled trial". *Pain.* 2010;151(3):694-702.

WOLFE, F, et al. "The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity." *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2010 May;62(5):600-10. doi: 10.1002/acr.20140.

WOOLF, C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. 2011. *Pain* 152, S2–S15.

ZIMMERMANN, A. Tierschutzorientierte Untersuchungen zur Standardhaltung von Laborratten. *Dissertation ETH Nr. 13136, ETHZü"rich, Switzerland, 2001.*