

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Karen Luise dos Santos Moreira

**O EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO EM RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE FIBROMIALGIA
INDUZIDO POR RESERPINA**

Santa Maria, RS
2018

Karen Luise dos Santos Moreira

**O EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO EM RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDO POR
RESERPINA**

Dissertação apresentada ao curso Pós-Graduação em Farmacologia, área de concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Santa Maria, RS
2018

Moreira, Karen Luise dos Santos

O efeito neuroprotetor do exercício físico em ratos submetidos ao modelo animal de fibromialgia induzido por reserpina / Karen Luise dos Santos Moreira.- 2018.

49 p.; 30 cm

Orientadora: Patrícia Severo do Nascimento

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2018

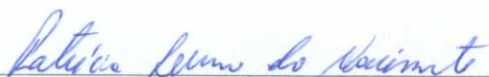
1. Fibromialgia 2. Serotonina 3. Núcleo magno da rafe
4. Reserpina 5. Exercício Físico I. do Nascimento, Patrícia Severo II. Título.

Karen Luise dos Santos Moreira

**O EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO EM RATOS
SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDO POR
RESERPINA**

Dissertação apresentada ao curso Pós-Graduação em Farmacologia, área de concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

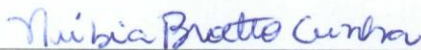
Aprovado em 16 de Março de 2018



Patricia Severo do Nascimento, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Maria Izabel U. M. Rocha, Dr^a. (UFSM)



Nubia Broetto Cunha, Dr^a. (ULBRA/SM)

Santa Maria, RS.
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que está sempre presente guiando meus passos.

Aos meus pais, Vilmar e Sônia, e também ao meu padrasto, Jairo, por todo apoio, incentivo e compreensão, pois com certeza sem vocês nada seria possível até aqui. É difícil expressar tamanha gratidão e amor em ter vocês na minha vida. Muito obrigada por tudo!

À minha orientadora, Prof. Patrícia Severo do Nascimento, pelos ensinamentos, pelo exemplo, pela paciência e pela compreensão durante esta fase. Reconheço e agradeço de coração a oportunidade e também o exemplo de profissional. O caminho ainda é longo, mas sigo na certeza de que os ensinamentos serão essenciais e me acompanharão nas próximas etapas. De coração, a minha gratidão e admiração!

Agradeço ao Professor Marcelo Veiga, e à Professora Maria Izabel Ugalde, por sempre me acolherem com muito carinho desde o período da faculdade até hoje.

Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram de alguma forma para minha formação.

Aos amigos e colegas do Labitex pelo carinho, amizade e companheirismo. Em especial, gostaria de agradecer à Marina e à Gabi, pelas risadas (que não foram poucas!), pelos vários trabalhos na histologia, pelos conselhos, almoços no RU e no 20. Adoro vocês!

Ao amigos e colegas do NeuronLAB e também à Professora Gabriela e o Professor Guilherme, que me receberam de “braços abertos” neste ano que passou. Obrigada!

A CAPES e ao CNPq, pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Aos animais utilizados na realização deste trabalho, todo o meu respeito.

Enfim, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela possibilidade de realização desta etapa profissional.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

O EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO ANIMAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDO POR RESERPINA

AUTORA: Karen Luise dos Santos Moreira
ORIENTADORA: Patrícia Severo do Nascimento

A fibromialgia (FM) é uma síndrome musculoesquelética caracterizada por dor primária crônica generalizada. Nesta patologia há uma disfunção no sistema inibitório da dor, ocorrendo redução de monoaminas, como a serotonina (5-HT), a qual é produzida por neurônios localizados nos núcleos da rafe, incluindo o núcleo magno da rafe (NMR), que envia projeções ao corno dorsal da medula espinal (CDME), onde ocorre a modulação da informação dolorosa ascendente. O tratamento farmacológico na FM não é eficaz, sendo o exercício físico indicado como intervenção não farmacológica, visando melhora na qualidade de vida dos pacientes que sofrem de fibromialgia. Contudo, não há estudos que demonstrem a relação neuroprotetora do exercício físico na FM ou métodos eficazes para a prevenção desta doença. Tendo em vista a importância da 5-HT e sua atividade no sistema nervoso central (SNC), o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de reserpina quanto à sensibilidade mecânica, nociceptiva, atividade locomotora e imunorreatividade à 5-HT no NMR; bem como avaliar o efeito do exercício físico em esteira antes da aplicação de reserpina, durante 14 dias, em ratos *Wistar* machos. Para isso, os animais foram divididos em 3 grupos: controle (não-reserpinizados; C); Reserpinizados (R) e Treinados-Reserpinizados (TR). Ao término do protocolo de treinamento os animais foram reserpinizados e analisou-se a sensibilidade mecânica (teste dos filamentos de von Frey e teste de Randall-Selitto), a sensibilidade nociceptiva (teste do *tail-flick*), a atividade exploratória e locomotora (teste do campo aberto), a densidade ótica e o número de neurônios imunorreativos à 5-HT no NMR (marcados com anticorpo anti-5HT através da técnica de imunistoquímica). Observamos que a aplicação de reserpina não alterou o peso corporal e o comportamento locomotor nos animais, mas alterou as sensibilidades mecânica, nociceptiva e o número de neurônios imunorreativos à 5-HT no NMR. Todas essas alterações foram prevenidas pelo exercício físico em esteira. Em conclusão, o treinamento físico antes da reserpinação previne alterações comportamentais e morfológicas causadas pela reserpina, mostrando o efeito neuroprotetor do exercício físico.

Palavras-chave: Dor crônica. Treinamento físico. Serotonina. Núcleo da Rafe.

ABSTRACT

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF PHYSICAL EXERCISE IN RATS SUBMITTED TO ANIMAL MODEL OF FIBROMYALGIA INDUCED BY RESERPINE

AUTHOR: Karen Luise dos Santos Moreira

ADVISOR: Patrícia Severo do Nascimento

Fibromyalgia (FMS) is a musculoskeletal syndrome characterized by generalized chronic primary pain. In this pathology, dysfunction occurs in the pain inhibitory system, reducing monoamines, such as serotonin (5-HT), which is produced by neurons located in raphe nuclei, including the nucleus raphe magnus (NRM) which sends projections to the dorsal horn of the spinal cord, where modulation of ascending pain information occurs. Pharmacological treatment in FMS is not effective, so physical exercise is indicated as a non-pharmacological intervention, aiming to improve the quality of life of patients suffering from fibromyalgia. However, there are no studies demonstrating the neuroprotective relationship of physical exercise in FMS or effective methods to prevent FMS. Considering the importance of 5-HT and its activity in the central nervous system (CNS), the objective of this study was to evaluate the effect of reserpine on mechanical and nociceptive sensitivity, locomotor activity and immunoreactivity to 5-HT in NRM; as well as to evaluate the effect of physical exercise on treadmill, before reserpine, for 14 days in male Wistar rats. The animals were divided into three groups: control (no-reserpine; C); Reserpine (R) and Trained-Reserpine (TR). At the end of the training protocol the animals were reserpined and the mechanical sensitivity (von Frey filaments and Randall-Selitto test), nociceptive sensitivity (tail-flick test), exploratory and locomotor activities (open field test), optical density and the number of 5-HT immunoreactive neurons in NRM (by immunohistochemistry technique) were analyzed. After performing the appropriate statistical analysis, was observed that the application of reserpine did not alter the body weight and mobility of the animals; reserpine increases mechanical and nociceptive sensitivity, and decreases the number of 5-HT positive neurons in NRM. All of these changes were prevented by treadmill training. In conclusion, physical training prior to reserpine, prevents behavioral and morphological changes caused by reserpine, showing the neuroprotective effect of physical exercise.

Keywords: Chronic pain. Physical training. Serotonin. Raphe nucleus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação esquemática das informações nociceptivas conduzidas até o corno dorsal da medula espinal.....	15
Figura 2- Esquema representativo da principal via ascendente da dor.....	16
Figura 3- Localização dos 18 pontos dolorosos (<i>tender points</i>)	19
Figura 4- Esquema representativo da via inibitória ou descendente da dor.....	21

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- <i>Tender points</i> bilaterais e suas localizações	18
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figure 1- Experimental design. Rats were treated with reserpine (1 mg/kg/day, s.c.) or vehicle (saline) during 3 days. After treatment (day 4), rats from each group were weighted and evaluated. The experimental groups were as follows: no-reserpinized rats (C), reserpinized rats (R) and rats submitted to treadmill training for two weeks and reserpinized (TR). The brains were removed from the skulls and were used for immunohistochemistry, which was used to evaluate the optical densitometry and number of 5-HT immunopositive neurons in the NRM. Behavioral evaluations were performed on day 4, one day after last reserpinization (Von frey filaments, Randall Selitto, Tail-flick and Open field tests). Font: Author.....29

Figure 2- A) Body weight from C, R and TR groups before reserpinization and after the last reserpinization. B) Mechanical sensitivity, von Frey filaments test from C, R and TR groups. *: $P < 0.05$, compared to C and TR groups C) Mechanical sensitivity, Randall-Selitto test from C, R and TR groups. *: $P < 0.05$, compared to C and TR groups. D) Nociceptive sensitivity, tail flick test from C, R and TR groups. *: $P < 0.05$, compared to C and TR groups. E) Open field, crossed squares from C, R and TR groups. F) Optical densitometry of 5-HT immunoreactive neurons from C, R and TR groups. G) Number of 5-HT positive cells in RMN. *: $P < 0.05$, compared to C and TR groups.....35

Figure 3- Illustrative images from 5-HT positive neurons in NRM from no-reserpinized (C), Reserpinized (R) and treadmill training and reserpinized (TR) groups. Scale bar: 100 μm36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
5-HT _{1r}	Imunorreatividade à Serotonina
A δ	A-delta
ACMS	(do Inglês: Colégio Americano de Medicina Esportiva)
ACR	(do Inglês: Colégio Americano de Reumatologia)
AOI	Área de Interesse
C	Grupo Controle (não-reserpinizados)
CDME	Corno dorsal da medula espinal
CID	Classificação Internacional de Doenças
CNS	Central Nervous system (do inglês: Sistema Nervoso Central)
FM	Fibromialgia
FMS	Fibromyalgia Syndrome (do inglês: síndrome da fibromialgia)
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
IASP	(do Inglês: Associação Internacional do Estudo da Dor)
ICD	(do Inglês: Classificação Internacional de Doenças)
ME	Medula espinal
MET	Maximal Exercise Training (do inglês: Teste de esforço máximo)
NMR	Núcleo Magno da Rafe
NRM	Nucleus Raphe Magnus (do inglês: Núcleo Magno da Rafe)
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
R	Grupo Reserpinizados
SEM	Standart error of the mean (do inglês: média de erro padrão)
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TR	Grupo treinados-reserpinizados
VMAT	Transportador Vesicular de Monoaminas
VO ₂ R	Consumo de oxigênio de reserva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 DOR	14
2.2 FIBROMIALGIA	17
2.3 SEROTONINA	20
2.4 EXERCÍCIO FÍSICO	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 MANUSCRITO	25
5 CONCLUSÕES	41
6 PERSPECTIVAS	42
7 REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Fibromialgia (FM) é uma síndrome musculoesquelética caracterizada por dor primária crônica generalizada, fadiga, sensibilidade à palpação, depressão e ansiedade. Seus sintomas variam em intensidade, podem aumentar e diminuir ao longo do tempo, sendo o estresse um agravante para os sintomas. Esta, afeta 2% da população em geral e é mais comum em mulheres na idade adulta. O diagnóstico é baseado no exame físico e nos sintomas relatados pelos pacientes (AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY, 2010; TREÉDE et al., 2015).

Apesar da patogênese dessa doença ainda não estar bem elucidada, esta pode ser associada a agentes infecciosos virais, tais como o vírus da Hepatite B e C, HIV, traumas físicos, como os da coluna cervical (ABLIN; NEUMANN; BUSKILA, 2008).

Ainda, a fibromialgia tem sido relacionada com alterações nos sistemas de neurotransmissão serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos no SNC, havendo uma diminuição do conteúdo desses neurotransmissores no fluido cerebrospinal de pacientes fibromiálgicos, contribuindo para o conceito de que nessa patologia ocorre diminuição da atividade do sistema descendente inibitório da dor e um aumento dos níveis de aminoácidos e peptídeos excitatórios envolvidos na transmissão da dor (RUSSELL et al., 1992, 1994).

Como modelo animal de fibromialgia se tem utilizado injeções musculares de salina ácida (KIM et al., 2009), estresse por frio intermitente (NISHIYORI; UEDA, 2008) e o modelo de depleção de aminas biogênicas. Neste último, a aplicação subcutânea durante três dias consecutivos de reserpina (1 mg/kg) causa a depleção dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e 5-HT, surgindo um quadro clínico nos ratos semelhante ao da fibromialgia em humanos, com os sinais de hiperalgesia generalizada, sensibilidade à palpação, depressão e ansiedade (NAGAKURA et al., 2009).

A 5-HT é um neurotransmissor produzido no tronco encefálico por neurônios localizados nos núcleos da rafe que enviam projeções ao CDME, onde modulam a informação dolorosa ascendente. Dessa forma a serotonina é considerada um importante neurotransmissor, o qual está envolvido na modulação da sensação dolorosa (informação nociceptiva) (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA; 2010).

Foi demonstrado o efeito anti-hiperalgésico de drogas inibidoras seletivas da recaptação da serotonina e noradrenalina (milnacipran em conjunto com tramadol; 40/40 mg/kg) em modelo animal de fibromialgia em ratos, no qual foram observados aumento do

limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico, corroborando com o conceito do envolvimento desses neurotransmissores nesta patologia (KIM et al., 2009).

Uma vez que na FM ocorrem alterações no sistema serotoninérgico e que o exercício físico aeróbico é capaz de alterar as respostas aos estímulos nociceptivos (MAZZARDO-MARTINS et al., 2010), o comportamento motor de ratos (DO NASCIMENTO et al., 2011), bem como, o conteúdo de 5-HT no tronco encefálico (BOBINSKI et al., 2015) e nos núcleos da rafe (KORB et al., 2010), têm-se indicado o mesmo, como parte do tratamento de pessoas com fibromialgia (AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY, 2010; BUSCH et al., 2011).

Na literatura, há evidências dos efeitos benéficos do exercício físico. Foi demonstrado que o exercício físico previne anormalidades e mantém a morfologia do nervo sural em ratos diabéticos (DO NASCIMENTO et al., 2013), auxilia no controle da glicemia (VANCEA et al., 2009) e na redução de doenças cardiovasculares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010), bem como, no controle da dor, ansiedade, melhora do sono e bem-estar e como uma alternativa não-farmacológica para pacientes com FM (BUSH et al., 2002; VALIM et al., 2003). Porém, ainda não se sabe se o exercício físico possui efeito neuroprotetor de forma que possa ser utilizado como abordagem profilática nesta patologia.

Tendo em vista o que foi exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação de reserpina quanto à sensibilidade mecânica, nociceptiva, atividade locomotora e a imunorreatividade à 5-HT no NMR. Ainda, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do exercício físico, antes da aplicação de reserpina, em ratos submetidos ao modelo de fibromialgia, induzido por reserpina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOR

A dor tem um impacto profundo na qualidade de vida (social, econômica, psicológica e emocional) de pacientes que convivem diariamente nesta situação. Mesmo o tratamento da dor sendo considerado um direito humano, estima-se que 80% da população mundial possui acesso limitado à um tratamento adequado para dor moderada à grave (LOHMAN; SCHLEIFER; AMON, 2010).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*Internacional Association for the study of pain*, IASP), “a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano real ou potencial tecidual, ou apenas descrita como tal lesão” (LOESER; TREEDE, 2008).

A dor é considerada uma experiência subjetiva e pessoal, visto que sua percepção é complexa e envolve os fatores emocionais e cognitivos de cada indivíduo. Durante muito tempo foi considerada como uma reação a um estímulo nociceptivo, funcionando apenas como um mecanismo de proteção do organismo. Hoje em dia se sabe que a dor é muito mais complexa do que um sistema de ação e reação (BERNACCHIO; CONTIN; MORI, 2005; DELLAROZA et al., 2008).

A importância de reconhecer a dor como uma experiência sensorial, antes do que uma sensação, é reconhecer primeiro, que sensações apresentam vias neuroatômicas com receptores específicos para permitir a detecção e mediação de um estímulo. Em contraste, uma experiência sensorial incorpora componentes pessoais e influências ambientais. O componente sensorial da dor é denominado nocicepção (RUSSO; BROSE, 1998).

Sabendo-se disso, a nocicepção é considerada o processo de codificação de um estímulo nocivo, por terminações periféricas livres, denominados nociceptores. Estes nociceptores se localizam na pele, bem como nos músculos, articulações, vísceras, e outros órgãos, atuando como alerta para possíveis danos pela detecção de estímulos mecânicos, térmicos e químicos, como também pela transdução e transmissão de sinais elétricos enviados, os quais podem ser interpretados como “dolorosos” pelo cérebro (WOOLF, 2010).

As fibras sensoriais aferentes que participam da transmissão da informação nociceptiva são as fibras C e as fibras A δ . Estas fibras sensoriais diferem entre si, quanto à velocidade de condução e quanto à categoria de estímulo conduzido. As fibras C, são fibras de pequeno diâmetro, não-mielinizadas que conduzem o estímulo doloroso de forma lenta; as

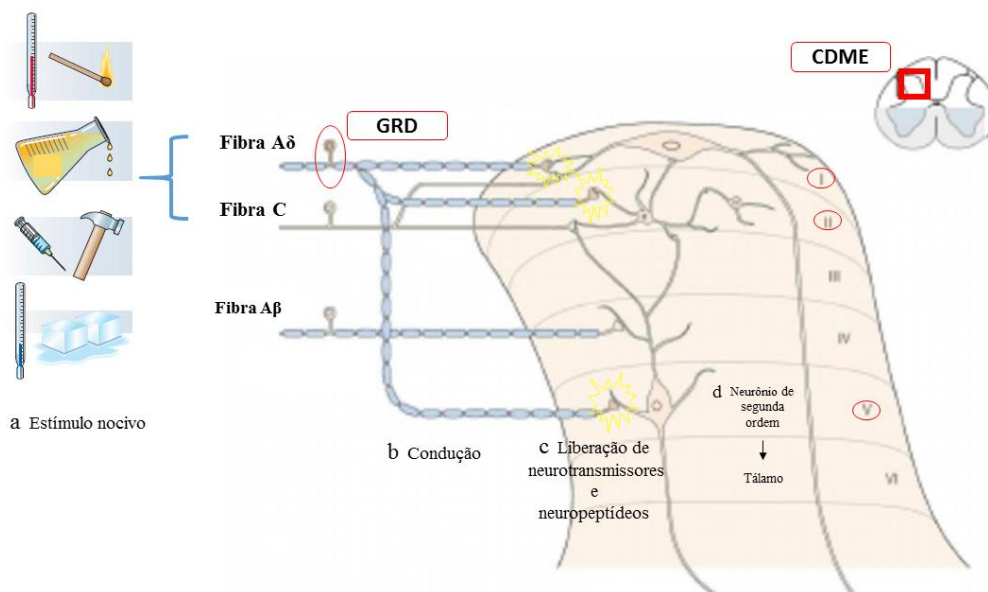
fibras A δ , são de médio diâmetro e levemente mielinizadas, responsáveis pela velocidade de condução rápida (BASBAUM, 2009; WOOLF, 2010).

Quando um estímulo é capaz de ativar os nociceptores periféricos, ocasionando um potencial de ação, este se projeta, através das fibras C ou A δ , principalmente para as lâminas I, II e V, do CDME, onde ocorre a liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato e a substância P (SP). O glutamato, liberado excessivamente na medula espinal promove a ativação de células gliais (microglia e astrócitos). Uma vez que estas células se tornam ativadas, elas contribuem para o desenvolvimento e manutenção da sensibilização central (WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001).

Ainda, essa sensibilização desencadeada pode fazer com que o paciente tenha uma sensibilidade sensorial aumentada, ou seja, passe a reconhecer estímulos que antes eram inócuos como dolorosos (alodinia), assim como estímulos que antes já eram caracterizados como dolorosos, sejam percebidos mais exacerbadamente (hiperalgesia) (LOESER; TREEDE, 2008; COSTIGAN et al., 2009; WOOLF, 2010).

Além disso, é necessário que ocorra a ativação de um neurônio de segunda ordem, o qual levará o estímulo pelo trato espinotalâmico até o tálamo, onde os neurônios de terceira ordem conduzirão o estímulo até o córtex somatossensorial primário, o discriminando como doloroso (BAUSBAM et al., 2009; TODD, 2010; WOOLF, 2010; OSSIPOV, 2010; KANDEL et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1- Representação esquemática das informações nociceptivas conduzidas até o corno dorsal da medula espinal.



Nota: (a) Logo após o estímulo nocivo, ocorre a ativação dos nociceptores, que são receptores sensoriais nociceptivos cujos corpos celulares estão localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD). Estes neurônios sensoriais possuem fibras do tipo A δ ou C.

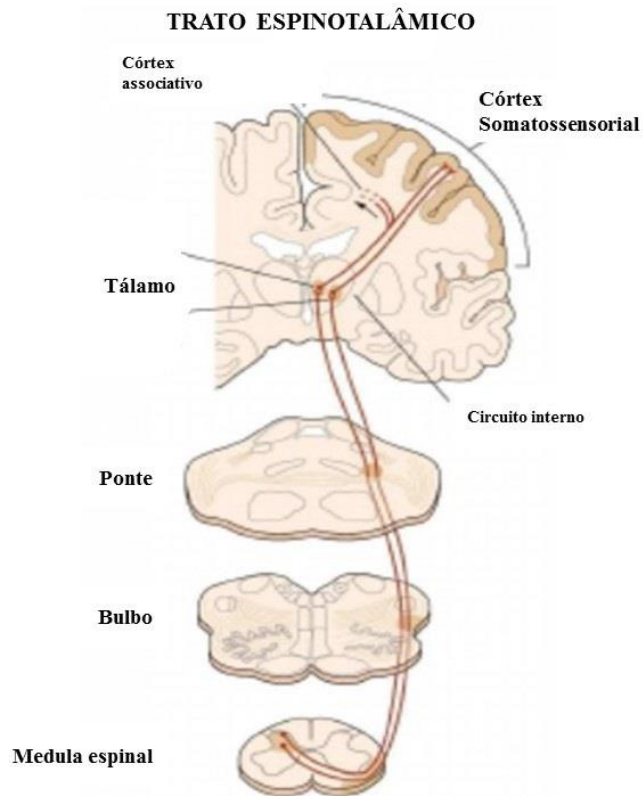
(b) As fibras sensoriais (A δ e C) conduzem o estímulo nociceptivo até o CDME, onde chegam de forma organizada em diferentes locais nas lâminas de Rexed (dependendo da modalidade sensorial as quais transmitem), mas, principalmente, nas lâminas I, II e V.

(c) No CDME, ocorre a liberação de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato e de neuropeptídeos, como a substância P, ocasionando sensibilização central.

(d) Ativação de um neurônio de segunda ordem, o qual conduzirá o estímulo pelo trato espinotalâmico (via ascendente da dor) até o tálamo.

O trato espinotalâmico é uma das principais vias ascendentes da dor, o qual é responsável pela condução da informação nociceptiva da medula até as regiões encefálicas, mais especificamente para o córtex somatossensorial (Figura 2).

Figura 2- Esquema representativo da principal via ascendente da dor, o trato espinotalâmico.



Fonte: Adaptado de *Kandel et. al.*, (5ª edição) 2014.

Ainda, diferente da dor nociceptiva, a qual alerta a ocorrência de lesões no organismo do indivíduo e tende a desaparecer com a remoção do fator causal ou resolução do quadro patológico (TEIXEIRA, 2001), a dor crônica é reconhecida como uma dor persistente ou recorrente com duração de mais de três meses (WOOLF, 2010; TREEDE et al, 2015).

A dor crônica é considerada um problema de saúde global, com maior gravidade e está presente em mais de 70% dos pacientes que buscam os consultórios médicos brasileiros por motivos diversos. Apesar de ser a razão de consultas médicas, em um terço dos casos, é de difícil tratamento devido sua persistência e redução na qualidade de vida do paciente, já que está associada a comorbidades comuns como: distúrbios de sono, medo, ansiedade e depressão (RUSSO; BROSE, 1998; LOHMAN; SCHLEIFER; AMON, 2010; TRACEY; DICKENSON, 2012).

Diversas patologias levam a uma redução da qualidade de vida do paciente, devido sua sintomatologia e a não existência de um tratamento adequado, dentre estas temos a fibromialgia (WOLF, 2010; TREEDE et al., 2015).

2.2 FIBROMIALGIA

A fibromialgia (FM; CID-10 M797) é caracterizada, principalmente, como dor primária crônica generalizada, não-inflamatória e que possui destaque por seu diagnóstico apresentar bastante controvérsias no campo da reumatologia (TREEDE et al., 2015). A FM tem prevalência de 1-3% da população e afeta, principalmente, mulheres dos 35 aos 50 anos e o diagnóstico é feito, exclusivamente, pela avaliação dos sintomas do paciente (JESCHONNECK et al., 2001).

A dor é a principal característica desta patologia, porém há outros sintomas relevantes como ansiedade, depressão, fadiga, rigidez matinal, distúrbios do sono e psicológicos (MARQUES et al., 2002). Numerosos estudos relacionam os problemas de sono tanto à dor, como à depressão, uma vez que, quando deprimidos, os pacientes apresentam níveis de atividade reduzidos e níveis de sono aumentados durante o dia, caracterizando dificuldade ao adormecer e interrupções de sono na madrugada (BIGATTI et al., 2008).

Uma vez que não existem exames laboratoriais específicos para o diagnóstico da FM, ele se faz pela história clínica do paciente. Além disso, os pacientes com esta síndrome musculoesquelética possuem sítios anatômicos dolorosos específicos, os *tender points*, que auxiliam no diagnóstico da FM, a partir de escores propostos em 1990 pelo Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Reumatology - ACR*, 1990). Estes escores variam de acordo com a seguinte escala: 0 – ausência de dor; 1 – dor leve; 2 – exclamação verbal da dor; 3 – movimento de retirada ou expressão facial de dor.

Além desses escores preestabelecidos, se faz uso de duas variáveis: dor bilateral, acima e abaixo da cintura pélvica; dor nos lados esquerdos e direitos do corpo como representado no Quadro 1 (WOLFE et al., 1990; ATALLAH-HAUN et al., 1999, PROVENZA et al., 2004).

Quadro 1- *Tender points* bilaterais e suas localizações.

Cervical baixo	No ligamento intertransverso C5-C6
Segunda costela	Na segunda junção costovertebral
Epicôndilo lateral	À uma distância de 2cm do epicôndilo
Joelho	Acima da linha média do joelho
Occipital	Na inserção do músculo suboccipital
Trapézio	No ponto médio da borda superior
Supra – espinhoso	Acima da escápula
Glúteo	Na porção anterior do glúteo
Trocânter maior do fêmur	Posterior à eminência trocantérica

Fonte: Adaptada de WOLFE et.al,1990.

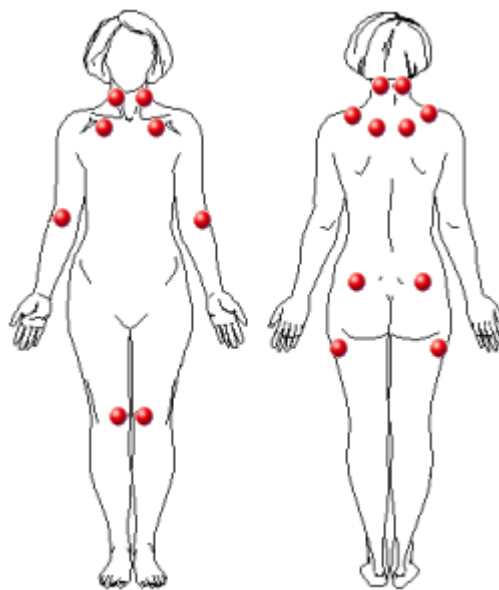
Será considerado um quadro clínico de fibromialgia se os critérios citados acima, forem satisfeitos (WOLFE et al., 1990; 1997) somado à dor generalizada crônica com mais de três meses de duração e dor à palpação em pelo menos 11 dos 18 pontos dolorosos (Figura 3), onde um ponto é considerado positivo, quando o indivíduo classificar e declarar a força aplicada no local (palpação) como dolorosa.

Em contrapartida com o que foi citado acima, outro estudo adiciona critérios mais simples e práticos que contribuem para o diagnóstico da FM, sem a quantificação do número de *tender points*. Estes novos critérios avaliam o índice de dor generalizada (0-19 pontos) nas costas, quadril, mandíbula, ombros, braços, pernas, abdômen, peito (todas estas áreas bilateralmente) e uma escala 0-3 para cada sintoma como: fadiga, insônia e sintomas cognitivos, somados à severidade total destes sintomas (0-3), totalizando uma escala de 0-12. O paciente é considerado acometido por FM se apresentar um índice de dor generalizada ≥ 7 e escala ≥ 5 ; ou quando o índice de dor generalizada for de 3–6 e escala ≥ 9 . Esta escala classifica corretamente 88% dos casos de FM, definidos pelo *American College of Rheumatology*, não necessitando de avaliação física ou palpação dos sítios dolorosos (WOLFE et al., 2010a).

Wolfe (2010) afirma que com a utilização deste critério é possível estudar mais amplamente, de forma simples e sem muitos custos, conduzindo para uma “nova era” de pensamento sobre a FM e dor crônica.

Apesar da etiopatologia desta síndrome não ser muito conhecida, vários estudos evidenciam a complexa interação entre o SNC e o periférico (ELVIN et al., 2006), e principalmente a disfunção neuro-hormonal que acarreta na redução ou deficiência de neurotransmissores, como a 5-HT (HELFENSTEIN et al., 2002). Como tratamento são usados antidepressivos tricíclicos, os quais atuam auxiliando na redução da sintomatologia no indivíduo, contribuindo assim, para uma melhora na sua qualidade de vida (LITTLEJOHN; GUYMER; 2006; BELLATO, 2012).

Figura 3 – Representação ilustrativa da localização dos 18 pontos dolorosos (*tender points*).



Fonte: <https://trynabpainfreemomma.wordpress.com/>

Como modelo animal de fibromialgia se tem utilizado injeções musculares de salina ácida (KIM et al, 2009), estresse por frio intermitente (NISHIYORI; UEDA, 2008) e o modelo de depleção de amins biogênicas. Este último modelo foi escolhido para o presente trabalho, no qual há a aplicação subcutânea durante três dias consecutivos de reserpina (1 mg/kg) (NAGAKURA et.al, 2009).

A reserpina é um depletor de amins biogênicas, no qual age no transportador vesicular de monoaminas (VMAT), bloqueando a transmissão e o armazenamento neuronal, participando então da patofisiologia da dor (LOHR; KUCZENSKI; NICULESCU,2003). Ainda, a reserpina era utilizada como antipsicótico no tratamento de esquizofrenia (CONLEY; KELLY, 2001), assim como em diversos modelos de distúrbios neurológicos, como a doença de Parkinson (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957; BURGER

et al., 2003; RECKZIEGEL et al., 2015) e discinesia tardia (movimentos de mastigação no vácuo) (BURGER et al., 2004; BUSANELLO et al., 2011; RECKZIEGEL et al., 2015).

2.3 SEROTONINA

A 5-HT é uma indolamina notada por seu papel como neurotransmissor e proveniente da hidroxilação e de descarboxilação do aminoácido triptofano obtido da dieta (O'MAHONY et al., 2015). A síntese de 5-HT ocorre nos neurônios serotoninérgicos que constituem um grupo de células multipolares distribuídas e localizadas no núcleo medial e dorsal da rafe (REIS, 2007). Atua influenciando quase todas as funções cerebrais de forma direta ou estimulando o sistema GABAérgico, modulando o humor, sono, atividade sexual, apetite, ritmo circadiano, funções neuroendócrinas, temperatura corporal, sensibilidade à dor, atividade motora e funções cognitivas (MOHAMMAD-ZADEH et al., 2008).

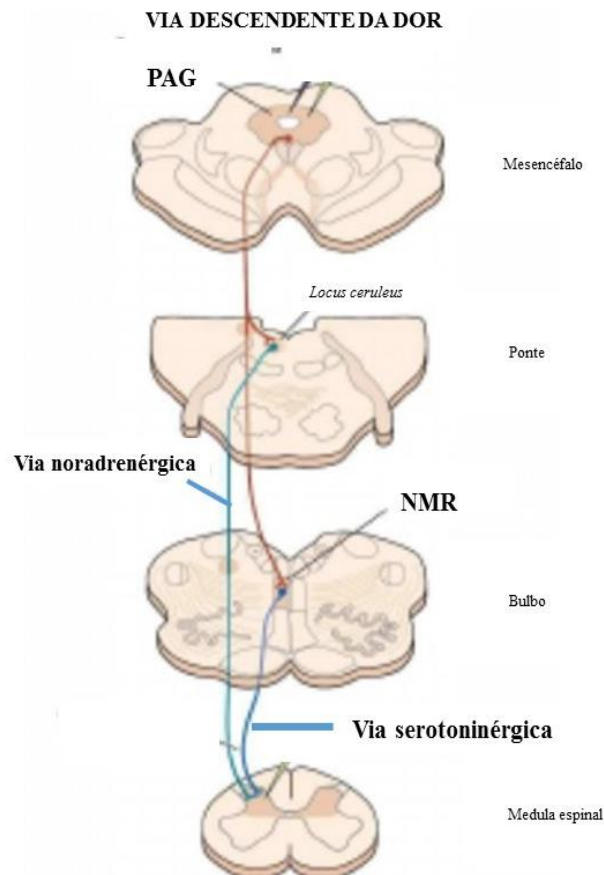
Na transdução do sinal nociceptivo, em condições fisiológicas, a substância P e a 5-HT atuam em conjunto, ocorrendo aumento de SP, demonstrado no fluido cerebrospinal e ao mesmo tempo há aumento dos níveis de 5-HT e conseqüentemente, redução da liberação de SP na medula espinal (ERNBERG; 1999; STAUD et al., 2001; 2003; STAUD; SMITHERMAN, 2002). No entanto, um desequilíbrio neuroquímico ou funcional entre substância P e 5-HT estão envolvidos no processo da dor. Um estudo realizado em pacientes com FM, mostrou que estes apresentam redução da concentração de serotonina, que atua inibindo a SP (RUSSEL, et al., 1994), ou seja, os níveis de SP são menos controlados pelos neurônios serotoninérgicos, contribuindo para o aparecimento do sintoma de dor (NARANJO; TREMBLAY; BUSTO 2001).

Estes neurônios serotoninérgicos são originados no tronco encefálico e participam da modulação descendente da dor. As estruturas envolvidas nesta modulação incluem a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e bulbo rostroventromedial, mais precisamente o NMR (Figura 4). A PAG expressa grande quantidade de encefalinas, dinorfinas e receptores opióides e envia projeções para o bulbo rostroventromedial, especialmente para o NMR, onde a 5-HT é o neurotransmissor mais abundante encontrado (MILLAN, 2004; BASBAUM et al., 2009; OSSIPOV, 2010).

No corno dorsal da medula espinal ocorrerá a interconexão de fibras descendentes (serotoninérgicas), interneurônios inibitórios (encefalinérgicos) e de fibras nociceptivas (ascendentes). As fibras serotoninérgicas irão fazer conexão com os interneurônios inibitórios

presentes no CDME, ativando-os e fazendo com que ocorra a liberação de encefalinas, assim, suprimindo a atividade dos neurônios de projeção espinotalâmicos (MILLAN, 2002; BAUSBAM et al., 2009; OSSIPOV, 2010; KANDEL et al., 2014; WOOLF, 2010).

Figura 4 – Esquema representativo da via inibitória ou descendente da dor.



Fonte: Adaptado de *Kandel et. al.*, (5ª edição) 2014.

2.4 EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício físico tem sido um aliado importante na manutenção do bem-estar e como recurso terapêutico na redução de patologias e doenças crônicas. Vários trabalhos mostram a importância e os benefícios que a atividade física proporciona, como a melhora da força e potência muscular em idosos (CECI et al., 2014), redução dos problemas de dependentes químicos, com estimulação na liberação de substâncias neurotróficas que auxiliam na prevenção e tratamento da dependência (FERREIRA et. al., 2016), e também como parte do tratamento de pacientes diabéticos, mantendo um índice glicêmico adequado (VANCEA, 2009).

Ainda, o exercício físico tem sido capaz de beneficiar a saúde física e mental, melhorando a qualidade de vida e diminuindo a incidência de doenças relacionadas ao estilo de vida sedentário, tais como diabetes e obesidade (RADÁK et al., 2006; HAYES et al., 2008 MEDEIROS et al., 2011), melhorando fatores relacionados ao aprendizado e a cognição (VAN PRAAG et al., 1999; DAVRANCHE; MCMORRIS, 2009) e auxiliando no controle de algumas condições dolorosas (WRIGHT; SLUKA, 2001).

Há também forte evidência de que o exercício aeróbio supervisionado reduz a dor, o número de pontos dolorosos, depressão, ansiedade, melhora a qualidade de vida, e outros aspectos psicológicos. Uma vez que o treino aeróbio provoca mudanças neuroendócrinas, aumentando a liberação de aminas biogênicas, como serotonina e norepinefrina (VALIM et al., 2003; BUSH et al., 2002).

Para ser considerado um treino aeróbio, o indivíduo deve atingir 55-90% da frequência cardíaca máxima ou 40-85% do consumo de oxigênio de reserva (VO_2R). O volume de oxigênio máximo traz dados objetivos que auxiliam na prescrição de exercícios ou protocolos de treinamento apropriados para humanos, porém sua utilização em experimentação animal, muitas vezes é inviável pelo alto custo com equipamentos, fazendo com que outros métodos alternativos sejam escolhidos, como o teste de esforço máximo que é considerado seguro e tolerado (RODRIGUES et al., 2007)

Rodrigues e colaboradores (2007), ainda relata que o teste de esforço máximo (TEM), relaciona-se com a avaliação da capacidade física e é utilizado na prescrição de atividade e treinamentos físicos. Tem sido uma prática comum em experimentos com animais, onde os animais caminham em esteira ergométrica com velocidade progressiva até seu esgotamento físico.

Atualmente, o Colégio Americano de Medicina de Esportes (*American College of Sports Medicine – ACMS*) reconhece que a intensidade de treinamento para promoção de saúde (redução do risco coronariano, melhora metabólica e de doenças degenerativas) é menor do que aquela necessária para aumentar a aptidão cardiorrespiratória. Entretanto, é importante conhecer a intensidade mínima de treino capaz de promover a melhora da dor (POLLOCK et al, 1998) e se considera um treino de 50-70% de $VO_2máx$ de baixa intensidade (HARTHMAN et al., 2007).

Para estudos de funções básicas do encéfalo em animais, se tem utilizado protocolos de exercício físico forçado, como ocorre na esteira, os quais visam estimular respostas ao um

treinamento com predominância do metabolismo aeróbico, pois este tipo de exercício físico está associado aos benefícios da saúde em geral (PLOUGHMAN et al., 2005).

A corrida em esteira ativa as respostas neuroendócrinas de estresse e mantém o animal correndo em uma velocidade constante, de acordo com as configurações de treinamento físico do experimento: tempo, duração, velocidade. A preferência por este tipo de atividade é geralmente devido às maiores respostas do metabolismo aeróbio e por ser responsável pela indução dos maiores e mais consistentes efeitos do treinamento físico (KEMI et al., 2002).

Há estudos demonstrando que exercício físico pode modificar a neurotransmissão serotoninérgica em diferentes regiões do SNC, aumentando a concentração de 5-HT na medula espinal, tronco encefálico, mesencéfalo, córtex cerebral e hipocampo de ratos (GERIN; BECQUET; PRIVAT, 1995; GOMEZ-MERINO et al., 2001), no corno dorsal e ventral da medula espinal de gatos (VEASEY et al., 1997) e atuando na melhora do metabolismo da 5-HT no córtex cerebral (DEY; SINGH; DEY, 1992).

Sabe-se que programas de exercícios são considerados parte do tratamento de pacientes com FM. As indicações de exercício físico são frequentes e de forma geral, auxiliam na qualidade de vida destes indivíduos, produzindo uma diminuição do impacto da síndrome na qualidade de vida dos pacientes (SABBAG et al., 2000).

Os efeitos benéficos do exercício físico já estão descritos e bem esclarecidos em algumas patologias, como na prevenção de acidente vascular encefálico (HAYES et al., 2008), e na regeneração de nervos periféricos (BOBINSKY, 2011), porém pouco se sabe sobre neuroproteção em casos de fibromialgia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito neuroprotetor do exercício físico quanto à sensibilidade mecânica, nociceptiva, comportamento locomotor, conteúdo e quantidade de neurônios marcados com serotonina no núcleo magno da rafe em ratos submetidos ao modelo experimental de fibromialgia induzido por reserpina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da aplicação de reserpina quanto à sensibilidade mecânica e nociceptiva, usando estesiômetro (filamentos de von Frey), analgesímetro (teste de Randall-Selitto) e analgesímetro digital (teste de *tail-flick*).
- Avaliar o efeito da aplicação de reserpina quanto à locomoção, pela análise no campo aberto.
- Mensurar o conteúdo de 5-HT no NMR, por meio de análise da densidade óptica e o número de neurônios imunorreativos à 5-HT no NMR de ratos submetidos à injeção de reserpina.
- Avaliar o efeito de um protocolo de treinamento em esteira de 14 dias, antes da aplicação de reserpina, nos animais submetidos ao modelo animal de fibromialgia quanto à sensibilidade mecânica e nociceptiva, usando estesiômetro (filamentos de von Frey), analgesímetro (teste de Randall-Selitto) e analgesímetro digital (teste de *tail-flick*).
- Analisar o efeito de um protocolo de treinamento em esteira de 14 dias, antes da aplicação de reserpina, nos animais submetidos ao modelo animal de fibromialgia quanto à locomoção, pela análise no campo aberto.
- Analisar o efeito de um protocolo de treinamento em esteira de 14 dias, antes da aplicação de reserpina, nos animais submetidos ao modelo animal de fibromialgia quanto ao conteúdo de 5-HT no NMR, por meio de análise da densidade óptica e o número de neurônios imunomarcados com 5-HT no NMR.

4 MANUSCRITO

O manuscrito está disposto conforme as especificações requisitadas pela revista BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH, ao qual foi submetido para publicação.

Physical training prevents behavioral and morphological alterations in Fibromyalgia animal model induced by reserpine

Karen Luise dos Santos Moreira^{a,c}, Sílvia Barbosa^b, Patrícia Severo do Nascimento^{a,c*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^bLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

^cLaboratório de Pesquisa Experimental da Dor, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

All the authors contributed equally to the development of this project.

***Corresponding author:** Patrícia Severo do Nascimento. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, prédio 21, sala 5210, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Telephone number: +55 55 3220 8097. E-mail address: patricia.nascimento@ufsm.br

Highlights

Reserpine induced mechanical and nociceptive alterations in rats.

Reserpine decreased the number of 5-HT neurons in the Nucleus Raphe Magnus.

Treadmill training prevents mechanical, nociceptive and morphological alterations caused by reserpine.

Abstract

In fibromyalgia there are alterations in the serotonergic system, but there is no evidence regarding to the effect of reserpine in the nucleus raphe magnus. Physical exercise has been recommended as complementary therapy in the treatment of this syndrome, but there is no evidence about its neuroprotective effects. Thus, the aim of the current study was to investigate the effect of reserpine in nucleus raphe magnus and to evaluate the effect of the treadmill training for two weeks before reserpinization. Twenty-nine male *Wistar* rats were divided in three groups: non-reserpinized rats, reserpinized rats and rats submitted to treadmill training and reserpinized. Treadmill training was performed for two weeks. Animals were

reserpinized and after the last reserpinization, mechanical and nociceptive sensitivities were assessed by von Frey, Randall-Selitto and tail-flick tests. Also, locomotor activity was evaluated by open field test. Then, animals were transcardially perfused and the brains were post-fixed, cryoprotected and sectioned in cryostat. Immunohistochemistry for serotonin was performed in the nucleus raphe magnus to evaluate the optical density and number of neurons. Our results showed that reserpine increased mechanical and nociceptive sensitivities, as well as decreased the number of serotonin-immunoreactive neurons in the nucleus raphe magnus. These alterations were prevented by treadmill physical training before reserpinization. In conclusion, our data showed that altered sensitivities were related to decreased number of neurons in the nucleus raphe magnus. Also, physical training before reserpinization prevents behavioral and morphological alterations caused by reserpine, showing physical training as a neuroprotective agent in animal model of fibromyalgia.

Keywords: Widespread chronic pain. Physical exercise. Serotonin. Nucleus raphe magnus.

Introduction

Fibromyalgia syndrome (FMS; ICD -10 M797) is characterized by widespread chronic pain and its prevalence is around 2-4% of the general population. The syndrome diagnosis is based on its symptoms as generalized pain, depression, anxiety, fatigue, disturbance of the mood and sleep; and in the clinical and physical characteristics of patients [1].

Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) is an indolamine produced by neurons located in the raphe nuclei, including the nucleus raphe magnus (NRM) [2,3], which projects to the dorsal horn of the spinal cord, contacting interneurons related to the ascending pathway, modulating the perception of the nociceptive stimulus [4].

Moreover, these neurons modulate sleep and mood [5]. Although FMS does not have a well-described pathogenesis, an alteration in the descending pain control, which is modulated by the serotonergic projections, is one of the proposed mechanisms involved in this syndrome [1,4].

Physical training has been used in the well-being maintenance and to control chronic diseases [6]. Further, in FMS there are alterations in the serotonergic system, and, physical exercise can modulate the nociceptive stimulus [7], the motor behavior in rats [8], as well as the content of 5-HT in raphe nuclei [9]. Thus, physical training has been indicated to people

with FMS [10]. However, there is no evidence regarding the neuroprotective effects of physical training in FMS. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of the reserpine (an alkaloid classically used to reproduce FMS animal model) in the serotonin (5-HT) immunoreactivity in the NRM, as well as, to evaluate the neuroprotective effect of treadmill physical training, in rats submitted to FMS animal model.

Methods

Animals

Twenty-nine male *Wistar* rats (4 weeks old) obtained from Central Animal Laboratory of the Federal University of Santa Maria (UFSM) were housed in standard laboratory conditions with food and water *ad libitum*, controlled temperature (22 ± 2 °C) and under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 am). All efforts were made to minimize the number of animals studied and their suffering. The animals were cared for following Arouca Brazilian law (11794/2008) and the recommendations of the National Council for Control of Animal Experimentation, Ministry of Science and Technology (CONCEA, BRAZIL). Moreover, the study methods were in compliance with the Ethics committee on the use of animals of UFSM which approved this study under protocol number 6276101114.

Experimental design

The rats were divided into three groups: no-reserpinized rats (C), reserpinized rats (R) and rats submitted to treadmill training for two weeks and reserpinized (TR). For the body weight and behavioral analysis (mechanical and nociceptive sensitivities and locomotion) were used 9-10 animals per group. For immunohistochemistry and morphological studies, 5-6 animals were randomly selected per group. All animals were weighted before and after the experimental protocols.

Maximal exercise test and Treadmill training

All animals were adapted for 4 days for 10 min at 5 m/min walking on a treadmill (*Athletic Advance 500EE*, Brasil). Then, on the 5th day, they were submitted to a maximal exercise test (MET), which consisted of a graded exercise on the treadmill with speed increments of 5 m/min every 3 min, starting at 5 m/min and continuing up to the maximal intensity attained by each rat. The exercise was stopped when each animal remained for more

than 50% of the time without run or walk [11, 12]. The values obtained in the MET were used to plan the treadmill training program.

The exercise protocol was performed on a treadmill once per day, during two weeks. In the first week animals started to running for 30 minutes and reached the time of 60 minutes. In the second week, the animals kept running for 60 min. The training intensity was increased gradually according to the MET results. The training sessions consisted of a warm-up period, a main period and a cool-off period. During the warm-up period, the rats ran 30% of the maximum velocity determined by the MET, per 5 minutes; during the main period, the rats ran 50 minutes at 40-60% of the maximum velocity obtained in MET; and during the cool-off period, the rats ran 5 minutes at 30% of the maximum MET values, modified from [11].

After physical training (day 15) the rats from R and TR groups received repeated administration of reserpine (Sigma-Aldrich, USA; 1mg/kg; subcutaneously, dissolved in glacial acetic acid, which was diluted to a final concentration of 0.5% in distilled water) once a day, for three consecutive days. Animals from the C group received repeated administration of 0.5% acetic acid in distilled water once a day, for three successive days (Figure 1) [13].

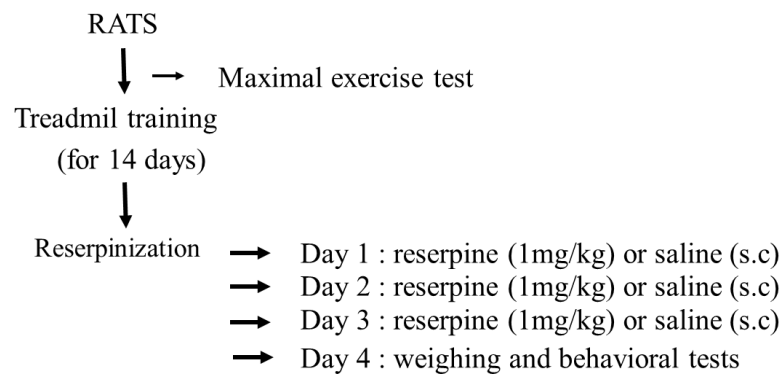


Figure 1- Experimental design. Rats were treated with reserpine (1 mg/kg/day, s.c.) or vehicle (saline) during 3 days. After treatment (day 4), rats from each group were weighted and evaluated. The experimental groups were as follows: no-reserpimized rats (C), reserpimized rats (R) and rats submitted to treadmill training for two weeks and reserpimized (TR). The brains were removed from the skulls and were used for immunohistochemistry, which was used to evaluate the optical densitometry and number of 5-HT immunopositive neurons in the NRM. Behavioral evaluations were performed on day 4, one day after last reserpimization (Von frey filaments, Randall Selitto, Tail-flick and Open field tests). Font: Author.

Behavioral Tests

Mechanical sensitivity analysis

Von Frey filaments test

The mechanical sensitivity was evaluated using a series of von Frey filaments, and the rats were acclimatized for 30 minutes in a box (27 X 27 X 20 cm) with a mesh floor. The filaments were applied in a consecutive sequence (15, 26, 60, and 100 g), three times, on the plantar surface of the left and right hind paw pads. Vertical elevation of the paw immediately upon removal of the testing hair was considered a positive response. To confirm the reaction, this filament was replaced by a weaker one. In the absence of paw withdrawal, filaments of increasing weight were applied sequentially [14]. This test was done one day after the last reserpinization.

Randall- Selitto test

In the day after the last reserpinization, the animals were immobilized with soft cotton cloth, and the same hand used to hold the tested paw. The test consisted of the application of an increasing mechanical force, in which the tip of the device was applied to the medial portion of the hind paws until the withdrawal response. Was applied a maximum force of 250 g to avoid skin damage. The test was performed to the left and right hind paws and the data represents the mean of the responses from both hind paws (in grams) [15].

Nociceptive sensitivity analysis

Tail-Flick test

In the day after the last reserpinization, nociceptive sensitivity was assessed using the tail-flick apparatus (Insight, Brazil). The rats were placed on the equipment wrapped in a towel. A light source positioned below the tail was focused on a point 2–3 cm rostral to the tip of the tail. With the removal of the tail, the photocell is activated, and automatically the test is terminated. The animals were placed in the tail-flick apparatus, at the week when they were in adaptation for the MET, to familiarize them with the procedure, as the novelty of the device can itself induce antinociception [16]. The tail-flick latency represented the period from the beginning of the test to the tail deflection (in seconds) [17].

Locomotor and exploratory activity

Open field test

The rats were gently placed in the corner of a 40 cm×50 cm×60 cm box, in which the floor was divided into 12 squares, and then filmed with a digital camcorder for 3 min. The number of crossings from one square to another were counted. Data represented the mean ± standard error of the mean (SEM) of crossed squares [8].

Immunohistochemistry procedure

One day after the analyses of the motor skills, rats were anesthetized with sodium thiopental (i.p; 50 mg/kg; Cristalia, Brazil). Heparin (1000 IU; Cristalia, Brazil) was injected into the left cardiac ventricle, then the animals were transcardially perfused using a peristaltic pump (Control Company, Brazil, 20 mL/min) with 400 mL of 0.9% saline solution, and after by 400 mL of a fixative solution 4% paraformaldehyde (Synth, Brazil) in solution of the 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB).

The brains were removed from the skulls, post-fixed in the same solution at room temperature for 4 hours and cryoprotected by immersion in a 15% and 30% sucrose (Synth, Brazil) solution in PB at 4 °C until they sank. After these procedures, the brains were quickly frozen in isopentane (Neon, Brazil) cooled in liquid nitrogen and kept in a freezer (−80 °C) for further analyses.

Coronal sections (50 µm) from nucleus raphe magnus (NRM) were obtained from each brain using a cryostat (CM1850, Leica, Germany) and collected in a PB saline (PBS), pH 7.4, with a temperature at −20 °C. These areas were identified using Paxinos and Watson's Atlas (1998). The free-floating sections were pre-treated with 3% hydrogen peroxide for 30 min, carefully washed and treated with 2% bovine serum albumin (Inlab, Brazil) in PBS containing 0.4% Triton X-100 (PBS-Tx) for 30 min and incubated with polyclonal anti-serotonin antibody produced in rabbit (Sigma Chemical Co., USA), diluted 1:4000 in PBS-Tx for 48 h at 4 °C. Sections were again washed in PBS-Tx and incubated in an anti-rabbit antibody conjugated with peroxidase (Sigma Chemical Co., USA) diluted 1:200 in PBS-Tx for two h at room temperature. The reaction was revealed in a medium containing 0.06% 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co., USA) dissolved in PBS for 10 min and then 1 µL of 3% H₂O₂/mL was added to the DAB medium for additional 10 min. Finally, the sections were rinsed in PBS, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and covered with

Canada Balsam (MediQuímica, Brazil) and coverslips. Control sections were prepared to omit the primary antibody by replacing it with PBS [9].

Optical densitometry

The semi-quantitative densitometric analysis was used to measure the intensity of the 5-HT immunoreaction using a digital camera (Opton®, 10.0 MP) coupled to a light microscope (Olympus®, design CX40). The camera functions were controlled and configured by the interfaced software IS Capture® and the software Image J® 1.46 (NHI, USA). The digitized images obtained from the selected areas were converted to an 8-bit grayscale (0–255 gray levels). All lighting conditions and magnifications were held constant. Both left and right sides of each brain were used. For each rat, five measures were taken from the NRM. In each image two area of interest (AOI) were analyzed in the NRM. Picture elements (pixels) employed to measure optical density were obtained from squares measuring 30,639 μm^2 overlaid on the grayscale image. Background correction was done using the rolling ball radius method.

The formula:

$$\text{OD} = -\log[\text{INT}(x,y) - \text{BL}] / (\text{INC} - \text{BL})$$

was used to calculate optical density (OD). Where "OD(x,y)" is the optical density at pixel(x,y), "INT(x,y)" or intensity is the intensity at pixel(x,y), "BL" or black is the intensity generated when no light goes through the material and "INC" is the intensity of the incidental light [26, 12]. The results shown were the mean value \pm standard error of the mean (SEM) from the NRM [8].

Counting cells method

The same images from NRM for the optical densitometry analysis were used to count cells. For each rat, five images were analyzed. In each image, all the 5HT-neurons in the AOI (44,684 μm^2) were counted [9]. Data represented the mean \pm standard error of the mean (SEM) from counted cells.

Statistical Analysis

Data from the body weight was evaluated by repeated measures analysis of variance (ANOVA), and differences between the groups were assessed using the Bonferroni *post-hoc* test. The data obtained from mechanical sensitivity test (von Frey filaments test and Randall-

Selitto test) and nociceptive sensitivities (tail-flick test), open field test (crossed squares), as well as optical densitometry of 5HT-ir and counted cells in the NRM were analyzed using one-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test. The data were considered significant when $P < 0.05$. Data were run on Statistica 6.0 software package (StatSoft, Inc., USA). All data are represented by the mean \pm standard error of the mean (SEM).

Results

Body Weight

The body weight was not altered among the C, R and TR groups before (111.3 ± 2.5 g; 106.06 ± 2.5 g; 108.4 ± 2.6 g, respectively) and after (222.1 ± 5.5 g; 225.4 ± 5.5 g; 221.2 ± 5.8 g, respectively) training period ($P > 0.05$). Nevertheless, there were differences in the groups before and after the training period ($P < 0.05$; Figure 2A).

Mechanical sensitivity results

Von Frey filaments test

One day after the last application of reserpine there were differences between R (17.2 ± 3 g) and C (56.6 ± 2.9 g; $P < 0.05$) and TR (56.2 ± 3.1 g; $P < 0.05$). However, there was no difference between C and TR groups ($P > 0.05$; Figure 2B).

Randall-Selitto test

One day after the last reserpine data showed the R (45.0 ± 5.9 g) has a decreased threshold response compared to C (76.5 ± 5.9 g; $P < 0.05$). Moreover, there was no difference between C and TR groups (84.2 ± 6.2 g; $P > 0.05$; Figure 2C).

Nociceptive sensitivity results

Tail-Flick test

After the last reserpine, the R (1.96 ± 0.1 s) was different of C (2.42 ± 0.09 s) and TR (2.60 ± 0.1 s) groups ($P < 0.05$). Moreover, there were no differences between C and TR groups ($P > 0.05$; Figure 2D).

Open Field test

There were no differences in the number of crossed squares among C (29.3 ± 3.7), R (35.4 ± 3.9) and TR (33.9 ± 3.9) groups ($P > 0.05$; Figure 2E).

Optical densitometry and 5-HT positive counted cells

Statistical analysis showed that there were no differences in the optical densitometry of 5-HT-ir among the C (0.0048 ± 0.0006), R (0.0035 ± 0.0007) and TR (0.0044 ± 0.0006) groups ($P > 0.05$; Figure 2F).

However, in the R (4.2 ± 0.2) decreased 5-HT NRM counted cells compared to C (5.4 ± 0.2) and TR groups (5.7 ± 0.2 ; $P < 0.05$). There was no difference between C and TR groups ($P > 0.05$; Figure 2G). Figure 3 shows illustrative images from C, R and TR groups.

Discussion

In this study, we analyzed the neuroprotective effect of physical training on treadmill before reserpine. The mechanical and nociceptive sensitivities, locomotor activity, as well as the optical density and the number of 5-HT immunoreactive neurons were evaluated.

In control, reserpine and trained-reserpine groups, the treadmill training did not alter body weight, both in the initial and final evaluations. These data are in agreement with other studies in which no differences in body weight were observed after training [19].

The mechanical sensitivity tests in the reserpine animals showed an increased mechanical sensitivity, demonstrated by the decrease in the withdrawal threshold in the von Frey filaments and Randall-Selitto tests. However, in the trained-reserpine animals, the withdrawal threshold in these tasks were similar to the no-reserpine animals. This neuroprotective effect of physical training was shown in animal models of neuropathic pain [20] and stroke.

Reserpine animals had increased nociceptive sensitivity, demonstrated by the decreased latency of tail deflection in the tail flick test. However, the latency to tail deflection was similar in no-reserpine animals and trained-reserpine animals, showing the effectiveness of treadmill training on the protection from the nociceptive effects of the reserpine. Nevertheless, although there are no studies showing neuroprotective effects of the treadmill training in FMS, several studies showed its benefits in oxidative stress [19], in therapeutic of the neuropathic pain and peripheral regeneration [17,8,20], as well as in the rats' cognition improvement [19].

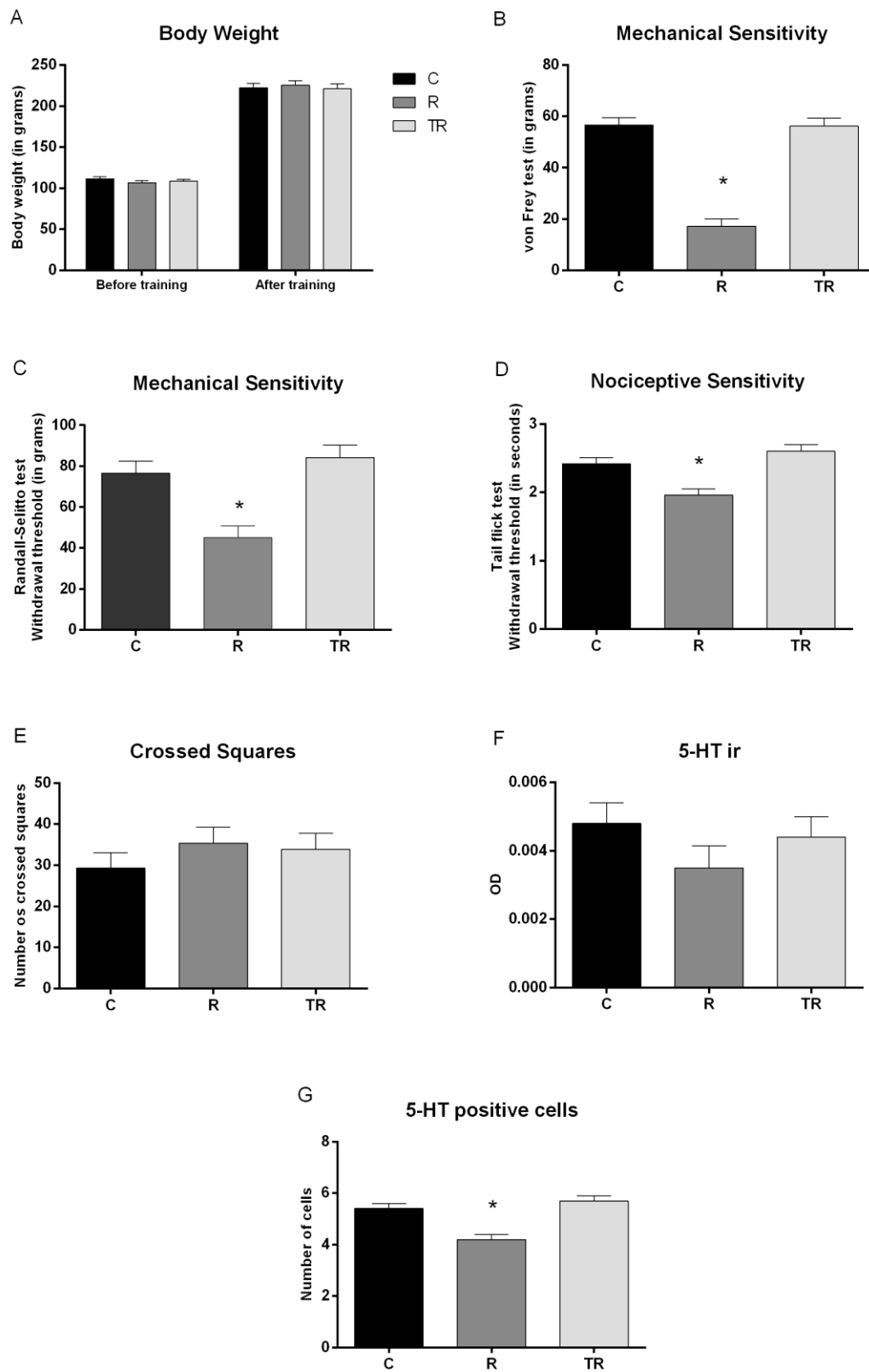


Figure 2- A) Body weight from C, R and TR groups before reserpinization and after the last reserpinization. B) Mechanical sensitivity, von Frey filaments test from C, R and TR groups. *:

$P < 0.05$, compared to C and TR groups. C) Mechanical sensitivity, Randall-Selitto test from C, R and TR groups. *: $P < 0.05$, compared to C and TR groups. D) Nociceptive sensitivity, tail flick test from C, R and TR groups. *: $P < 0.05$, compared to C and TR groups. E) Open field, crossed squares from C, R and TR groups. F) Optical densitometry of 5-HT immunoreactive neurons from C, R and TR groups. G) Number of 5-HT immunoreactive cells. *: $P < 0.05$, compared to C and TR groups.

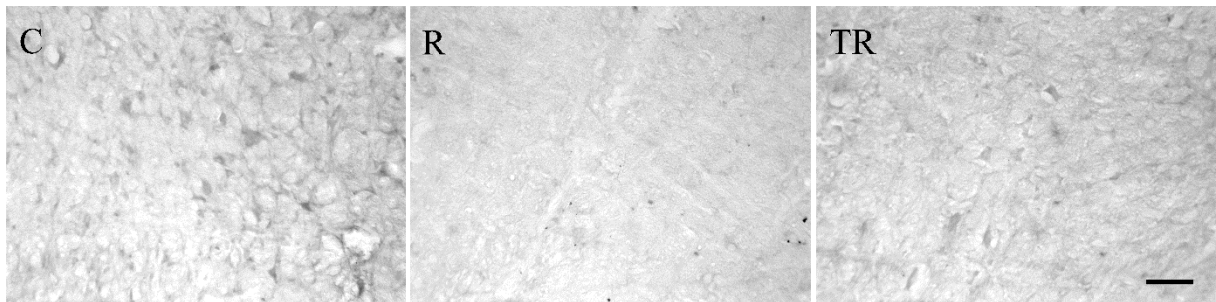


Figure 3- Illustrative images from 5-HT positive neurons in NRM from no-reserpinized (C), reserpinized (R) and treadmill training and reserpinized (TR) groups. Scale bar: 100 μm .

In this study, the open field test showed reserpinized animals crossing the same amount of quadrants as no-reserpinized animals and trained reserpinized. This fact indicates that application of reserpine did not cause hypokinesia, unlikely showed by other studies in which reserpine reducing locomotion. However, a study showed acute or chronic application of reserpine inducing different types of locomotor behavior. While chronic application of reserpine causes immobility, the acute application, as we did in the present study, does not change the motor function of animals [21]. Also, to cause alterations in the locomotor activity in rodents is needed 2 mg/kg or 10 mg/kg of reserpine, as showed in previous studies [22].

The 5-HT immunoreactivity in NRM neurons was similar in all groups. However, reserpinized animals showed fewer 5-HT neurons than no-reserpinized and trained-reserpinized animals. In literature, some studies reveal that application of reserpine for three consecutive days reproduces the animal model of fibromyalgia, causing monoamines depletion, such as serotonin [13,5] dopamine and noradrenaline in spinal cord, thalamus, and prefrontal cortex [23,5]. Moreover, it is well known that NRM neurons are pain modulators, and their serotonergic neurons stimulate opioids neurons in the spinal cord that inhibits ascending pain pathway [2].

In addition, our study shows that previous physical exercise prevents the decreases in the number of 5HT- positive neurons in reserpinized rats, showing physical training protects

NRM neurons from reserpine. Studies had demonstrated physical exercise as an important allied in the maintenance of quality of life and as a tool in reduction risk of pathologies and chronic diseases. Many studies have shown physical exercise benefiting physical and emotional health, providing muscular strength in old-aged people [6] and controlling pain, anxiety, sleep and psychological well-being [24]. Nevertheless, literature describes protocols, that in general, reduces the impact of the syndrome in quality of life of affected patients with fibromyalgia [25], but not the physical exercise as neuroprotective in this syndrome, as showed in our study.

In conclusion, our study showed that application of reserpine caused alterations in mechanical and nociceptive sensitivities, as well as decreased number of 5-HT positive neurons in NRM neurons. Physical training before reserpinization prevents behavioral and morphological alterations caused by reserpine, showing physical training as a neuroprotective agent in animal model of fibromyalgia.

Acknowledgements

We thank to Eliane Maria Zanchet for the Randall Slitto apparatus loan. We are in debt with Simone Marcuzzo and Laboratório de Histofisiologia Comparada (UFRGS) by technical support. This study was supported by grants from CNPq. K.L.S. Moreira was supported by a Master Scholarship from CAPES.

References

- [1] E. Bellato, E. Marini, F. Castoldi, N. Barbasetti, L. Mattei, E. Bonasia, D. Blonna. Fibromyalgia Syndrome: Etiology, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *Pain Res Treat.* (2012) 1-17.
- [2] J.P Hornung. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat.* 6 (2003) 331- 343.
- [3] G. Paxinos; C. Watson. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic express. Compact. 6th-London 2009.
- [4] M. H. Ossipov, G. O. Dussor, F. Porreca. Central modulation of pain. *J Clin Invest.* (2010) 120 (11), 3779–3787.
- [5] A. Blasco-Serra, F. Escrihuela-Vidal, E.M. González-Soler, F. Martínez-Expósito, M.C. Blasco-Ausina, S. Martínez-Bellver, A. Cervera-Ferri, V. Teruel-Martí, A.A. Valverde-

- Navarro. Depressive-like symptoms in a reserpine-induced model of fibromyalgia in rats. *Physiol Behav.* 151 (2015) 456–462.
- [6] R. Ceci, M.R.B. Valls, G. Duranti, I. Dimauro, F. Ouaranta, M. Pittaluga, S. Stefania, P. Caserotti, P. Parisi, A. Parisi, D. Caporossi. Oxidative stress responses to a graded maximal exercise test in older adults following explosive-type resistance training. *Redox Biol.* 2 (2014) 65–72.
- [7] L. Mazzardo - Martins, D.F Martins, R. Marcon, U.D Dos Santos, B. Speckhann, V.M Gadotti, A.R Sigwalt, L.G Guglielmo, A.R Santos. High-Intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. *J Pain.* 11 (2010) 1384-1393.
- [8] P. S Do Nascimento, G. A Lovatel, S. Barbosa, J. Ilha, L. A Centenaro, T. Malysz, L.L. Xavier, B.D Schaan, M. Achaval. Treadmill training improves motor skills and increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta in diabetic rats. *Brain Res.* 1382 (2011) 173-180.
- [9] A. Korb, L.V. Bonetti, S.A Da Silva, S. Marcuzzo, J. Ilha, M. Bertagnolli, W.A Partata, M.C Faccioni-Heuser. Effect of treadmill exercise on serotonin immunoreactivity in medullary raphe nuclei and spinal cord following sciatic nerve transection in rats. *Neurochem Res.* 35 (2010) 380-389.
- [10] AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. Fibromyalgia. www.rheumatology.org 2010 (accessed 31 March 2017).
- [11] J. Ilha, R.T Araujo, T. Malysz, E.E Hermel, P. Rigon, L.L Xavier, M. Achaval. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil Neural Repair.* 22 (2008) 355-366.
- [12] B. Rodrigues, D.D. Figueroa, C.T. Mostarda, M.V. Heeren, M.C. Irigoyen, K. De Angelis. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc. Diabetol.* 6 (2007) 1–7.
- [13] Y. Nagakura, T. Oe, T. Aoki, N. Matsuoka. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. *Pain.* 146 (2009) 26-33.

- [14] O. Ilnytska, V.V Lyzogubov, M.J. Stevens, V.R. Drel, N. Mashtalir, P. Pacher, M.A. Yorek, I.G. Obrosova. Poly (ADP-Ribose) polymerase inhibition alleviates experimental diabetic sensory neuropathy. *Diabetes*. 55 (2006) 1686-1694.
- [15] E. Santos-Nogueira, E.R. Castro, R. Mancuso, X. Navarro. Randall-Selitto Test: A New Approach for the Detection of Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*. 29 (2012) 898–904.
- [16] C.A. Netto, B. Siegfried, I. Izquierdo. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol*. 48(2) (1987) 304-309.
- [17] P.S . Diabetes increases mechanical sensitivity and causes morphological abnormalities in the sural nerve that are prevented by treadmill training. *Muscle Nerve (Print)*. 47 (2013) 46-52.
- [18] L.L. Xavier, G.G. Viola, A.C. Ferraz, C. Da Cunha, J.M. Deonizio, C.C. Netto, M. Achaval. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Protoc*. 16 (2005) 58-64.
- [19] Z. Radak, T. Kaneko, S. Tahara, H. Nakamoto, J. Pucso, M. Sasvari. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int*. 38 (2001) 17–23.
- [20] F. Bobinski, D.F. Martins, T. Bratti, L. Mazzardo-Martins, E.C. Winkelmann-Duarte, L.G. Guglielmo, A.R. Santos. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience*. 194 (2011) 337-48.
- [21] L. Antkiewicz-Michaluk, A. Wąsik, E. Możdżeń, I. Romańska, J. Michaluk. Withdrawal from repeated administration of a low dose of reserpine induced opposing adaptive changes in the noradrenaline and serotonin system function: A behavioral and neurochemical ex vivo and in vivo studies in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 57 (2015) 146–154.
- [22] L.L. Skalisz, V. Beijamini, S.L. Joca, M.A.B.F. Vital, C. Da Cunha, R. Andreatini. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression–Parkinson’s disease association. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 26 (2002) 879– 883.
- [23] T. OE, T.Y. Nagakura. Reserpine causes biphasic nociceptive sensitivity alteration in conjunction with brain biogenic amine tones in rats. *Neuroscience*. 169 (2010) 1860-1871.

- [24] V. Valim, J. Natour, Y. Xiao, A. F. A. Pereira, B. B. C. Lopes, D. F. Pollak, E. Zandonade, I. J. Russell . Aerobic fitness effects in fibromyalgia. *J Rheumatol.* 30 (2003)1060-1069.
- [25] L.M.S. Sabbag, M. P. Dourado, P. Y Júnior, N. F. Novo, H. H. S. Kaziyama, M. H. Miyazaki, L. R. Battistella. Estudo ergométrico evolutivo de portadoras de fibromialgia primária em programa de treinamento cardiovascular supervisionado. *Acta Fisiátrica.* 7 (2000) 29-34.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos observar que a aplicação de reserpina causa alterações mecânicas e nociceptivas nos animais, como também causa um decréscimo no número de neurônios imunorreativos à 5-HT no núcleo magno da rafe.

O treinamento físico em esteira antes da aplicação de reserpina, previne estas alterações comportamentais e morfológicas causadas pela reserpina, mostrando que o exercício físico tem efeito neuroprotetor na Fibromialgia.

6 PERSPECTIVAS

Após a realização deste trabalho, se tornam necessários estudos futuros com o objetivo de avaliar os efeitos do exercício físico em esteira antes da aplicação de reserpina onde seja analisado o conteúdo de serotonina e a quantidade de neurônios marcados com serotonina no corno dorsal da medula espinal.

Ainda, novos estudos, com protocolo similar ao usado neste estudo, devem ser realizados com objetivo de serem avaliadas as aminas dopamina e noradrenalina, as quais também são depletadas pela reserpina.

Finalmente, devem ser também estudados os efeitos do exercício físico após a aplicação de reserpina, com objetivo de serem entendidos de melhor forma os mecanismos pelos quais o exercício atua, em conjunto ou não com terapias farmacológicas, como parte do tratamento do indivíduo que desenvolveu fibromialgia.

7 REFERÊNCIAS

- ABLIN, J; NEUMANN, L; BUSKILA, D. Pathogenesis of fibromyalgia - A review. **Joint Bone Spine**, v. 75, p. 273-279, 2008.
- AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. **Fibromyalgia**. www.rheumatology.org , 2010. Acessado em 31/03/2016.
- ATALLAH-HAUN, M. V. et.al. Validação dos critérios do Colégio Americano de Reumatologia (1990) para classificação da fibromialgia, em uma população brasileira. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 39:221-30, 1999.
- BASBAUM, A. L et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139(2); p. 267-284, 2009.
- BELLATO, E. et. al. Fibromyalgia Syndrome: Etiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. **Pain Research and Treatment**, 2012, Article ID 426130, 17 pages doi:10.1155/2012/426130, 2012
- BERNACCHIO, R. M. G.; CONTIN, I.; MORI, M.. Fatores modificadores da percepção da dor. **Revista da Dor**, v. 8, n. 3, p. 621- 633, jul./set. 2005.
- BIGATTI. M.S. et. al. Sleep Disturbances in Fibromyalgia Syndrome: Relationship to Pain and Depression. **Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)**, v. 59, No. 7, p. 961–967, 2008.
- BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of lowintensityaerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337–348, 2011.
- BOBINSKI, F. et al. Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low-intensity exercise on neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice. **Pain**, v. 156(12), p. 2595-2606, 2015.
- BURGER, M.E et al. Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum, **Progress in Neuropharmacology Biology and Psychiatry**, v. 27, p. 135–140, 2003.
- BURGER, M. et al. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. **Brain Research Bulletin**, v.64 (4), p.339-345, 2004.
- BUSANELLO, A. et al. Resveratrol protects against a model of vacuous chewing movements induced by reserpine in mice. **Behavioral Pharmacology**, v. 22 (1), p.71-75, 2011.
- BUSCH, A. et.al. Exercise for treating fibromyalgia syndrome. **Cochrane Database Systematic Review 2**, v. 3, 2002.

- BUSCH, A. J. et al. Exercise Therapy for Fibromyalgia. **Current Pain Headache Reports**, v. 15 (5), p. 358-367, 2011.
- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature**, v. 180, p. 1200, 1957.
- CECI, R. et. al. Oxidative stress responses to a graded maximal exercise test in older adults following explosive-type resistance training. **Redox Biology**, v. 2, 65–72, 2014.
- CONLEY, R.R; KELLY, D.L Management of treatment resistance in schizophrenia, **Biological Psychiatry**, v. 50, p. 898–911, 2001.
- COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of nervous system damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, p. 1-32, 2009.
- DAVRANCHE, K.; MCMORRIS, T. Specific effects of acute moderate exercise on cognitive control. **Brain and Cognition**, v. 69, n. 3, p. 565-70, 2009.
- DELLAROZA et. al., Caracterização da dor crônica e métodos analgésicos utilizados por idosos da comunidade. **Revista Associação Médica Brasileira**; v. 54(1), p. 36-41, 2008.
- DEY, S.; SINGH, R. H.; DEY, P. K. Exercise training: significance of regional alterations in serotonin metabolism of rat brain in relation to antidepressant effect of exercise. **Physiology & Behavior**, v. 52, n. 6, p. 1095-9, 1992.
- DO NASCIMENTO, P.S. et.al. Treadmill training improves motor skills and increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta in diabetic rats. **Brain Research**, v. 1382, p. 173-180, 2011.
- et.al. Diabetes increases mechanical sensitivity and causes morphological abnormalities in the sural nerve that are prevented by treadmill training. **Muscle & Nerve (Print)**, v. 47, p. 46-52, 2013.
- ELVIN, A. et.al. Decreased muscle blood flow in fibromyalgia patients during standardised muscle exercise: a contrast media enhanced colour doppler study. **European Journal of Pain, London**, v. 10, no. 2, p. 137-144, 2006.
- ERNBERG, M. Significance os serotonina for pain, allodynia, and hyperalgesia in the human masseter muscle. **KI Open Archive**, openarchive.ki.se/xmlui/handle/10616/4487, acessado em 15/02/2018.
- FERREIRA. S.E. et. al. Efeitos agudos do exercício físico no tratamento da dependência química. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**. +Model RBCE-1956; No. of Pages 9, 2016.

- GERIN, C.; BECQUET, D.; PRIVAT, A. Direct evidence for the link between monoaminergic descending pathways and motor activity. I. A study with microdialysis probes implanted in the ventral funiculus of the spinal cord. **Brain Research**, v. 704, n. 2, p. 191-201, 1995.
- GOMEZ-MERINO, D. et al. Site-dependent effects of an acute intensive exercise on extracellular 5-HT and 5 HIAA levels in rat brain. **Neurosci Letters**, v. 301, n. 2, p. 143-6, 2001.
- HARTHMANN, A.D.et. Al. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 133, 115–120, 2007.
- HAYES, K. et al. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. **Acta Neuropathologica**, v. 115, n. 3, p. 289-96, 2008.
- HELFFENSTEIN, M.; FELDMAN, D. Síndrome da fibromialgia: características clínicas e associações com outras síndromes disfuncionais. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 42, n. 1, p. 8-14, 2002.
- JESCHONNECK, M.et.al. Abnormal microcirculation and temperature in skin above tender points in patients with fibromyalgia. **Rheumatology**, v. 39, n. 8, p. 917-921, 2001.
- KANDEL et al. Princípios de neurociências. Artmed, Porto Alegre, 5ed. 2014.
- KEMI OJ, et.al. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 93:1301-9, 2002.
- KIM, S. H., et.al. Effect of the combined use of tramadol and milnacipran on pain threshold in an animal model of fibromyalgia. **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 24, p. 139-142, 2009.
- KORB, A. et.al. Effect of treadmill exercise on serotonin immunoreactivity in medullary raphe nuclei and spinal cord following sciatic nerve transection in rats. **Neurochemical Research**, v. 35, p. 380-389, 2010.
- LITTLEJOHN, G. O; GUYMER, E. R. Fibromyalgia syndrome: which antidepressant drug should we choose. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12(1), p. 3-9, 2006.
- LOESER, J. D; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain terminology. **Pain**, v.137(3), p. 473-477, 2008.
- LOHMAN, D.; SCHLEIFER, R.; AMON, J. J. Access to pain treatment as a human right. **BMC Medical**, v. 20; 8:8. doi: 10.1186/1741-7015-8-8., 2010.
- LOHR, J.B; KUCZENSKI, R.; NICULESCU, A.B. Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia. **CNS Drugs**, v. 17, P. 47–62, 2003.

- MARQUES, A. et.al. Physical therapy in the treatment of patients with fibromyalgia: a literature review. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 42, n.1, 2002.
- MAZZARDO-MARTINS,L., et.al. High-Intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. **The Journal of Pain**, v. 11, p. 1384-1393, 2010.
- MEDEIROS, C. et al. Exercise training reduces insulin resistance and upregulates the mTOR/p70S6k pathway in cardiac muscle of diet-induced obesity rats. **Journal of Cell Physiology**, v. 226, n. 3, p. 666-74, 2011.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p.355–474, 2002.
- MILLAN, M. J. The role of monoamines in the actions of established and novel antidepressant agents: a critical review. **European Journal of Pharmacology**, v.500, p.371–384, 2004.
- MOHAMMAD-ZADEH, L.F. et. al. Serotonin: a review. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 3, p. 187-99, 2008.
- NAGAKURA, Y. et.al. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. **Pain**, v. 146, p. 26-33, 2009.
- NARANJO, C.A; TREMBLAY, L.K.; BUSTO, U.E. The role of the brain reward system in depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol.* **Biological Psychiatry**, v.25, p.781– 823, 2001.
- NISHIYORI, M.; UEDA, H. Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia. **Molecular Pain**, v. 6, p. 4-52, 2008.
- O'MAHONY, S. M. et al. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 32–48, 2015.
- OSSIPOV, M. H; DUSSOR. G. O; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120 (11), p. 3779–3787, 2010.
- PLOUGHMAN, M. et.al. Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia. **Neuroscience**, v. 136, p 991-1001, 2005.
- POLLOCK, M.L. et al. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness, and flexibility in healthy adults. **Medicine Science in Sport and Exercise**, v. 30, p. 975-91, 1998.

- PROVENZA J.R. et. al. Fibromialgia. Special article, **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, p. 443-9, 2004.
- RADAK, Z. et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochemistry International**, v. 49, p. 387-92, 2006.
- RECKZIEGEL et al. Extracellular dopamine and alterations on dopamine transporter are related to reserpine toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Archives Toxicology**, DOI 10.1007/s00204, v. 15, p. 1451-1457, 2015.
- REIS, L.C. Role of the serotonergic system in the sodium appetite. **Anais da Academia Brasileira de ciências**, v. 79, p. 261-83, 2007.
- RODRIGUES, B. et. al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular Diabetology**, v. 6, p.1–7, 2007.
- RUSSELL I.J. et al. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 35, p. 550-556, 1992.
- RUSSELL I.J. et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. **Arthritis and Rheumatism**, v. 37, p. 1593-1601, 1994.
- RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v. 49, p. 123-133, 1998.
- SABBAG, L.M.S, et.al. Estudo ergométrico evolutivo de portadoras de fibromialgia primária em programa de treinamento cardiovascular supervisionado. **Acta Fisiátrica** 7: 29-34, 2000.
- STAUD, R. et al. Abnormal sensitization and temporal summation of second pain (wind-up) in patients with fibromyalgia syndrome. **Pain**, v.91, p.165-175, 2001.
- STAUD, R.; SMITHERMAN, M.L. Peripheral and central sensitization in fibromyalgia: pathogenetic role. **Current Pain and Headache Reports**. v. 6, p. 259–266, 2002.
- STAUD, R. et al. Temporal summation of pain from mechanical stimulation of muscle tissue in normal controls and subjects with fibromyalgia syndrome. **Pain**. v. 102, p. 87–95, 2003.
- TEIXEIRA, M.J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **JBA**. v.1, p.329-334,. 2001.
- TODD, A.J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, p. 823–836, 2010.
- TRACEY, I. DICKENSON, A. Pain perception. **Cell**, v. 148, p. 1308 (a-b), 2012.
- TREDE, R. et al. A classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, v. 156, p. 1003–1007, 2015.

- VALIM, V. et al. Aerobic fitness effects in fibromyalgia. **Journal of Rheumatology**, v. 30, p. 1060-1069, 2003.
- VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, p. 13427-31, 1999.
- VANCEA, D. M. M. et al. Effect of Frequency of Physical Exercise on Glycemic Control and Body Composition in Type 2 Diabetic Patients. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92(1), p. 23-30, 2009.
- VEASEY, S. C. et al. Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to specific motor challenges in freely moving cats. **Neuroscience**, v. 79, p. 161-169, 1997.
- WATKINS, L. R; MILLIGAN, E. D; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends in Neuroscience**, v. 24(8): p. 450-455, 2001.
- WOLFE, F, et al. The American College of Rheumatology. Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. **Arthritis and Rheumatism**, v. 33, p. 160-72, 1990.
- WOLFE, F, et al. Serotonin levels, pain threshold, and fibromyalgia symptoms in the general population. **Journal of Rheumatology**, v. 24, n. 3, p. 555–559, 1997.
- WOLFE, F. New American College of Rheumatology criteria for fibromyalgia: a twenty-year journey. **Arthritis Care and Research**, v. 62, n. 5, p. 583–584, 2010.
- WOLFE, F. et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v.62, p. 600 –10, 2010a.
- WOOLF, C. J. What is this called pain? The **Journal of Clinical Investigation**, v. 120(11), p. 3742–3744. doi:10.1172/JCI45178; 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular disease. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/. Acesso em: Agosto de 2017.
- WRIGHT, A.; SLUKA, K. A. Nonpharmacological treatments for musculoskeletal pain. **The Clinical of Journal of Pain**, v. 17, n. 1, p. 33-46, 2001.