

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Susana Paula Moreira Fischer

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL
TRANSITÓRIO VANILÓIDE 1 NA DÍADE DOR-DEPRESSÃO
INDUZIDA POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS**

Santa Maria, RS

2019

Susana Paula Moreira Fischer

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO
VANILÓIDE 1 NA DÍADE DOR-DEPRESSÃO INDUZIDA POR RESERPINA
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Sara Marchesan de Oliveira

Santa Maria, RS
2019

Susana Paula Moreira Fischer

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO
VANILÓIDE 1 NA DÍADE DOR-DEPRESSÃO INDUZIDA POR RESERPINA
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 16 de agosto de 2019:

Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

César Augusto Brüning, Dr. (UFPel)

Natália Brucker, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, aquele que me criou, tem sustentado e cuidado até aqui, com amor e fidelidade, os quais Ele tem me dado por Sua graça.

Sou imensamente grata aos meus pais, Matias e Ana, por me amarem, e assim me apoiarem e encorajarem em cada passo da minha caminhada, me dando a mão e o abraço, sempre que necessário. Também agradeço ao meu irmão Micael pela amizade e companheirismo. Ao meu querido Renan, por estar ao meu lado, e por cada palavra de amor, carinho e apoio.

À minha orientadora Sara, pela grande oportunidade de aprendizado, pela ajuda nas dificuldades, esclarecimento frente as dúvidas, e pelo incentivo para continuar e buscar aperfeiçoamento. Juntamente, quero agradecer à Camila, Evelyne, Gabriela, Indiara, Maria Fernanda e Nathali, as colegas e amigas que o LabNeuro me deu. Obrigada por toda a ajuda ao realizar meu trabalho, também pelo incentivo, conversas e sorrisos do dia-a-dia no laboratório.

Às amigas que a jornada em Santa Maria me trouxe. Chris, Lorena, Julia, Regina, Thaís, Yasmin, Tati, Luana, Karol, Cátia, que em cada encontro sempre foram usadas para abençoar a minha vida. À minha amiga Grace, que acabou se tornando uma irmã, agradeço por me ouvir, se preocupar comigo, e não deixar faltar momentos de diversão. Às amigas Pati e Vanessa, agradeço por me receberem como anexo em sua casa e se tornarem tão queridas por mim. Agradeço a Noemi, por todas as conversas, parceria, e continuar sempre por perto, mesmo com a distância.

À Universidade Federal de Santa Maria, e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela oportunidade de realizar o curso, bom como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Minha gratidão e respeito a todos que de alguma forma me trouxeram crescimento pessoal e profissional, proporcionando apoio e incentivo para que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE 1 NA DÍADE DOR-DEPRESSÃO INDUZIDA POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS

AUTORA: Susana Paula Moreira Fischer
ORIENTADORA: Sara Marchesan de Oliveira

A fibromialgia é caracterizada por dor crônica generalizada e algumas comorbidades, como depressão. Apesar da dor e a depressão causarem notável impacto na qualidade de vida dos pacientes, a fisiopatologia subjacente a essa doença permanece sem estar completamente elucidada. O receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) está envolvido no desenvolvimento de comportamento dolorosos e depressivos, enquanto que o α -espinasterol, um antagonista do TRPV1, apresenta efeitos antinociceptivos e antidepressivos. O presente estudo investigou o envolvimento do canal TRPV1 e os possíveis efeitos do α -espinasterol na díade dor-depressão em um modelo tipo-fibromialgia em camundongos. Este modelo foi induzido com uma injeção subcutânea (s.c.) de reserpina (1 mg/kg) uma vez ao dia durante três dias consecutivos em camundongos Swiss machos. A administração de reserpina depletou as monoaminas na medula espinhal, tálamo e córtex cerebral, aumentou o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado, induziu hipersensibilidade à capsaicina e causou alodínia mecânica que foi inibida pelo SB-366791 (1 mg/kg, v.o.), um antagonista seletivo do TRPV1 [com uma inibição máxima ($I_{máx}$) de $73,4 \pm 15,5\%$], ou pela administração única ou repetida do α -espinasterol (0.3 mg/kg, v.o.) [com $I_{máx}$ de $72,8 \pm 17,8\%$ e $78,9 \pm 32,9\%$, respectivamente]. Ambos SB-366791 e α -espinasterol (administração única e repetida) inibiram o aumento do tempo de imobilidade induzido por reserpina. A alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica induzidas por reserpina foram abolidas pela dessensibilização das fibras TRPV1-positivas induzida por resiniferatoxina. Neste trabalho sugerimos que o canal TRPV1 está envolvido no desenvolvimento/manutenção da dor e depressão em um modelo tipo-fibromialgia, e o antagonista TRPV1 α -espinasterol apresenta potencial terapêutico para tratar estes sintomas em pacientes com fibromialgia.

Palavras-chave: Reserpina, fibromialgia, nocicepção, monoaminas, α -espinasterol.

ABSTRACT

INVOLVEMENT OF TRANSIENT POTENTIAL RECEPTOR VANILLOID 1 IN THE PAIN-DEPRESSION DYAD INDUCED BY RESERPINE IN MICE

AUTHOR: Susana Paula Moreira Fischer

ADVISOR: Sara Marchesan de Oliveira

Fibromyalgia is characterized mainly as chronic widespread pain and the patients can present comorbidities like depression. Although pain and depression cause a notable impact on patients' quality of life, the underlying pathophysiology of this disease remain incompletely elucidated. The transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) is involved in the development of painful and depressive behaviours, while the α -spinasterol, a TRPV1 antagonist, presents antinociceptive and antidepressant effects. The current study investigated the involvement of the TRPV1 channel and the possible effects of α -spinasterol on the pain-depression dyad in a fibromyalgia-like model in mice. This model was induced with a subcutaneous (s.c.) injection of reserpine (1 mg/kg) once daily for three consecutive days in male Swiss mice. Reserpine administration depleted monoamines on spinal cord, thalamus and cerebral cortex, increased the mice immobility time on the forced swimming test, induced hypersensitivity to capsaicin, and caused mechanical allodynia. The reserpine-induced mechanical allodynia was inhibited by SB-366791 (1 mg/kg, p.o.), a selective TRPV1 antagonist [with a maximum inhibition (I_{max}) of $73.4\pm 15.5\%$] or by the single or 3-day-repeated administration of α -spinasterol (0.3 mg/kg, p.o.) [with I_{max} of $72.8\pm 17.8\%$ and $78.9\pm 32.9\%$, respectively]. Both SB-366791 and α -spinasterol (single or repeated administration) inhibited the increase of the reserpine-induced immobility time. The reserpine-induced mechanical allodynia and the thermal hyperalgesia were abolished by TRPV1-positive fibers desensitization induced by previous resiniferatoxin (RTX) administration. In summary, we suggest that TRPV1 channel may be involved in the pain/depression development and maintenance in a fibromyalgia-like model, and the TRPV1 antagonist α -spinasterol could be an interesting therapeutic agent to treat the pain-depression dyad in fibromyalgia' patients.

Keywords: Reserpine, fibromyalgia, nociception, monoamines, α -spinasterol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Colegiado Americano de Reumatologia (do inglês <i>American College of Rheumatology</i>)
ANOVA	Análise de Variância
ARRIVE	Animal Research: Reporting <i>in vivo</i> Experiments
ASIC	Canal iônico sensível à ácido (do inglês <i>acid-sensing ion channel</i>)
CEUA	Comitê de Ética para o Uso Animal
CFA	Adjuvante Completo de Freund (do inglês <i>Complete Freund's Adjuvant</i>)
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>)
EULAR	Liga Européia contra o Reumatismo (do inglês <i>European League Against Rheumatism</i>)
FDA	(do inglês <i>Food and Drug Administration</i>)
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês <i>International Association for the study of Pain</i>)
I_{max}	Inibição máxima
IRSN	Inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina
Nav	Canais de sódio dependente de voltagem
RTX	Resiniferatoxina (do inglês <i>Resiniferatoxin</i>)
s.c.	Via subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TRP	Receptor de potencial transitório (do inglês <i>Transient Receptor Potential</i>)
TRPA	Receptor de potencial transitório anquirina (do inglês <i>Transient Receptor Potential Ankirin</i>)
TRPM	Receptor de potencial transitório melastatina (do inglês <i>Transient Receptor Potential Melastatin</i>)
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1 (do inglês <i>Transient Receptor Potential Vanilloid 1</i>)
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas (do inglês <i>Vesicular Transporter of Monoamines</i>)
v.o.	Via oral
VR1	Receptor vanilóide 1 (do inglês <i>Vanilloid Receptor 1</i>)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 DOR.....	13
3.2 VIAS DESCENDENTES DE MODULAÇÃO DA DOR	18
3.3 FIBROMIALGIA	24
3.4 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE 1.....	28
3.5 ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA O ALÍVIO DOS SINTOMAS RELACIONADOS A FIBROMIALGIA	31
4 MANUSCRITO CIENTÍFICO	33
5 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO I	78
ANEXO II	79

APRESENTAÇÃO

Nos itens Introdução e Revisão Bibliográfica consta uma revisão da literatura sobre os temas abordados nesta dissertação.

A metodologia realizada e os resultados obtidos que compõem esta dissertação estão apresentados no item Manuscrito Científico da mesma forma em que foi submetido a um periódico internacional. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito.

O item Conclusões encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito científico contido neste trabalho.

As Referências Bibliográficas da dissertação referem-se somente às citações que aparecem nos itens: Introdução, Revisão Bibliográfica e Conclusões desta dissertação, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do manuscrito estão mencionadas no mesmo.

1 INTRODUÇÃO

A fibromialgia é uma doença caracterizada por dor primária crônica generalizada que surge principalmente por distúrbios no processamento central da dor (CLAUW, 2015; TREEDE et al., 2015) além de alterações periféricas (LITTLEJOHN, 2015; TAGUCHI et al., 2015). A prevalência de pacientes com fibromialgia é de 2 a 8% da população mundial (HAUSER et al., 2015; JONES et al., 2015). Os sintomas incluem dor em numerosas áreas localizadas, sendo mais frequente em ombros, braços, região inferior das costas, nádegas e coxas (BORCHERS; GERSHWIN, 2015). Os indivíduos apresentam hiperalgesia (dor aumentada frente a estímulos dolorosos) e alodínia (dor frente a estímulos normalmente não-dolorosos) quando submetidos à estimulação mecânica e térmica repetida (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; CLAUW, 2015; STAUD et al., 2003). Além dos sintomas dolorosos, a doença é acompanhada por diversas comorbidades como depressão, fadiga, distúrbios do sono, dificuldades de memória e problemas de humor (CLAUW, 2015). Todos esses sintomas causam grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, interferindo no rendimento e qualidade do trabalho ou perda de produtividade (CHOY et al., 2010; STRAUBE et al., 2011).

Os mecanismos envolvidos na fibromialgia não são totalmente compreendidos, no entanto estudos indicam algumas anormalidades na transmissão da dor (KLEIN et al., 2014). Essas alterações incluem sensibilização central que consiste em um aumento prolongado da excitabilidade dos neurônios do corno dorsal causado por uma entrada nociceptiva aumentada (BORCHERS; GERSHWIN, 2015; LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Além disso, são encontradas anormalidades nas fibras C (DOPPLER et al., 2015; TAGUCHI et al., 2015), disfunção nas vias descendentes inibitórias da dor associada a uma diminuição de neurotransmissores inibitórios como as monoaminas serotonina, dopamina e norepinefrina (ARNOLD, 2006; MILLAN, 2002; RUSSELL et al., 1992), além de aumento de neurotransmissores excitatórios, como glutamato e substância P (HARRIS, 2010; RUSSELL et al., 1994; SCHMIDT-WILCKE; CLAUW, 2011).

A fim de estudar e buscar elucidar os mecanismos envolvidos na fibromialgia tem sido relatado um modelo induzido por reserpina em animais experimentais, no intuito de mimetizar os sintomas e aspectos dessa doença. A reserpina tem como ações farmacológicas a capacidade de depleção de monoaminas (DA, NE e 5-HT) no sistema nervoso pela ligação irreversível ao transportador vesicular de monoaminas (VMAT). Em consequência, a administração de reserpina em animais de laboratório induz sintomas dolorosos característicos

da doença, além dos sintomas comorbidos da fibromialgia, incluindo a depressão (NAGAKURA et al., 2009).

Existem muitas barreiras para o diagnóstico e tratamento ideal da fibromialgia devido a variação no reconhecimento dos sintomas pelos médicos, além de haver inconsistências entre as práticas de tratamento (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016). A pregabalina, duloxetina e milnaciprano são os fármacos autorizados pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da fibromialgia. A pregabalina é um ligante da subunidade $\alpha 2\text{-}\delta$ de canais de cálcio que possui efeitos antiepiléptico, ansiolítico e analgésico. Este fármaco tem capacidade de reduzir a dor nos pacientes com fibromialgia, porém o seu uso pode levar ao aparecimento de tontura, sonolência e ganho de peso (DERRY et al., 2016). A duloxetina e o milnaciprano são inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN) que auxiliam no alívio da dor e sintomas depressivos em alguns casos, mas podem ter efeitos adversos como insônia, boca seca, náusea, constipação e dor de cabeça, os quais podem limitar o seu uso (ARNOLD, 2007; CORDING et al., 2015). Além dos medicamentos aprovados pelo FDA, outros medicamentos como amitriptilina, ciclobenzaprina, gabapentina e fluoxetina também podem ser utilizados para tratar a fibromialgia (ARNOLD, 2006; ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; SMITH; BRACKEN; SMITH, 2011).

A terapêutica além de ter eficácia limitada e de dispor de efeitos adversos relevantes, direciona-se, sobretudo para o alívio dos sintomas e os pacientes acabam demonstrando insatisfação com o tratamento (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; CHOY et al., 2010; LAUCHE et al., 2013). Deste modo, é conveniente a busca por terapias alternativas e/ou complementares e à medida que se amplia a compreensão a respeito da fisiopatologia e dos mecanismos de controle da dor, novas abordagens terapêuticas podem ser propostas (CROFFORD; APPLETON, 2001). Neste sentido, produtos naturais têm sido avaliados biologicamente quanto ao seu potencial terapêutico (CALIXTO et al., 2000, 2004).

O α -espinasterol é um fitoesterol originalmente isolado das folhas de espinafre e encontrado como subproduto do isolamento da vitamina K da alfafa (FERNHOLZ; MOORE, 1939). Possui boa absorção oral além de capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e alcançar o cérebro e medula espinhal de camundongos (TREVISAN et al., 2012). Diversas atividades biológicas têm sido relatadas para esse composto entre elas, antioxidante (COBALLASE-URRUTIA et al., 2010), anticonvulsivante (SOCALA et al., 2015), antidepressiva (SOCALA; WLAZ, 2016), anti-inflamatória (BOLLER et al., 2010; BORGES et al., 2014), e antinociceptiva em modelos de dor crônica como a dor neuropática (BRUSCO et al., 2017) e de dor inflamatória induzida por CFA (do inglês *Complete Freund's Adjuvant*),

e por cirurgia (BRUSCO et al., 2017; TREVISAN et al., 2012). O α -espinasterol é um antagonista do receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), desta forma seus efeitos antinociceptivos e antidepressivos podem ser mediados pela ação nesse receptor, uma vez que a ativação do TRPV1 implica no desenvolvimento de comportamentos dolorosos e depressivos (ABDELHAMID et al., 2014; DEMIRDAS; NAZIROGLU; ÖVEY, 2017; SOCALA; WLAZ, 2016; TREVISAN et al., 2012).

O TRPV1 está envolvido na manutenção de condições clínicas de dor (BRUSCO et al., 2017), comportamentos depressivos (ABDELHAMID et al., 2014; MANNA; UMATHE, 2012), e também na hiperalgesia crônica no modelo animal de fibromialgia induzido por ácido (YÜKSEL et al., 2017). Evidências sugerem efeitos benéficos significativos, a partir do uso de produtos naturais relacionados a plantas, sobre os sintomas e qualidade de vida de pacientes com fibromialgia (CASANUEVA et al., 2013; LUKACZER et al., 2005; RUTLEDGE; JONES, 2007; SKRABEK et al., 2008; WARE et al., 2010). Portanto, nesse estudo buscamos avaliar o envolvimento do TRPV1 e os efeitos do composto natural isolado de planta α -espinasterol, que possui ação antagonista do TRPV1, sobre os sintomas de dor crônica e comorbidades relacionadas a fibromialgia, a fim de fornecer mais informações sobre a patofisiologia dessa doença e desenvolver novas alternativas para o seu tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento do canal TRPV1 e o efeito do antagonista TRPV1, α -espinasterol, na díade dor-depressão associada a fibromialgia em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar o desenvolvimento de hipersensibilidade dolorosa, comportamento tipo-depressivo, enfraquecimento muscular e comportamento tigmotáxico dos animais após a administração de reserpina;
- II. Avaliar os níveis de noradrenalina, serotonina e dopamina na medula espinhal, tálamo e córtex cerebral, após a administração de reserpina;
- III. Avaliar o envolvimento do canal TRPV1 no modelo de dor associada a fibromialgia após a dessensibilização das fibras TRPV1-positivas em camundongos;
- IV. Investigar o efeito dos antagonistas TRPV1, SB-366791 e α -espinasterol sobre a hipersensibilidade dolorosa e comportamento tipo depressivo induzidos por reserpina.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DOR

A dor é uma experiência complexa e subjetiva, relatada de acordo com as experiências vividas por cada indivíduo, que envolve componentes emocionais, cognitivos e sociais além da transdução sensorial (JULIUS; BASBAUM, 2001). A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP – *International Association for the Study of Pain*) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (IASP, 2011). Ao passo que a dor é uma sensação subjetiva, a nocicepção pode ser medida a partir de parâmetros objetivos (SANDKÜHLER, 2013), uma vez que esta se refere ao componente sensorial da dor e abrange todas as formas de processamento da informação desencadeada por estímulos nocivos (LOESER; TREEDE, 2008; SANDKÜHLER, 2013).

No contexto da dor fisiológica, ela pode ser considerada como um sistema de alarme, desempenhando função protetora contra lesões, sendo por isso essencial para a sobrevivência e bem-estar do organismo (KUNER, 2010; WOOLF, 2010). Porém, em alguns casos, a dor pode persistir para além do processo natural de cura e do seu caráter adaptativo, tornando-se um sintoma debilitante, sem utilidade protetora (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014). Neste caso, a dor é mal adaptativa e resulta do funcionamento anormal do sistema somatossensorial ou de uma lesão do sistema nervoso, apresentando-se de forma patológica (YEKKIRALA et al., 2017).

Em relação ao tempo de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda refere-se à dor de início recente e de duração provavelmente limitada que geralmente tem uma relação temporal e causal identificável. Ela apresenta função biológica de preservação da integridade e da defesa, sendo consequência de uma lesão ou iminência de lesão tecidual (JULIUS; BASBAUM, 2001). Já a dor crônica geralmente persiste além do tempo de cura de uma lesão ou quando a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença mantém a dor mesmo após a resolução da lesão. Frequentemente, a dor crônica pode não ter causa claramente identificável (RUSSO; BROSE, 1998; TREEDE et al., 2018).

Quanto aos mecanismos moleculares e celulares, a dor pode ainda ser classificada como nociceptiva, inflamatória ou patológica (neuropática e disfuncional) (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; SCHOLZ; WOOLF, 2002). A dor nociceptiva está associada à proteção fisiológica do organismo em circunstâncias que podem causar lesão aos tecidos

(WOOLF, 2010). Este tipo de dor funciona como um sinal de alerta que, geralmente, provoca o reflexo de retirada do membro afetado em resposta a estímulos nocivos que ativam neurônios sensoriais de alto limiar, a fim de proteger o indivíduo de lesões potenciais (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014)

A segunda forma de dor, denominada de dor inflamatória, é também adaptativa e tem função de proteger o organismo. No entanto, ela ocorre após o dano tecidual com subsequente resposta inflamatória, e aumento da sensibilidade sensorial, de maneira a auxiliar a recuperação do tecido lesionado (WOOLF, 2010). Para isso, o sistema nervoso sensorial sofre uma mudança na sua capacidade de resposta, levando a uma redução do limiar de ativação dos receptores sensoriais e aumento da excitabilidade da membrana de neurônios sensoriais. Além de ocorrer dor espontânea, estímulos que normalmente eram inócuos passam a produzir dor (alodínia) e respostas a estímulos que já eram nocivos passam a ser exageradas e prolongadas (hiperalgesia) (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; LOESER; TREEDE, 2008; WOOLF, 2010). Esta forma de dor é de fato uma das características principais da inflamação (WOOLF, 2010) e normalmente desaparece após a resolução da lesão tecidual inicial. No entanto, em doenças crônicas, tais como a artrite reumatoide, a dor persiste durante tanto tempo quanto a inflamação é ativa (MICHAUD; BOMBARDIER; EMERY, 2007). A dor inflamatória crônica é um tipo de dor patológica, assim como a dor neuropática, e ambas correspondem a uma adaptação do organismo à lesão tecidual (STEIN, 2016).

A dor patológica é mal adaptativa e não tem finalidade protetora, configurando-se como um estado de doença do sistema nervoso periférico ou central. Primeiramente pode surgir como consequência de uma lesão ou doença que afeta o sistema nervoso somatossensorial, caracterizando a dor neuropática; e também pode ocorrer em situações em que não há dano identificável, caracterizando a dor disfuncional ou nociplástica (AYDEDE; SHRIVER, 2018; COLLOCA et al., 2017; WOOLF, 2010). A dor neuropática pode ocorrer devido a uma lesão da medula espinhal, acidente vascular cerebral, esclerose múltipla, diabetes, ou também como sintoma sensorial associado ao câncer ou ao próprio tratamento com quimioterápicos, entre outros (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). Ela é caracterizada por sintomas como hipersensibilidade mecânica ou térmica, alodínia, parestesia (formigamento) e sensação de queimação principalmente nas extremidades (BLACKBURN-MUNRO, 2004). A dor disfuncional aparece como resultado de uma amplificação dos sinais nociceptivos no SNC (STAUD; RODRIGUEZ, 2006), desequilíbrio dos circuitos neuronais centrais de inibição e excitação (JULIEN et al., 2005), e processamento sensorial alterado (STAUD et al., 2008), porém sem causa esclarecida (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF,

2009). Recentemente foi definido o termo dor nociplástica para caracterizar a dor que surge da nocicepção alterada sem evidência clara de dano tecidual ou doença/lesão do sistema somatossensorial (AYDEDE; SHRIVER, 2018).

Para que a transmissão de sinais sensoriais, desde fisiológicos até patológicos ocorra, fibras sensoriais altamente especializadas, sozinhas ou em conjunto, fornecem informações ao sistema nervoso central (SNC), não apenas sobre o meio ambiente, mas também sobre o estado do próprio organismo (RINGKAMP et al., 2013). Os diferentes tipos de estímulos térmicos, mecânicos ou químicos são detectados e conduzidos a partir da periferia para as regiões centrais por fibras aferentes primárias (BASBAUM et al., 2009). Com base em critérios anatômicos e funcionais, estes neurônios sensoriais são categorizados em três tipos principais de fibras, A β , A δ e fibras C, cada um com diferentes propriedades que lhes permite responder a diferentes tipos de estímulos e informações sensoriais (D'MELLO; DICKENSON, 2008) (Figura 1).

As fibras A β são fibras de grande diâmetro e densamente mielinizadas, isso faz com que elas conduzam os potenciais de ação (impulsos nervosos) dos terminais periféricos aos centrais com velocidade bastante rápida (30-100 m/s). Essas fibras possuem baixo limiar de ativação e normalmente respondem a estimulação inócua, como por exemplo, a um toque leve, sendo responsáveis por transmitir a informação tátil e a propriocepção (postura do corpo no espaço). Apesar de estas fibras serem especializadas na detecção de estímulos inócuos, em casos como, por exemplo, na dor neuropática, após uma lesão do nervo elas sofrem plasticidade e tornam-se capazes de transmitir também impulsos nervosos nociceptivos (BASBAUM et al., 2009; D'MELLO; DICKENSON, 2008; WEST et al., 2015).

As fibras A δ possuem médio diâmetro e são finamente mielinizadas, dispendo de uma velocidade de condução dos potenciais de ação (12-30 m/s) mais lenta do que as fibras A β , além de apresentarem um maior limiar de ativação o que lhes torna capaz de responder à estimulação nociva. Por outro lado, as fibras C não são mielinizadas, apresentam um pequeno diâmetro e possuem velocidade de condução lenta (0,5-2 m/s) dos potenciais de ação e assim como as fibras A δ respondem à estimulação nociva por serem ativadas por estímulos de alto limiar. A maioria das fibras C responde a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, outras são mecanicamente insensíveis, mas respondem ao calor nocivo. Além disso, as fibras C são divididas em 2 populações: peptidérgicas e não peptidérgicas. As peptidérgicas liberam os neuropeptídeos substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e expressam o receptor de tirosina quinase de alta afinidade (TrkA) que responde ao fator de crescimento neural. A população de fibras C não peptidérgicas expressa o receptor de

neurotrofina c-Ret, que é alvo do fator neurotrófico derivado da glia. Uma parte destas fibras possui locais de ligação para a isolectina B4 e expressam receptores purinérgicos específicos, como o P2X3 (BASBAUM et al., 2009; D'MELLO; DICKENSON, 2008; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Como os terminais periféricos de ambas as fibras A δ e fibras C respondem preferencialmente a estímulos nocivos, elas são chamadas de nociceptores, e estão envolvidas na nocicepção mecânica, térmica ou química (BASBAUM et al., 2009; D'MELLO; DICKENSON, 2008; GRACE et al., 2014; JULIUS; BASBAUM, 2001; WEST et al., 2015). Estas fibras aferentes primárias, A β , A δ e fibras C, se estendem da periferia ao corno dorsal da medula espinhal e seu corpo celular está localizado em diferentes gânglios. O gânglio da raiz dorsal abriga os corpos celulares de neurônios que se dirigem para o tronco e membros; o gânglio do trigêmeo abriga os corpos celulares de neurônios que se dirigem para a face; e o gânglio nodoso abriga os corpos celulares das fibras aferentes vagais que inervam os órgãos das cavidades torácica, abdominal e pélvica (BASBAUM et al., 2009; HUNT; MANTYH, 2001; TODD; KOERBER, 2013).

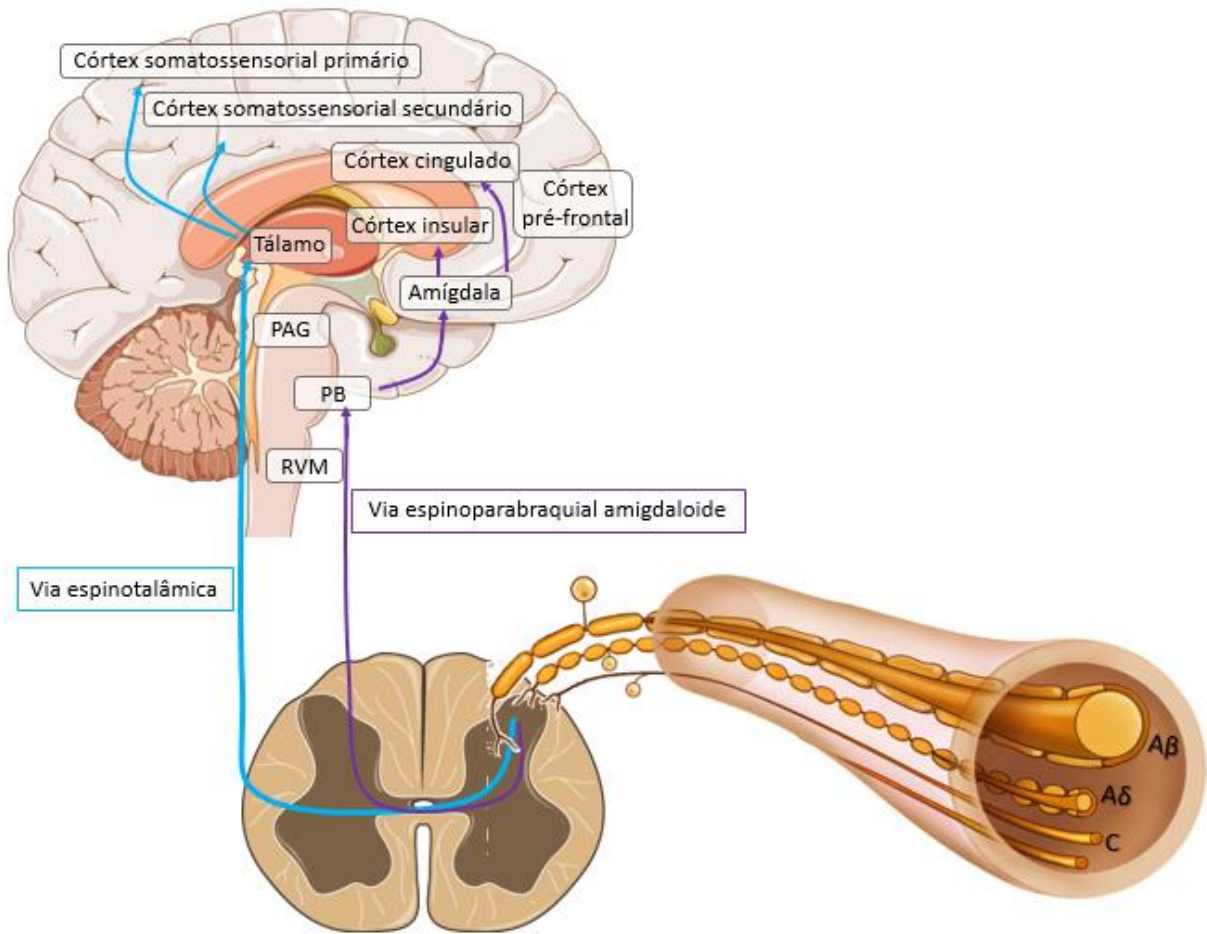
Para a transdução dos sinais sensoriais/nocivos da periferia ao SNC, é necessário que ocorra a despolarização da membrana do neurônio, a fim de gerar potenciais de ação que se propagam da periferia em direção ao corno dorsal da medula espinhal (BASBAUM et al., 2009). Um potencial gerador pode ser iniciado pela ativação de uma ampla gama de receptores sensoriais, incluindo canais de receptores de potencial transitório (TRPA, TRPM, TRPV), canais de sódio (Na_v), canais iônicos sensíveis a ácido (ASIC), entre outros, os quais ao serem ativados, irão alterar o potencial de membrana e, assim, resultar em um potencial de ação que será propagado em direção ao sistema nervoso central (BINGHAM et al., 2009; CATERINA et al., 1997; GRACE et al., 2014).

As fibras aferentes primárias têm morfologia pseudounipolar, contendo um axônio partindo do corpo celular do neurônio que se divide em 2 ramos, um que vai em direção à periferia e o outro em direção da medula espinhal. Quando os terminais deste tipo de neurônio sensorial são ativados ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, tanto na periferia (SP, CGRP) quanto na medula espinhal (SP, CGRP, glutamato), indicando que o nociceptor pode enviar e receber mensagens de qualquer extremidade do corpo (BASBAUM et al., 2009).

Após o processamento da dor na medula espinhal, a informação sensorial é então transmitida do corno dorsal da medula espinhal para centros superiores no encéfalo, via potenciais de ação, ao longo de neurônios de projeção espinhal, também chamados de neurônios de segunda ordem, que foram ativados por neurotransmissores ou neuropeptídeos

excitatórios. Esta informação pode ascender por duas vias nociceptivas até regiões corticais onde as diferentes dimensões da dor serão processadas (BINGHAM et al., 2009; BOURINET et al., 2014; KUNER, 2010). Existem várias regiões corticais que podem ou não ser ativadas durante uma experiência dolorosa (APKARIAN et al., 2005). Algumas dessas estruturas estão mais associadas às propriedades discriminativo-sensoriais da dor, como o córtex somatossensorial, e outras como o giro cingulado anterior e o córtex insular estão mais associadas com aspectos afetivo-emocionais da dor (BASBAUM et al., 2009; TRACEY; MANTYH, 2007).

Uma das vias pelas quais a percepção do estímulo doloroso pode ascender é a via espinotalâmica. Nesta via, um grande número de neurônios projetam-se do corno dorsal da medula espinhal predominantemente ao tálamo, com consequente direcionamento da informação, por neurônios de terceira ordem, para o córtex somatossensorial (D'MELLO; DICKENSON, 2008; KUNER, 2010). No córtex somatossensorial primário o componente discriminativo-sensorial da dor, que inclui a localização e a intensidade do estímulo nocivo, é interpretado, enquanto que o tipo de estímulo e outros aspectos cognitivos da percepção da dor são discriminados no córtex somatossensorial secundário (BINGHAM et al., 2009). A outra via pela qual a percepção do estímulo doloroso pode ascender é a via espinoparabraquial amigdalóide. Esta via constitui-se de projeções do núcleo parabraquial e amígdala, que convergem para o córtex insular e córtex cingulado, regiões capazes de atribuir o componente afetivo-emocional à experiência dolorosa (BASBAUM et al., 2009; D'MELLO; DICKENSON, 2008; KUNER, 2010; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).



Fonte: Adaptado de Basbaum et al. (2009) e Kasper et al. (2015).

Figura 1. Via anatômica ascendente de transmissão sensorial e de discriminação da dor. Os neurônios sensoriais primários (fibras A β , A δ e C) conduzem os estímulos sensoriais a partir da periferia até o corno dorsal da medula espinhal. Essas fibras fazem conexões sinápticas com neurônios de projeção (segunda ordem) na medula espinhal, e estes enviam as informações sensoriais para regiões supra-espinhais por meio de duas vias. Os neurônios da via espinotalâmica (em azul) participam do componente discriminativo-sensorial da dor e se projetam do corno dorsal até o tálamo, de onde se projetam neurônios de terceira ordem que atingem o córtex somatossensorial primário e secundário. Já os neurônios da via espinoparabraquial amigdalóide (em roxo) fazem parte do componente afetivo-emocional da dor, saem do corno dorsal, passam pelo núcleo parabraquial (PB), enviam projeções para a amígdala, e desta para o córtex insular e cingulado.

3.2 VIAS DESCENDENTES DE MODULAÇÃO DA DOR

O processamento espinhal da informação nociceptiva está sujeito ao controle inibitório e facilitatório de uma rede de circuitos descendentes que se projetam a partir de regiões cerebrais, passando pelo tronco encefálico em direção ao corno dorsal da medula espinhal (MILLAN, 2002; SANDKÜHLER, 2013). A substância cinzenta periaquedutal (PAG, do inglês *periaqueductal gray*) e a medula rostral ventromedial (RVM, do inglês *rostral ventromedial medulla*), são estruturas do tronco encefálico que tem função importante na

modulação descendente da dor. A PAG é uma região rica em células ao redor do aqueduto cerebral no mesencéfalo, enquanto a RVM inclui o núcleo magno da rafe e a formação reticular adjacente (HEINRICHER; FIELDS, 2013; HEINRICHER; INGRAM, 2008). A PAG e RVM são os principais locais de ação analgésica dos opioides e canabinoides (LAU; VAUGHAN, 2014). Já o glutamato e o GABA tem papéis opostos no processamento nociceptivo na PAG, uma vez que a ativação de neurônios glutamatérgicos ou a inibição de neurônios GABAérgicos, suprimem a nocicepção, ao passo que o oposto facilita a nocicepção (SAMINENI et al., 2017) (Figura 2).

Uma vez que a antinocicepção resulta da excitação e ativação direta de neurônios da via descendente que se projetam da PAG para a RVM, e que os opioides endógenos ou injetados nessas estruturas têm um efeito inibitório direto sobre os neurônios, causando analgesia, Basbaum e Fields (1984) propuseram a hipótese da desinibição do GABA, para explicar este efeito dos opioides. De acordo com essa hipótese, interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos presentes na PAG e na RVM liberam GABA que atua via receptores GABA_A para inibir os neurônios de saída da via descendente. Foi proposto que os opioides suprimem indiretamente a influência inibitória dos interneurônios GABAérgicos locais, desinibindo desse modo o impulso antinociceptivo para a medula espinhal com subsequente efeito analgésico (LAU; VAUGHAN, 2014). Ainda, tem sido proposto que agonistas μ -opioides não inibem diretamente os neurônios de saída da PAG, os quais seriam supostamente neurônios glutamatérgicos, e sim que os interneurônios GABAérgicos, sensíveis a agonistas μ -opioides, estariam exercendo efeitos inibitórios nesses neurônios glutamatérgicos, (presumidamente neurônios de saída) que se projetam para a RVM, para iniciar a inibição descendente (HEINRICHER; INGRAM, 2008; LAU; VAUGHAN, 2014; SAMINENI et al., 2017).

A RVM recebe entradas neuronais da PAG e é provável que seja o local de retransmissão comum final da inibição descendente da nocicepção, enviando projeções descendentes para o corno dorsal da medula espinhal. Ali, essas projeções formam conexões sinápticas com terminais aferentes primários e neurônios de segunda ordem, bem como com interneurônios, modulando desta forma a entrada nociceptiva na medula espinhal. Existem duas populações de neurônios na RVM que são determinantes para a modulação da dor. Um grupo de neurônios chamados de células ON (células liga), dispara imediatamente antes da ocorrência do reflexo de retirada frente a um estímulo nocivo. Já a outra população de neurônios chamados de células OFF (células desliga) tem sua frequência de disparo reduzida pouco antes do reflexo de retirada (HEINRICHER; FIELDS, 2013; OSSIPOV; DUSSOR;

PORRECA, 2010). O corpo celular dos neurônios ON e OFF está na RVM, e os seu axônios se projetam diretamente para lâminas específicas do corno dorsal da medula espinhal que retransmitem sinais nociceptivos, indicando que estas células podem exercer influências modulatórias sobre as entradas aferentes nociceptivas (FIELDS, 2004; HEINRICHER; FIELDS, 2013). Uma vez que as células ON possuem características pronociceptivas (facilitatórias), enquanto as células OFF desempenham atividades antinociceptivas (inibitórias), a ativação da modulação descendente pode inibir ou facilitar a entrada nociceptiva na medula espinhal e por isso fornece um sistema descendente endógeno de regulação bidirecional da dor (FIELDS, 2004; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

Os diferentes níveis do circuito PAG-RVM estão ligados em parte através da liberação de opioides endógenos (HEINRICHER; FIELDS, 2013). Assim como na PAG, agonistas μ -opioides também estão envolvidos na modulação descendente da dor por agir na RVM, aumentando indiretamente a atividade das células OFF através da inibição da entrada inibitória GABAérgica (FIELDS, 2004; HEINRICHER; FIELDS, 2013). Interneurônios GABAérgicos na RVM inibem preferencialmente a atividade das células OFF do que das células ON, portanto nessa estrutura eles favorecem os mecanismos de facilitação descendentes da dor (MILLAN, 2002). Agonistas μ -opioides atuam reduzindo a liberação do GABA na RVM, e desta forma, a inibição mediada pelo GABA é reduzida, levando à ativação (desinibição) das células OFF pelos agonistas μ -opioides (FIELDS, 2004). Neurônios glutamatérgicos também podem agir ativando as células OFF, amplificando o efeito da desinibição destas células (HEINRICHER; INGRAM, 2008).

Em contrapartida, as células ON são inibidas pelos agonistas μ -opioides sugerindo que elas provavelmente expressam os receptores μ -opioides (FIELDS, 2004). O efeito analgésico de agonistas μ -opioides na PAG e RVM se dá mais provavelmente devido à desinibição das células OFF (FIELDS, 2004). Desta forma, mesmo que os opioides sejam capazes de inibir as células ON, sabe-se que a ativação das células OFF é necessária e suficiente para a analgesia desencadeada por eles (FIELDS, 2004; HEINRICHER; FIELDS, 2013; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

A modulação da sensação dolorosa também é amplamente mediada pelas vias descendentes monoaminérgicas que atuam tanto inibindo quanto facilitando a transmissão da informação nociceptiva. As monoaminas serotonina, noradrenalina e dopamina exercem efeitos antinociceptivos ou pronociceptivos dependendo de qual subtipo de receptor elas ativam (BENARROCH, 2008).

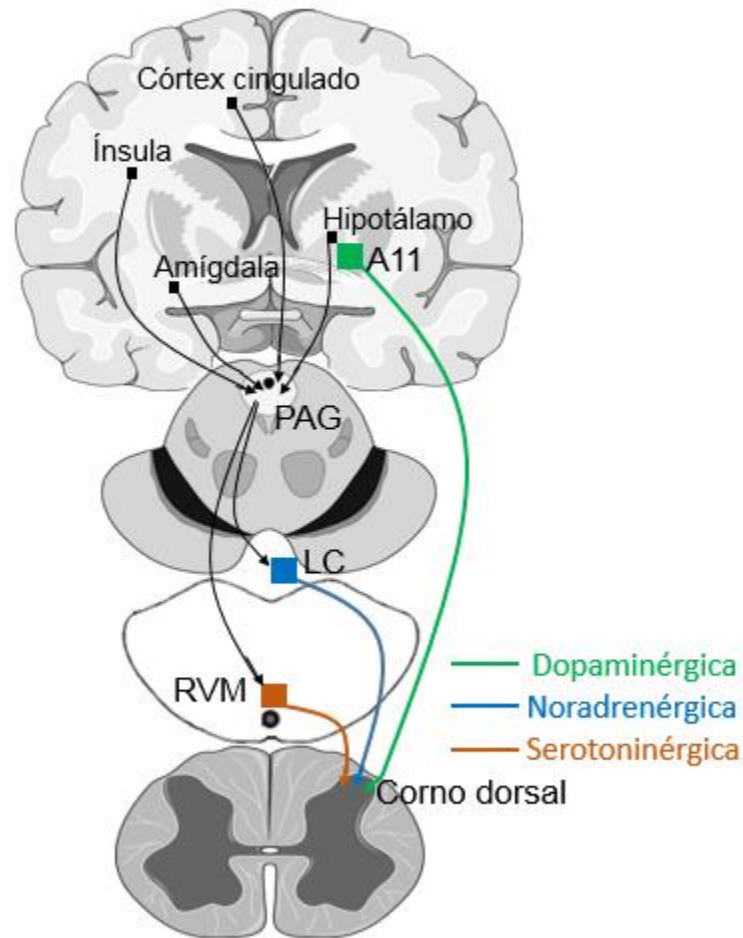
A via descendente serotoninérgica de modulação da dor tem projeções que partem do núcleo magno da rafe na RVM até o corno dorsal espinhal e ao serem ativadas promovem a liberação de serotonina a qual irá se ligar aos seus diferentes tipos de receptores (KWIAT; BASBAUM, 1992). A ativação de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos ou 5-HT_{1B/D} pré-sinápticos exerce efeitos antinociceptivos por inibir a excitabilidade dos neurônios espinotalâmicos e de interneurônios excitatórios (DOGRUL; OSSIPOV; PORRECA, 2009; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). Essas vias descendentes serotoninérgicas também podem exercer efeitos pró-nociceptivos, que estão envolvidos com a ativação dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₃ pré- ou pós-sinápticos, sendo este último um canal de cátion que provoca despolarização neuronal, por aumentar a liberação de neurotransmissores dos aferentes primários ou por aumentar a excitabilidade dos neurônios espinotalâmicos (BENARROCH, 2008; BOADAS-VAELLO et al., 2016).

Outro sistema importante de modulação da dor surge a partir de neurônios noradrenérgicos localizados nos núcleos A5, A6 (locus coeruleus) e A7 (Kölliker-Füse), que são regiões de origem das principais projeções noradrenérgicas para a medula espinhal (HEINRICHER; FIELDS, 2013; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). A estimulação dirigida aos grupos de células noradrenérgicas produz antinocicepção mediada por receptores α 2-adrenérgicos pré-sinápticos expressos na medula espinhal, que leva a inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios dos terminais aferentes primários (BOADAS-VAELLO et al., 2016; HEINRICHER; FIELDS, 2013; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). Além disso, quando a noradrenalina ativa de forma pós-sináptica os adrenoceptores α 1, ocorre a despolarização de neurônios GABAérgicos do corno dorsal, levando ao aumento da liberação de GABA e conseqüentemente à antinocicepção (GASSNER; RUSCHEWEYH; SANDKÜHLER, 2009), uma vez que na medula espinhal os interneurônios GABAérgicos medeiam efeitos inibitórios da dor (BASBAUM et al., 2009), ao contrário do efeito facilitatório da dor que o GABA exerce na PAG e RVM (FIELDS, 2004; LAU; VAUGHAN, 2014).

A inervação dopaminérgica da medula espinhal se origina na região posterior do hipotálamo (A11) e em menor proporção da substância nigra e do núcleo paraventricular do hipotálamo (BENARROCH, 2008; MILLAN, 2002). A ativação de receptores do tipo-D2 está envolvida com uma redução da resposta à estímulos nocivos, posto que esses receptores provocam a inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissores dos aferentes primários. Agonistas D2 também provocam antinocicepção por potencializar os efeitos de opióides endógenos (BENARROCH, 2008). Por outro lado, estudos têm mostrado que a estimulação

de receptores dopaminérgicos tipo-D1 produz efeitos pronociceptivos por aumentar a atividade neuronal (BENARROCH, 2008).

Os sistemas moduladores do tronco cerebral exercem controle bidirecional e a facilitação da dor é uma parte importante de sua função (HEINRICHER et al., 2009). A entrada nociva causa ativação da célula ON e inibição da célula OFF, para aumentar o reflexo de retirada frente ao estímulo nocivo. Desta forma, a estimulação nociva por si só recruta a RVM para facilitar a nocicepção como parte de um feedback positivo de curto prazo que prepara o organismo para responder de forma mais rápida frente a entradas potencialmente prejudiciais (HEINRICHER; INGRAM, 2008; ROEDER et al., 2016). O problema surge quando essas modulações se tornam disfuncionais, como por exemplo, a interrupção do equilíbrio dos circuitos moduladores descendentes para favorecer a facilitação pode promover e manter a dor crônica. Essa ativação de vias facilitatórias descendentes pode ser o resultado de alterações neuroplásticas que ocorrem em locais medulares em resposta à entrada persistente de sinais de dor (HEINRICHER; FIELDS, 2013; PORRECA; OSSIPOV; GEBHART, 2002). Dentre alguns dos fatores que exercem influência sobre a modulação da dor está a liberação de substância P na RVM, que contribui para aumentar a excitabilidade dos neurônios facilitatórios da dor (HEINRICHER; FIELDS, 2013). Mais recentemente foi demonstrado que neurônios GABAérgicos da RVM se projetam para o corno dorsal da medula espinhal e inibem interneurônios encefalinérgicos e GABAérgicos locais facilitando a dor mecânica (FRANÇOIS et al., 2017).



Fonte: Adaptado de Fields et al. (2004) e Benarroch et al. (2008)

Figura 2. As vias modulatórias da dor incluem projeções descendentes de áreas supra-espinhais (córtex cingulado, ínsula, hipotálamo e amígdala) para a substância cinzenta periaquedutal (PAG), com retransmissão para a medula rostral ventromedial (RVM). A PAG também envia projeções para o locus cerúleo (LC) que então projeta neurônios noradrenérgicos (em azul) para o corno dorsal da medula espinhal. A via serotonérgica (em laranja) se projeta do núcleo magno da rafe (NMR) a partir da RVM para o corno dorsal. Já as vias descendentes dopaminérgicas (em verde) partem do núcleo A11 do hipotálamo em direção ao corno dorsal da medula espinhal.

Evidências sugerem que a facilitação descendente da nociceção espinhal é um importante contribuinte para a sensibilização central e o desenvolvimento de hiperalgesia secundária, indicando uma mudança no equilíbrio em favor da facilitação na transição da dor aguda para a dor crônica (HEINRICHER et al., 2009). Existe comprovação clínica apontando que disfunções das vias descendentes modulatórias da dor podem resultar da facilitação aumentada e/ou da inibição reduzida das respostas nociceptivas (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). Esse desequilíbrio do sistema de modulação inibitória/facilitatória da dor

pode estar envolvido em alguns estados de dor crônica, como, por exemplo, o que acontece em pacientes com fibromialgia (POTVIN; MARCHAND, 2016).

3.3 FIBROMIALGIA

A fibromialgia é uma doença cuja prevalência varia de 2 a 8% da população mundial, e é uma das condições musculoesqueléticas mais comuns (CHOY, 2015; CLAUW, 2014). Ela é considerada pela 11ª Classificação Internacional de Doenças como um tipo de dor primária crônica, uma vez que os pacientes apresentam dor em uma ou mais regiões anatômicas que persiste por mais de 3 meses e está associada com estresse emocional significativo e/ou incapacidade funcional significativa, sendo que os sintomas não podem ser melhor explicados por outro diagnóstico (NICHOLAS et al., 2019; TREEDE et al., 2015).

A principal característica da fibromialgia são os sintomas dolorosos, representados por um aumento da sensibilidade à dor devido a redução do limiar de ativação dos nociceptores. Os pacientes apresentam dor espontânea em músculos e articulações, além de manifestar alodínia e/ou hiperalgesia frente ao toque e pressão, respectivamente, e também quando em contato com temperaturas frias e quentes (CHOY, 2015; REHM et al., 2010). Além dos sintomas de dor generalizada, a doença é acompanhada de diversas comorbidades como depressão, fadiga, distúrbios do sono, dificuldades de memória e problemas de humor (CLAUW, 2015). Todos esses sintomas causam um notável impacto na qualidade de vida dos pacientes, interferindo com a capacidade de realizar seu trabalho e levando a perda de produtividade (CHOY et al., 2010; STRAUBE et al., 2011).

A patogênese da fibromialgia ainda não é totalmente esclarecida, porém sabe-se que alterações funcionais no sistema nervoso central e periférico, que causam um distúrbio no processamento da dor e sensibilização central, fazem parte da patofisiologia desta doença (CHOY, 2015; CLAUW, 2015; DOPPLER et al., 2015). O processo de sensibilização central se desenvolve a partir do aumento da excitabilidade neuronal e da eficácia sináptica dos neurônios somatossensoriais nos cornos dorsais da medula espinhal e/ou pela redução da atividade da via inibitória nociceptiva, e está intimamente ligada a doenças que manifestam dor crônica, como é o caso da fibromialgia (STAUD, 2013; WOOLF, 2011; WOOLF; SALTER, 2000). A fibromialgia também têm sido descrita como um estado de dor centralizada, e isso foi originalmente notado nos pacientes devido a sua sensibilidade difusa à palpação, ou seja, os pacientes sentem mais dor do que seria normalmente esperado de acordo

com o grau de entrada nociceptiva (CLAUW, 2014, 2015). Tem sido demonstrado que em pacientes com fibromialgia ocorre uma maior ativação neural, incluindo do córtex somatosensorial, frente ao estímulo de pressão. Também, tem sido encontrado anormalidades em regiões supra-espinais como amígdala e hipotálamo, responsáveis pela emoção e respostas de estresse frente à dor, além de diminuição da substância cinzenta no córtex cerebral (CHOY, 2015).

Além disso, o sistema nervoso central modula a transmissão da dor através de mecanismos facilitatórios ou inibitórios por meio da liberação de neurotransmissores (CLAUW, 2015). Neurotransmissores que estão envolvidos na transmissão do estímulo nociceptivo da periferia para as regiões espinais e supraespinais, como o glutamato e substância P, se encontram em concentrações aumentadas no líquido espinal de pacientes com fibromialgia (LARSON et al., 2000; RUSSELL et al., 1994). Nestes pacientes, a presença de sensibilidade dolorosa a alta pressão está relacionada com altos níveis de glutamato também na região posterior da insula (CHOY, 2015). Por outro lado, evidências mostram que os níveis de neurotransmissores envolvidos na modulação da percepção da dor, como serotonina, noradrenalina e dopamina, apresentam níveis diminuídos (ARNOLD, 2006; RUSSELL et al., 1992). Este acontecimento resulta em redução na capacidade de modulação descendente inibitória da dor, que é uma característica patofisiológica da fibromialgia (HAUSER et al., 2015). Isto porque, as monoaminas podem exercer ações analgésicas em neurônios aferentes primários e de projeção, além de interneurônios inibitórios dependendo do tipo de receptor em que se ligam (MILLAN, 2002; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

Como a patofisiologia da fibromialgia é inespecífica o seu manejo clínico é frequentemente longo e complexo, envolvendo visitas clínicas repetidas e com diferentes médicos, o diagnóstico pode demorar anos para ser confirmado (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016). O critério de diagnóstico para fibromialgia primeiramente publicado pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR, do inglês *American College of Rheumatology*) em 1990 descrevia que o indivíduo deveria ter certo número de pontos sensíveis pelo corpo (>11) além de relatar dor generalizada crônica para ser qualificado no diagnóstico (JONES et al., 2015; WOLFE et al., 1990). Os novos critérios de diagnóstico publicados em 2010 e 2011 consideram de menor relevância o número de pontos sensíveis distribuídos ao longo do corpo, mas baseiam-se principalmente nos sintomas comórbidos relatados pelos pacientes como a presença e gravidade da fadiga, distúrbios do sono, dificuldades de memória e problemas de humor, além do auto-relato dos pacientes sobre os locais de dor (CLAUW, 2015; WOLFE et al., 2011).

Sabe-se que sintomas de depressão coexistem com a dor em 70% dos casos de dor crônica (BAIR et al., 2003) e 66% dos pacientes com fibromialgia apresentam depressão moderada a grave (REHM et al., 2010). Um estudo mostrou que pacientes com fibromialgia que apresentavam várias características de depressão comórbida também experimentaram maior intensidade de dor, fadiga e má qualidade do sono em comparação aos indivíduos com fibromialgia que apresentavam sinais mínimos de depressão (SORIANO-MALDONADO et al., 2015). Além disso, os escores de ansiedade e depressão avaliados a partir de questionários foram duas vezes mais altos nos pacientes com fibromialgia do que nos controles saudáveis, ressaltando a importância de se fornecer um suporte psiquiátrico a estes pacientes que inclua cuidados biológicos, sociais e psicológicos combinados (UÇAR et al., 2015).

Existem muitas barreiras para o diagnóstico e tratamento ideal da fibromialgia devido a sua complexidade de sintomas e variação no reconhecimento destes entre médicos de diferentes regiões, além de haver inconsistências entre as práticas de tratamento (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016). Os tratamentos recomendados pela Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR do inglês 'European League Against Rheumatism') e pelo FDA (do inglês 'Food and Drug Administration-US') incluem a abordagem farmacológica e não-farmacológica. As terapias não-farmacológicas mais recomendadas são a prática de exercício físico, educação (no sentido de explicar a condição ao paciente e definir as expectativas de tratamento), terapia cognitivo-comportamental, e também acupuntura, entre outras. Este tipo de abordagem é de grande importância, uma vez que frequentemente o seu efeito excede ao das terapias medicamentosas e levam a uma melhora sustentada (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; CLAUW, 2015).

A abordagem farmacológica visa, no geral, aumentar a atividade dos neurotransmissores inibitórios ou reduzir a atividade dos excitatórios (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016). Em alguns países, os fármacos autorizados para o tratamento da fibromialgia pelo FDA são a pregabalina, duloxetina e milnaciprano, sendo que a pregabalina possui maior relevância terapêutica (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016). A pregabalina se liga na subunidade $\alpha_2\delta$ dos canais de cálcio sensíveis a voltagem no SNC, bloqueando assim o influxo de cálcio e inibindo a liberação de glutamato a partir de neurônios pré-sinápticos e esse mecanismo está relacionado com sua capacidade de reduzir a dor. O uso da pregabalina pelos pacientes com fibromialgia está relacionado com um alívio médio da dor de cerca de 50% (ÜÇEYLER et al., 2013), e o seu uso crônico pode levar ao aparecimento de efeitos adversos como tontura, sonolência e ganho de peso, os quais limitam o seu uso (CROFFORD et al., 2005). A duloxetina e o milnaciprano são inibidores da recaptação dos

neurotransmissores serotonina e noradrenalina (IRSN), e levam ao aumento da disponibilidade destas monoaminas na fenda sináptica, contudo podem causar efeitos adversos como náusea, constipação, e dor de cabeça (ARNOLD et al., 2004; CORDING et al., 2015; WOOD; HOLMAN; JONES, 2007).

Além dos medicamentos aprovados pelo FDA, outros medicamentos como amitriptilina, ciclobenzaprina, gabapentina e fluoxetina também são usados para tratar a fibromialgia (ARNOLD, 2006; ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; SMITH; BRACKEN; SMITH, 2011). De forma interessante, a atividade opioide endógena está aumentada nessa doença, mas os opioides não tem evidência de eficácia, uma vez que a disponibilidade dos receptores μ -opioides está reduzida (HARRIS et al., 2007; MACFARLANE et al., 2017). Além do mais, esta classe de analgésicos pode levar à hiperalgesia induzida por opioides, exacerbando os sintomas de dor, além de conduzir à adição de opioides (CLAUW, 2015; MARTYN; MAO; BITTNER, 2019). De modo geral, os pacientes com fibromialgia demonstram insatisfação com a medicação e tratamento disponíveis para o alívio dos sintomas dolorosos (LAUCHE et al., 2013).

Considerando que são encontradas poucas terapias plenamente eficazes para a fibromialgia, e a sua patofisiologia não é bem estabelecida, é conveniente a busca pelos mecanismos subjacentes a esta doença, que possam auxiliar na pesquisa de novos agentes mais efetivos. Nesse sentido, modelos animais que mimetizam os aspectos identificados na fibromialgia vêm sendo utilizados a fim de elucidar esses mecanismos. Existem vários protocolos experimentais diferentes empregados para induzir um modelo de fibromialgia, dentre eles estão os protocolos que empregam o uso de salina ácida, a indução de estresse tanto sonoro ou ao frio, além do modelo que utiliza a administração de reserpina. Visto que o estoque de monoaminas é realizado pelos transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs, do inglês *vesicular monoamine transporters*) 1 e 2, a reserpina se liga ao VMAT de modo a inibir sua ação, impedindo o armazenamento das monoaminas dentro das vesículas para posterior liberação na fenda sináptica, tendo como resultado dessa inibição a depleção de monoaminas (YAFFE; FORREST; SCHULDINER, 2018). A reserpina causa, tanto em humanos quanto em animais experimentais, uma série de alterações bioquímicas e comportamentais que estão associadas à fibromialgia (NAGAKURA et al., 2009; TAGUCHI et al., 2015; VESELINOVIC et al., 2011) e representa um modelo com validade aparente (alterações relacionadas a dor e depressão), validade construtiva (depleção de monoaminas) e validade preditiva (eficácia de fármacos utilizados clinicamente, como a pregabalina). Além disso, a disfunção do sistema descendente inibitório da dor, juntamente com a depleção de

monoaminas, estão envolvidas na facilitação de comportamentos relacionados à dor e depressão neste modelo (NAGAKURA et al., 2009; TAGUCHI et al., 2015), e isso mimetiza as principais disfunções observadas nos pacientes com fibromialgia (CHOY, 2015; CLAUW, 2015).

Sabe-se que o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), amplamente expresso no sistema nervoso, está envolvido em condições dolorosas crônicas, contribuindo para a alodínia, hiperalgesia, dor espontânea e comportamentos depressivos, que são sintomas relatados pelos pacientes com fibromialgia (ABDELHAMID et al., 2014; CHOI et al., 2016; CLAUW, 2015; SZALLASI et al., 2007). Além disso, os canais TRPV1 estão expressos, entre outros locais, principalmente nas fibras C cuja estrutura e função está alterada em pacientes com fibromialgia (PREMKUMAR; SIKAND, 2008; TAGUCHI et al., 2015). As monoaminas liberadas na medula espinhal a partir de projeções descendentes diminuem a sinalização dolorosa a partir da inibição/hiporegulação de canais TRPV1 pré-sinápticos (CHAKRABORTY et al., 2016, 2017), logo, a depleção de monoaminas pela reserpina poderia afetar esta modulação do TRPV1, contribuindo para o estado doloroso na fibromialgia.

Estudo prévio mostra que as resolvinas, um grupo de mediadores lipídicos implicados na resolução da inflamação, reduzem os sintomas dolorosos e depressivos no modelo de fibromialgia induzido por reserpina (KLEIN et al., 2014). Uma vez que as resolvinas agem como inibidores de alguns canais TRP, incluindo o TRPV1 (PARK et al., 2011), é possível inferir que as resolvinas agem, pelo menos em parte, pela regulação de canais TRP para atenuar os sintomas da fibromialgia. Sendo assim, canais TRPV1 poderiam estar mediando os sintomas dolorosos e depressivo associados a fibromialgia no modelo induzido por reserpina. A ativação do TRPV1 está envolvida no desenvolvimento de hiperalgesia crônica em um modelo de fibromialgia induzido por ácido em camundongos (YÜKSEL et al., 2017), porém o efeito de um antagonista TRPV1 ainda não foi avaliado até o presente momento no modelo de dor/depressão induzido por reserpina.

3.4 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE 1

Os nociceptores transmitem informações sensoriais desde a periferia até os centros de processamento da dor na medula espinhal e no encéfalo (RINGKAMP et al., 2013), e são caracterizados, em parte, por sua sensibilidade à capsaicina, um composto natural encontrado

na pimenta (JANCSO; KIRALY; JANCSO-GARBOR, 1977; TOMINAGA; TOMINAGA, 2005). O sítio de ação para a capsaicina e para a resiniferatoxina, um agonista ultrapotente análogo da capsaicina, é denominado de receptor vanilóide devido a porção de ácido homovanílico existente em uma das extremidades destes compostos, a qual é um componente químico essencial compartilhado entre ambos (SZALLASI, 1994). No ano de 1997, foi publicada a clonagem do receptor para a capsaicina, que possibilitou um conhecimento maior sobre a estrutura molecular deste alvo biológico e posterior identificação como um membro da família de canais iônicos receptores de potencial transitório (TRP) (CATERINA et al., 1997; CATERINA; JULIUS, 2001). O receptor vanilóide 1, inicialmente denominado VR1, foi o protótipo da sua subfamília, e posteriormente foi denominado TRPV1 (CATERINA; JULIUS, 2001).

O TRPV1 é um canal de cátions não-seletivo permeável ao cálcio que possui seis domínios transmembrana e uma alça hidrofóbica formadora de poro entre o quinto e sexto domínio. Este canal possui um terminal amino que contém três domínios de repetição de anquirina e um terminal carboxila contendo um domínio de TRP próximo ao sexto domínio transmembrana (TOMINAGA; TOMINAGA, 2005). Ele é considerado um transdutor de sinal, que pode iniciar a sinalização nociceptiva gerando um potencial de receptor nas terminações periféricas por aumentar a permeabilidade da membrana à cátions mono- e bivalentes (CATERINA et al., 1997; PREMKUMAR; SIKAND, 2008). Além da capsaicina, mais tarde, outros compostos também foram reconhecidos como sendo agonistas do TRPV1, dentre eles a resiniferatoxina (do látex de *Eucalyptus resinifera*), piperina (o ingrediente pungente da pimenta preta), gingerol e zingerona (do gengibre), cânfora e eugenol (um óleo essencial encontrado no cravo-da-índia) (SZALLASI et al., 2007). O canal TRPV1 é um receptor polimodal: além de ser ativado por compostos químicos, seus ativadores variam de calor inócuo e calor nocivo (acima de 43°C) a mudanças no pH (tanto ácido quanto alcalino) (MORAN; SZALLASI, 2018).

A expressão e a função do TRPV1 pode ser alterada durante a lesão nervosa ou inflamação através de múltiplos mecanismos, dentre estes a regulação transcricional e traducional, mudanças pós-traducionais e tráfego alterado, desse modo, aumentam a sensibilidade a estímulos nocivos (sensibilização periférica), contribuindo para estados patológicos de dor (JI et al., 2002; PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009; SZALLASI et al., 2007). Aproximadamente uma década após a clonagem do TRPV1, os primeiros antagonistas deste canal de baixo peso molecular já entraram em estudos clínicos de Fase I. O interesse clínico nestes antagonistas representa uma nova estratégia de alívio da dor e foi

baseado no pensamento de que agonistas endógenos que atuam no TRPV1 podem fornecer uma contribuição importante para algumas condições dolorosas (SZALLASI et al., 2007). Alguns antagonistas do canal TRPV1 testados clinicamente tiveram seu uso associado a efeitos adversos como redução na capacidade dos indivíduos de sentir calor nocivo e indução de hipertermia corporal (MORAN; SZALLASI, 2018). No entanto, formulações de alta dose de capsaicina têm mostrado utilidade terapêutica. Adesivos para uso tópico com alta concentração de capsaicina são recomendados como segunda linha terapêutica da dor neuropática devido à alta qualidade das evidências (FINNERUP et al., 2015).

A capsaicina evoca uma excitação neuronal inicial que é seguida por um estado refratário durável, durante o qual os neurônios previamente excitados não respondem a um desafio vanilóide subsequente, ou eles permanecem resistentes a uma ampla gama de estímulos, que variam de calor nocivo, pressão mecânica, até agentes pró-inflamatórios endógenos ou exógenos (SZALLASI; BLUMBERG, 1999). Isso se dá possivelmente devido à depleção de substância P nas terminações nervosas aferentes e diminuição transitória da densidade das fibras nervosas na pele (NASCIMENTO et al., 2013). Este efeito, habitualmente chamado de dessensibilização, tem um evidente potencial terapêutico, como mencionado anteriormente (SZALLASI; BLUMBERG, 1999). Além disso, o uso tópico da capsaicina no tratamento da fibromialgia também já foi descrito (CASANUEVA et al., 2013; MCCARTY et al., 1994). Posto que, as aplicações repetidas de capsaicina levam à dessensibilização duradoura em relação à dor, causando aumento do limiar de dor nos pacientes com fibromialgia, a dessensibilização das fibras TRPV1-positivas nesta doença ou o bloqueio farmacológico destes canais iônicos poderia ser benéfico para melhor tratá-la (NASCIMENTO et al., 2013).

Evidências apontam a contribuição do TRPV1 em diferentes condições dolorosas incluindo modelos de dor inflamatória e neuropática (BRUSCO et al., 2017), e também na hiperalgesia crônica no modelo de fibromialgia induzido por ácido (YÜKSEL et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que os receptores TRPV1 estão envolvidos no comportamento depressivo, logo, o seu antagonismo pode produzir efeitos antidepressivos (ABDELHAMID et al., 2014; MANNA; UMATHE, 2012). Portanto, o TRPV1 tornou-se um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de sintomas de dor crônica e comorbidades relacionadas a fibromialgia.

3.5 ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA O ALÍVIO DOS SINTOMAS RELACIONADOS A FIBROMIALGIA

O tratamento da fibromialgia possui eficácia limitada e dispõe de efeitos adversos relevantes. Deste modo, é conveniente a busca por terapias alternativas e/ou complementares e à medida que se amplia a compreensão a respeito dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na fibromialgia, novas propostas terapêuticas podem surgir (CROFFORD; APPLETON, 2001). Neste sentido, uma abordagem atual tem sido a avaliação quanto ao potencial terapêutico de produtos naturais, com o objetivo de obter eficácia aprimorada e efeitos adversos mínimos (CALIXTO et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2013). Evidências sugerem efeitos benéficos significativos, a partir do uso de plantas medicinais ou produtos naturais relacionados, na perturbação do sono, dor, depressão, rigidez articular, ansiedade, função física e qualidade de vida de pacientes com fibromialgia (CASANUEVA et al., 2013; LUKACZER et al., 2005; RUTLEDGE; JONES, 2007; SKRABEK et al., 2008; WARE et al., 2010).

O α -espinasterol é um fitosterol originalmente isolado das folhas de espinafre e encontrado como subproduto do isolamento da vitamina K da alfafa (FERNHOLZ; MOORE, 1939). Ainda, o óleo de semente de abóbora é uma importante fonte alimentar de α -espinasterol (TSAKNIS; LALAS; LAZOS, 1997). Além de ser usado como um tempero típico da culinária da Estíria (FRUHWIRTH; HERMETTER, 2008; NILIUS; APPENDINO, 2013), ele também é relevante na fitomedicina para o tratamento da hiperplasia benigna da próstata, uma doença cuja expressão de TRPV1 apresenta-se aumentada (CZIFRA et al., 2009; PAGANO et al., 2014). O α -espinasterol também tem mostrado notável eficácia, mediada por seu antagonismo do canal TRPV1, em modelos animais de dor crônica (BRUSCO et al., 2017).

Ele possui boa absorção oral além de capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e alcançar o encéfalo e medula espinhal de camundongos (TREVISAN et al., 2012). Possui efeito antioxidante (COBALLASE-URRUTIA et al., 2010), anticonvulsivante (SOCALA et al., 2015), antidepressivo (SOCALA; WLAZ, 2016), anti-inflamatório (BOLLER et al., 2010; BORGES et al., 2014) e antinociceptivo em modelos de dor crônica (BRUSCO et al., 2017) e de dor inflamatória induzida por CFA (TREVISAN et al., 2012).

A ativação do receptor TRPV1 está envolvida no desenvolvimento de comportamentos dolorosos e depressivos (ABDELHAMID et al., 2014; DEMIRDAS; NAZIROGLU; ÖVEY, 2017). Neste sentido, uma vez que estudos prévios demonstram que o espinasterol atua como

um antagonista do TRPV1, os efeitos antinociceptivo e antidepressivo do α -espinasterol podem estar sendo mediados por este receptor (SOCALA; WLAZ, 2016; TREVISAN et al., 2012).

4 MANUSCRITO CIENTÍFICO

Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and the Benefits of α -Spinasterol in the Pain-Depression Dyad in Mice

Susana Paula Moreira Fischer¹, Indiara Brusco¹, Maria Fernanda Pessano Fialho¹, Camila Camponogara¹, Evelyne da Silva Brum¹, Rahisa Scussel², Ricardo Andrez Machado-de-Ávila², Gabriela Trevisan³, Sara Marchesan Oliveira^{1*}

¹Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

²Graduate Program in Health Sciences, University of Extrem South Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.

³Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author: Sara Marchesan Oliveira

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Zipcode: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil, Phone: +55 3220-8053, email: saramarchesan@hotmail.com; saramarchesan@ufsm.br.

Highlights

- Reserpine caused pain-depression dyad without promoting physical alterations.
- A low dose of capsaicin produced nociception in reserpine-injected mice.
- The TRPV1 desensitization prevented the reserpine-induced nociception behaviours.
- SB-366791 and α -spinasterol decreased reserpine-induced mechanical allodynia.
- TRPV1 antagonists reduced the reserpine-induced increased immobility time.

Abstract

Fibromyalgia is characterized mainly as chronic widespread pain and the patients can present comorbidities like depression. Although these symptoms cause a notable impact on patients' quality of life, the underlying aetiology and pathophysiology of this disease remain incompletely elucidated. The transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) is a polymodal nociceptive receptor, involved in the development of painful and depressive behaviours, while the α -spinasterol, a TRPV1 antagonist, presents antinociceptive and antidepressant effects. The present study investigated the involvement of the TRPV1 channel and the possible effects of α -spinasterol on the pain-depression dyad in a fibromyalgia-like model. This model was induced with a subcutaneous (s.c.) injection of reserpine (1 mg/kg) once daily for three consecutive days in male Swiss mice. Reserpine administration depleted monoamines and caused mechanical allodynia that was inhibited by SB-366791 (1 mg/kg, p.o.), a selective TRPV1 antagonist, with a maximum inhibition (I_{\max}) of $73.4 \pm 15.5\%$ or by the single or 3-day-repeated administration of α -spinasterol (0.3 mg/kg, p.o.) with I_{\max} of $72.8 \pm 17.8\%$ and $78.9 \pm 32.9\%$, respectively. The SB-366791 was also able to inhibit the increase of the reserpine-induced immobility time with I_{\max} of 100%, while α -spinasterol inhibited this parameter with I_{\max} of $98.2 \pm 21.5\%$ and 100%, by single or repeated administration, respectively. The reserpine-induced mechanical allodynia and the thermal hyperalgesia were abolished by TRPV1-positive fibers desensitization induced by previous resiniferatoxin (RTX) administration. In summary, we suggest that TRPV1 channel may be involved in the fibromyalgia pain/depression development and maintenance. Intending this pharmacological target, α -spinasterol has therapeutic potential to treat the pain-depression dyad in fibromyalgia' patients.

Keywords: Reserpine, fibromyalgia, mechanical allodynia, spontaneous nociception, monoamines, α -spinasterol.

1 INTRODUCTION

Fibromyalgia is a disease characterized by widespread chronic pain (Clauw, 2015; Treede et al., 2015) which occurs mainly from central and peripheral pain processing disturbances (Fleming and Volcheck, 2015; Taguchi et al., 2015) without evidence of tissue damage or somatosensory system lesion (Aydede and Shriver, 2018), affecting from 2% to 8% of the world's population (Jones et al., 2015). Besides the painful symptoms, this disease is accompanied by several comorbidities, especially depression (Clauw, 2015). All of these symptoms interfere with the work capacity, leading to productivity loss and causing a notable impact on the life' quality of patients (Choy et al., 2010). Pathophysiology of fibromyalgia remains uncertain and its mechanisms are not entirely understood (Schmidt-Wilcke and Clauw, 2011). However, clinical studies have shown abnormalities on nociceptive transmission and descending pain-inhibitory pathways dysfunction associated with decreased monoamines levels (Arnold, 2006; Russell et al., 1992).

Monoamines levels are also reduced in depression patients, a neurochemical characteristic commonly shared with patients with chronic pain as fibromyalgia (Russell et al., 1992; Surah et al., 2014). Furthermore, depression symptoms coexist with pain in 70% of chronic pain cases (Bair et al., 2003) and around 66% of fibromyalgia patients present moderate to severe depression (Rehm et al., 2010). Patients with depression often have increased pain perception and they are more likely to develop chronic pain. Presupposing that, the conditions often coexist, respond to similar treatment and can exacerbate one another, the term 'pain-depression dyad' has been used when referring to this interaction (Surah et al., 2014). In this sense, it is of high relevance to identify compound with dual action that could treat both pain and depression symptoms.

The pharmacological therapy (pregabalin, duloxetine, and milnacipran) recommended for fibromyalgia treatment is directed mainly to the relief of the symptoms, it has limited efficacy and causes adverse effects that limit its use (Arnold et al., 2016; Choy et al., 2010). In this context, to elucidate the mechanisms involved in fibromyalgia and to find new treatments, we used a reserpine-induced fibromyalgia-like symptoms animal model. Reserpine depletes monoamines in the nervous system causing fibromyalgia-like painful symptoms and the depression, a fibromyalgia comorbidity (Brusco et al., 2019).

The TRP family has been an exciting group of targets for the treatment of several pain disorders, and further studies about it have the potential to deliver new therapeutic agents to patients. The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) is a non-selective cation channel, expressed mainly in the nervous system, that detects noxious stimuli when activated, contributing to the development of painful and depressive behaviours (Abdelhamid et al., 2014; Szallasi et al., 2007). TRPV1 is a relevant therapeutic target for the development of novel analgesics since antagonists of this receptor have been reported to produce preclinical and clinical antinociceptive effects (Finnerup et al., 2015; Szallasi et al., 2007; Yekkirala et al., 2017). Previous studies show that TRPV1 activation is involved in the development of chronic hyperalgesia in an acid-induced fibromyalgia model in mice (Chen et al., 2014; Lin et al., 2015; Yüksel et al., 2017), but the effect of a TRPV1 antagonist was not evaluated until now in the reserpine-induced pain-depression dyad. The α -spinasterol is a phytosterol characterized as a TRPV1 antagonist and several biological activities have been reported for this compound, among them, antidepressant (Socala and Wlaz, 2016), anti-inflammatory (Borges et al., 2014) and antinociceptive activity in acute and chronic pain models (Brusco et al., 2017; Trevisan et al., 2012). Thus, we investigated the participation of the TRPV1 channel in the fibromyalgia-like painful and depressive symptoms and the possible analgesic and antidepressant effects of the TRPV1 antagonist, α -spinasterol.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Drugs and Reagents

Reserpine, SB-366791, and capsaicin were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis MO, USA). α -Spinasterol, pregabalin, and amitriptyline were purchased from Tocris (Sao Paulo SP, Brazil). Pregabalin and amitriptyline were dissolved in 0.9% isotonic saline solution. Resiniferatoxin was purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (Sao Paulo SP, Brazil) and was dissolved in 0.5% ethanol and 0.5% Tween 80 in 0.9% isotonic saline solution. Ketamine and xylazine were purchased from Syntecvet (Sao Paulo SP, Brazil) and were diluted in 0.9% isotonic saline solution. Reserpine was dissolved in a vehicle solution (0.1% acetic acid solution and 99.9% of 0.9% isotonic saline solution, pH 7.15). α -Spinasterol and SB-366791 were dissolved in

vehicle solution: Tween[®] 80 (5%), polyethylene glycol (PEG) 400 (20%), and 0.9% isotonic saline solution (75%). The drugs doses used in this study were based on previous studies or pilot experiments (Brusco et al., 2017; Li et al., 2016; Trevisan et al., 2012).

2.2 Animals

Adult male Swiss mice (25-30g) were used and maintained under controlled temperature ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) in a light/dark cycle of 12 h, with free access to food and tap water. The experiments were performed in accordance with national and international legislation (Guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy). All animal experiments also complied with the Animal Research: Reporting *in vivo* Experiments (ARRIVE) Guidelines (McGrath and Lilley, 2015) and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). The Institutional Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria approved the experimental protocols (process number 7614210318/2018 and 9148060319/2019). The number of animals and noxious stimuli intensities were the minimum necessary to demonstrate consistent treatment effects.

2.3 Pain-Depression dyad in a Fibromyalgia-like model induced by reserpine

The fibromyalgia-like model to cause pain and depressive-like behaviours was performed according to previously described (Brusco et al., 2019; Li et al., 2016). Reserpine (1 mg/kg) was given subcutaneously (s.c.), once a day, for 3 consecutive days. Control group received subcutaneous administration of vehicle (0.1% acetic acid solution and 99.9% of 0.9% saline solution), employing the same schedule of administration. The animals were submitted to the behavioural tests one day after the last reserpine or vehicle administration.

2.4 Mechanical allodynia

The mechanical paw withdrawal threshold (PWT) of animals to von Frey filaments was measured using the Up-and-Down paradigm (Chaplan et al., 1994; Fischer et al., 2018). The PWT was

calculated from the resulting scores using von Frey filaments of increasing stiffness (0.02-10g), as described previously by Dixon (1980), expressed in grams (g), and was evaluated before (basal) and after the three days of reserpine administration. A significant reduction in PWT compared to baseline values was considered as mechanical allodynia.

The effect of SB-366791 (1 mg/kg, p.o.), α -spinasterol (0.1-1 mg/kg, p.o.), pregabalin (30 mg/kg, p.o.; used as a positive control) or vehicle [Tween[®] 80 (5%), PEG 400 (20%), and 0.9% isotonic saline solution (75%), 10 mg/ml, p.o.], on the behavioural changes elicited by reserpine, were investigated after their single administration one day after the last reserpine administration. The mechanical PWT was evaluated at several times following the oral drug treatments.

To investigate if the repeated treatment with α -spinasterol improves its analgesic effect compared to a single dose we also evaluated the effect of repeated administration for 3 days of α -spinasterol. Different groups of mice received the following treatments: vehicle (10 mg/ml), α -spinasterol (0.3 mg/kg, p.o.) or pregabalin (30 mg/kg, p.o.) for 3 consecutive days, before each daily reserpine administration.

2.5 Thigmotaxis behaviour test

The thigmotaxis paradigm is based on natural behaviours of rodents to adhere to the perimeter of a novel open arena based on their instinct predator avoidance behaviour. In pain studies, animals submitted to chronic pain models increase the time spent in the peripheral area, characterising thigmotaxis behaviour. The thigmotaxis test was performed as described by Huang et al. (2013) and adapted for mice. The animals were treated with reserpine (1 mg/kg, s.c.) or vehicle (10 ml/kg, s.c.) and at one day after the last administration they were introduced into a wood box (40 x 30 x 18cm) with a central quadrant (12 x 12 cm). The spontaneous locomotor activity was recorded using the ANY-maze software for 15 min and the number of inputs and time spent in the central quadrant were evaluated.

2.6 Muscle strength test (Grip test)

The muscle strength test was carried out according to Pirog et al. (2010), which mice were placed on a metal grid connected to a grip strength meter (Grip Strength meter EFF 305 – Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil), and were held by the tail until they grip the grid firmly with both forepaws. The maximum muscle strength was recorded in grams (g) by the device. First, the basal strength values were recorded for each animal. The grip strength was measured 3 times per mouse with at least 1 min between each round. After basal values measure, the animals were treated with reserpine (1 mg/kg, s.c.) or vehicle (10 ml/kg, s.c.) and at one day after the last administration, the muscle strength of the animals' hindlimbs and forelimbs was again measured.

2.7 Forced swimming test

The forced swimming is used to evaluate possible depressive-like behaviour. The experiment was carried out using a cylinder (20 cm diameter, 55 cm height) filled with water maintained at 24°C until the height of 30 cm (Li et al., 2016). Mice were placed into the water and immobility was defined as the absence of paw movements except motions required for keeping the mouse's head above the water. The test was performed one day after the last reserpine administration, at 1h after SB-366791 (1 mg/kg, p.o.) or amitriptyline (10 mg/kg, p.o., positive control), or 2h after α -spinasterol (0.3 mg/kg, p.o.). We also evaluated the effect of repeated administration for 3 days of these treatments. Different groups of mice received the following treatments: SB-366791 (1 mg/kg), α -spinasterol (0.3 mg/kg, p.o.), amitriptyline (10 mg/kg, p.o.), or vehicle (10 mg/ml, p.o), for three consecutive days, before each daily reserpine administration. The test was performed at 24h after the last administration of oral treatments.

2.8 Monoamines levels determination in spinal cord and brain

The levels of dopamine, noradrenaline, and serotonin were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) method (De Benedetto et al., 2014). The mice were euthanized (thiopental 100 mg/kg, intraperitoneally) and the spinal cord, cortex, and thalamus were collected one day after the last reserpine or vehicle injection and the samples were homogenized in 0.2

M perchloric acid. Following centrifugation (12,000 x g, for 10 min at 4°C), the supernatants were analyzed by HPLC with fluorometric detection. The HPLC system was equipped with an LC-20AT pump coupled to an SIL-20AHT autosampler and an RF-20A fluorescence detector, and LC Solution software (Shimadzu, Kyoto, Japan). The fluorescence was monitored at excitation and emission wavelengths of 279 and 320 nm, respectively. The peaks of monoamines were identified by comparing their retention times in the sample (tissue extract) solution with each standard solution. In sequence, the results were quantified by comparison with the peak area of the standards solutions from a calibration curve ($r^2 \geq 0.99$). Results were expressed as ng of monoamines/ μ L of sample.

2.9 Possible adverse effects of reserpine

To evaluate some physical alterations that reserpine could induce, we first measured the possible cataleptic behaviour using a horizontal bar (Atwal et al., 2019). For the cataleptic behaviour test, the front paws of the mouse were placed on a horizontal bar suspended 4.5 cm above the ground and the time taken for the mouse to remove both front paws from the bar was recorded. Bar output latency (time required for the animal to remove the forelimbs from the bar) was measured after the 3-day-injection of reserpine or vehicle.

The body temperature also was measured one day after the last administration of reserpine (1 mg/kg, s.c.) or vehicle (10 ml/kg, s.c.). Mice were restrained, and a lubricated thermometer was inserted 0.5 cm into the rectum for the time needed (approximately 15 s) to stabilise the temperature reading (Brum et al., 2016). Moreover, the body weight of the same mice was measured using a digital weighing scale.

2.10 Evaluation of TRPV1-mediated hypersensitivity induced by reserpine

To examine whether mice that received the 3 days reserpine injection would be more sensitive to capsaicin, a TRPV1 agonist, we used a low dose of it, as described previously (Rossato et al., 2018). We also evaluated the effects of the SB-366791 and α -spinasterol, TRPV1 antagonists, on the reserpine plus capsaicin-induced nociceptive behaviour to confirm the TRPV1 involvement on overt nociception induced by reserpine. One day after the last administration of reserpine, the animals were

treated with SB-366791 (1 mg/kg, p.o.), α -spinasterol (0.3 mg/kg, p.o.), or vehicle (10 ml/kg, p.o.). The nociceptive behaviour was verified immediately after the intraplantar injection (i.pl.; under the right hind paw surface) of a low dose of capsaicin (0.05 nmol/site), at 1h after SB-366791 treatment or at 2h after α -spinasterol. The animals were individually observed for 5 min after capsaicin injection and the amount of time spent licking the injected paw was measured with a chronometer and was used as a measure of overt nociceptive behaviour (in seconds).

2.11 Thermal hyperalgesia

The thermal threshold was assessed using the Hargreaves apparatus and tail immersion in a water bath (Brum et al., 2016; Trevisan et al., 2012). Briefly, a radiant thermal stimulus (60W) was projected on the paw, and the paw withdrawal latency was registered in seconds (cut-off time, to prevent tissue damage: 20s). To the tail immersion, the animal tail was placed in a water bath maintained at $48\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, until tail withdrawal was observed (cut-off time: 25 s). Paw withdrawal and tail flick latency were evaluated one day after the last injection of reserpine (1 mg/kg, s.c.) or vehicle (10 ml/kg, s.c.).

2.12 Desensitization of TRPV1 positive fibers with resiniferatoxin (RTX)

To further explore the effect of reserpine and the involvement of TRPV1 channels, the animals were anaesthetized [ketamine (90 mg/kg) and xylazine (30 mg/kg), i.p.] and submitted to a systemic desensitization protocol with resiniferatoxin (RTX) (Trevisan et al., 2012). The baseline threshold was determined before RTX (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s.c.) or vehicle (0.5% ethanol and 0.5% Tween 80 in 0.9% isotonic saline, s.c.) injection. After 7 days from the desensitization, the animals were administered for 3 days with reserpine (1 mg/kg, s.c.). One day after the last administration of reserpine, the mechanical allodynia and thermal hyperalgesia (as described above) were verified.

2.13 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using Graph Pad Prism 6.0 software (San Diego California, USA). The results are expressed as the mean and standard error of the mean (SEM), except

for the inhibitory doses (ID_{50}) value, which was expressed as the geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. All data were analyzed by Student's t-test, one-way or two-way analyses of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's *post hoc* test. To meet parametric assumptions, data of mechanical threshold were log transformed before analyses. $P < 0.05$ was considered as statistically significant. Our group sizes ($n=6-7$) are similar to those reported in previous publications in the field.

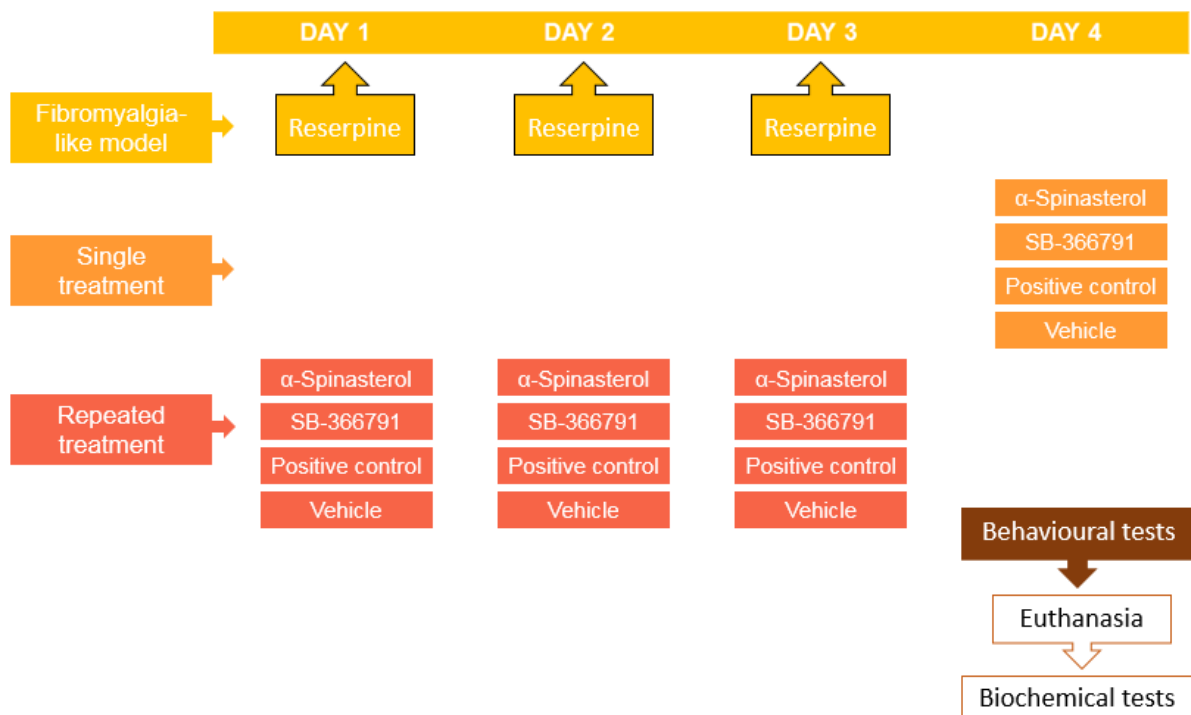


Figure 1. To induce pain/depression in the fibromyalgia-like model, reserpine (1 mg/kg subcutaneous daily) was administered for three consecutive days. The single treatment of α -Spinasterol (0.1, 0.3 and 1 mg/kg, p.o.), SB-366791 (1 mg/kg, p.o.), positive control [pregabalin (30 mg/kg, p.o.) or amitriptyline (10 mg/kg, p.o.)] or vehicle (10 ml/kg, p.o.) were given one day after the last reserpine injection. The repeated treatment with α -Spinasterol (0.3 mg/kg, p.o.) or SB-366791 (1 mg/kg, p.o.), positive control or vehicle was administered by oral route for 3 days. All behavioural experiments were conducted one day after the last reserpine administration. Brain samples were harvested immediately after the measurement of the behavioural paradigms for biochemical evaluations.

3 RESULTS

3.1 Reserpine induces symptoms and biochemical changes related to fibromyalgia

Reserpine (1 mg/kg, s.c.) decreased the paw withdrawal threshold of mice ($69.3 \pm 2.8\%$ of decrease) when compared to the control group, which was characterised as mechanical allodynia (Fig. 2A). Moreover, reserpine reduced the muscle strength ($16.0 \pm 2.7\%$ of reduction) of mice in the grip test, when compared to the vehicle-injected mice (Fig. 2B). Reserpine reduced the entries number ($48.4 \pm 9.4\%$) and the spent time ($44.3 \pm 6.7\%$) in the central zone of the thigmotaxis apparatus when compared to the vehicle group (Fig. 2C, D). Reserpine increased the mice immobility time ($47.5 \pm 6.4\%$ of increase), in the forced swimming test, which is related to depressive-like symptoms (Fig. 3A). Besides that, subcutaneous injection with reserpine for three consecutive days reduced the dopamine and serotonin content of the spinal cord by $25.9 \pm 4.2\%$ and $20.6 \pm 3.4\%$, respectively. In the cerebral cortex, the reserpine decreased by $20.8 \pm 4.3\%$ the serotonin and by $7.5 \pm 2.0\%$ the norepinephrine content. Norepinephrine was reduced by reserpine by $54.1 \pm 9.6\%$ in the thalamus (Fig. 3B-D). Only the monoamines with detectable values on each tissue were shown on the graphs.

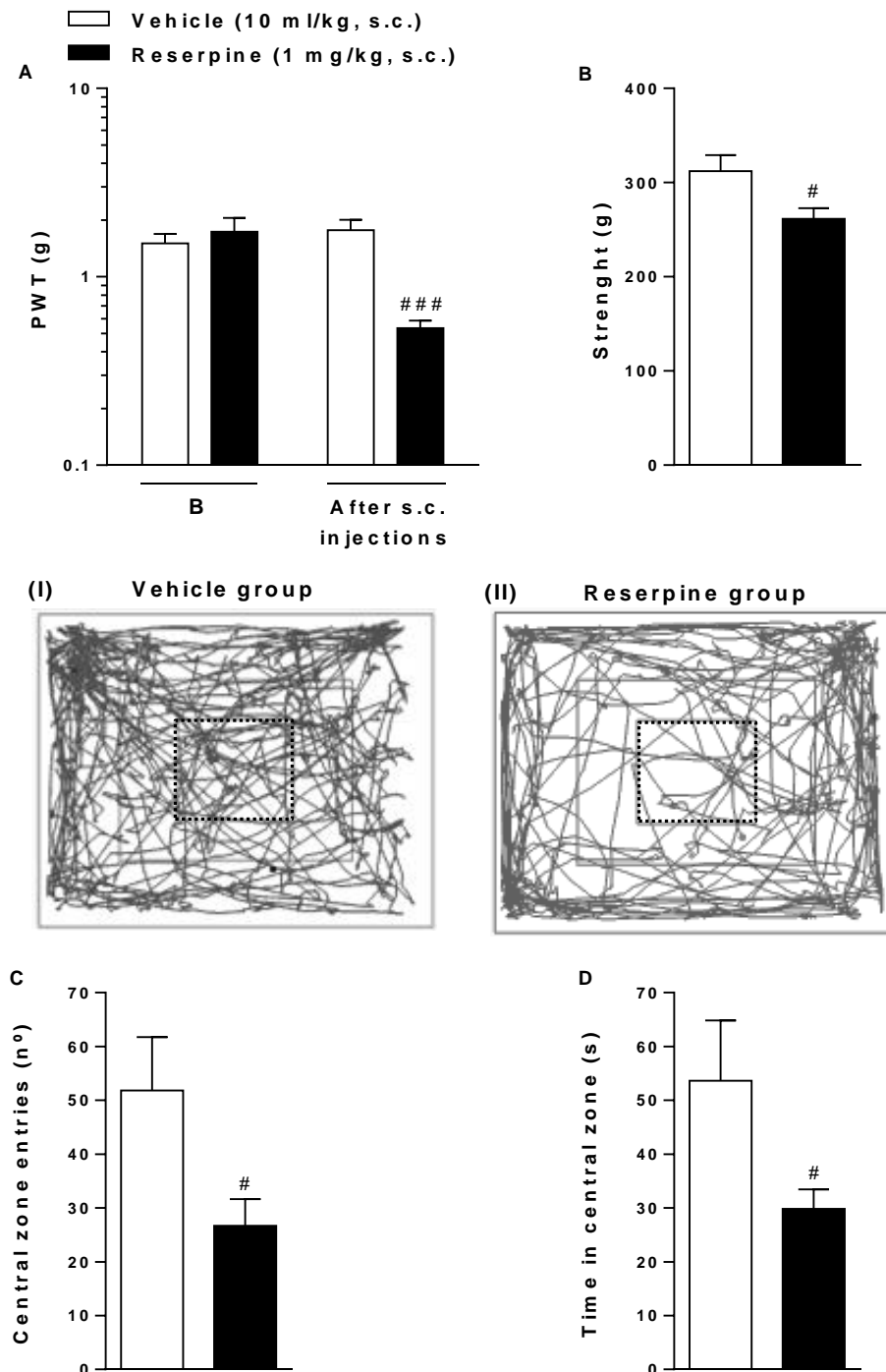


Figure 2. (A) Effect of repeated subcutaneous injection of vehicle (10 ml/kg,s.c.) or reserpine (1 mg/kg, once daily for three consecutive days) on the paw withdrawal threshold (n=6). (B) Muscle strength measurements of the vehicle or reserpine-injected groups (n=6). (C, D) Thigmotaxic behaviour over 15 min in mice injected with reserpine (n=6). (C) Number of entries into the central zone and the (D) time spent in the central zone of the open field by mice that received vehicle or reserpine. The path travelled of (I) vehicle-injected, and (II) reserpine-injected mice over 15 min in the

open field arena. Data are expressed as the mean+SEM (n=6 per group). ###P< 0.001 and #P<0.05 when compared with the vehicle-injected (10 ml/kg, s.c.) group; one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test (PWT); Unpaired one-tailed Student's t-test.

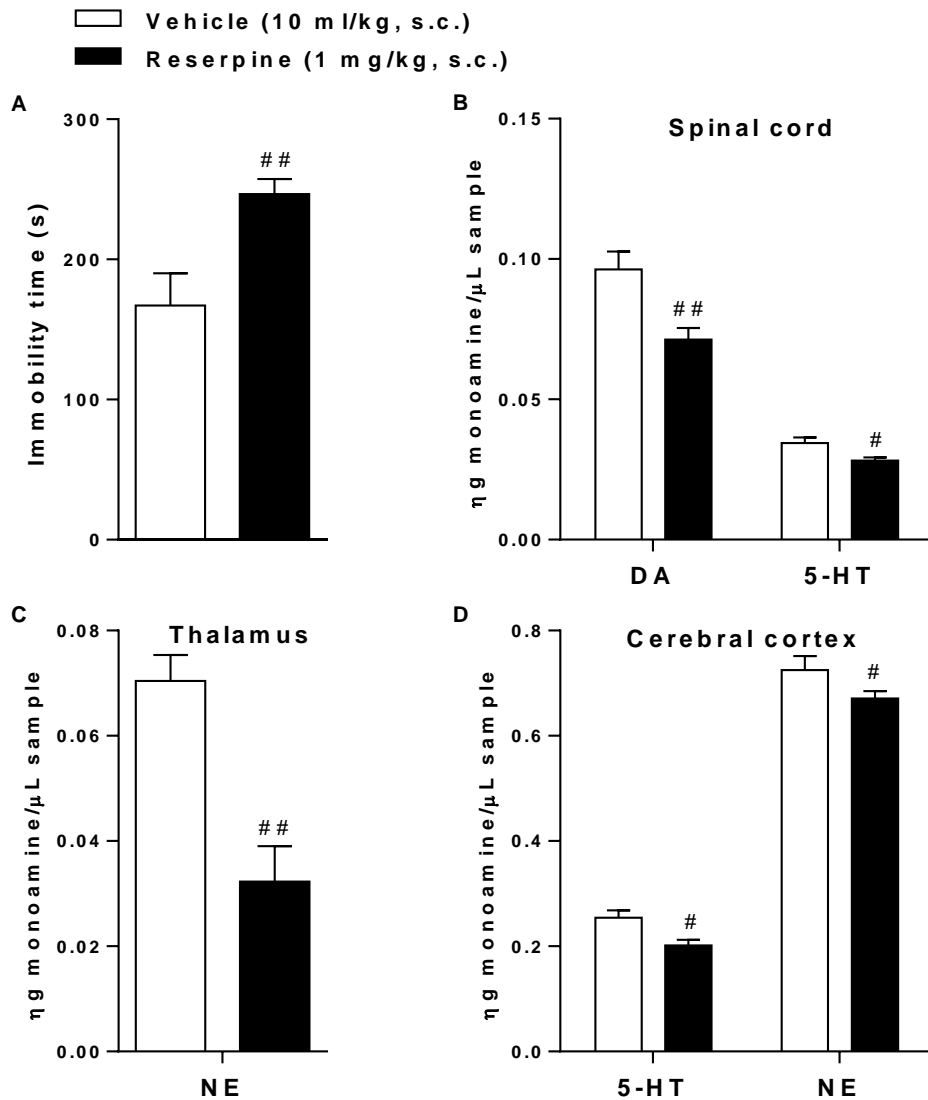


Figure 3. (A) Effect of reserpine (1 mg/kg, s.c., for three consecutive days) or vehicle (10 ml/kg, s.c.) injection in the forced swimming test (n=6-7). (B-D) Depletion of dopamine (DA), serotonin (5-HT), and norepinephrine (NE) on the (B) spinal cord, (C) thalamus and (D) cerebral cortex induced by injections of reserpine (n=6). Data are expressed as the mean+SEM (n=6 per group). ###P<0.01 and #P<0.05 when compared with the vehicle-injected (10 ml/kg, s.c.) group; Unpaired one-tailed Student's t-test.

3.2 Reserpine induces fibromyalgia-like symptoms without causing adverse effects

Reserpine neither altered body weight and temperature nor caused cataleptic behaviour. We noted that reserpine did not alter the distance travelled and average speed on the thigmotaxis test (Table 1).

Table 1. Possible adverse effects of the reserpine (1 mg/kg, s.c.) at one day after its last administration. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=6 animals per group). Significant differences were not found between groups (Student's t-test).

	Treatment	
	Vehicle (10 ml/kg, s.c.)	Reserpine (1 mg/kg, s.c.)
Body weight (g)	30.33 \pm 1.2	29.5 \pm 1.2
Body temperature (s)	36.93 \pm 0.1	36.33 \pm 0.2
Bar latency (s)	8.44 \pm 1.13	7.59 \pm 0.99
Distance (m)	13.1 \pm 1.3	10.3 \pm 0.8
Average speed (m/s)	14.67 \pm 1.5	11.5 \pm 1.0

3.3 The TRPV1 antagonists SB-366791 and α -spinasterol decreased the reserpine-induced mechanical allodynia

The mechanical allodynia caused by reserpine (1 mg/kg, s.c.) on the 4th day after its injections (Fig. 1) was reversed by oral SB-366791 administration from 1h to 2h after its administration, with a maximal inhibition (I_{max}) of 73.4 \pm 15.5% at 1h after its administration (Fig. 4A). α -Spinasterol also inhibited the reserpine-induced mechanical allodynia from 1h to 6h after its administration with I_{max} of 72.8 \pm 17.8% at 6h. Its anti-allodynic effect occurred at doses of 0.1, 0.3 and 1 mg/kg with a 50% inhibitory dose (ID_{50}) of 0.454 (0.141-1.460) mg/kg at 2h after its administration (Fig. 4B). We chose the intermediate dose of 0.3 mg/kg, which was the nearest dose of ID_{50} , to perform the following experiments. Pregabalin (positive control, 30 mg/kg, p.o.) also inhibited the reserpine-induced mechanical allodynia with I_{max} of 100% at 4h after its administration (Fig. 4C).

The repeated administration (for 3 days) of α -spinasterol (0.3 mg/kg, p.o.) prevented the reserpine-induced mechanical allodynia, with an inhibition ($78.9\pm 32.9\%$) similar to that observed to the positive control pregabalin (30 mg/kg, p.o.) (100%) (Fig. 4D).

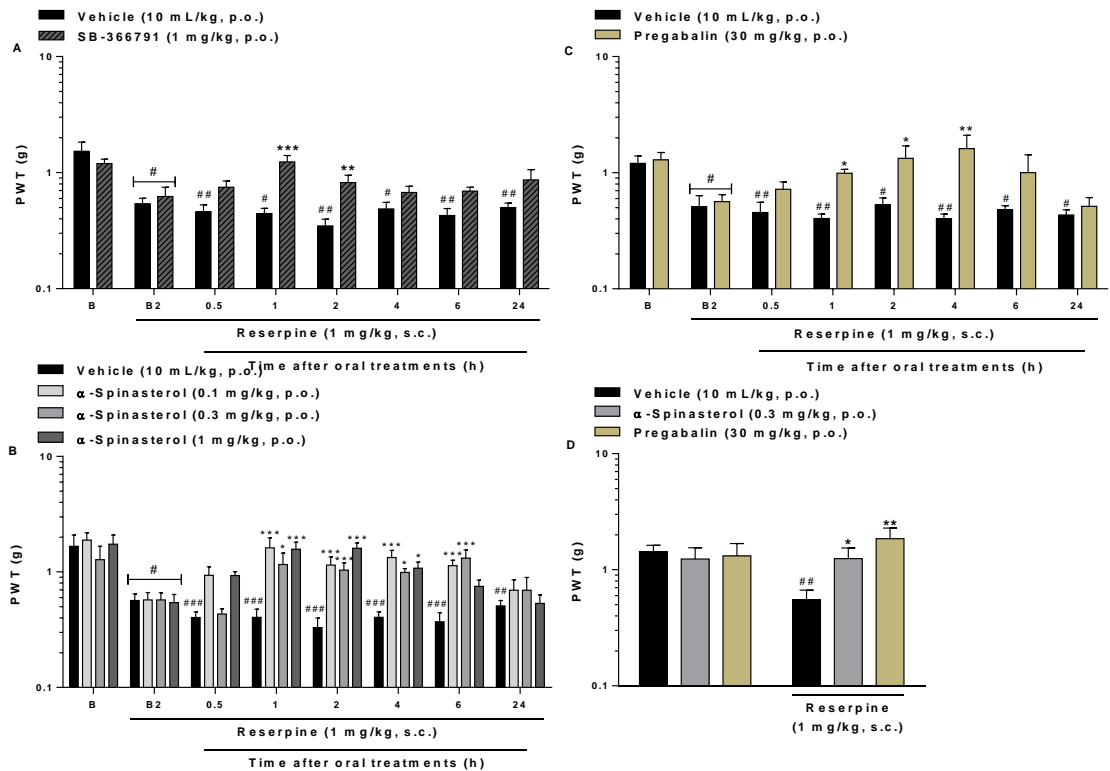


Figure 4. (A) Time-response curve of the selective TRPV1 antagonist effect, SB-366791 (1 mg/kg), on the reserpine-induced mechanical allodynia; (B) Time-response and dose-response curve of α -spinasterol effect on the reserpine-induced mechanical allodynia; (C) Time-response curve of pregabalin effect on reserpine-induced mechanical allodynia; (D) Effect of 3-day-repeated treatment with α -spinasterol and pregabalin on the reserpine-induced mechanical allodynia. The baseline 2 (B2) values were determined after three reserpine-injections and before oral treatments. Data are expressed as the mean+SEM (n=6 per group). ###P<0.001, ##P<0.01, and #P<0.05 when compared with the baseline (B; before reserpine administration); ***P<0.001, **P<0.01, and *P<0.05 when compared with the oral vehicle-treated (10 ml/kg, p.o.) plus reserpine group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

3.4 TRPV1 agonist mediates hypersensitivity induced by reserpine

A submaximal dose of intraplantar capsaicin (0.05 nmol/paw) into the reserpine-injected mice paw but not vehicle-injected caused paw licking, which is an indication of overt nociceptive behaviour to the capsaicin (Fig. 5). Both the treatment with SB-366791 or α -spinasterol prevented the capsaicin-induced nociceptive behaviour in reserpine-injected mice, with I_{\max} of 81.0 ± 13.9 and 100%, respectively (Fig. 5).

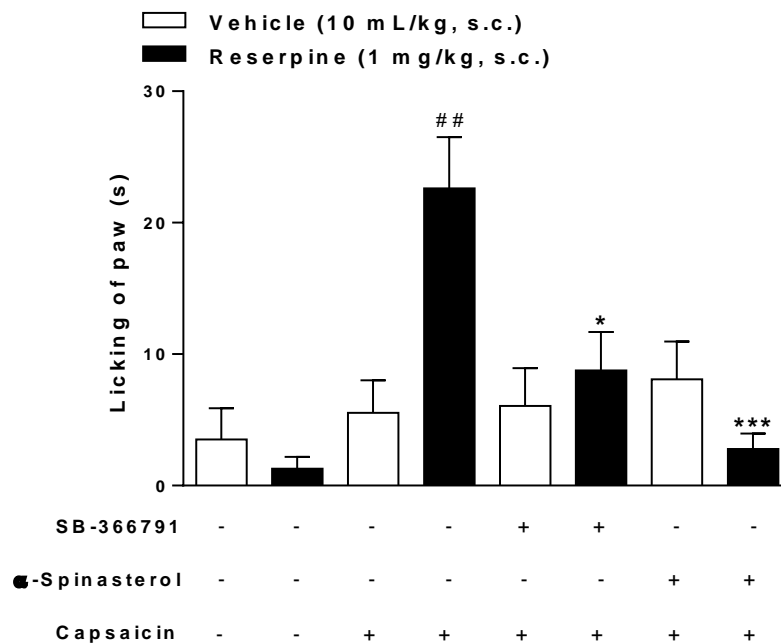


Figure 5. Overt nociception caused by an injection of a low capsaicin dose (0.05 nmol/paw, 20 μ L) under the dorsal surface of the right hind paw (intraplantar, i.pl.) after the 3 days of reserpine subcutaneous administration (1 mg/kg, s.c.). Effect of oral pre-treatment with α -spinasterol (0.3 mg/kg, p.o.) or SB-366791 (1 mg/kg, p.o.) on the capsaicin-induced overt nociceptive behaviour in reserpine-injected mice. Each point represents the mean+SEM (n=6 animals per group). ^{##}P<0.01 when compared to the subcutaneously vehicle-injected group; ^{***}P<0.001 and ^{*}P<0.05 when compared with the reserpine-injected plus oral vehicle-treated animals; one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

3.5 TRPV1-positive fibers desensitization induced by RTX

Reserpine caused mechanical allodynia ($69.3 \pm 2.8\%$ of inhibition; Fig. 6A) and thermal hyperalgesia [evaluated by the Hargreaves apparatus ($41.9 \pm 6.3\%$ of inhibition; Fig. 6B) and tail immersion ($57.7 \pm 3.6\%$ of inhibition; Fig. 6C)] when compared to the vehicle group (Fig. 6). The RTX pre-administration did not alter the mechanical or thermal threshold of vehicle group when compared to the vehicle group without RTX. On the other hand, RTX abolished the reserpine-induced mechanical allodynia ($78.4 \pm 14.7\%$ of inhibition) and thermal hyperalgesia ($76.1 \pm 13.8\%$ of inhibition to Hargreaves and $57.87 \pm 12.5\%$ of inhibition to tail immersion) development when compared with the reserpine-injected group, without RTX (Fig. 6).

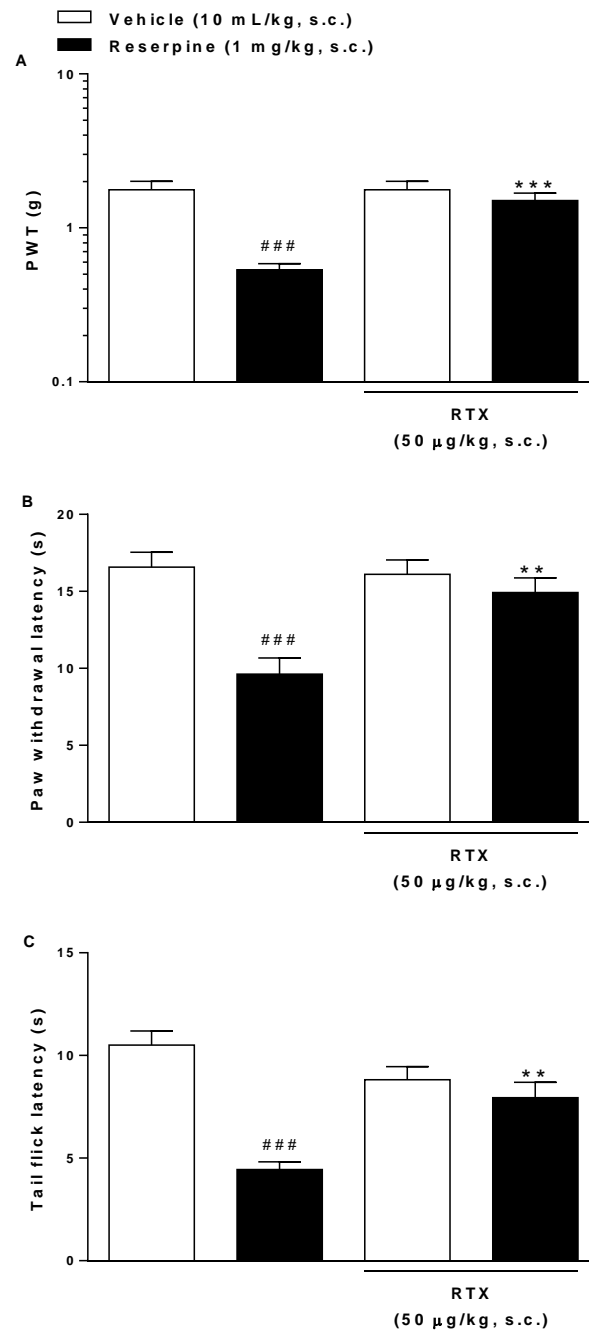


Figure 6. Effect of systemic resiniferatoxin (RTX) administration (50 µg/kg s.c.) on the mechanical allodynia (A) and thermal hyperalgesia (B-C) induced by reserpine. Data are expressed as mean+SEM (n=6). ###P<0.001 when compared to the vehicle-injected (10 ml/kg, s.c.) without RTX administration; ***P<0.001 e **P<0.01 when compared to the reserpine subcutaneous-injected group (1 mg/kg, s.c.) without RTX administration; one-way ANOVA, followed by Bonferroni *post hoc* test.

3.6 α -Spinasterol and SB-366791 reduced the immobility time in the forced swimming test

The reserpine increased the mice immobility time, in the forced swimming test. α -Spinasterol (0.3 mg/kg, p.o.) and SB-366791 (1 mg/kg, p.o.) reversed this increased immobility time induced by reserpine, when compared to the oral vehicle-treated group, with I_{\max} of $98.2 \pm 21.5\%$ and of 100%, respectively, similar to that observed for the positive control amitriptyline (10 mg/kg, p.o.) (I_{\max} of 100%) (Fig. 7A).

The repeated α -spinasterol treatment (0.3 mg/kg, p.o., *per day* for 3 days) and SB-366791 (1 mg/kg, p.o., *per day* for 3 days) also reverted this increased immobility time induced by reserpine with I_{\max} of 100% for both, similarly to the amitriptyline repeated treatment for 3 days (10 mg/kg, p.o., *per day*) (Fig. 7B).

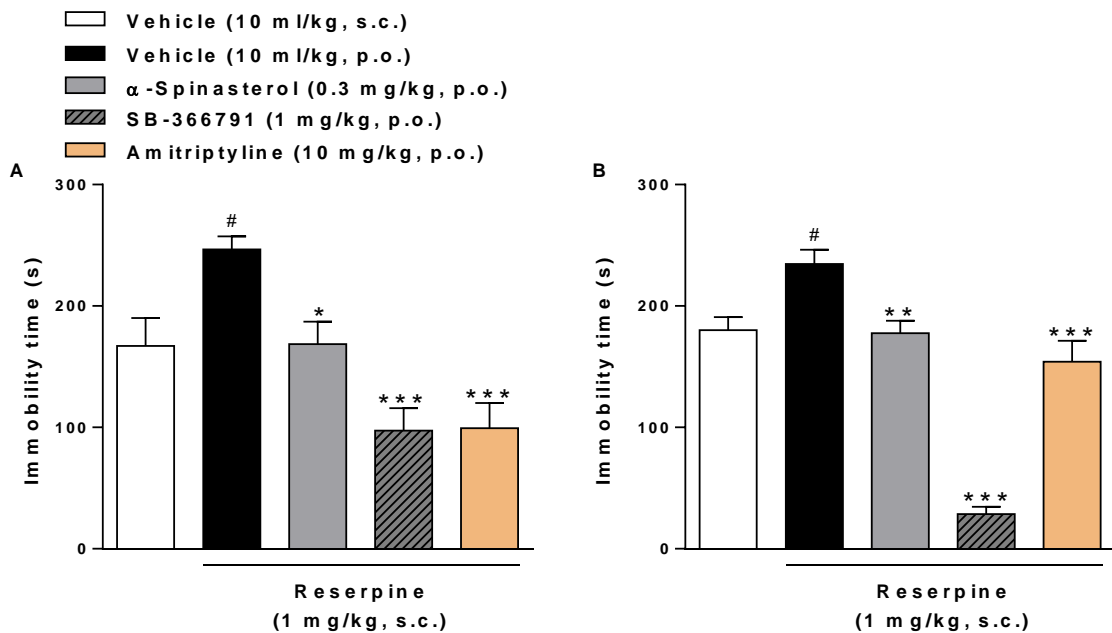


Figure 7. Effect of the single (A) and repeated (B) treatment with α -spinasterol, SB-366791 or amitriptyline in the forced swimming test. Data are expressed as the mean+SEM (n=6-7 per group). #P<0.01 when compared with the vehicle (10 ml/kg, s.c.) group (without reserpine); ***P<0.001, **P<0.01 and *P<0.05 when compared with the vehicle-treated (10 ml/kg, p.o.) plus reserpine group; one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

4 DISCUSSION

Fibromyalgia patients report a wide range of symptoms that include chronic pain in different regions of their body combined with comorbidities, like depression. Since the underlying pathophysiology of fibromyalgia remains uncertain and its mechanisms are not totally established, current pharmacological therapies are inadequate (Schmidt-Wilcke and Clauw, 2011). Therefore, it is important to research the machinery behind this disease and the search for new therapeutic agents. The present study investigated the involvement of TRPV1 channel in the reserpine-induced fibromyalgia-like symptoms model in mice, besides evaluating the effect of α -spinasterol on the pain-depression dyad, in this model.

Reserpine caused mechanical allodynia, depressive-like symptoms and monoamines depletion without promoting adverse effects. Furthermore, we verified that a low dose of the TRPV1 agonist, capsaicin, produced overt nociception only in reserpine-injected mice and the desensitization of TRPV1-positive fibers with RTX prevented the development of reserpine-induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. The selective TRPV1 antagonist, SB-366791, decreased the reserpine-induced mechanical allodynia. The same was observed to the single or repeated (for 3 days) α -spinasterol administration. Besides, SB-366791 and α -spinasterol also reduced the reserpine-induced increased immobility time. These results show that TRPV1 channel is involved in the reserpine-induced pain-depression dyad. Moreover, the antinociceptive and antidepressant-like effects of α -spinasterol are relevant findings since pain and depression are symptoms presented by patients with fibromyalgia, and it could be interesting to use a dual action compound that could treat both symptoms (Lichtenstein et al., 2017).

Our study exhibits that reserpine caused mechanical allodynia, a painful response to an usually innocuous stimulus, corroborating with other studies in which reserpine promoted allodynia in experimental animals (Brusco et al., 2019; Li et al., 2016), and corresponding with the evidence that patients with fibromyalgia are tender to palpation, a signal of allodynia (Clauw, 2015). Moreover, reserpine increased the immobility time in the forced swimming test, which is an indicator of depressive-like behaviour, corroborating with previous studies, which reserpine also increased the mean immobility time (Li et al., 2016; Liu et al., 2014; Xu et al., 2013). Most fibromyalgia patients

present moderate to severe depression, comorbid to the pain symptoms (Rehm et al., 2010). Pain and depression can influence each other, so this relationship is often assigned as a pain-depression dyad and presupposes that both conditions often coexist and share common biological pathways (Goldenberg, 2010). Patients with fibromyalgia suffer from widespread pain and have features of comorbid depression. There are similar central nervous system changes in fibromyalgia and depression, and the effective management of fibromyalgia is comparable to that of depression (Goldenberg, 2010).

Dysfunction of biogenic amines, characteristic of fibromyalgia patients, may lead to augmented pain and altered sensory processing since they are involved with the regulation of pain signal processing (Arnold, 2006). Here, we demonstrated that reserpine injections decreased the monoamine content (dopamine, serotonin, and norepinephrine) in the spinal cord and brain of mice, corroborating with previous data (Li et al., 2016). Several studies have used reserpine administration to induce the pain-depression dyad in animal models since this model presents face validity (painful and depressive alterations), construct validity (monoamines depletion), and predictive validity (efficacy of clinically used drugs as pregabalin) (Brusco et al., 2019; Li et al., 2016).

The thigmotaxis paradigm is natural animal behaviour which can be associated with a protective alternative in chronic pain models (Huang et al., 2013). In this study, the reserpine-injected animals decreased the exploration time of the central zone of the arena indicating a thigmotaxic behaviour. These findings consent with chronic pain models, whose animals also presented increased thigmotaxis (Antoniazzi et al., 2018; Huang et al., 2013). The decreased time and number of entries to the inner zone in the thigmotaxis test apparatus also indicate anxiety behaviour, a common mood disorder associated with depression (Clauw, 2015; Simon et al., 1994).

Reserpine-injected mice also presented decreased muscle strength in the grip test, suggesting that reserpine can cause muscle weakness. This result corroborates with studies showing that fibromyalgia' patients have a loss of strength and muscle fatigue (Srikuea et al., 2013). Therefore, the animal model using reserpine is a good predictor of fibromyalgia, since it can mimic the pain, depression, anxiety and fatigue symptoms, besides biochemical alterations seen on this disease (Brusco et al., 2019; Li et al., 2016). Moreover, corroborating with Brusco et al. (2019), reserpine

caused no degeneration on locomotor and physiological conditions of *Swiss* mice, since it alters neither body temperature, body weight, travelled distance, average speed, nor bar latency, which would compromise the results of nociceptive tests.

Monoamines released on the spinal cord by descending projections can decrease the pain signalling by inhibiting/downregulating pre-synaptic TRPV1 channels (Chakraborty et al., 2017, 2016), thus the monoamine depletion by reserpine might affect this TRPV1 modulation, contributing to pain state. Some reports indicate that TRPV1 activation is involved in the development of painful and depressive behaviours (Abdelhamid et al., 2014; Szallasi et al., 2007). The TRPV1 is a cation-selective ion channel expressed on primary afferent neurons, activated by low pH, noxious heat, chemical irritants, such as capsaicin (responsible for the piquancy of hot-chilli peppers) and resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analogue (Moran and Szallasi, 2018). Evidence supports the contribution of TRPV1 on different pain conditions, including inflammatory and neuropathic pain models (Brusco et al., 2017), and also chronic hyperalgesia in an acid-induced fibromyalgia model in mice (Yüksel et al., 2017).

A previous study shows that resolvins, a group of lipid mediators widely implicated in the resolution of inflammation, reduce the reserpine-induced painful and depressive symptoms in a fibromyalgia model (Klein et al., 2014). Since resolvins act as inhibitors of some TRP channels, including TRPV1 (Park et al., 2011), it is possible to infer that resolvins act, at least in part, by the regulation of TRP channels to attenuate the fibromyalgia symptoms. Thus, TRPV1 channels could be mediating the painful and depressive symptoms in the fibromyalgia-like model induced by reserpine. According to this hypothesis, we show that TRPV1 blockade by selective antagonist SB-366791 reduced the reserpine-induced mechanical allodynia and decreased the immobility time-increasing of mice in the forced swimming test. Our results corroborate with preclinical data that showed the antinociceptive and antidepressant effects of TRPV1 antagonists (Adamante et al., 2019; Manna and Umathe, 2012). Besides, several TRPV1 antagonists and the topical capsaicin TRPV1 agonist have already submitted to clinical trials to treat chronic painful conditions (Finnerup et al., 2015; Szallasi et al., 2007; Yekkirala et al., 2017).

It is known that activation of the TRPV1 by capsaicin causes spontaneous nociception (Trevisan et al., 2012), a common feature of pain in fibromyalgia patients (Rehm et al., 2010). We observed that a low dose of capsaicin, which did not cause overt nociception in vehicle-treated animals, produced overt nociception in reserpine-injected mice, indicating a hypersensitivity to this agonist, as observed in another chronic pain model in rodents (Rossato et al., 2018). This nociceptive effect was prevented by TRPV1 antagonist SB-366791 indicating the TRPV1 involvement in the spontaneous nociception.

To confirm once again the involvement of TRPV1 in the fibromyalgia-like symptoms model induced by reserpine in mice, we performed TRPV1-positive fibers desensitization using subcutaneous RTX administration. The TRPV1-positive fibers desensitization was able to abolish the mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by reserpine, corroborating with previous studies showing that the RTX pre-administration prevented the development of pain states (Trevisan et al., 2012). Our findings provide strong evidence that TRPV1 is involved in the reserpine-induced pain-depression dyad model. Thus, we verified the effect of the compound α -spinasterol, a new TRPV1 antagonist, on these same parameters.

The α -spinasterol is a phytosterol characterized as a TRPV1 antagonist, which presents good oral absorption as well as the ability to cross the blood-brain barrier and reach the spinal cord and brain of mice. Also, it has been demonstrated that α -spinasterol does not cause a transient increase in body temperature (febrile reaction) or a long-lasting compromise of noxious heat sensation leading to burning injuries, two major adverse effects of TRPV1 channel antagonists (Trevisan et al., 2012; Moran and Szallasi, 2018). In the current study, α -spinasterol presented an antinociceptive effect on reserpine-induced mechanical allodynia, similarly to TRPV1 antagonist SB-366791 and pregabalin, clinically used to treat fibromyalgia pain. This activity of pregabalin is according to its effect on pain reduction in fibromyalgia patients, but it can show low efficacy and cause adverse effects (dizziness, somnolence, and weight gain) that limit its use (Derry et al., 2016). Our results also corroborate with other studies which demonstrated that α -spinasterol presents antinociceptive effects in acute and chronic pain models in experimental animals (Brusco et al., 2017; Trevisan et al., 2012).

Similarly to SB-366791, α -spinasterol also prevented the capsaicin-induced overt nociception in reserpine-injected mice corroborating with another study which α -spinasterol had antinociceptive effect in the capsaicin-induced nociceptive model (Trevisan et al., 2012). In addition to the analgesic effect, α -spinasterol also presents antioxidant and anti-inflammatory activities (Borges et al., 2014; Coballase-Urrutia et al., 2010), which could be contributing to its analgesic action. The role of TRPV1 channels specifically in pain supports TRPV1 channels as targets for new analgesics (Patapoutian et al., 2009).

Besides the antinociceptive effect, α -spinasterol caused an antidepressant-like behaviour, whereas attenuated the reserpine-induced increase in mice immobility time in the forced swimming test, similarly to SB-366791 and amitriptyline, an antidepressant clinically used. According to the recommendation of several guidelines for the management of patients with fibromyalgia, amitriptyline is assigned inside the highest ranking recommendations for fibromyalgia therapy (Thieme et al., 2017). It is important to note that both α -spinasterol and amitriptyline similarly reduced the depressive-like behaviour induced by reserpine observed on forced swimming test. Indeed, a recent study also provides evidence for the antidepressant-like effect of α -spinasterol (Socala and Wlaz, 2016). Furthermore, it was demonstrated that TRPV1 receptors have a role in depressive behaviour, therefore, its antagonism may produce antidepressant effects (Abdelhamid et al., 2014; Manna and Umathe, 2012). Importantly, α -spinasterol did not cause known adverse effects of TRPV1 antagonists, as hyperthermia, neither the common adverse effects of analgesic drugs used in the clinic (Brusco et al., 2017); thus α -spinasterol could be a safe and effective alternative to treat pain and depression in fibromyalgia patients.

Although there are studies involving the research about the mechanisms underlying fibromyalgia, they are not totally known probably due to intricate pathophysiology, and the consequent development of treatments that benefit patients over their lifetime remains a great challenge (Schmidt-Wilcke and Clauw, 2011). Therefore, it is important to understand on a better way the pathophysiology behind this disease to find more effective and safe therapeutics. We showed that the TRPV1 channel may be involved in the pain/depression symptoms in a fibromyalgia-like model induced by reserpine. Moreover, the use of α -spinasterol, a TRPV1 antagonist, may be an effective

novel approach for treating both pain and depression symptoms in fibromyalgia patients since their antinociceptive and antidepressive effects are already known.

Financial Support: This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul-FAPERGS and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq [Grant #16/2551-0000281-9]; and by FAPERGS [Grant #17/2551-0001082-5] (Brazil); and by the CNPq [process #406098/2018-2]; and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/PROEX [#23038.005848/2018-31; #23038.004173/2019-93, Grant: #0493/2019]. SMO and GT are recipients of a fellowship from CNPq [process #307220/2017-6 and process #306576/2017-1, respectively]. SPMF is a recipient of a fellowship from CNPq [process #134613/2017-1]. IB, MFPP, CC, and EB are recipients of fellowship from CAPES/PROEX [process #88882.182148/2018-01, #88882.182170/2018-01, #88882.182152/2018-01, #88887.185973/2018-00, respectively]. We thank CNPq and CAPES for their fellowship support.

Author contributions: All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity and accuracy of the data analysis. Conceptualization: SPMF, IB, and SMO. Methodology, investigation, formal analysis and data curation: SPMF, MFPP, CC, EB, RS, RAM, GT and SMO. Writing: SPMF, IB, and SMO. Study supervision: SMO.

Conflict of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Abdelhamid, R.E., Kovács, K.J., Nunez, M.G., Larson, A.A., 2014. Depressive behavior in the forced swim test can be induced by TRPV1 receptor activity and is dependent on NMDA receptors. *Pharmacol. Res.* 79, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.10.006>
- Adamante, G., de Almeida, A.S., Rigo, F.K., da Silva Silveira, E., Coelho, Y.O., De Prá, S.D.T., Milioli, A.M., Camponogara, C., Casoti, R., Bellinaso, F., Desideri, A.V., Santos, M.F.C., Ferreira, J., Oliveira, S.M., Trevisan, G., 2019. Diosmetin as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive activity in mice. *Life Sci.* 216, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.029>
- Antoniazzi, C.T.D.D., Cunha, T.M., Bellinaso, F., Nassini, R., Ferreira, J., Rossato, M.F., De Logu, F., Rigo, F.K., Camponogara, C., Geppetti, P., Oliveira, S.M., Silva, C.R., de Almeida, A.S., Trevisan, G., Milioli, A.M., 2018. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain. *Int. J. Cancer* 144, 355–365. <https://doi.org/10.1002/ijc.31911>
- Arnold, L.M., 2006. Biology and therapy of fibromyalgia - New therapies in fibromyalgia. *Arthritis Resear* 8, 1–20. <https://doi.org/10.1186/ar1971>
- Arnold, L.M., Gebke, K.B., Choy, E.H.S., 2016. Fibromyalgia: management strategies for primary care providers. *Int. J. Clin. Pract.* 70, 99–112. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12757>
- Atwal, N., Casey, S.L., Mitchell, V.A., Vaughan, C.W., 2019. THC and gabapentin interactions in a mouse neuropathic pain model. *Neuropharmacology* 144, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.10.006>
- Aydede, M., Shriver, A., 2018. Recently introduced definition of “nociceptive pain” by the International Association for the Study of Pain needs better formulation. *Pain* 159, 1176–1177. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001184>
- Bair, M.J., Robinson, R.L., Katon, W., Kroenke, K., 2003. Depression and Pain Comorbidity. *Arch.*

- Intern. Med. 163, 2433–2445. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.20.2433>
- Borges, F.R.M., Silva, M.D., Córdova, M.M., Schambach, T.R., Pizzolatti, M.G., Santos, A.R.S., 2014. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. *J. Ethnopharmacol.* 151, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.009>
- Brum, S., Moreira, R., Regina, A., Augusti, A., Barbosa, F., Linde, M., Brandão, R., Marchesan, S., 2016. *Tabernaemontana catharinensis* ethyl acetate fraction presents antinociceptive activity without causing toxicological effects in mice. *J. Ethnopharmacol.* 191, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.036>
- Brusco, I., Camponogara, C., Carvalho, F.B., Schetinger, M.R.C., Oliveira, M.S., Trevisan, G., Ferreira, J., Oliveira, S.M., 2017. α -Spinasterol: a COX inhibitor and a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist presents an antinociceptive effect in clinically relevant models of pain in mice. *Br. J. Pharmacol.* 174, 4247–4262. <https://doi.org/10.1111/bph.13992>
- Brusco, I., Justino, A.B., Silva, C.R., Fischer, S., Cunha, T.M., Scussel, R., Machado-de-ávila, R.A., 2019. Kinins and their B1 and B2 receptors are involved in fibromyalgia-like pain symptoms in mice. *Biochem. Pharmacol.* 168, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.023>
- Chakraborty, S., Elvezio, V., Kaczocha, M., Rebecchi, M., Puopolo, M., 2017. Presynaptic inhibition of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) receptors by noradrenaline in nociceptive neurons. *J. Physiol.* 595, 2639–2660. <https://doi.org/10.1113/JP273455>
- Chakraborty, S., Rebecchi, M., Kaczocha, M., Puopolo, M., 2016. Dopamine modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) receptor in dorsal root ganglia neurons. *J. Physiol.* 594, 1627–1642. <https://doi.org/10.1113/JP271198>
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55–63.
- Chen, W.-N., Lee, C.-H., Lin, S.-H., Wong, C.-W., Sun, W.-H., Wood, J.N., Chen, C.-C., 2014. Roles

- of ASIC3, TRPV1, and Na V 1.8 in the Transition from Acute to Chronic Pain in a Mouse Model of Fibromyalgia. *Mol. Pain* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-40>
- Choy, E., Perrot, S., Leon, T., Kaplan, J., Petersel, D., Ginovker, A., Kramer, E., 2010. A patient survey of the impact of fibromyalgia and the journey to diagnosis. *BMC Health Serv. Res.* 10, 1–9.
- Clauw, D.J., 2015. Fibromyalgia and Related Conditions. *Mayo Clin. Proc.* 90, 680–692.
- Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Camacho-Carranza, R., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Medina-Campos, O.N., Mendoza-Cruz, M., Delgado-Lamas, G., Espinosa-Aguirre, J.J., 2010. Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology* 276, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.06.013>
- De Benedetto, G.E., Fico, D., Penetta, A., Malitesta, C., Nicolardi, G., Lofrumento, D.D., De Nuccio, F., La Pesa, V., 2014. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98, 266–70. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.05.039>
- Derry, S., Cording, M., Wiffen, P., Law, S., Moore, R., 2016. Pregabalin for pain in fibromyalgia in adults (Review). *Cochrane Database Syst. Rev.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011790.pub2>. www.cochranelibrary.com
- Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 441–462.
- Finnerup, N.B., Attal, N., Haroutounian, S., McNicol, E., Baron, R., Dworkin, R.H., Gilron, I., Haanpää, M., Hansson, P., Jensen, T.S., Kamerman, P.R., Lund, K., Moore, A., Raja, S.N., Rice, A.S.C., Rowbotham, M., Sena, E., Siddall, P., Smith, B.H., Wallace, M., 2015. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet. Neurol.* 14, 162–73. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70251-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70251-0)

- Fischer, S.P.M., Brusco, I., Camponogara, C., Piana, M., Faccin, H., Gobo, L.A., Carvalho, L.M., Oliveira, S.M., 2018. *Arctium minus* crude extract presents antinociceptive effect in a mice acute gout attack model. *Inflammopharmacology* 26, 505–519. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0384-6>
- Fleming, K.C., Volcheck, M.M., 2015. Central Sensitization Syndrome and the Initial Evaluation of a Patient with Fibromyalgia: A Review. *Clin. Psychol. Med.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10204>
- Goldenberg, D.L., 2010. Pain/depression dyad: A key to a better understanding and treatment of functional somatic syndromes. *Am. J. Med.* 123, 675–682. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.01.014>
- Huang, W., Calvo, M., Karu, K., Olausen, H.R., Bathgate, G., Okuse, K., Bennett, D.L.H., Rice, A.S.C., 2013. A clinically relevant rodent model of the HIV antiretroviral drug stavudine induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 154, 560–575. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.12.023>
- Jones, G.T., Atzeni, F., Beasley, M., Flüß, E., Sarzi-Puttini, P., Macfarlane, G.J., 2015. The Prevalence of Fibromyalgia in the General Population A Comparison of the American College of Rheumatology 1990, 2010, and Modified 2010 Classification Criteria. *Arthritis Rheumatol.* 67, 568–575. <https://doi.org/10.1002/art.38905>
- Klein, C.P., Sperotto, N.D.M., Maciel, I.S., Leite, C.E., Souza, A.H., Campos, M.M., 2014. Effects of D-series resolvins on behavioral and neurochemical changes in a fibromyalgia-like model in mice. *Neuropharmacology* 86, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.043>
- Li, S., Han, J., Wang, D., Feng, B., Deng, Y., Wang, X., Yang, Q., Zhao, M., 2016. Echinocystic acid reduces reserpine-induced pain/depression dyad in mice. *Metab. Brain Dis.* 31, 455–463. <https://doi.org/10.1007/s11011-015-9786-6>
- Lichtenstein, A., Tiosano, S., Amital, H., 2017. The complexities of fibromyalgia and its comorbidities. *Curr. Opin. Rheumatol.* 29. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000464>

- Lin, J.G., Hsieh, C.L., Lin, Y.W., 2015. Analgesic effect of electroacupuncture in a mouse fibromyalgia model: Roles of TRPV1, TRPV4, and pERK. *PLoS One* 10, 1–16.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128037>
- Liu, S., Zhao, R., Li, X., Guo, H., Tian, Z., Zhang, N., Gao, G., Zhao, M., 2014. Attenuation of Reserpine-Induced Pain/Depression Dyad by Gentiopicroside Through Downregulation of GluN2B Receptors in the Amygdala of Mice. *Neuromolecular Med.* 16, 350–359.
<https://doi.org/10.1007/s12017-013-8280-8>
- Manna, S.S.S., Umathe, S.N., 2012. A possible participation of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the antidepressant effect of fluoxetine. *Eur. J. Pharmacol.* 685, 81–90.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.04.023>
- McGrath, J.C., Lilley, E., 2015. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): New requirements for publication in *BJP*. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3189–3193.
<https://doi.org/10.1111/bph.12955>
- Moran, M.M., Szallasi, A., 2018. Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. *Br. J. Pharmacol.* 175, 2185–2203.
<https://doi.org/10.1111/bph.14044>
- Park, C.-K., Xu, Z.-Z., Liu, T., LU, N., Serhan, C.N., Ji, R.-R., 2011. Resolvin D2 Is a Potent Endogenous Inhibitor for Transient Receptor Potential Subtype V1/A1, Inflammatory Pain, and Spinal Cord Synaptic Plasticity in Mice: Distinct Roles of Resolvin D1, D2, and E1. *J. Neurosci.* 31, 18433–18438. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4192-11.2011>
- Patapoutian, A., Tate, S., Woolf, C.J., 2009. Transient receptor potential channels: Targeting pain at the source. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 55–68. <https://doi.org/10.1038/nrd2757>
- Pirog, K.A., Jaka, O., Katakura, Y., Meadows, R.S., Kadler, K.E., Boot-handford, R.P., Briggs, M.D., 2010. A mouse model offers novel insights into the myopathy and tendinopathy often associated with pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Hum. Mol. Genet.* 19, 52–64.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp466>

- Rehm, S.E., Koroschetz, J., Gockel, U., Brosz, M., Freynhagen, R., Tolle, T.R., Baron, R., 2010. A cross-sectional survey of 3035 patients with fibromyalgia: subgroups of patients with typical comorbidities and sensory symptom profiles. *Rheumatology* 1146–1152.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq066>
- Rossato, M.F., Rigo, F.K., Oliveira, S.M., Guerra, G.P., Silva, C.R., Cunha, T.M., Gomez, M.V., Ferreira, J., Trevisan, G., 2018. Participation of transient receptor potential vanilloid 1 in paclitaxel-induced acute visceral and peripheral nociception in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 828, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.03.033>
- Russell, J., Vaeroy, H., Javors, M., Nyberg, F., 1992. CEREBROSPINAL FLUID BIOGENIC AMINE METABOLITES IN FIBROMYALGIA/FIBROSITIS SYNDROME AND RHEUMATOID ARTHRITIS. *Arthritis Rheum.* 35, 550–556.
- Schmidt-Wilcke, T., Clauw, D.J., 2011. Fibromyalgia: from pathophysiology to therapy. *Nat. Publ. Gr.* 7, 518–527. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.98>
- Simon, P., Dupuis, R., Costentin, J., 1994. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav. Brain Research* 61, 59–64.
- Socala, K., Wlaz, P., 2016. Evaluation of the antidepressant- and anxiolytic-like activity of α -spinasterol, a plant derivative with TRPV1 antagonism effects, in mice. *Behav. Brain Res.* 303, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.048>
- Srikuea, R., Symons, T.B., Long, D.E., Lee, J.D., Shang, Y., Chomentowski, P.J., Yu, G., Crofford, L.J., Peterson, C.A., 2013. Fibromyalgia is Associated With Altered Skeletal Muscle Characteristics Which May Contribute to Post-Exertional Fatigue in Post-Menopausal Women. *Arthritis Rheum.* 65, 519–528. <https://doi.org/10.1002/art.37763>.Fibromyalgia
- Surah, A., Baranidharan, G., Morley, S., 2014. Chronic pain and depression. *Contin. Educ. Anaesthesia, Crit. Care Pain* 14, 85–89. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkt046>
- Szallasi, A., Cortright, D.N., Blum, C.A., Eid, S.R., 2007. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years

from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 357–373.

<https://doi.org/10.1038/nrd2280>

Taguchi, T., Katanosaka, K., Yasui, M., Hayashi, K., Yamashita, M., Wakatsuki, K., Kiyama, H., Yamanaka, A., Mizumura, K., 2015. Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. *Pain* 156, 415–427.

Thieme, K., Mathys, M., Turk, D.C., 2017. Evidence-Based Guidelines on the Treatment of Fibromyalgia Patients - Are They Consistent and If Not, Why Not? Have effective psychological treatments been overlooked? *J. Pain.* <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2016.12.006>

Treede, R.-D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M.I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N.B., First, M.B., Giamberardino, M.A., Kaasa, S., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perron, S., Scholz, J., Schug, S., Smith, B.H., Svensson, P., Vlaeyen, J.W.S., Wang, S., 2015. A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain* 156, 1003–1007.

Trevisan, G., Rossato, M.F., Walker, C.I.B., Klafke, J.Z., Rosa, F., Oliveira, S.M., Tonello, R., Guerra, G.P., Boligon, A.A., Zanon, R.B., Athayde, M.L., Ferreira, J., 2012. Identification of the Plant Steroid α -Spinasterol as a Novel Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Antagonist with Antinociceptive Properties. *J. pf Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 258–269.

Xu, Y., Zhang, L., Shao, T., Ruan, L., Wang, L., Sun, J., Li, J., Zhu, X., 2013. Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates depression-like behaviors in reserpine-treated mice : behavioral and neurobiological analyses. *Metab. Brain Dis.* 4, 571–583. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9404-4>

Yekkirala, A.S., Roberson, D.P., Bean, B.P., Woolf, C.J., 2017. Breaking barriers to novel analgesic drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 545–564. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.87>

Yüksel, E., Nazıroğlu, M., Şahin, M., Çiğ, B., 2017. Involvement of TRPM2 and TRPV1 channels on hyperalgesia, apoptosis and oxidative stress in rat fibromyalgia model: Protective role of selenium. *Sci. Rep.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17715-1>

5 CONCLUSÃO

Neste estudo mostramos o envolvimento do canal TRPV1 nos sintomas de dor e depressão em um modelo que mimetiza a fibromialgia em camundongos. Além disso, demonstramos que o α -spinasterol, um antagonista do TRPV1, pode ser uma abordagem nova e eficaz para o tratamento de sintomas de dor e depressão em pacientes com fibromialgia, uma vez que ele apresenta importantes efeitos antinociceptivos e antidepressivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAMID, R. E. et al. Depressive behavior in the forced swim test can be induced by TRPV1 receptor activity and is dependent on NMDA receptors. **Pharmacological Research**, v. 79, p. 21–27, 2014.
- ADAMANTE, G. et al. Diosmetin as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive activity in mice. **Life Sciences**, v. 216, p. 215–226, 2019.
- ANTONIAZZI, C. T. D. D. et al. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 2, p. 355–365, 2018.
- APKARIAN, A. V. et al. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **European Journal of Pain**, v. 9, n. 4, p. 463–484, 2005.
- ARNOLD, L. M. et al. A double-blind, multicenter trial comparing duloxetine with placebo in the treatment of fibromyalgia patients with or without major depressive disorder. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 9, p. 2974–2984, 2004.
- ARNOLD, L. M. Biology and therapy of fibromyalgia - New therapies in fibromyalgia. **Arthritis Resear**, v. 8, n. 212, p. 1–20, 2006.
- ARNOLD, L. M. Duloxetine and Other Antidepressants in the Treatment of Patients with Fibromyalgia. **Pain Medicine**, v. 8, n. S2, p. S63–S74, 2007.
- ARNOLD, L. M.; GEBKE, K. B.; CHOY, E. H. S. Fibromyalgia: management strategies for primary care providers. **The International Journal of Clinical Practice**, v. 70, n. 2, p. 99–112, 2016.
- ATWAL, N. et al. THC and gabapentin interactions in a mouse neuropathic pain model. **Neuropharmacology**, v. 144, p. 115–121, 2019.
- AYDEDE, M.; SHRIVER, A. Recently introduced definition of “nociplastic pain” by the International Association for the Study of Pain needs better formulation. **Pain**, v. 159, n. 6, p. 1176–1177, 2018.
- BAIR, M. J. et al. Depression and Pain Comorbidity. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, n. 20, p. 2433–2445, 2003.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. ENDOGENOUS PAIN CONTROL SYSTEMS: Brainstem Spinal Pathways and Endorphin Circuitry. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 7, p. 309–338, 1984.
- BENARROCH, E. E. Descending monoaminergic pain modulation: Bidirectional control and

clinical relevance. **Neurology**, v. 71, n. 3, p. 217–221, 2008.

BINGHAM, B. et al. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 5, n. 1, p. 28–37, 2009.

BLACKBURN-MUNRO, G. Pain-like behaviours in animals - How human are they? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 6, p. 299–305, 2004.

BOADAS-VAELLO, P. et al. Neuroplasticity of ascending and descending pathways after somatosensory system injury: Reviewing knowledge to identify neuropathic pain therapeutic targets. **Spinal Cord**, v. 54, n. 5, p. 330–340, 2016.

BOLLER, S. et al. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 262–266, 2010.

BORCHERS, A. T.; GERSHWIN, M. E. Fibromyalgia: A Critical and Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 49, n. 2, p. 100–151, 2015.

BORGES, F. R. M. et al. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 144–150, 2014.

BOURINET, E. et al. Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 1, p. 81–140, 2014.

BRUM, S. et al. *Tabernaemontana catharinensis* ethyl acetate fraction presents antinociceptive activity without causing toxicological effects in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 115–124, 2016.

BRUSCO, I. et al. α -Spinasterol: a COX inhibitor and a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist presents an antinociceptive effect in clinically relevant models of pain in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 23, p. 4247–4262, 2017.

BRUSCO, I. et al. Kinins and their B1 and B2 receptors are involved in fibromyalgia-like pain symptoms in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 168, p. 119–132, 2019.

CALIXTO, J. B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 6, p. 401–418, 2000.

CALIXTO, J. B. et al. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part II. Modulation of Pro-Inflammatory Cytokines, Chemokines and Adhesion Molecules. **Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research**, v. 70, n. 2, p. 93–103, 2004.

CASANUEVA, B. et al. Short-term efficacy of topical capsaicin therapy in severely affected fibromyalgia patients. **Rheumatology International**, v. 33, n. 10, p. 2665–2670, 2013.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. October, p. 816–824, 1997.

- CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 487–517, 2001.
- CHAKRABORTY, S. et al. Dopamine modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) receptor in dorsal root ganglia neurons. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 6, p. 1627–1642, 2016.
- CHAKRABORTY, S. et al. Presynaptic inhibition of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) receptors by noradrenaline in nociceptive neurons. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 8, p. 2639–2660, 2017.
- CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1994.
- CHEN, W.-N. et al. Roles of ASIC3, TRPV1, and Na V 1.8 in the Transition from Acute to Chronic Pain in a Mouse Model of Fibromyalgia. **Molecular Pain**, v. 10, p. 1–15, 2014.
- CHOI, S. I. et al. Emerging Role of Spinal Cord TRPV1 in Pain Exacerbation. **Neural Plasticity**, p. 1–10, 2016.
- CHOY, E. et al. A patient survey of the impact of fibromyalgia and the journey to diagnosis. **BMC Health Services Research**, v. 10, p. 1–9, 2010.
- CHOY, E. H. S. The role of sleep in pain and fibromyalgia. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 9, p. 513–520, 2015.
- CLAUW, D. J. Fibromyalgia A Clinical Review. **JAMA**, v. 311, n. 15, p. 1547–1555, 2014.
- CLAUW, D. J. Fibromyalgia and Related Conditions. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 5, p. 680–692, 2015.
- COBALLASE-URRUTIA, E. et al. Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. **Toxicology**, v. 276, n. 1, p. 41–48, 2010.
- COLLOCA, L. et al. Neuropathic Pain. **Nature Reviews Disease Primerse**, v. 3, p. 1–19, 2017.
- CORDING, M. et al. Milnacipran for pain in fibromyalgia in adults. **The Cochrane Collaboration**, n. 10, 2015.
- COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. **Annu Rev of Neurosci.**, v. 32, p. 1–32, 2009.
- CROFFORD, L. J. et al. Pregabalin for the treatment of Fibromyalgia syndrome: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 4, p. 1264–1273, 2005.
- CROFFORD, L. J.; APPLETON, B. E. Complementary and Alternative Therapies for Fibromyalgia. **Current Rheumatology Reports**, v. 3, n. 2, p. 147–156, 2001.

CZIFRA, G. et al. Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 135, p. 507–514, 2009.

D’MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.

DE BENEDETTO, G. E. et al. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 98, n. September, p. 266–70, 2014.

DEMIRDAS, A.; NAZIROGLU, M.; ÖVEY, İ. S. Duloxetine Reduces Oxidative Stress, Apoptosis, and Ca²⁺ Entry Through Modulation of TRPM2 and TRPV1 Channels in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 54, p. 4683–4695, 2017.

DERRY, S. et al. Pregabalin for pain in fibromyalgia in adults (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, 2016.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v. 20, p. 441–462, 1980.

DOGRUL, A.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. **Brain Research**, v. 1280, p. 52–59, 2009.

DOPPLER, K. et al. Reduced dermal nerve fiber diameter in skin biopsies of patients with fibromyalgia. **Pain**, v. 156, n. 11, p. 2319–2325, 2015.

FERNHOLZ, E.; MOORE, M. L. The Isolation of α -Spinasterol from Alfalfa. **Journal of the American Chemical Society**, v. 61, n. 9, p. 2467–2468, 1939.

FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 565–575, 2004.

FINNERUP, N. B. et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet. Neurology**, v. 14, n. 2, p. 162–73, 2015.

FISCHER, S. P. M. et al. Arctium minus crude extract presents antinociceptive effect in a mice acute gout attack model. **Inflammopharmacology**, v. 26, p. 505–519, 2018.

FLEMING, K. C.; VOLCHECK, M. M. Central Sensitization Syndrome and the Initial Evaluation of a Patient with Fibromyalgia: A Review. **Clinical Psychology in Medicine**, v. 6, n. 2, p. 1–12, 2015.

FRANÇOIS, A. et al. A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. **Neuron**, v. 93, n. 4, p. 822–839.e6, 2017.

FRUHWIRTH, G. O.; HERMETTER, A. Production technology and characteristics of

Styrian pumpkin seed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 7, p. 637–644, 2008.

GASSNER, M.; RUSCHEWEYH, R.; SANDKÜHLER, J. Direct excitation of spinal GABAergic interneurons by noradrenaline. **Pain**, v. 145, n. 1–2, p. 204–210, 2009.

GOLDENBERG, D. L. Pain/depression dyad: A key to a better understanding and treatment of functional somatic syndromes. **American Journal of Medicine**, v. 123, n. 8, p. 675–682, 2010.

GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217–231, 2014.

HARRIS, R. E. et al. Decreased Central μ -Opioid Receptor Availability in Fibromyalgia. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 37, p. 10000–10006, 2007.

HARRIS, R. E. Elevated excitatory neurotransmitter levels in the fibromyalgia brain. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, p. 141, 2010.

HAUSER, W. et al. Fibromyalgia. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. August, p. 1–16, 2015.

HEINRICHER, M. M. et al. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 214–225, 2009.

HEINRICHER, M. M.; FIELDS, H. L. Central Nervous System Mechanisms of Pain Modulation. In: **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. [s.l: s.n.]. v. 6th ed.p. 129–142.

HEINRICHER, M. M.; INGRAM, S. L. The Brainstem and Nociceptive Modulation. In: **In Bushnell MC, Basbaum AI, editors: The senses, a comprehensive reference**. [s.l: s.n.]. p. 593–626.

HUANG, W. et al. A clinically relevant rodent model of the HIV antiretroviral drug stavudine induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, v. 154, n. 4, p. 560–575, 2013.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. February, p. 83–91, 2001.

IASP, C. M. OF THE T. Classification of Chronic Pain Part III: Pain Terms. In: **Classification of Chronic Pain**. [s.l: s.n.]. p. 1–9.

JANCZO, G.; KIRALY, E.; JANCZO-GARBOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature**, v. 270, p. 741–743, 1977.

JII, R.-R. et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, v. 36, n. 1, p. 57–68, 2002.

JONES, G. T. et al. The Prevalence of Fibromyalgia in the General Population A Comparison of the American College of Rheumatology 1990, 2010, and Modified 2010 Classification Criteria. **Arthritis & Rheumatology**, v. 67, n. 2, p. 568–575, 2015.

- JULIEN, N. et al. Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. **Pain**, v. 114, n. 1–2, p. 295–302, 2005.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.
- KLEIN, C. P. et al. Effects of D-series resolvins on behavioral and neurochemical changes in a fibromyalgia-like model in mice. **Neuropharmacology**, v. 86, p. 57–66, 2014.
- KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010.
- KWIAT, G. C.; BASBAUM, A. I. The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. **Somatosensory & Motor Research**, v. 9, n. 2, p. 157–173, 1992.
- LARSON, A. A. et al. Changes in the concentrations of amino acids in the cerebrospinal fluid that correlate with pain in patients with fibromyalgia: implications for nitric oxide pathways. **Pain**, v. 87, p. 201–211, 2000.
- LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 9, p. 895–926, 2009.
- LAU, B. K.; VAUGHAN, C. W. Descending modulation of pain: The GABA disinhibition hypothesis of analgesia. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 29, p. 159–164, 2014.
- LAUCHE, R. et al. Patient-related predictors of treatment satisfaction of patients with fibromyalgia syndrome: results of a cross-sectional survey Patient-related predictors of treatment satisfaction of patients with fibromyalgia syndrome : results of a cross-sectional survey. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 31, n. January 2014, p. 34–40, 2013.
- LI, S. et al. Echinocystic acid reduces reserpine-induced pain/depression dyad in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 31, p. 455–463, 2016.
- LICHTENSTEIN, A.; TIOSANO, S.; AMITAL, H. The complexities of fibromyalgia and its comorbidities. **Current Opinion of Rheumatology**, v. 29, 2017.
- LIN, J. G.; HSIEH, C. L.; LIN, Y. W. Analgesic effect of electroacupuncture in a mouse fibromyalgia model: Roles of TRPV1, TRPV4, and pERK. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015.
- LITTLEJOHN, G. Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome. **Nature Reviews Rheumatology**, p. 1–10, 2015.
- LIU, S. et al. Attenuation of Reserpine-Induced Pain/Depression Dyad by Gentiopicroside Through Downregulation of GluN2B Receptors in the Amygdala of Mice. **Neuromolecular Medicine**, v. 16, p. 350–359, 2014.

- LOESER, J. D.; TREEDE, R.-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008.
- LUKACZER, D. et al. A pilot trial evaluating Meta050, a proprietary combination of reduced iso-alpha acids, rosemary extract and oleanolic acid in patients with arthritis and fibromyalgia. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 10, p. 864–870, 2005.
- MACFARLANE, G. J. et al. EULAR revised recommendations for the management of fibromyalgia. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 2, p. 318–328, 2017.
- MANNA, S. S. S.; UMATHE, S. N. A possible participation of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the antidepressant effect of fluoxetine. **European Journal of Pharmacology**, v. 685, n. 1–3, p. 81–90, 2012.
- MARTYN, J. A. J.; MAO, J.; BITTNER, E. A. Opioid Tolerance in Critical Illness. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 4, p. 365–378, 2019.
- MCCARTY, D. J. et al. Treatment of pain due to fibromyalgia with topical capsaicin: A pilot study. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 23, n. 6, p. 41–47, 1994.
- MCGRATH, J. C.; LILLEY, E. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): New requirements for publication in BJP. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 13, p. 3189–3193, 2015.
- MICHAUD, K.; BOMBARDIER, C.; EMERY, P. Quality of Life in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, p. S35–S45, 2007.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. February, p. 355–474, 2002.
- MORAN, M. M.; SZALLASI, A. Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 12, p. 2185–2203, 2018.
- 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, n. 1–2, p. 26–33, 2009.
- NASCIMENTO, S. D. S. et al. Efficacy and Safety of Medicinal Plants or Related Natural Products for Fibromyalgia: A Systematic Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, n. 2008, 2013.
- NAVRATILOVA, E.; PORRECA, F. Reward and motivation in pain and pain relief. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 1304–1312, 2014.
- NICHOLAS, M. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic primary pain. **Pain**, v. 160, p. 28–37, 2019.
- NILIUS, B.; APPENDINO, G. Spices: The Savory and Beneficial Science of Pungency. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 167, 2013.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 2010.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 8, n. 2, p. 143–151, 2014.

PAGANO, E. et al. Phytotherapy of benign prostatic hyperplasia. A minireview. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 7, p. 949–955, 2014.

PARK, C.-K. et al. Resolvin D2 Is a Potent Endogenous Inhibitor for Transient Receptor Potential Subtype V1/A1, Inflammatory Pain, and Spinal Cord Synaptic Plasticity in Mice: Distinct Roles of Resolvin D1, D2, and E1. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 50, p. 18433–18438, 2011.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: Targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 55–68, 2009.

PIROG, K. A. et al. A mouse model offers novel insights into the myopathy and tendinopathy often associated with pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 1, p. 52–64, 2010.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 319–325, 2002.

POTVIN, S.; MARCHAND, S. Pain facilitation and pain inhibition during conditioned pain modulation in fibromyalgia. **Pain**, v. 157, p. 1704–1710, 2016.

PREMKUMAR, L. S.; SIKAND, P. TRPV1: A Target for Next Generation Analgesics. **Current Neuropharmacology**, v. 6, p. 151–163, 2008.

REHM, S. E. et al. A cross-sectional survey of 3035 patients with fibromyalgia: subgroups of patients with typical comorbidities and sensory symptom profiles. **Rheumatology**, n. March, p. 1146–1152, 2010.

RINGKAMP, M. et al. Peripheral Mechanisms of Cutaneous Nociception. In: **Wall and Textbook of Pain**. 6th ed ed. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone: [s.n.]. p. 1–2.

ROEDER, Z. et al. The parabrachial complex links pain transmission to descending pain modulation. **Pain**, v. 157, n. 12, p. 2697–2708, 2016.

ROSSATO, M. F. et al. Participation of transient receptor potential vanilloid 1 in paclitaxel-induced acute visceral and peripheral nociception in rodents. **European Journal of Pharmacology**, v. 828, n. December 2017, p. 42–51, 2018.

RUSSELL, J. et al. CEREBROSPINAL FLUID BIOGENIC AMINE METABOLITES IN FIBROMYALGIA/FIBROSITIS SYNDROME AND RHEUMATOID ARTHRITIS. **Arthritis and Rheumatism**, v. 35, n. 5, p. 550–556, 1992.

- RUSSELL, J. et al. ELEVATED CEREBROSPINAL FLUID LEVELS OF SUBSTANCE P IN PATIENTS WITH THE FIBROMYALGIA SYNDROME. **Arthritis & Rheumatism**, v. 37, n. 11, p. 1593–1601, 1994.
- RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v. 49, n. 3, p. 123–133, 1998.
- RUTLEDGE, D. N.; JONES, C. J. Effects of Topical Essential Oil on Exercise Volume After a 12-Week Exercise Program for Women with Fibromyalgia: A Pilot Study. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1099–1106, 2007.
- SAMINENI, V. K. et al. Divergent Modulation of Nociception by Glutamatergic and GABAergic Neuronal Subpopulations in the Periaqueductal Gray. **eNeuro**, v. 4, n. 2, p. 1–27, 2017.
- SANDKÜHLER, J. Spinal Cord Plasticity and Pain. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**, v. 6th ed., n. Chapter 6, p. 94–110, 2013.
- SCHMIDT-WILCKE, T.; CLAUW, D. J. Fibromyalgia: from pathophysiology to therapy. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. 9, p. 518–527, 2011.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, n. Supp, p. 1062–1067, 2002.
- SIMON, P.; DUPUIS, R.; COSTENTIN, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. **Behavioural Brain Research**, v. 61, p. 59–64, 1994.
- SKRABEK, R. Q. et al. Nabilone for the Treatment of Pain in Fibromyalgia. **Journal of Pain**, v. 9, n. 2, p. 164–173, 2008.
- SMITH, H. S.; BRACKEN, D.; SMITH, J. M. Pharmacotherapy for fibromyalgia. **Frontier in Pharmacology**, v. 2, n. 17, p. 1–14, 2011.
- SOCALA, K. et al. α -Spinasterol, a TRPV1 receptor antagonist, elevates the seizure threshold in three acute seizure tests in mice. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, p. 1239–1247, 2015.
- SOCALA, K.; WLAZ, P. Evaluation of the antidepressant- and anxiolytic-like activity of α -spinasterol, a plant derivative with TRPV1 antagonism effects, in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 303, p. 19–25, 2016.
- SORIANO-MALDONADO, A. et al. Association of different levels of depressive symptoms with symptomatology, overall disease severity, and quality of life in women with fibromyalgia. **Quality of Life Research**, v. 24, n. 12, p. 2951–2957, 2015.
- SRIKUEA, R. et al. Fibromyalgia is Associated With Altered Skeletal Muscle Characteristics Which May Contribute to Post-Exertional Fatigue in Post-Menopausal Women. **Arthritis & Rheumatism**, v. 65, n. 2, p. 519–528, 2013.

- 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.
- STAUD, R. et al. Brain activity associated with slow temporal summation of C-fiber evoked pain in fibromyalgia patients and healthy controls. **European Journal of Pain**, v. 12, n. 8, p. 1078–1089, 2008.
- STAUD, R. The important role of CNS facilitation and inhibition for chronic pain. **International Journal of Clinical Rheumatology**, v. 8, n. 6, p. 639–646, 2013.
- STAUD, R.; RODRIGUEZ, M. E. Mechanisms of disease: Pain in fibromyalgia syndrome. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 2, n. 2, p. 90–98, 2006.
- STEIN, C. Opioid Receptors. **Annual Review of Medicine**, v. 67, p. 433–451, 2016.
- STRAUBE, S. et al. Interference with work in fibromyalgia - effect of treatment with pregabalin and relation to pain response. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 12, n. 1, p. 125, 2011.
- SURAH, A.; BARANIDHARAN, G.; MORLEY, S. Chronic pain and depression. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain**, v. 14, n. 2, p. 85–89, 2014.
- SZALLASI, A. The vanilloid (capsaicin) receptor: Receptor types and species differences. **General Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 223–243, 1994.
- SZALLASI, A. et al. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. May, p. 357–373, 2007.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacological reviews**, v. 51, n. 2, p. 159–212, 1999.
- TAGUCHI, T. et al. Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. **Pain**, v. 156, n. 3, p. 415–427, 2015.
- THIEME, K.; MATHYS, M.; TURK, D. C. Evidence-Based Guidelines on the Treatment of Fibromyalgia Patients - Are They Consistent and If Not, Why Not? Have effective psychological treatments been overlooked? **Journal of Pain**, 2017.
- TODD, A. J.; KOERBER, H. R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. [s.l: s.n.]. p. 77–93.
- TOMINAGA, M.; TOMINAGA, T. Structure and function of TRPV1. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 451, n. 1, p. 143–150, 2005.
- TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 377–391, 2007.
- TREEDE, R.-D. et al. A classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, v. 156, n. 6, p. 1003–1007, 2015.

TREEDE, R.-D. et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). **Pain**, v. 160, n. 1, 2018.

TREVISAN, G. et al. Identification of the Plant Steroid α -Spinasterol as a Novel Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Antagonist with Antinociceptive Properties. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, n. 2, p. 258–269, 2012.

TSAKNIS, J.; LALAS, S.; LAZOS, E. S. Characterization of crude and purified pumpkin seed oil. **Grasas y Aceites**, v. 48, n. 5, p. 267–272, 1997.

UÇAR, M. et al. Health anxiety and depression in patients with fibromyalgia syndrome. **Journal of International Medical Research**, v. 43, n. 5, p. 679–685, 2015.

ÜÇEYLER, N. et al. Anticonvulsants for fibromyalgia. **The Cochrane Collaboration**, n. 10, p. 1–94, 2013.

VESELINOVIC, T. et al. Effects of antipsychotic treatment on psychopathology and motor symptoms . A placebo-controlled study in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v. 218, p. 733–748, 2011.

WARE, M. A. et al. The Effects of Nabilone Sleep in Fibromyalgia: Results of a Randomized Controlled Trial. **Anesthesia and Analgesia**, v. 110, n. 2, p. 604–610, 2010.

WEST, S. J. et al. Circuitry and plasticity of the dorsal horn - Toward a better understanding of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 300, p. 254–275, 2015.

WOLFE, F. et al. THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY 1990 CRITERIA FOR THE CLASSIFICATION OF FIBROMYALGIA Report of the Multicenter Criteria Committee. **Arthritis and Rheumatism**, v. 33, n. 2, p. 160–172, 1990.

WOLFE, F. et al. Fibromyalgia Criteria and Severity Scales for Clinical and Epidemiological Studies: A Modification of the ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. **The Journal of Rheumatology**, v. 38, n. 6, p. 1113–1122, 2011.

WOOD, P. B.; HOLMAN, A. J.; JONES, K. D. Novel pharmacotherapy for fibromyalgia. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 16, n. 6, p. 829–841, 2007.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain ? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 10–12, 2010.

WOOLF, C. J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, p. 1–31, 2011.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5472, p. 1765–1769, 2000.

XU, Y. et al. Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates depression-like behaviors in reserpine-treated mice : behavioral and neurobiological analyses. **Metabolic Brain**

Disease, v. 4, p. 571–583, 2013.

YAFFE, D.; FORREST, L. R.; SCHULDINER, S. The ins and outs of vesicular monoamine transporters. **The Journal of General Physiology**, v. 150, n. 5, p. 671–682, 2018.

YEKKIRALA, A. S. et al. Breaking barriers to novel analgesic drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 8, p. 545–564, 2017.

YÜKSEL, E. et al. Involvement of TRPM2 and TRPV1 channels on hyperalgesia, apoptosis and oxidative stress in rat fibromyalgia model: Protective role of selenium. **Scientific Reports**, v. 7, n. August, p. 1–12, 2017.

ANEXO I



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO alfa-ESPINASTEROL EM UM MODELO DE FIBROMIALGIA", protocolada sob o CEUA nº 7614210318, sob a responsabilidade de **Sara Marchesan de Oliveira e equipe; Susana Paula Moreira Fischer; Gabriela Becker; Indiara Brusco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 10/05/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF alfa-SPINASTEROL EFFECT ON A FIBROMYALGIA MODEL", utilizing 186 Heterogenics mice (186 males), protocol number CEUA 7614210318, under the responsibility of **Sara Marchesan de Oliveira and team; Susana Paula Moreira Fischer; Gabriela Becker; Indiara Brusco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 05/10/2018.

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

Vigência da Proposta: de **05/2018 a 07/2019**

Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **4 a 4 semanas**

N: **186**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Resumo: A fibromialgia (FM) é uma doença caracterizada por dor primária crônica generalizada, onde os pacientes relatam sintomas dolorosos em numerosas áreas do corpo, além de apresentarem sintomas co-mórbidos, incluindo depressão. Esses sintomas causam grande impacto na qualidade de vida dos pacientes e o tratamento para essa doença tem eficácia limitada e apresenta efeitos adversos, sendo necessária a busca por terapias alternativas. O -espinasterol é um composto isolado de produtos naturais e possui diversas atividades biológicas, incluindo efeito antinociceptivo em modelos de dor crônica e inflamatória e efeito antidepressivo. Em vista disso, neste estudo pretende-se investigar os efeitos antinociceptivo e antidepressivo do -espinasterol em um modelo de fibromialgia. Para isso, camundongos adultos machos receberão por via subcutânea (s.c.) uma injeção de reserpina (1 mg/kg, s.c.) uma vez por dia durante três dias consecutivos com objetivo de induzir um modelo de dor similar àquela que ocorre em pacientes com fibromialgia. Serão avaliados o desenvolvimento da alodínia mecânica e hiperalgesia térmica, bem como comportamento tipo depressivo induzido pela reserpina, além de serem avaliados comportamentos de tigmotaxia e burrowing. Será investigado o efeito do -espinasterol (0,1; 0,3 e 1 mg/kg, v.o.), em reverter esses comportamentos, através da sua administração única um dia após a última administração de reserpina.. Também será avaliado o efeito do -espinasterol a partir de sua administração repetida por 3 dias, 30 minutos antes de cada administração de reserpina. E por fim, serão estimados os níveis de citocinas inflamatórias e de monoaminas na medula espinhal, tálamo e córtex cerebral, bem como será avaliada a expressão do receptor TRPV1 nessas estruturas, após indução de fibromialgia com a reserpina. A partir dos resultados desse estudo, espera-se constatar o potencial do -espinasterol em prevenir e/ou reverter comportamentos dolorosos e depressivos no modelo de fibromialgia induzida por reserpina.

Local do experimento: Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia - LabNeuro

Santa Maria, 12 de setembro de 2019

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO II



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR TRPV1 EM UM MODELO DE DOR TIPO FIBROMIALGIA", protocolada sob o CEUA nº 9148060319, sob a responsabilidade de **Sara Marchesan de Oliveira** e equipe; **Susana Paula Moreira Fischer**; **Indiara Brusco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 21/05/2019.

We certify that the proposal "TRPV1 CHANNEL INVOLVEMENT EVALUATION IN A FIBROMYALGIA-LIKE PAIN MODEL", utilizing 87 Heterogenics mice (87 males), protocol number CEUA 9148060319, under the responsibility of **Sara Marchesan de Oliveira** and team; **Susana Paula Moreira Fischer**; **Indiara Brusco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 05/21/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**Vigência da Proposta: de **06/2019** a **12/2019** Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem:	Biotério Central UFSM	sexo:	Machos	idade:	4 a 4 semanas	N:	87
Espécie:	Camundongos heterogênicos						
Linhagem:	Swiss				Peso:	25 a 30 g	

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**Vigência da Proposta: de **06/2019** a **12/2019** Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem:	Biotério Central UFSM	sexo:	Machos	idade:	4 a 4 semanas	N:	87
Espécie:	Camundongos heterogênicos						
Linhagem:	Swiss				Peso:	25 a 30 g	

Resumo: A fibromialgia (FM) é uma doença caracterizada por dor generalizada crônica, onde os pacientes relatam sintomas dolorosos em numerosas áreas do corpo, além de apresentarem sintomas comórbidos, incluindo depressão. Os mecanismos patofisiológicos da fibromialgia ainda não são totalmente conhecidos, por isso é de grande importância o entendimento destes, na intenção de encontrar um tratamento mais preciso para esta doença, cujos sintomas causam grande impacto na qualidade de vida dos pacientes. Sabe-se que o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) está envolvido no desenvolvimento de comportamentos dolorosos e depressivo, sendo assim, pensamos que poderia existir um possível envolvimento do canal TRPV1 nos efeitos causados pela reserpina. Para isso, camundongos adultos machos receberão por via subcutânea (s.c.) uma injeção de reserpina (1 mg/kg, s.c.) uma vez por dia durante três dias consecutivos com objetivo de induzir um modelo de dor e outros sintomas similares aqueles que ocorrem em pacientes com fibromialgia. Será avaliado o desenvolvimento da alodínia mecânica e hiperalgesia térmica, bem como de comportamento tipo depressivo e de nocicepção espontânea induzidos pela reserpina. Será investigado o efeito do antagonista TRPV1, SB-366791 (1 mg/kg, v.o.), em reverter esses comportamentos, além de ser avaliado o efeito do α -espinasterol sobre o comportamento de nocicepção espontânea, através da sua administração única um dia após a última administração de reserpina. A partir dos resultados desse estudo, espera-se constatar se há o envolvimento do receptor TRPV1 nos comportamentos dolorosos e depressivos no modelo de fibromialgia induzido por reserpina.

Local do experimento: Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia do Prédio 18.

Santa Maria, 08 de junho de 2019

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria