

ENVOLVIMENTO DA ENZIMA Na^+/K^+ -ATPase E DO ESTRESSE OXIDATIVO NAS ALTERAÇÕES NOCICEPTIVAS EM UM MODELO ANIMAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDO PELO ESTRESSE FRIO INTERMITENTE

VANESSA M. E. DA ROCHA¹; CAROLINA C. MARTINS²; ANGÉLICA S. REIS³;
KETLYN P. DA MOTTA⁴; CRISTIANE LUCHESE⁵; ETHEL A. WILHELM⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – vnsmacedo@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carol_cristovao@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – ge_schiavon@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – mottaketlyn@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – cristiane_luchese@yahoo.com.br (coorientadora)

⁶Universidade Federal de Pelotas – ethelwilhelm@yahoo.com.br (orientadora)

1. INTRODUÇÃO

A fibromialgia (FM) é uma condição crônica caracterizada pela dor generalizada, particularmente nos músculos esqueléticos. De modo geral, a fibromialgia é acompanhada pelo desenvolvimento de outros sintomas, incluindo fadiga, distúrbios do sono e depressão. Dados epidemiológicos evidenciaram que a fibromialgia é a segunda doença reumática mais frequente no Brasil. A prevalência de FM varia entre 0,6-4,4% na população brasileira (OEZEL et al., 2016; FREITAS et al., 2017; CORREIA et al., 2018; COSTA et al., 2020). Nesse contexto, as condições dolorosas crônicas, incluindo a fibromialgia, são consideradas um problema de saúde pública visto que afetam negativamente a qualidade de vida da população (SOUZA e PERISSINOTTI, 2018).

Embora a etiologia da FM seja ainda considerada complexa e desconhecida, diversos fatores parecem estar envolvidos no desenvolvimento dos sintomas clínicos dessa patologia, incluindo fatores genéticos, psicológicos, emocionais e ambientais. (STAUD e RODRIGUEZ, 2006; LATORRE-SANTIAGO e TORRES-LACOMBA, 2017). Além disso, a fisiopatologia da fibromialgia ainda não é completamente compreendida. Entretanto, sugere-se que esta síndrome é de origem neurogênica visto que a FM promove a amplificação na percepção da dor. Estudos prévios demonstraram que uma superprodução de espécies reativas (ER) associada a um estado antioxidante irregular pode representar uma das bases do mecanismo da FM. Dessa forma, o estresse oxidativo parece estar envolvido como um dos mecanismos fisiopatológicos desta doença (OZGOCMEN et al., 2006; SINGH et al., 2019). Consideravelmente, o estabelecimento de estresse oxidativo dentro das células pode levar a uma atividade disfuncional das enzimas integrantes da membrana, incluindo ATPases, em particular, a bomba transmembrana de sódio/potássio-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase) (BARCELOS et al., 2020). Nesse sentido, esse estudo teve como objetivo investigar as alterações comportamentais relacionadas à nocicepção, assim como o envolvimento do estresse oxidativo em um modelo animal de FM induzido pelo estresse frio intermitente (EFI).

2. METODOLOGIA

2.1 Comitê de ética e Modelo de fibromialgia induzida pelo estresse frio intermitente (EFI)

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEAA 28142-2019). Para isso, foram utilizados camundongos machos da raça Swiss provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas.

Inicialmente, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: **i)** Controle e **ii)** EFI. Os camundongos do grupo EFI foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ a partir das 16:30 no primeiro dia até as 10:00h do próximo dia. Na manhã seguinte (dia 2), os animais foram expostos a temperaturas que alternavam entre 4 e $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a cada 30 minutos. Às 16:30h, os camundongos foram novamente realocados no ambiente à $4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante a noite. Este mesmo procedimento foi repetido no dia seguinte (dia 3). A partir das 10:00h do quarto dia do protocolo experimental, os camundongos foram adaptados a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 horas. Enquanto isso, os camundongos do grupo controle foram mantidos a uma temperatura constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (Nishiyory e Ueda, 2008). Após o período de adaptação, os animais foram avaliados em testes comportamentais relacionados à dor para confirmar o desenvolvimento de sensibilidade mecânica, bem como hiperalgesia muscular. Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de sobredosagem de anestésico e as amostras do córtex cerebral foram coletadas para a realização das análises bioquímicas.

2.2 Testes comportamentais

A sensibilidade mecânica e a miastenia foram avaliadas nos animais, por meio do teste do von Frey e da força muscular, respectivamente. O teste do von Frey descrito por BORTOLANZA et al. (2002), determina a hiperalgesia mecânica por meio do limiar de retirada da pata. O teste da força muscular descrito por BURNES et al. (2008), determina a força de aderência dos animais por meio de um aparelho de medição de força digital. Os animais foram suavemente puxados paralelamente para longe da barra pela cauda até que os membros dianteiros liberaram a barra.

2.3 Análises bioquímicas

Os níveis de espécies reativas (ER) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinados conforme metodologia descrita por LOETCHUTINAT et al. (2005) e por OHKAWA et al. (1979), respectivamente. A atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e sódio/potássio-ATPase (Na^+ , K^+ -ATPase) foram mensuradas segundo método estabelecido por WENDEL (1981) e por FISKE e SUBBAROW (1925), respectivamente.

2.4 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados pelo teste t de Student. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados ilustrados na figura 1A e 1B demonstraram que os animais expostos ao EFI apresentaram um aumento na sensibilidade mecânica, acompanhado de uma diminuição na força muscular quando comparados ao grupo controle. Diante disso, foi possível observar um aumento na sensibilidade à dor e um desgaste muscular apresentado no grupo EFI, indicando que esse modelo induz os sinais característicos da fibromialgia.

Ainda, os resultados ilustrados na figura 2A e 2B demonstram que os animais expostos ao EIF exibiram um aumento nos níveis de ER e de TBARS no córtex cerebral de camundongos quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, na figura 2C e 2D foi evidenciada uma inibição da atividade da Na^+/K^+ -

ATPase no córtex cerebral dos camundongos expostos ao EFI, enquanto não houve uma diferença significativa na atividade da enzima GPx entre os grupos. Diante disso, as análises bioquímicas demonstram que a exposição ao EFI leva ao desenvolvimento do dano oxidativo e subsequente prejuízo na atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase. Os dados sugerem que a enzima GPx não foi capaz de combater o estresse oxidativo, resultando na inibição da enzima Na^+/K^+ -ATPase.

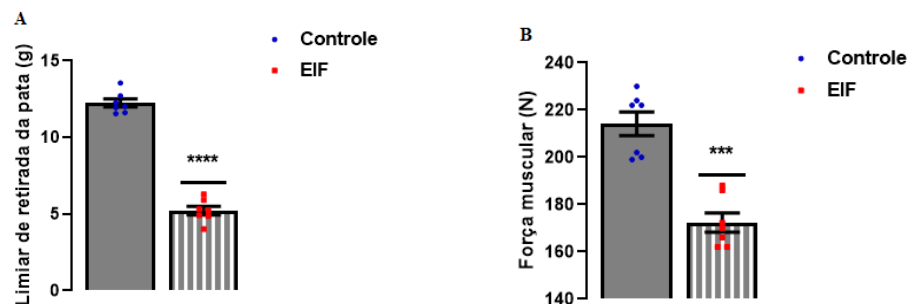


Figura 1. Efeito do EFI na hiperalgesia mecânica (A) e na força muscular (B) em camundongos. (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$ denota níveis de significância quando comparados ao grupo controle. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student.

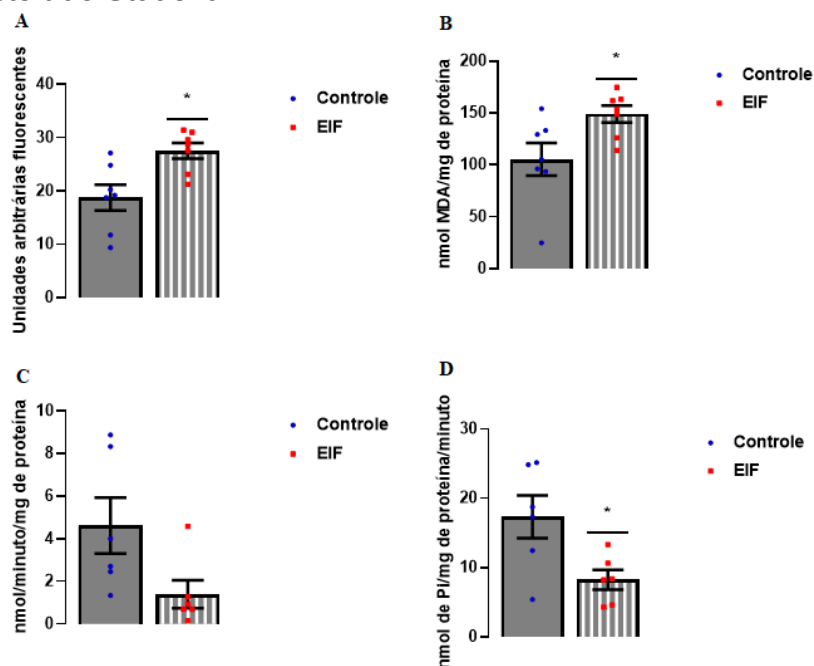


Figura 2. Efeito do EFI na formação de espécies reativas (A) na peroxidação lipídica (B) e na atividade das enzimas GPx (C) e Na^+/K^+ -ATPase (D) no córtex cerebral dos camundongos. (*) $p < 0,05$ denota níveis de significância quando comparados ao grupo controle. A análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, foi possível observar nesse estudo que a exposição ao EFI, levou ao aumento na sensibilidade nociceptiva e diminuição na força muscular. Tais alterações comportamentais relacionadas à nocicepção podem ser atribuídas ao aumento na produção de ER e na consequente inibição enzimática da Na^+/K^+ -ATPase no córtex cerebral de camundongos expostos ao EFI. Entretanto, mais estudos são necessários para a melhor compreensão desses mecanismos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARCELOS, Raquel Cristine Silva et al. Apical periodontitis induces changes on oxidative stress parameters and increases Na⁺/K⁺-ATPase activity in adult rats. **Archives of Oral Biology**, v. 118, p. 104849, 2020.
- BORTOLANZA, Léslei Bauermann et al. Atividade antinociceptiva do triterpeno ácido tormêntico isolado das cascas da *Vochysia divergens* (vochysiaceae) em modelos de nocicepção aguda e crônica, em camundongo. 2002.
- BURNES, Lynn A. et al. Enhanced muscle fatigue occurs in male but not female ASIC3^{-/-} mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 4, p. R1347-R1355, 2008.
- CORREIA, Lidiane Cristina et al. Efeito do treinamento resistido na redução da dor no tratamento de mulheres com fibromialgia: revisão sistemática. **Rev Bras Ciênc Mov**, v. 26, n. 2, p. 170-5, 2018.
- COSTA, Samara Maria Lopes et al. Aspectos clínicos e principais formas de tratamento para Fibromialgia-Revisão de Literatura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e729119495-e729119495, 2020.
- FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, v.66, p.375–400, 1925.
- FREITAS, Rodrigo Pegado de Abreu et al. Impacto do apoio social sobre os sintomas de mulheres brasileiras com fibromialgia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, p. 197-203, 2017.
- LATORRE-SANTIAGO, D.; TORRES-LACOMBA, M. REVISIÓN/REVIEW FIBROMYALGIA AND THERAPEUTIC EXERCISE. QUALITATIVE SYSTEMATIC REVIEW FIBROMYALGIA Y EJERCICIO TERAPEÚTICO. REVISIÓN SISTEMÁTICA CUALITATIVA. **International Journal of Medicine and Science of Physical Activity and Sport**, v. 17, n. 65, p. 183-204, 2017.
- LOETCHUTINAT, Chatchanok et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 2-3, p. 323-331, 2005.
- OEZEL, Lisa et al. Fibromyalgia syndrome: metabolic and autophagic processes in intermittent cold stress mice. **Pharmacology research & perspectives**, v. 4, n. 5, p. e00248, 2016.
- OHKAWA, Hiroshi; OHISHI, Nobuko; YAGI, Kunio. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- OZGOCMEN, Salih et al. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide in fibromyalgia: etiologic and therapeutic concerns. **Rheumatology international**, v. 26, n. 7, p. 598-603, 2006.
- SINGH, Lovedeep et al. Possible molecular mediators involved and mechanistic insight into fibromyalgia and associated co-morbidities. **Neurochemical research**, v. 44, n. 7, p. 1517-1532, 2019.
- SOUZA, Juliana Barcellos de; PERISSINOTTI, Dirce Maria Navas. A prevalência da fibromialgia no Brasil—estudo de base populacional com dados secundários da pesquisa de prevalência de dor crônica brasileira. **BrJP**, v. 1, p. 345-348, 2018.
- STAUD, Roland; RODRIGUEZ, Miguel E. Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome. **Nature clinical practice Rheumatology**, v. 2, n. 2, p. 90-98, 2006.
- WENDEL, Albrecht. [44] Glutathione peroxidase. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1981. p. 325-333.