

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Thayza Martins Melzer

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DA PLANTA
EUGENIA BRASILIENSIS NO MODELO ANIMAL DE FIBROMIALGIA
INDUZIDA PELA RESERPINA**

Florianópolis

2019

Thayza Martins Melzer

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DA PLANTA
EUGENIA BRASILIENSIS NO MODELO ANIMAL DE FIBROMIALGIA
INDUZIDA PELA RESERPINA**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Melzer, Thayza Martins

Avaliação do extrato padronizado da planta *Eugenia
brasiliensis* no modelo animal de fibromialgia induzida
pela reserpina. / Thayza Martins Melzer ; orientador,
Adair Roberto Soares dos Santos, 2019.

77 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Fibromialgia, Dor, *Eugenia
brasiliensis*. I. Santos, Adair Roberto Soares dos. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

Thayza Martins Melzer

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DA PLANTA EUGENIA
BRASILIENSIS NO MODELO ANIMAL DE FIBROMIALGIA INDUZIDA PELA
RESERPINA**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 03 de julho de 2019.

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.

Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos, Dr.

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Geisson Marcos Nardi, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Tiago Tizziani, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a Caroline Valente, Dr^a.

Universidade Regional de Blumenau

Suplente

Este trabalho é dedicado a minha mãe, Dulcemére Martins Melzer, e ao meu pai, Paulo Melzer Júnior (*in memoriam*), pelo incansável apoio durante esta trajetória de UFSC.

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro agradecimento é para o Universo, que me permitiu estar presente aqui, nesta Universidade, neste momento da história e que me possibilitou muitas vivências – todas de extrema importância para o meu desenvolvimento como ser humano.

Todo o meu amor e um muito obrigada especial a minha mãe, Dulcemére, pelo apoio incondicional, pela paciência e pela compreensão durante estes cinco anos e meio de curso (e todos os outros de vida). Você é incomparável!

Ao meu pai, Paulo, e a minha avó, Maria, que me viram começar esta jornada, mas já não estão mais fisicamente entre nós. Os ensinamentos de vocês foram e são essenciais na minha vida. Vocês jamais serão esquecidos. A minha avó, Ondina, por compreender a minha ausência e por sempre se preocupar comigo.

A minha família, pelo apoio e pela força de sempre. E a minha família estendida: Patrícia, Maria Fernanda e Guilherme, obrigada pela amizade inabalável, pelas conversas e pelos momentos de descontração.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas, pelas lições aprendidas dentro e fora de sala de aula. A Turma 14.1, jamais poderia ter sonhado em pertencer a uma turma tão incrível. Vocês tornaram estes cinco anos mais leves! A família Simbiosis, que muito me ensinou no último ano.

A professora Ana Maria Viana, por me permitir vivenciar a experiência de monitoria nas disciplinas de Fisiologia Vegetal e Biotecnologia Vegetal.

Ao professor Adair, por permitir o meu ingresso no Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI) e por todos os ensinamentos nestes quatro anos de Iniciação Científica.

Faltam palavras para agradecer aos meus queridos colegas de LANDI. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, dicas e pela parceria em todos os momentos. Jamais esquecerei o que vivi aqui, levarei sempre comigo todas as coisas que criamos e construímos juntos. A chance de participar de uma equipe como esta acontece uma vez só na vida!

Ao CNPq, pelo financiamento dos experimentos de Iniciação Científica.

E a UFSC, uma universidade ímpar e que, infelizmente, vem sendo atacada de todos os lados por aqueles que não sabem ou não reconhecem a importância desta instituição para o país. Foi um privilégio estudar e me formar (e me transformar) aqui.

Sciences provide an understanding of a universal experience, Arts are a universal understanding of a personal experience... they are both a part of us and a manifestation of the same thing... the arts and sciences are avatars of human creativity”

(Mae Jemison)

RESUMO

Pacientes com Fibromialgia apresentam dor crônica generalizada acompanhada por sintomas associados como depressão, fadiga, distúrbios do sono e disfunção cognitiva. A prevalência é maior em mulheres e o seu diagnóstico implica em uma série de complicações na vida do indivíduo nos âmbitos pessoal e profissional. Atualmente, o tratamento farmacológico mais utilizado é baseado em antidepressivos e anticonvulsivantes. Entretanto, estas combinações não são eficazes para todos os indivíduos e muitas vezes também não contemplam a totalidade dos sintomas. Este cenário estimula estudos que visam o desenvolvimento de novas formas de tratamento da Fibromialgia e a utilização das plantas medicinais pode ser uma alternativa para atenuar os sintomas vividos por estes pacientes. O uso de plantas medicinais acompanha a história humana. Em pesquisas recentes, a espécie *Eugenia brasiliensis* apresentou propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas, justificando a sua utilização neste estudo. Assim, o objetivo deste trabalho consiste em avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de *Eugenia brasiliensis* (EHEb) no comportamento nociceptivo de camundongos submetidos ao modelo de fibromialgia induzido pela reserpina. O tratamento dos animais foi realizado uma hora antes da aplicação do protocolo experimental, nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg. O EHEb, na dose de 300 mg/kg, foi capaz de reduzir a nociceção avaliada pelos testes de von Frey, Placa Fria e Escala *Grimace*. Estes dados corroboram com os existentes na literatura sobre um potencial efeito antinociceptivo de *Eugenia brasiliensis* e serve como incentivo para o desenvolvimento de novos estudos com a planta.

Palavras-chave: Fibromialgia. Dor. Plantas medicinais. *Eugenia brasiliensis*.

ABSTRACT

Patients with Fibromyalgia suffer from chronic pain followed by associated symptoms such as depression, fatigue, sleep disorders and cognitive dysfunction. The prevalence is higher in women and the diagnosis implies a series of complications in the individual's life in the personal and professional spheres. Currently, the most widely used pharmacological treatment is based on antidepressants and anticonvulsants. However, these combinations are not effective for all individuals and often don't address the full range of symptoms. This scenario stimulates studies aimed at the development of new forms of Fibromyalgia treatment and the use of medicinal plants may be an alternative to attenuate the symptoms experienced by these patients. The use of medicinal plants accompanies human history. In recent research, the species *Eugenia brasiliensis* presented anti-inflammatory and antinociceptive properties, justifying its use in this study. Thus, the objective of this work consists in evaluating the effect of the hydroalcoholic extract of *Eugenia brasiliensis* (HEEb) on the nociceptive behavior of mice submitted to reserpine-induced fibromyalgia model. Treatment of the animals was carried out one hour before the application of the experimental protocol at doses of 10, 30, 100 and 300 mg/kg. HEEb, at a dose of 300 mg / kg, was able to reduce nociception evaluated by the von Frey, Cold Plate and Grimace Scale tests. These data corroborate with those in the literature on a potential antinociceptive effect of *Eugenia brasiliensis* and serves as an incentive for the development of new studies with the plant.

Keywords: Fibromyalgia. Pain. Medicinal plants. *Eugenia brasiliensis*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Representação anatômica das vias ascendentes da dor. | 28 |
| Figura 2: Representação anatômica das vias descendentes de controle e modulação da dor. | 29 |
| Figura 3: Em vermelho, distribuição dos <i>hotspots</i> no planeta. | 32 |
| Figura 4: Imagem ilustrativa da árvore de <i>Eugenia brasiliensis</i> (A), flor (B) e fruto (C). | 34 |
| Figura 5: Representação do processo de formação e estocagem de serotonina nas vesículas de neurônios serotoninérgicos. | 36 |
| Figura 6: Esquema do desenho experimental. | 46 |
| Figura 7: Imagem da aplicação dos filamentos de Von Frey na para posterior direita de um dos animais durante o experimento. | 47 |
| Figura 8: Imagem de um dos animais na Placa Fria durante a avaliação da sensibilidade térmica. | 48 |
| Figura 9: Desenho esquemático das alterações faciais analisadas na Escala Grimace | 49 |
| Figura 10: Efeito do tratamento com EHEb na alodinia mecânica. | 52 |
| Figura 11: Efeito do tratamento com EHEb na sensibilidade térmica ao frio. | 54 |
| Figura 12: Efeito do tratamento com EHEb no componente emocional associado a dor (Escala <i>Grimace</i>). | 56 |
| Figura 13: Fotografias de animais do grupo Salina + Veículo (A) e Reserpina + Veículo (B). | 57 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1: Classificação científica de <i>Eugenia brasiliensis</i> | 34 |
| Quadro 2: Identificação dos grupos de animais utilizados no estudo..... | 45 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC – Córtex Cingulado

B - Basal

CCB – Centro de Ciências Biológicas

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA – Adjuvante Completo de Freund

CFS – Departamento de Ciências Fisiológicas

cm - Centímetro

CNS – Conselho Nacional de Saúde

E - Eutanásia

E.P.M. – Erro Padrão da Média

EG – Escala *Grimace*

EHEb – Extrato Hidroalcoólico de *Eugenia brasiliensis*

ESS – Escala de Severidade dos Sintomas

FM - Fibromialgia

FURB – Universidade Regional de Blumenau

g - Grama

GABA - Ácido gama-aminobutírico

H - Hipotálamo

HHa – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

i.g. – Via intra-gástrica

IASP – Associação Internacional de Estudo da Dor (do inglês, *International Association for the Study of Pain*)

IDG – Índice de Dor Generalizada

IL-1 β - Interleucina-1 β

IL-6 – Interleucina 6

kg - Quilograma

LANDI – Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação

mg - Miligrama

ml - Mililitro

NMDA – Receptor N-metil-D-aspartato

°C – Graus Celsius

PAG – Substância Cinzenta Pariaqueductal (do inglês, *Periaqueductal Gray Matter*)

PB – Núcleo Parabraquial (do inglês, *Parabrachial nucleus*)

PF – Placa Fria

PNPIC-SUS – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do Sistema Único de Saúde

RVM – Bulbo Rostroventral (do inglês, *Rostral ventral medulla*)

s.c. – Via subcutânea

SNC – Sistema Nervoso Central

T - Tálamo

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α (*Tumor necrosis factor alpha*)

TRP - Receptores de Potencial Transitório

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

VF – von Frey

VMAT – Transportadores de monoaminas vesiculares

LISTA DE SÍMBOLOS

δ - delta

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 25 |
| 1.1 | FIBROMIALGIA | 25 |
| 1.2 | PROCESSAMENTO DO ESTÍMULO DOLOROSO NA FIBROMIALGIA | 26 |
| 1.2.1 | Via ascendente da dor | 26 |
| 1.2.2 | Via descendente da dor e sensibilização central | 28 |
| 1.2.3 | Tratamento..... | 30 |
| 1.3 | PLANTAS MEDICINAIS | 31 |
| 1.3.1 | Gênero <i>Eugenia</i> | 32 |
| 1.3.2 | <i>Eugenia brasiliensis</i> | 33 |
| 1.4 | MODELO ANIMAL DE FIBROMIALGIA | 35 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 39 |
| 3 | OBJETIVOS | 41 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 41 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 41 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 43 |
| 4.1 | ANIMAIS | 43 |
| 4.2 | INDUÇÃO DO MODELO DE FIBROMIALGIA | 43 |
| 4.3 | TRATAMENTO | 44 |
| 4.4 | DESENHO EXPERIMENTAL..... | 45 |
| 4.5 | AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL | 46 |
| 4.5.1 | Avaliação da sensibilidade ao estímulo mecânico | 46 |
| 4.5.2 | Avaliação da sensibilidade ao estímulo térmico | 47 |
| 4.5.3 | Avaliação subjetiva associada à emocionalidade da dor | 48 |
| 4.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 49 |
| 5 | RESULTADOS..... | 51 |
| 5.1 | EFEITO DO EHEb NO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS COM FIBROMIALGIA: ALODINIA MECÂNICA | 51 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.2 | EFEITO DO EHEb NO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS COM FIBROMIALGIA: HIPERALGESIA TÉRMICA AO FRIO | 53 |
| 5.3 | EFEITO DO EHEb NO COMPORTAMENTO EMOCIONAL DOS ANIMAIS COM FIBROMIALGIA: PONTUAÇÃO NA ESCALA <i>GRIMACE</i> | 55 |
| 6 | DISCUSSÃO | 59 |
| 7 | CONCLUSÃO | 63 |
| | REFERÊNCIAS | 65 |
| | ANEXO A – Localização dos <i>tender points</i> avaliados | 71 |
| | ANEXO B – Índice de Dor Generalizada (IDG) | 73 |
| | ANEXO C – Escala de Severidade dos Sintomas (ESS) | 75 |
| | ANEXO D – Escala <i>Grimace</i> | 77 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 FIBROMIALGIA

A Fibromialgia (FM) é uma síndrome caracterizada por dor crônica, a qual é difusa por todo o corpo, acompanhada por comorbidades como depressão, disfunção cognitiva, fadiga e distúrbios do sono, sem que haja uma doença orgânica como causa deste quadro. A palavra fibromialgia, termo elaborado na década de 1970 por Smythe e Moldofsky, tem origem no latim e no grego e significa uma “condição dolorosa no tecido muscular e no fibroso” (BELLATO et al., 2012). A doença é conhecida desde o início do século XX, porém foi apenas em 1990 que o Colégio Americano de Reumatologia desenvolveu critérios para diagnosticá-la.

Para ser diagnosticado com FM, até 2010, o paciente precisava apresentar histórico de dor generalizada abrangendo todo o corpo há pelo menos três meses associada à presença de dor na palpação de, pelo menos, 11 dos 18 *tender points* - áreas que apresentam baixo limiar de dor à pressão, (Anexo A) descritos no exame físico e alguns dos sintomas associados citados acima, como fadiga e depressão (WOLFE et al., 1990; GRANGES; LITTLEJOHN, 1993). Atualmente, os sintomas associados e não somente ao limiar de dor apresentado pelo indivíduo passou a ter maior importância de acordo com a última revisão dos critérios diagnósticos da FM (WOLFE et al., 2010; FITZCHARLES; YUNUS, 2011).

Nos últimos nove anos, a avaliação dos *tender points* foi suprimida e os critérios para o diagnóstico da FM estão sendo baseados em escores do Índice de Dor Generalizada (IDG – Anexo B), relacionado as áreas do corpo onde o paciente sentiu dor na última semana e da Escala de Severidade dos Sintomas (ESS – Anexo C), que quantifica a presença de sintomas associados; e também na presença de dor há pelo menos três meses, isso partindo-se do princípio que o paciente não tenha outra enfermidade que possa causar o quadro algico (WOLFE et al., 2010). Assim, devido às características apresentadas, a dor na FM é considerada nociplástica, segundo a classificação de dor proposta pela Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP, em inglês). Ou seja, o indivíduo sente dor sem existência, ou possibilidade, de dano tecidual ou de doença ou lesão no Sistema Nervoso Central (SNC) que justifique a percepção dolorosa do paciente.

Com relação à prevalência, aproximadamente 1,8% da população mundial possui o diagnóstico de FM. A síndrome é mais comum em mulheres, totalizando 3,98% da população feminina e 0,01% dos homens afetados (HEIDARI et al., 2017). No Brasil, a FM afeta aproximadamente 2,5% da população total, com predomínio nas mulheres com idade de 35 a 60 anos (SENNA et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2006).

O atendimento a estes indivíduos sobrecarrega os sistemas de saúde e os gastos, nos Estados Unidos, em média, giram em torno de US\$ 11.973,00 por paciente após o primeiro ano de diagnóstico. Esta estimativa foi feita baseada em dados de 1999 até 2005, e deve, portanto, estar defasada (BERGER et al., 2010; SCHUG; GODDARD, 2014). O impacto no mercado de trabalho também é grande. Anualmente, pacientes com FM faltam, em média, de 23 a 58 dias de trabalho e metade dos pacientes com FM nos Estados Unidos afirma que os sintomas da síndrome atrapalham suas atividades no ambiente de trabalho (SCHAEFER et al., 2011; WHITE et al. 2008; ROBINSON et al. 2012).

1.2 PROCESSAMENTO DO ESTÍMULO DOLOROSO NA FIBROMIALGIA

A capacidade do corpo de perceber estímulos nocivos é de extrema importância para o bem-estar e para a sobrevivência do indivíduo, uma vez que é esta capacidade que permite com que ocorra uma reação a fim de se proteger contra condições prejudiciais a integridade física do indivíduo (BASBAUM et al., 2009). Entretanto, existem situações onde a dor vai além do seu papel adaptativo de mecanismo de defesa e se torna uma doença crônica, causando uma série de prejuízos na qualidade de vida dos indivíduos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

1.2.1 Via ascendente da dor

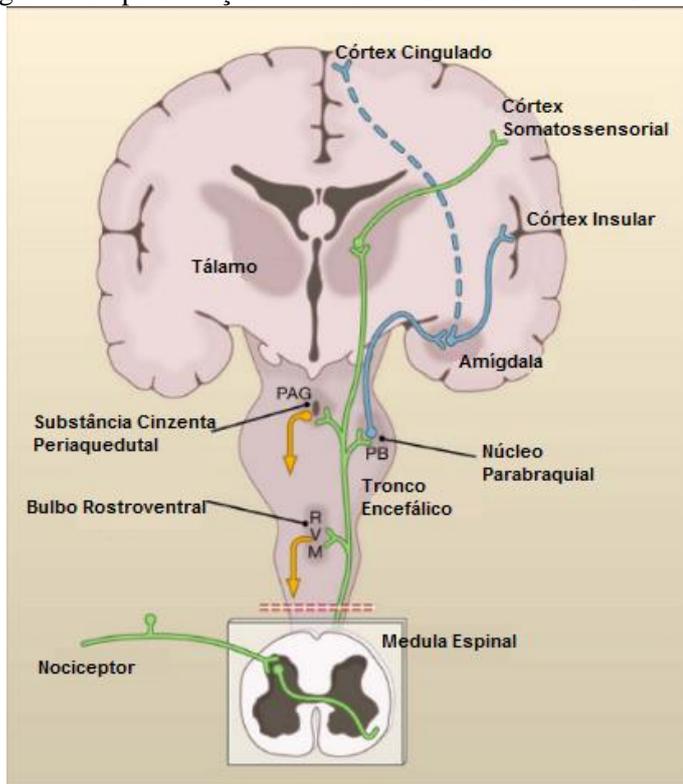
O processo doloroso tem início com a percepção de um estímulo ambiental nocivo (pode ser de natureza térmica, mecânica ou química) por nociceptores presentes nas extremidades distais dos neurônios aferentes primários. São terminações nervosas livres, com ramificações e sem mielina, capazes de captar e enviar, por meio de potenciais de ação, este estímulo da periferia até o SNC (BEAR, CONNORS & PARADISO, 2008).

O estímulo segue pela fibra nervosa, do tipo A δ ou C com pouca ou nenhuma mielina, respectivamente, até o corno dorsal da medula espinal, onde a informação dolorosa é

transmitida a neurônios secundários que, por sua vez, são responsáveis por levá-la até o encéfalo, caracterizando a via ascendente da dor (Figura 1). Uma vez no encéfalo, esta informação chega no tálamo e é transmitida ao córtex somatossensorial, onde será interpretada em relação à localização e intensidade. Outro caminho possível é através da amígdala seguindo até os córtices cingulado e insular, sendo esta via relacionada à interpretação emocional da dor. Assim, a dor envolve tanto componentes sensoriais quanto emocionais, o que garante a complexidade desta experiência (BASBAUM et al, 2009).

Além das vias ascendentes, que levam o estímulo doloroso da periferia para o SNC, este processo de percepção está sujeito à ação de vias descendentes de controle e modulação da dor. Esta via percorre um caminho inverso, trazendo sinalização de regiões do encéfalo e da medula espinal a fim de facilitar ou inibir a transmissão dos sinais dolorosos no corno dorsal da medula espinal (CHOY, 2015; BANNISTER; DICKENSON, 2016). A ocorrência de anormalidades no processamento da dor, comum na FM, pode estar relacionada a alterações nesta via descendente inibitória e também na ocorrência de uma sensibilização central (CHOY, 2015).

Figura 1: Representação anatômica das vias ascendentes da dor.



Legenda: Os nociceptores levam a informação da periferia até o Corno Dorsal da Medula Espinal, fazem sinapse com interneurônios que atravessam a Medula e transmitem o estímulo, via neurônios secundários, até o Córtex Somatossensorial (em verde) e os córtices cingulado e insular (em azul), caracterizando a via ascendente da dor. Fonte: adaptado de Basbaum et al, 2009.

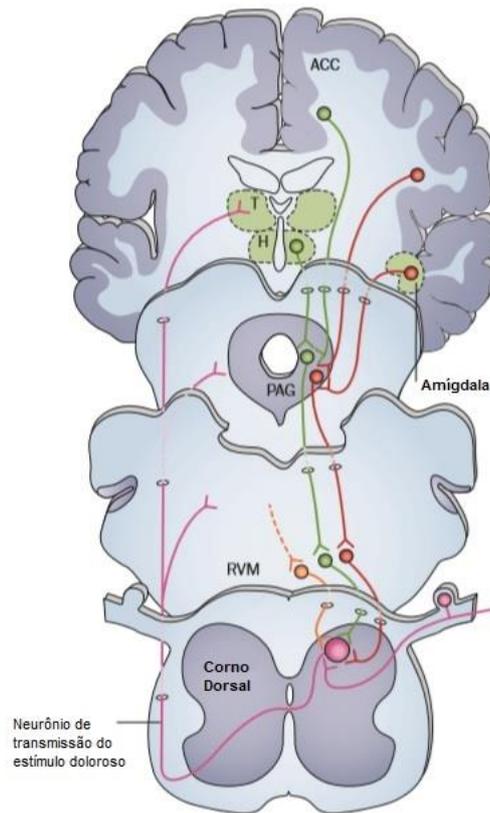
1.2.2 Via descendente da dor e sensibilização central

As principais vias de controle descendente da dor atuam na chegada do estímulo doloroso no corno dorsal da medula espinhal (Figura 2). As regiões do mesencéfalo e do tronco encefálico se comunicam com o corno dorsal da medula espinhal, modulando os estímulos conduzidos até esta região pelos neurônios aferentes primários e também as sinapses que acontecem na medula espinhal, resultando na inibição ou facilitação do sinal doloroso (BANNISTER; DICKENSON, 2016).

Na literatura, as vias inibitórias mais bem descritas são a serotonérgica-noradrenérgica e opioidérgica, responsáveis pela liberação de serotonina, norepinefrina, e opióides endógenos capazes de modular a liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato (LEE et al., 2011). Devido à ação destas vias, o indivíduo tem uma menor sensibilidade ao estímulo doloroso. Pacientes com dor crônica apresentam um funcionamento anormal ou a total inexistência destas vias, resultando em uma resposta desproporcional ao estímulo doloroso inicial, a hiperalgesia, e também em uma resposta de dor a um estímulo

inócuo, a alodinia (CHOY, 2015). Análise do líquido cerebrospinal de pacientes com FM mostrou uma concentração mais baixa de serotonina e norepinefrina em relação a indivíduos saudáveis (RUSSELL et al, 1992).

Figura 2: Representação anatômica das vias descendentes de controle e modulação da dor.



Legenda: As vias descendentes de controle da dor: em verde, a via inibitória de neurônios noradrenérgicos, partindo do Hipotálamo e do Córtex Cingulado; e em laranja neurônios serotoninérgicos que partem da Medula Rostro Ventromedial; esses neurônios fazem sinapse na medula espinal e são capazes de inibir a transmissão do estímulo doloroso para o encéfalo. Em rosa a via ascendente e em vermelho a via descendente facilitadora. Fonte: adaptado de Choy, 2015.

O processo de sensibilização central em pacientes com dor crônica é outra questão relevante quando se trata de FM. Na sensibilização central ocorre uma hiperexcitabilidade do SNC, resultando em um maior processamento de estímulos dolorosos e, conseqüentemente, maior sensação de dor. Dos mecanismos envolvidos no processo de sensibilização central destacam-se as alterações na via glutamatérgica, com a ativação de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) em resposta a liberação excessiva de glutamato na medula espinal; a diminuição da atividade inibitória de interneurônios GABAérgicos, que atuam modulando a

comunicação entre as fibras aferentes primárias e neurônios secundários; e a ativação da microglia, em um processo que resulta na liberação de moléculas sinalizadoras, incluindo as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, as quais contribuem para sensibilização central (STAUD, 2006; BASBAUM et al, 2009)

Além destes dois mecanismos principais, há ainda suspeita de alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e na liberação de monoaminas envolvidas no processo algico (STAUD, 2006). Estudos demonstram alterações nos níveis do cortisol, na urina e no plasma, em pacientes com FM, quando comparados com indivíduos saudáveis, indicando uma possível alteração no funcionamento do eixo HHA. Altas concentrações de cortisol estão relacionadas a uma maior sensibilidade a estímulos dolorosos (CROFFORD et al., 1994). Com relação às monoaminas, Wood e colaboradores (2007) demonstraram que pacientes com FM não liberam dopamina da mesma forma que indivíduos saudáveis frente a um estímulo doloroso (WOOD et al., 2007). O mesmo acontece com a serotonina, que apresenta baixas concentrações em pacientes com FM (ARREOLA et al., 2015). Estas alterações nas vias dopaminérgicas e serotoninérgicas, que também ocorrem nos quadros de depressão, contribuem para o quadro de dor generalizada comum na FM (WOOD et al., 2007; CZÉH; NAGY, 2018).

1.2.3 Tratamento

Considerando-se todo o exposto acima, o tratamento farmacológico tipicamente prescrito para a FM consiste em antidepressivos tricíclicos (amitriptilina), anticonvulsivantes (pregabalina e gabapentina), inibidores seletivos da recaptção de serotonina e noradrenalina (duloxetina e milnacipram), inibidores seletivos da recaptção da serotonina (fluoxetina), relaxante muscular (ciclobenzaprina) e opióides (tramadol), baseados em Diretrizes da Liga Europeia contra o Reumatismo, Associação das Sociedades Médicas Científicas da Alemanha e a Sociedade Canadense de Dor (KIA; CHOY, 2017).

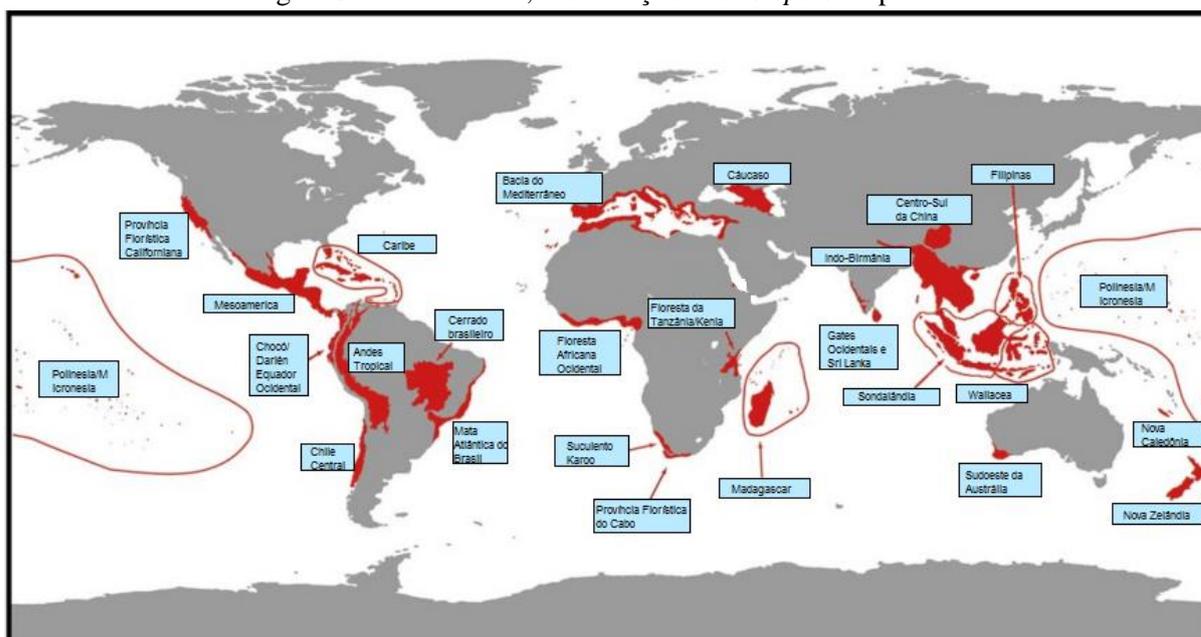
Devido à complexidade dos sintomas enfrentados pelos pacientes com FM, alternativas não farmacológicas também estão sendo utilizadas a fim de melhorar a qualidade de vida e o bem-estar destes indivíduos. Atividades físicas, como treinos aeróbicos e de força de baixa intensidade, psicoterapia, técnicas de controle de estresse e de relaxamento e acupuntura têm se mostrado eficazes no controle dos sintomas (ROOKS et al., 2007; ABLIN et al., 2013). Os tratamentos mencionados acima atuam apenas nos sintomas do paciente, o

que justifica a necessidade de se estudar a FM a fim de se elucidar sua fisiopatologia e de encontrar um tratamento eficaz que atue no decurso da síndrome.

1.3 PLANTAS MEDICINAIS

Desde o início da história humana, as plantas com propriedades medicinais têm sido cultivadas e utilizadas para tratar, curar e prevenir os mais variados sintomas e doenças. Este uso se propaga por todas as culturas e continua relevante, mesmo com os avanços da medicina tradicional na história recente (CALIXTO, 2000; ZUNIC et al., 2017). As plantas apresentam uma grande diversidade de compostos químicos que podem apresentar fins terapêuticos, justificando, assim, o seu estudo farmacológico. Atualmente, derivados de produtos naturais correspondem a 30% do mercado farmacêutico, sendo a fonte mais comum utilizadas no desenvolvimento de novas drogas (KIRKPATRICK, 2002; BASSO et al., 2005).

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo, com duas grandes áreas consideradas *hotspots* de biodiversidade (Figura 3) - regiões biogeográficas com alta diversidade biológica e concentração de espécies endêmicas, a Mata Atlântica e o Cerrado, além do potencial já parcialmente conhecido da Amazônia (MYERS et al. 2000). De um total que, estima-se, varia entre 350 e 550 mil espécies de plantas, o Brasil já catalogou aproximadamente 55 mil, sendo o país que apresenta maior diversidade de vegetação em seu território (FONSECA, 2012).

Figura 3: Em vermelho, distribuição dos *hotspots* no planeta.

Fonte: adaptado de MYERS et al., 2000.

Com todo este potencial a ser explorado e uma tradição de uso das plantas medicinais pela população, o Conselho Nacional de Saúde (CNS) criou, em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC-SUS). Esta política pretende incluir uma série de terapias alternativas como opções terapêuticas no Sistema Único de Saúde brasileiro, incluindo a utilização de plantas medicinais. Como forma de estender o programa, foi desenvolvida, em 2008, a Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o intuito de informar a população e de guiar a utilização das plantas medicinais e fitoterápicos no tratamento de doenças (BRASIL, 2006, 2008). O exposto acima mostra a importância de se estudar a atividade farmacológica das plantas medicinais a fim de consolidar o conhecimento popular já utilizado e garantir a segurança da população.

1.3.1 Gênero *Eugenia*

A família Myrtaceae está amplamente distribuída no mundo, com predominância nas regiões pantropicais e subtropicais e maior concentração nas Américas e Austrália. De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), existem aproximadamente 130 gêneros e quatro mil espécies no total, 23 gêneros e cerca de mil espécies são endêmicas do Brasil, sendo, assim, uma das maiores famílias do país. Os gêneros mais importantes em território brasileiro são *Eugenia* e *Myrcia*.

O gênero *Eugenia* possui mais de 500 espécies e 400 destas podem ser encontradas no Brasil, nas regiões de Mata Atlântica. Estas espécies apresentam propriedades medicinais e estudos fitoquímicos já demonstraram a presença de compostos como terpenos, flavonoides e taninos na planta (OLIVEIRA et al., 2005; REYNERTSON et al., 2008; MAGINA et al., 2009; FLORES et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013; MACHADO et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017). Na medicina popular, o gênero *Eugenia* é conhecido por apresentar propriedades terapêuticas hipotensivas, anti-gota, diurético, antimicrobiano, hipoglicemiante e anti-inflamatório (SCHAPOVAL et al. 1994; AURICCHIO, BACCHI, 2003; GARMUS et al., 2014).

1.3.2 *Eugenia brasiliensis*

Eugenia brasiliensis Lamarck (Lam.), uma das espécies do gênero *Eugenia* (Quadro 1), é conhecida popularmente no Brasil como ‘grumixama’, ‘grumixameira’, ‘grumixaba’, ‘ibaporoiti’ ou ‘cereja-brasileira’ (Figura 4). Trata-se de uma árvore encontrada na Mata Atlântica do sul do Brasil, em Santa Catarina, nas cidades de Florianópolis, Brusque, Ibirama, Itajaí e Joinville. As folhas, frutos e casca são utilizados na medicina popular para tratamento de reumatismo, a infusão das folhas como diurético e os frutos maduros são consumidos na alimentação (REITZ, KLEIN, 1969).

Quadro 1: Classificação científica de *Eugenia brasiliensis*.

| Classificação científica | |
|--------------------------|------------------------|
| Reino | Plantae |
| Divisão | Magnoliophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Ordem | Myrtales |
| Família | Myrtaceae |
| Gênero | <i>Eugenia</i> |
| Espécie | <i>E. brasiliensis</i> |

Fonte: Flora Digital/UFRGS, 2019.

Figura 4: Imagem ilustrativa da árvore de *Eugenia brasiliensis* (A), flor (B) e fruto (C).

Fonte: Flora Digital/ UFRGS, 2019.

Estudos fitoquímicos realizados com folhas de *E. brasiliensis* demonstraram a presença de compostos fenólicos, como os flavonoides catequina, miricetina, isoquercetina, rutina, quercetina, apigenina e galangina. Na literatura, estudos utilizando o extrato hidroalcoólico a partir das folhas de *E. brasiliensis* demonstraram efeito antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, além de efeitos tipo-antidepressivo e anti-inflamatório, (PIETROVSKI et al., 2008; MAGINA et al., 2009; COLLA et al., 2012; SIMÕES et al., 2018). Teixeira e colaboradores (2017) demonstraram um possível efeito antiproliferativo do

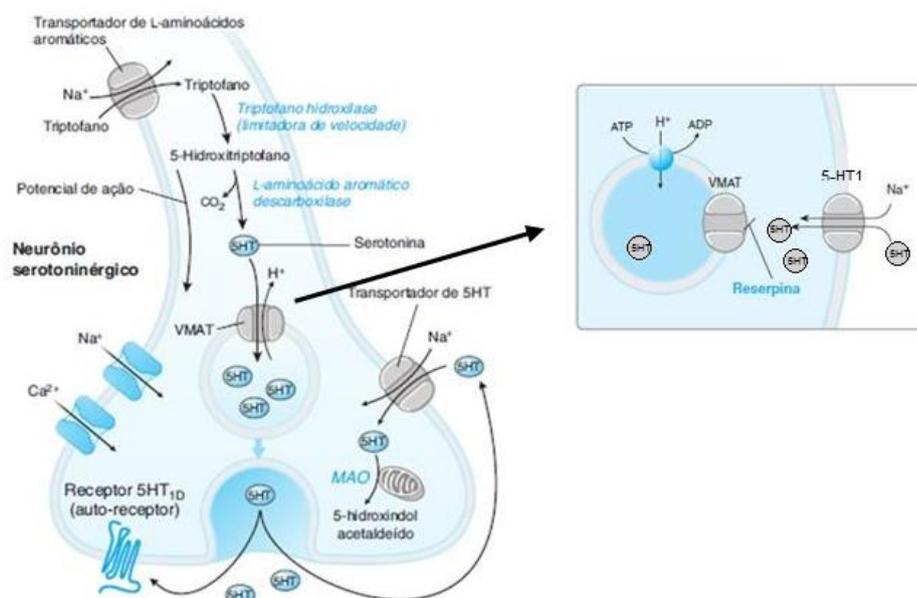
suco da fruta de *E. brasiliensis* nas células de câncer de mama e Rodrigues e colaboradores (2013) trabalharam com o óleo essencial das folhas da planta, que apresentou potencial para tratar a leishmaniose.

Dados recentes desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação demonstraram, pela primeira vez, efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. brasiliensis* em camundongos. Foi observado que os animais que foram tratados com a planta e submetidos ao modelo de nocicepção visceral induzida pelo ácido acético apresentaram redução significativa no número de contrações abdominais, em comparação com o grupo controle. Além disto, foi observado que a planta também promoveu redução do comportamento nociceptivo induzida pela injeção intraplantar de algogênicos como a histamina, o composto 48/80 e a formalina (apenas na fase inflamatória). De nota, o extrato de *E. brasiliensis* também foi eficaz em reduzir a nocicepção (dor) associada ao modelo de inflamação crônica causada por Adjuvante Completo de Freund (CFA, em inglês), com uma redução da hiperalgesia mecânica e redução da concentração de de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, quando comparados ao grupo controle (SIMÕES et al., 2018). Estes resultados justificam a continuidade dos estudos com a *E. brasiliensis* e a sua utilização neste trabalho como um possível tratamento para a FM.

1.4 MODELO ANIMAL DE FIBROMIALGIA

O modelo de FM desenvolvido por Nagakura e colaboradores (2009) faz uso da afinidade da reserpina, um alcaloide presente na planta *Rauwolfia serpentina*, pelos transportadores de monoaminas vesiculares (VMAT). A reserpina compete com as monoaminas e bloqueia estes transportadores impossibilitando, assim, a estocagem dos neurotransmissores nas vesículas sinápticas e impedindo a sua liberação na fenda sináptica (Figura 5). Como resultado deste processo, as monoaminas acabam ficando no citosol onde são degradadas (SÜDHOF, STARKE, 2008; GOLAN, 2009; LOBAY, 2015). Um dos efeitos colaterais do uso crônico da reserpina é a depressão, resultado da depleção das monoaminas no organismo (RANG et al., 2012).

Figura 5: Representação do processo de formação e estocagem de serotonina nas vesículas de neurônios serotoninérgicos.



Legenda: A serotonina, formada a partir do triptofano, se liga ao transportador de monoaminas vesiculares (VMAT) e assim é estocado dentro das vesículas até o momento de ser liberado na fenda sináptica. No detalhe a ação da reserpina, bloqueando a VMAT e impedindo a ligação do neurotransmissor, que fica no citoplasma e é degradado. Fonte: adaptado de Golan et al., 2014.

Para investigar o envolvimento da depleção das monoaminas no quadro de dor crônica da FM, ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas receberam reserpina, pela via subcutânea, 1 mg/kg, durante três dias consecutivos. Foi observada uma redução no limiar de pressão muscular até o 10º dia após a indução do modelo, em machos, e até o 7º dia, em fêmeas. O estudo mostrou, também, uma redução no limiar de resposta tátil dos animais machos até o 21º e das fêmeas até o 14º dia. Além disso, as concentrações de serotonina, dopamina e noradrenalina apresentaram redução significativa por até vinte e um dias após a indução do modelo nas regiões do tálamo, da medula espinal e do córtex pré-frontal (NAGAKURA et al., 2009).

A fim de se estudar o componente emocional da dor, a equipe de Nagakura realizou teste do nado forçado, que avalia o comportamento tipo-depressivo dos animais. O tempo de imobilidade dos animais tratados com reserpina foi maior do que o do grupo controle até o 14º após a indução do modelo. Neste protocolo também foram avaliados fármacos utilizados na clínica, como a pregabalina, duloxetina, pramipexole e diclofenaco, que apresentaram resultados na redução da hiperalgesia mecânica, com exceção do diclofenaco (NAGAKURA et al., 2009).

Quando avaliado sob a ótica das validades, o modelo descrito acima cumpre a validade de face, uma vez que a diminuição prolongada do limiar de pressão muscular e da alodínia mimetiza a dor muscular dos pacientes com FM, além de conseguir induzir um quadro tipo depressivo nos animais, comorbidade comum. Também apresenta as validades de constructo, pois o modelo não gera nenhuma doença orgânica e apresenta a redução das concentrações das aminas biogênicas semelhante ao observado em pacientes; e preditiva, já que os fármacos comumente utilizados para tratar a FM atenuam a nocicepção induzida pela reserpina (NAGAKURA et al., 2009; BEPPLER, 2018)

2 JUSTIFICATIVA

A FM apresenta uma sintomatologia bastante variada e complexa capaz de influenciar negativamente na vida pessoal, familiar e profissional do indivíduo acometido por esta síndrome, além do impacto financeiro resultante de atendimentos médicos, tratamentos complementares e remédios (SCHUG; GODDARD, 2014). Na sociedade, não se pode deixar de citar a sobrecarga dos sistemas de saúde e a dificuldade de inserção e de permanência no mercado de trabalho do paciente diagnosticado com FM (SCHAEFER et al., 2011). Com uma fisiopatologia ainda não elucidada (STAUD, 2006) e tratamentos farmacológicos que não atendem a todos os pacientes além de apresentarem efeitos colaterais (OKIFUJI, 2016), é de extrema importância o estudo da FM para que se possam compreender as suas causas, a sua ação no organismo, a correlação com outras doenças associadas e as formas mais eficientes de se tratar este conjunto de sintomas. Os modelos de estudos pré-clínicos da FM são uma forma de tentar responder estas questões. Levando-se em consideração todo o potencial existente no uso de plantas medicinais, o efeito antinociceptivo do extrato de *E. brasilienses* já descritos na literatura sugerem esta planta como uma possível opção para o tratamento da FM, justificando sua escolha neste estudo (KIRKPATRICK, 2002; SIMÕES et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico da planta *Eugenia brasiliensis* no modelo animal de fibromialgia induzido pela reserpina em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do extrato hidroalcoólico da planta *Eugenia brasiliensis* na resposta sensorial tátil de alodinia
- Analisar o efeito do extrato hidroalcoólico da planta *Eugenia brasiliensis* na resposta sensorial ao estímulo térmico de frio
- Examinar o efeito do extrato hidroalcoólico da planta *Eugenia brasiliensis* na resposta emocional associada a dor

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) *Swiss* fêmeas, com idade entre dois e três meses e peso entre 35 e 40 gramas, oriundos do Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI), localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS/CCB), durante todo o período de experimentação. Os 36 animais utilizados neste estudo foram subdivididos em grupos de três e alocados em caixas de polipropileno (32x20x21 cm) acopladas a uma estante de mini-isolador ventilado (ALESCO, série vent-life) que garante a troca de ar adequada para uma melhor qualidade de vida dos animais. As condições do ambiente são controladas, com temperatura de 22° C, ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água filtrada (Jojaco®) e ração (BioBase para roedores) proveniente do Biotério Central da UFSC. Antes do início dos experimentos, os animais foram submetidos a avaliação da resposta sensorial tátil (teste de von Frey) e, a partir deste, foram divididos em grupos de forma randomizada. Todos os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê do Uso Ético dos Animais da UFSC (CEUA/UFSC) (Protocolo 9675020317 e 8939170718).

4.2 INDUÇÃO DO MODELO DE FIBROMIALGIA

Para a indução do modelo de FM foi utilizada a Reserpina (Sigma-Aldrich, USA), em modelo adaptado de Nagakura e colaboradores (2009), conforme realizado em estudos prévios no laboratório. A reserpina foi administrada aos animais na dose de 0,25 mg/kg, por via subcutânea (s.c.), uma vez ao dia, por três dias consecutivos (KLEIN et al., 2014). Para isso, foi preparada uma solução estoque de reserpina com 10 mg em 1 ml de salina e 5% de Tween 80. A partir desta, foi preparada a dose de 0,25 mg/kg de reserpina utilizada para a indução do modelo. Após os três dias de administração consecutiva da reserpina foi dado início as avaliações experimentais. Os dias de experimento foram contabilizados a partir da última administração de reserpina, assim a marcação temporal “1° dia” se refere ao primeiro

dia após a indução do modelo. Os animais foram divididos em seis grupos, dos quais cinco receberam a reserpina (s.c.) para indução do modelo de FM e um grupo recebeu apenas o veículo (s.c.).

4.3 TRATAMENTO

O extrato hidroalcoólico de *Eugenia brasiliensis* (EHEb) foi fornecido pelo Laboratório coordenado pela professora doutora Michele Debiase Alberton, localizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB). Este extrato foi obtido das folhas de *E. brasiliensis* e sua diluição realizada em solução salina 0,9%, com administração por via intragástrica (i.g.). O tratamento foi realizado uma vez ao dia, sempre uma hora antes da aplicação do protocolo experimental, a partir do primeiro dia após a indução do modelo de FM – o primeiro dia após os três dias de administração da reserpina.

Com o intuito de observar a ação do EHEb no modelo de FM induzido pela Reserpina, os animais foram divididos em seis grupos e tratados com quatro doses previamente definidas do EHEb: 10, 30, 100 e 300 mg/kg (i.g.). Os outros dois grupos foram tratados com veículo do extrato (i.g.), conforme Quadro 2.

4.3.1 Obtenção e preparo do material vegetal

O extrato foi produzido a partir de folhas da planta *E. brasiliensis* coletadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, em março de 2012 (27°36'13.65"S, 48°31'14.75"L). Após a coleta, o material foi identificado pelo professor doutor Daniel de Barcelos Falkenberg, do Departamento de Botânica da UFSC, e uma exsiccata foi armazenada no Herbário FLOR da UFSC sob número 34675. Este material vegetal passou por processos de secagem e de moagem e, em seguida, foi macerado em solução hidroalcoólica, onde permaneceu por sete dias. Após este período, a solução foi filtrada e seca até a evaporação total do solvente, resultando no extrato bruto utilizado no tratamento dos animais neste trabalho.

Quadro 2: Identificação dos grupos de animais utilizados no estudo.

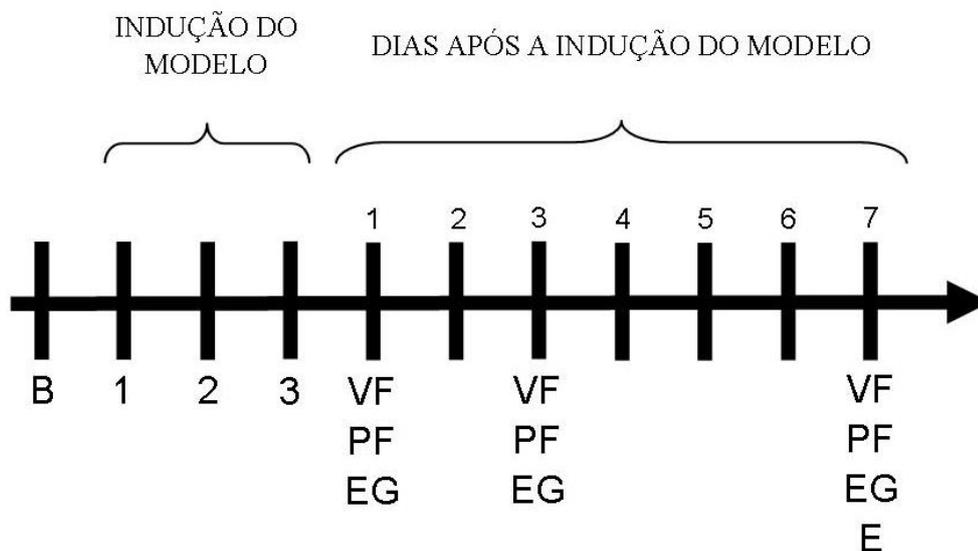
| Grupos | Tratamento |
|----------------------------|--|
| Salina + Veículo | Foi administrado veículo da Reserpina (10 ml/kg) (s.c.) por três dias consecutivos e os animais foram tratados com veículo do EHEb (10 ml/kg) (i.g.) |
| Reserpina + EHEb 10 mg/kg | Foi administrado Reserpina (s.c.) por três dias consecutivos e os animais foram tratados com EHEb (10 mg/kg) (i.g.) |
| Reserpina + EHEb 30 mg/kg | Foi administrado Reserpina (s.c.) por três dias consecutivos e os animais foram tratados com EHEb (30 mg/kg) (i.g.) |
| Reserpina + EHEb 100 mg/kg | Foi administrado Reserpina (s.c.) por três dias consecutivos e os animais foram tratados com EHEb (100 mg/kg) (i.g.) |
| Reserpina + EHEb 300 mg/kg | Foi administrado Reserpina (s.c.) por três dias consecutivos e os animais foram tratados com EHEb (300 mg/kg) (i.g.) |
| Reserpina + Veículo | Foi administrado Reserpina (s.c.) por três dias consecutivos e os animais foram tratados com veículo do EHEb (10 ml/kg) (i.g.) |

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

A representação temporal da indução do modelo de FM seguido das avaliações comportamentais realizadas neste trabalho pode ser acompanhada na figura 6.

Figura 6: Esquema do desenho experimental.



Legenda dos testes realizados: Basal (B); Von Frey (VF); Placa Fria (PF); Escala *Grimace* (EG); Eutanásia (E). Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

4.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Os pacientes com FM apresentam hipersensibilidade a estímulos mecânicos e térmicos. Com o intuito de investigar estas características da FM, foi avaliada a resposta nociceptiva dos animais a estímulos mecânicos e térmicos e também foi analisada a resposta subjetiva associada à emocionalidade dos animais a dor.

4.5.1 Avaliação da sensibilidade ao estímulo mecânico

A avaliação da alodinia mecânica foi realizada através do teste de filamentos de von Frey, método *up and down*, similar ao descrito por Chaplan et al. (1994). Após serem tratados com o EHEb (i.g.), os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico (9x7x11 cm) sem fundo, que por sua vez estavam apoiadas sob plataformas de malha de arame fenestrado elevadas a uma altura de 30 centímetros da bancada, permitindo acesso a superfície ventral da pata traseira direita (BOBINSKI, et al., 2011). Os animais foram aclimatados por 30 minutos e o experimento começou uma hora após o tratamento com EHEb. Para o teste, os filamentos de Von Frey (0,02; 0,07; 0,16; 0,4; 1,4; 4,0 gramas; VFH, Stoelting, Chicago, EUA) foram pressionados, verticalmente, na superfície plantar do membro posterior direito até ocorrer uma curvatura do filamento (Figura 7). A avaliação foi

iniciada com o filamento de 0,4 g e nos casos em que o animal retirou a pata em resposta a este contato, o próximo filamento utilizado apresentava uma gramatura inferior; quando o animal não removia a pata, a troca foi feita por um filamento de gramatura superior, seguindo este padrão até o final do teste (HERVERA et al., 2010). O limiar de resposta foi calculado utilizando o programa Microsoft Excel®.

Figura 7: Imagem da aplicação dos filamentos de Von Frey na para posterior direita de um dos animais durante o experimento.



Fonte: Beppler, 2018.

4.5.2 Avaliação da sensibilidade ao estímulo térmico

A Placa Fria (AVS system, cold-hot plate, São Paulo, SP, Brazil) foi utilizada para avaliar a hipersensibilidade dos animais a estímulos frios. Os animais foram colocados individualmente em um aparato cônico, sem fundo e de vidro (11,8 cm de raio) apoiado sobre uma placa com temperatura de $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de corte de 120 segundos (Figura 8). O teste consistiu em avaliar a resposta dos animais à temperatura reduzida da placa através do tempo de latência para a exibição de comportamentos nociceptivos, como retirada, movimentos bruscos e lambida da pata traseira direita, conforme descrito por MIKA et al. (2015). Para o teste, os animais foram aclimatados sobre a placa do aparato por cinco minutos, antes do início do protocolo experimental.

Figura 8: Imagem de um dos animais na Placa Fria durante a avaliação da sensibilidade térmica.

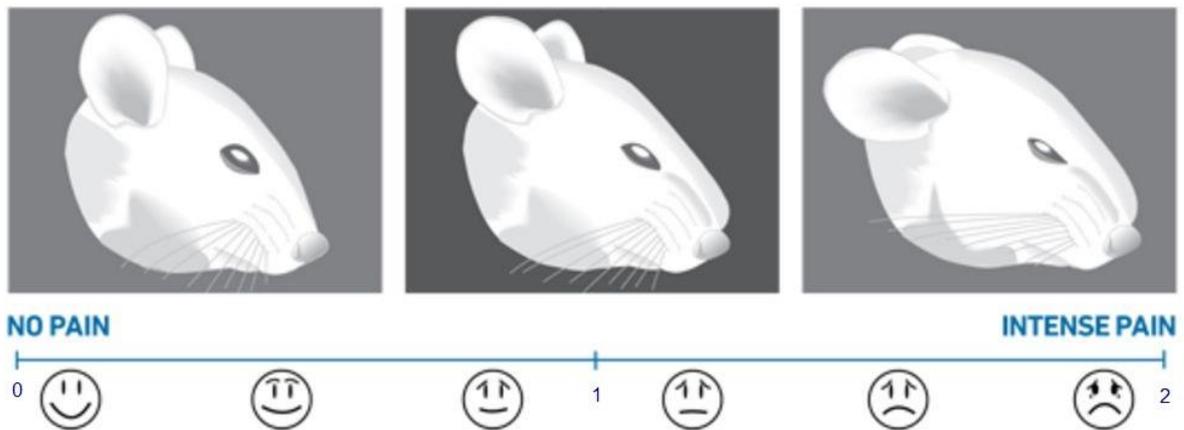


Fonte: Beppler, 2018.

4.5.3 Avaliação subjetiva associada à emocionalidade da dor

A escala Grimace (Anexo D), desenvolvida por Langford e colaboradores (2010), foi utilizada para avaliar as expressões faciais de dor dos camundongos, auxiliando, assim, na compreensão da experiência de dor espontânea dos animais. Para que isto seja possível, são avaliados cinco parâmetros: o estreitamento da área orbital, a protuberância do nariz, a protuberância do rosto através da aparência do músculo da bochecha, a alteração na posição das orelhas e a alteração na posição das vibrissas. Estes parâmetros são classificados de acordo com um escore que varia entre 0 (não presente), 1 (moderadamente visível) e 2 (severo), conforme mostra a figura 9. Para este teste, os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico (9x7x11 cm) por 30 minutos e, em seguida, foi realizada a observação e pontuação dos parâmetros descritos acima a fim de se avaliar a expressão facial do animal.

Figura 9: Desenho esquemático das alterações faciais analisadas na Escala Grimace



Fonte: adaptado de Wootton, 2010.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no software Graph Pad Prism for Windows versão 6.01 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, EUA). Os testes realizados consistiram na análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Turkey, para múltiplas comparações. Os resultados foram expressos como média + erro padrão da média (E.P.M.) dos dados analisados. Para todas as análises foi empregado um nível de significância para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DO EHEb NO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS COM FIBROMIALGIA: ALODINIA MECÂNICA

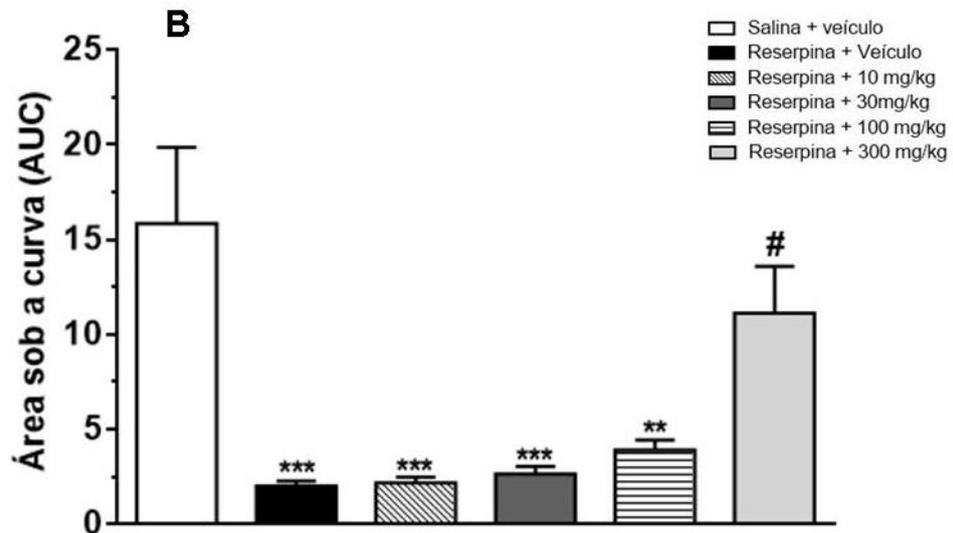
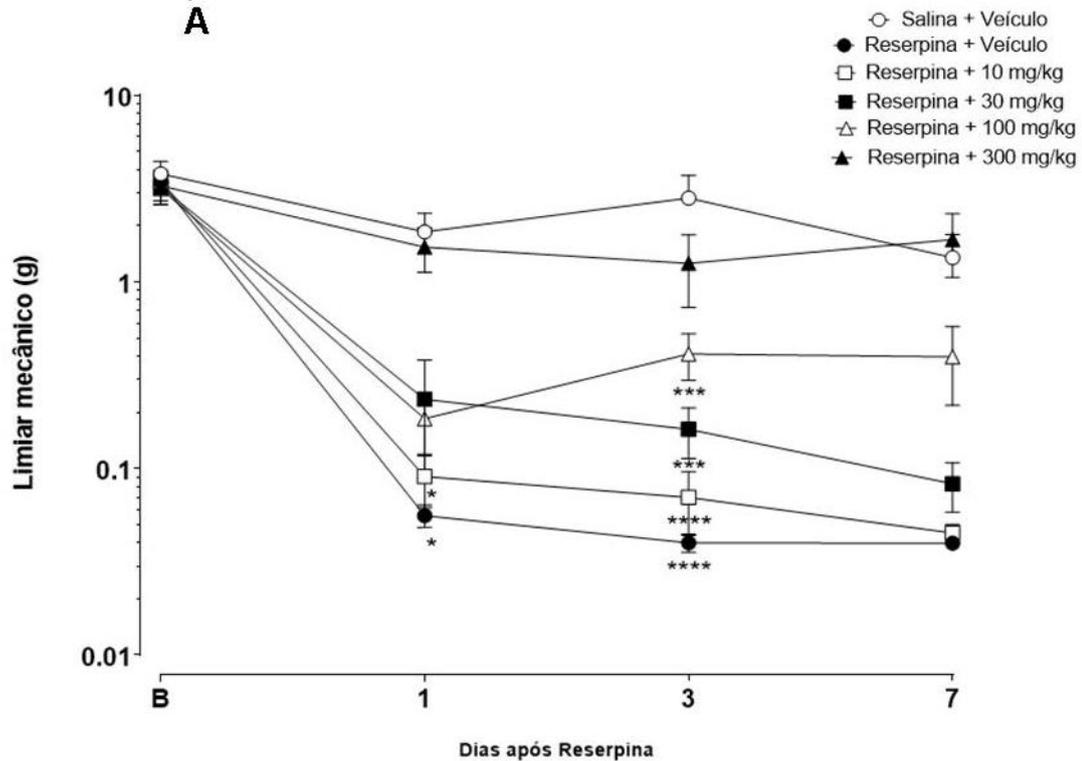
Seguindo o modelo de indução de FM descrito acima e previamente padronizado no nosso laboratório (LANDI) em camundongos fêmeas, a avaliação da sensibilidade ao estímulo mecânico foi realizada por meio do teste de filamentos de von Frey. Este estudo demonstra que todos os grupos partiram de um mesmo limiar basal (B) de sensibilidade mecânica e que esta resposta começou a variar entre os grupos após a administração da reserpina, permanecendo os grupos Salina + Veículo e o Reserpina + Veículo com o limiar mecânico mais alto e mais baixo entre os grupos, respectivamente. A avaliação do efeito do EHEb ocorreu no primeiro, terceiro e sétimo dia após a indução do modelo e uma hora após o tratamento com EHEb.

A Figura 10 mostra que o EHEb promoveu uma redução dependente de dose na alodinia mecânica presente no modelo de FM induzida pela reserpina. Os dados apresentados na figura 10A mostram comportamentos nociceptivos diferentes entre os grupos tratados com EHEb nas diferentes doses. O grupo Reserpina + EHEb 300 mg/kg apresentou resposta semelhante ao grupo Salina + Veículo nos três dias de avaliação. Já o grupo Reserpina + EHEb 10 mg/kg apresentou resposta semelhante ao grupo Reserpina + Veículo, no mesmo período temporal, apresentando diferença significativa com o grupo Salina + Veículo no primeiro e no terceiro dia, com $P < 0,05$ e $P < 0,0001$, respectivamente.

O grupo Reserpina + EHEb 30 mg/kg apresentou uma queda no limiar mecânico após a administração da reserpina, se aproximando da resposta do grupo Reserpina + Veículo ao longo dos 7 dias de experimento, apresentando diferença significativa com o grupo Salina + Veículo no terceiro dia ($P < 0,001$). A resposta do grupo Reserpina + EHEb 100 mg/kg foi similar, apresentou uma diferença significativa com o Salina + Veículo no terceiro dia ($P < 0,001$), porém o limiar de sensibilidade dos animais aumentou no sétimo dia. A Fig. 10B mostra os dados da área sob a curva e confirma que os animais do grupo Reserpina + Veículo apresentaram menor área sob a curva em relação ao grupo Salina + Veículo, indicando maior

resposta de dor. Além disto, pode-se observar que somente o grupo Reserpina + EHEb 300 mg/kg foi significativamente maior em relação ao grupo Reserpina + Veículo.

Figura 10: Efeito do tratamento com EHEb na alodinia mecânica.



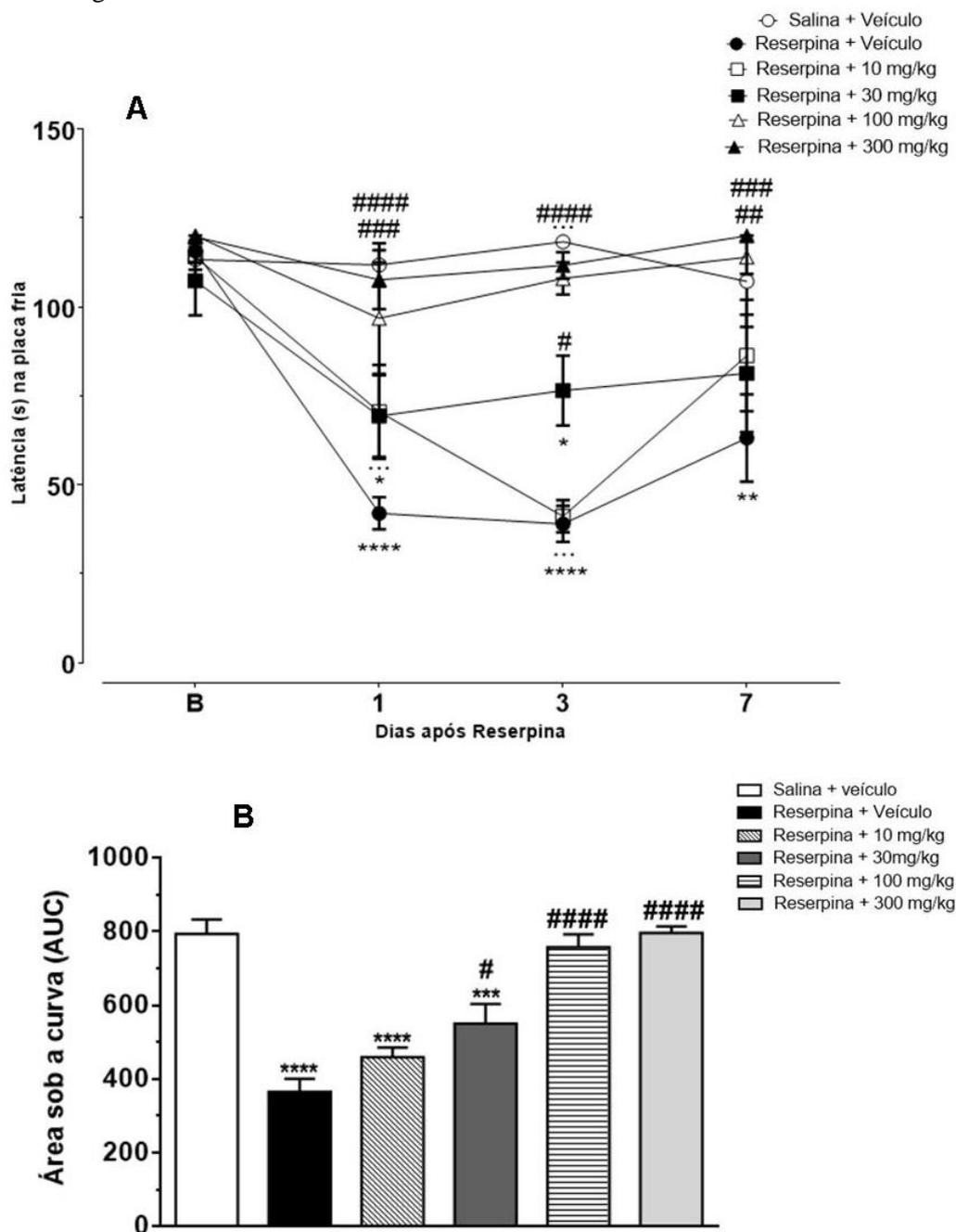
Legenda: O painel A apresenta o efeito da administração de *E. brasiliensis* na sensibilidade mecânica dos animais com fibromialgia, enquanto o painel B apresenta a área sob a curva deste efeito. Cada ponto representa grupos de 6 animais, e a linha vertical indica o S.E.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância comparados ao grupo Salina + Veículo. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 e ****P < 0,0001. Os sustentados denotam os níveis de significância comparados ao grupo Reserpina + Veículo. #P < 0,05. (ANOVA de duas vias seguido do teste Turkey). B: limiar basal; 1: primeiro dia após administração da reserpina; 3: terceiro dia após administração da reserpina; 7: sétimo dia após administração da reserpina. Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

5.2 EFEITO DO EHEb NO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS COM FIBROMIALGIA: HIPERALGESIA TÉRMICA AO FRIO

Com o intuito de avaliar o efeito do EHEb na sensibilidade térmica ao frio, foi realizado o teste da Placa Fria, no primeiro, terceiro e sétimo dia após a indução do modelo e logo após ao teste de von Frey. Foi possível observar que todos os grupos partiram de um tempo de latência basal (B) similar e que o tempo de permanência na superfície do aparato variou entre os grupos após a administração da reserpina. A média de resposta do grupo Salina + Veículo permaneceu próxima ao teto de 120 segundos durante todo o experimento, exceto no sétimo dia quando apresentou ligeira queda, com diferença estatística significativa em relação ao grupo Reserpina + Veículo no primeiro e terceiro dia ($P < 0,0001$).

A Figura 11 mostra que o grupo Reserpina + EHEb 300 mg/kg apresentou resposta similar ao Salina + Veículo, com diferença significativa em relação ao grupo Reserpina + Veículo nos três dias de teste ($P < 0,001$ nos dias 1 e 7 e $P < 0,0001$ no dia 3). Comportamento similar foi apresentado pelo grupo Reserpina + EHEb 100 mg/kg, com diferença significativa nos dias 3 e 7 ($P < 0,0001$ e $P < 0,01$, respectivamente) em relação ao grupo Reserpina + Veículo. Já os grupos Reserpina + EHEb 30 mg/kg e Reserpina + EHEb 10 mg/kg apresentaram resposta similar ao grupo Reserpina + Veículo, com tempo de permanência na Placa Fria mais baixo no primeiro dia e gradualmente maior nos dias seguintes, terminando o sétimo dia com uma diferença menor entre os seis grupos. A Fig. 11B mostra os dados da área sob a curva e confirma que os animais do grupo Reserpina + Veículo apresentaram menor área sob a curva em relação ao grupo Salina + Veículo, indicando maior resposta de dor. Além disto, pode-se observar que as áreas dos grupos Reserpina + EHEb 30 mg/kg, Reserpina + EHEb 100 mg/kg e Reserpina + EHEb 300 mg/kg foram significativamente maior em relação ao grupo Reserpina + Veículo.

Figura 11: Efeito do tratamento com EHEB na sensibilidade térmica ao frio.



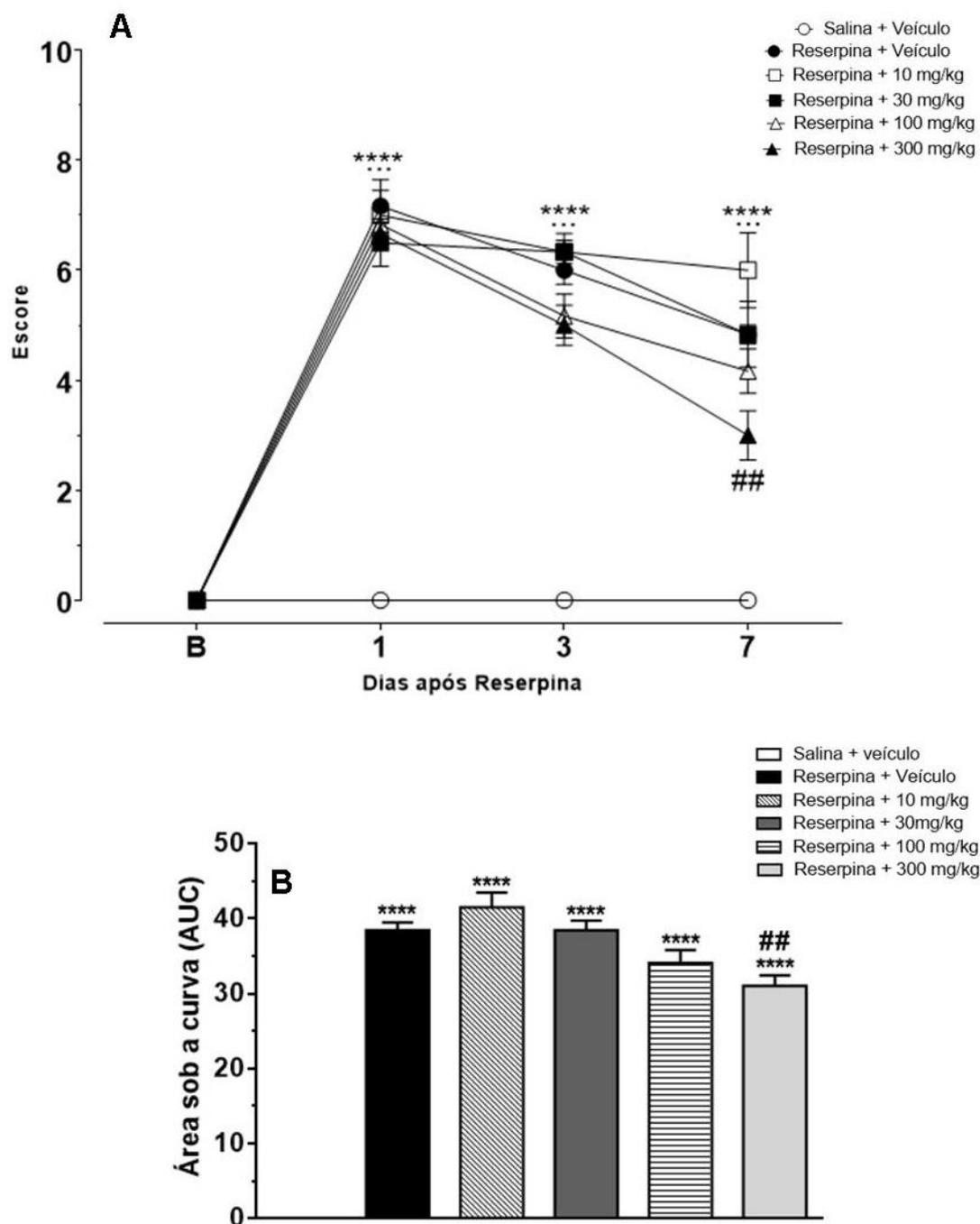
Legenda: O painel A apresenta o efeito da administração de *E. brasiliensis* na sensibilidade térmica dos animais com fibromialgia, enquanto o painel B apresenta a área sob a curva deste efeito. Cada ponto representa grupos de 6 animais, e a linha vertical indica o S.E.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância comparados ao grupo Salina + Veículo. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 e ****P < 0,0001. Os sustenidos denotam os níveis de significância comparados ao grupo Reserpina + Veículo. #P < 0,05; ##P < 0,01; ###P < 0,001 e ####P < 0,0001. (ANOVA de duas vias seguido do teste Turkey). B: limiar basal; 1: primeiro dia após administração da reserpina; 3: terceiro dia após administração da reserpina; 7: sétimo dia após administração da reserpina. Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

5.3 EFEITO DO EHEb NO COMPORTAMENTO EMOCIONAL DOS ANIMAIS COM FIBROMIALGIA: PONTUAÇÃO NA ESCALA *GRIMACE*

A Figura 12 mostra o efeito do EHEb na média de pontuação dos animais no teste de *Grimace*. Esta escala foi utilizada com a finalidade de avaliar o componente emocional subjetivo no quadro de dor generalizada dos animais tratados com reserpina. A análise da expressão facial dos animais foi realizada logo antes do início do teste de von Frey, no primeiro, terceiro e sétimo dia após a indução do modelo, uma hora após o tratamento com o EHEb. Os dados demonstram que, em avaliação prévia a administração de reserpina, todos os animais receberam escore zero em todos os cinco parâmetros avaliados, partindo, assim, de uma mesma média basal (B). A pontuação do grupo Salina + Veículo permaneceu linear durante os três dias de teste. A Fig. 12B mostra os dados da área sob a curva e confirma que os animais do grupo Reserpina + Veículo apresentaram menor área sob a curva em relação ao grupo Salina + Veículo, indicando maior resposta de dor. Além disto, pode-se observar que somente o grupo Reserpina + EHEb 300 mg/kg foi significativamente maior em relação ao grupo Reserpina + Veículo.

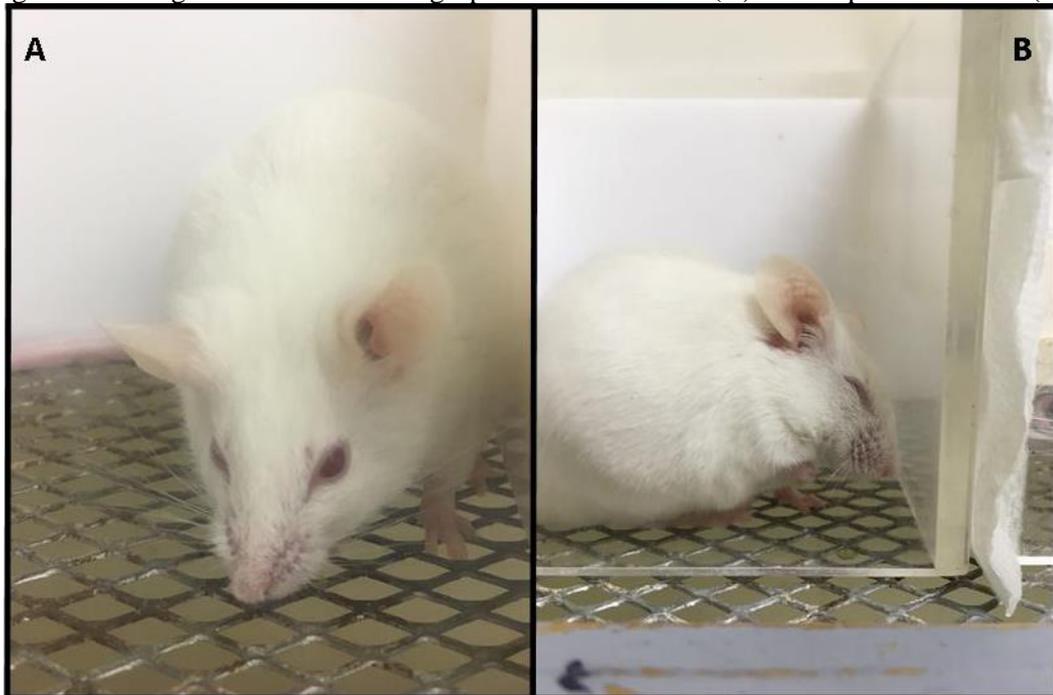
Após os três dias de administração da reserpina, foi possível observar alterações nas expressões faciais dos camundongos (Figura 13), indicando que os animais apresentaram algum grau de nocicepção. Todos os animais dos grupos de receberam reserpina apresentaram um aumento relevante no escore do teste, com a mesma diferença estatística em relação ao grupo Salina + Veículo durante os três dias de avaliação ($P < 0,0001$). No sétimo dia, a pontuação do grupo Reserpina + EHEb 300 mg/kg começou a diminuir, se aproximando do Salina + Veículo, o que resultou em uma diferença significativa entre aquele e o grupo Reserpina + Veículo ($P < 0,01$).

Figura 12: Efeito do tratamento com EHEb no componente emocional associado a dor (Escala *Grimace*).



Legenda: O painel A apresenta o efeito da administração de *E. brasiliensis* na variação do escore da Escala *Grimace* dos animais com fibromialgia, enquanto o painel B apresenta a área sob a curva deste efeito. Cada ponto representa grupos de 6 animais, e a linha vertical indica o S.E.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância comparados ao grupo Salina + Veículo. **** $P < 0,0001$. Os sustentados denotam os níveis de significância comparados ao grupo Reserpina + Veículo. ## $P < 0,01$. (ANOVA de duas vias seguido do teste Turkey). B: limiar basal; 1: primeiro dia após administração da reserpina; 3: terceiro dia após administração da reserpina; 7: sétimo dia após administração da reserpina. Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 13: Fotografias de animais do grupo Salina + Veículo (A) e Reserpina + Veículo (B).



Legenda: Ilustração da diferença na expressão facial entre animais de grupos diferentes. Destaque para a diferença na abertura orbital, posição das orelhas e aparência das bochechas dos dois animais. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

6 DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado com a intenção de somar à literatura já existente possíveis novos tratamentos para a FM e também de expandir o conhecimento sobre o uso e a eficácia da planta medicinal *E. brasiliensis*. A FM foi induzida conforme descrito por Nagakura e colaboradores (2009) devido a sua robustez, uma vez que atende aos três postulados necessários para se validar um modelo, os quais são validade de analogia, preditiva e teórica (NAGAKURA, 2009). Este modelo foi anteriormente padronizado em camundongos fêmeas, devido a alta prevalência da síndrome em mulheres, pela nossa equipe do LANDI e apresentou resultados condizentes com o que se observa na literatura, reforçando a consistência desta metodologia (BEPPLER, 2018).

Os pacientes com FM apresentam hipersensibilidade a diversos tipos de estímulos, entre estes, o tátil. É comum que pessoas com a síndrome apresentem uma resposta dolorosa desproporcional a intensidade do estímulo aplicado. Outra característica comum é a presença de sensação dolorosa frente a estímulos inócuos a pessoas saudáveis (BRADLEY, 2009). Assim, a avaliação da sensibilidade mecânica nos estudos de FM é essencial para a reprodução fiel da sintomatologia. Os dados obtidos nesta pesquisa, após a indução da FM através da administração da reserpina, vão ao encontro do que já vem sendo mostrado em estudo pré-clínicos e clínicos.

Os animais que receberam reserpina apresentaram hiperalgesia mecânica no primeiro, terceiro e sétimo dia de avaliação. Este era o resultado esperado, uma vez que Beppler (2018) demonstrou que o quadro de dor generalizada permanece até o 21º dia após a indução do modelo em camundongos, dado semelhante ao exposto por Nagakura e colaboradores (2009) que constataram a permanência de um baixo limiar de resposta a estímulos mecânicos até o 14º dia, em ratas. Em recente estudo, Nagakura e colaboradores (2018) avaliam a possível relação entre a disfunção no sistema de monoaminas causada pela reserpina e o quadro algíco dos animais. Os dados apresentados pela equipe indicam que a diferença no limiar mecânico entre o grupo que recebeu reserpina e o grupo salina permanece significativa até o sétimo dia de testes (NAGAKURA et al., 2018).

O ser humano possui a capacidade de perceber e identificar estímulos térmicos nocivos ao seu organismo, a fim de tomar medidas que evitem qualquer prejuízo para o

indivíduo (MCKEMY, 2013). As estruturas envolvidas neste processo de percepção térmica estão no trato espinotalâmico, responsável por levar as informações relacionadas à temperatura ao encéfalo, através das fibras nervosas que conduzem este estímulo e dos termorreceptores (como os TRP's) que captam a informação do ambiente. O que acontece em algumas patologias é o desenvolvimento de uma resposta exacerbada a baixas temperaturas (BELMONTE; BROCK; VIANA, 2009; YIN et al., 2015).

Esta é uma ocorrência comum a pacientes com FM - uma resposta dolorosa a estímulos térmicos, principalmente ao frio (BRADLEY, 2009). Os resultados obtidos neste estudo demonstram uma redução no tempo de latência na Placa Fria dos animais que receberam reserpina em relação ao grupo salina. Esta redução foi observada no primeiro e terceiro dias, com leve aproximação ao grupo salina no sétimo dia de experimento. Esses dados vão ao encontro do que foi observado por Beppler (2018), onde também foi verificada uma redução no tempo de permanência na superfície do aparato no primeiro e no sexto dia de avaliação.

Algumas pesquisas realizadas nas últimas décadas têm apontado uma relação entre a depleção de monoaminas causada pela reserpina e a interpretação dos estímulos térmicos pelo hipotálamo (CRANSTON; ROSENDORFF, 1967), além da interferência que este desequilíbrio pode estar causando no recebimento, na interpretação e no controle dos estímulos térmicos (TAN; KNIGHT, 2018). Ishiwata & Greenwood (2017) observaram um aumento de serotonina no hipotálamo de ratos expostos a temperaturas de 5°C por períodos de três horas, indicando um possível mecanismo de produção de calor quando o animal está exposto a baixas temperaturas. Com este sistema monoaminérgico prejudicado, também estaria prejudicado o mecanismo de produção de calor, o que pode ter conexão com o baixo limiar de tolerância ao frio presente na FM.

Na tentativa de expandir a avaliação do modelo de FM para além dos testes de quantificação de sensibilidade mecânica e térmica, foi realizada, também, uma investigação subjetiva buscando identificar o componente emocional presente no quadro nociceptivo. Esta análise foi verificada por meio da utilização da Escala *Grimace*, que mensura, por meio de escores, a expressão facial dos animais para cinco parâmetros indicativos de comportamento nociceptivo. Este estudo mostrou, através da aplicação desta escala, que os animais apresentaram uma modificação facial perceptível compatível com o que foi proposto por Langford e colaboradores (2010) como uma expressão facial compatível com a experiência dolorosa.

Os animais tratados com reserpina apresentaram um aumento na pontuação na escala no primeiro, terceiro e sétimo dia após a indução do modelo, novamente indo ao encontro do que foi observado por Beppler (2018) que demonstrou uma variação semelhante nos dez primeiros dias após a indução do modelo. A avaliação do estado emocional dos animais em processo álgico verificado pela Escala *Grimace* tem sido realizada nas mais diversas pesquisas com animais, como em modelos de craniotomia (CHO et al., 2019), indução cirúrgica de infarto do miocárdio (FALLER et al., 2014) e injeção intra-plantar de carragenina (LEUNG et al., 2016).

O presente estudo verificou que o extrato da planta medicinal de *E. brasiliensis* foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo causado pela administração de reserpina quando avaliado nos testes de von Frey e Placa Fria, na dose de 300 mg/kg. O extrato foi também eficaz na redução da pontuação da Escala *Grimace* dos animais que receberam a dose de 300 mg/kg, corroborando com o que foi observado nos testes de sensibilidade mecânica e térmica ao frio. A atividade antinociceptivo do EHEb já havia sido investigada por Simões e colaboradores (2018) que mostraram a eficácia do extrato em modelos de dor inflamatória visceral e somática em camundongos. O efeito no comportamento tipo-depressivo dos animais também foi estudado por Colla e colaboradores (2012) que mostraram uma redução na imobilidade de animais tratados com a planta no teste da suspensão pela cauda. É possível que este efeito do EHEb esteja relacionado com a interação de compostos fenólicos presentes na planta no sistema monoaminérgico, interferindo, assim, na disponibilidade destes neurotransmissores na fenda sináptica (MACHADO et al., 2008). Esta hipótese de atuação do EHEb nas vias moniaminérgicas pode explicar a eficácia do tratamento da *E. brasiliensis* neste trabalho.

Os resultados obtidos nesta pesquisa fortalecem o que já está descrito na literatura relacionado ao modelo animal de FM induzido pela reserpina e também aos efeitos antinociceptivos do extrato da planta medicinal *E. brasiliensis*. Estes dados representam um segmento inicial da avaliação do efeito do EHEb no modelo de FM induzida pela reserpina, onde foram avaliados componentes sensoriais de dor - a hiperalgesia mecânica e térmica. Os resultados positivos alcançados nesta etapa estimulam a continuidade e o desenvolvimento de novas etapas deste estudo, expandindo as análises para componentes emocionais da dor

através de testes que avaliam o comportamento tipo-depressivo e anedônico dos animais a fim de se complementar o entendimento da ação do EHEb na sintomatologia geral da FM.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se com este trabalho que a reserpina foi capaz de induzir um quadro nociceptivo similar ao da FM, no qual os animais apresentaram hipersensibilidade a estímulos mecânicos e térmicos, e onde também foi possível observar alterações na expressão facial condizentes com os aspectos emocionais de dor. Foi observado durante o estudo que o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *E. brasiliensis* foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo dos animais, na dose de 300 mg/kg, mostrando o efeito antinociceptivo da planta. Mais estudos são necessários para se expandir o conhecimento sobre a eficácia do EHEb na sintomatologia diversa da FM.

REFERÊNCIAS

- ABLIN, J. N.; HÄUSER, W.; BUSKILA, D. Spa Treatment (Balneotherapy) for Fibromyalgia—A Qualitative-Narrative Review and a Historical Perspective. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2013, s.n., p.1-5. 2013.
- ARREOLA, R. et al. Immunomodulatory Effects Mediated by Serotonin. **Journal of Immunology Research**. v.2015, s.n., p. 1-21. 2015.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Leaves of *Eugenia uniflora* L. (pitanga): pharmacobotanic, chemical and pharmacological properties. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 52, p. 55–61. 2003.
- BANNISTER, K.; DICKENSON, A. H. What do monoamines do in pain modulation?. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**. v.10, n.2, p.143-148. 2016.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**. v.139, n.2, p.267-284. 2009.
- BASSO, L. A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.100, n.6, p.457-506. 2005.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. Tradução de Carla Dalmaz et al. Porto Alegre, Artmed, 2008.
- BELLATO, E. et al. Fibromyalgia Syndrome: Etiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. **Pain Research and Treatment**. v.2012, s.n., p.1-17. 2012.
- BELMONTE, C.; BROCK, C. A.; VIANA, F. Converting cold into pain. **Experimental Brain Research**. v. 196, p. 13-30. 2009.
- BEPPLER, L. M. **Efeito do extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata* no modelo de fibromialgia induzido pela reserpina em camundongos**. 2018. 103 p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- BERGER, A. et al. Characteristics and healthcare costs of patients with fibromyalgia syndrome. **International Journal of Clinical Practice**. v. 61, s.n., p. 1498-1508. 2007.
- BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**. v. 194, n. 27, p. 337–348. 2011.
- BRADLEY, L. A. Pathophysiology of Fibromyalgia. **American Journal of Medicine**. v. 122, n. 12, p. 1-13. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PN-PIC) no Sistema Único de Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Diário Oficial da União, Brasília, 04 mai 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Portaria nº 2.960, de 09 de dezembro de 2008. Diário Oficial da União, Brasília, 10 dez 2008.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-89. 2000.

CAVALCANTE, AB, et al. A Prevalência de Fibromialgia: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 46, n. 1, p. 40-48, 2006.

CHAPLAN, SR, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 53, p. 55-63. 1994.

CHO, C. et al. Evaluating analgesic efficacy and administration route following craniotomy in mice using the grimace scale. **Scientific Reports**. v. 9, n. 1, p. 1-9. 2019.

CHOY, E. The role of sleep in pain and fibromyalgia. **Nature Reviews Rheumatology**. v. 11, n. 10, p. 513-520. 2015.

COLLA, G., et al. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressantlike effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 143, p. 720–731. 2012.

CRANSTON, W. I.; ROSENDORFF, C. Central temperature regulation in the conscious rabbit after monoamine oxidase inhibition. **Journal of Physiology**. v. 193, p.359-373. 1967.

CROFFORD, L. J. et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis perturbations in patients with fibromyalgia. **Arthritis & Rheumatism**. v.37, n.11, p.1583-1592. 1994.

CZÉH, B.; NAGY, S.A. Clinical Findings Documenting Cellular and Molecular Abnormalities of Glia in Depressive Disorders. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. v.11, n.56, p.1-16. 2018.

FALLER, K.M.E. et al. Refinement of analgesia following thoracotomy and experimental myocardial infarction using the Mouse Grimace Scale. **Experimental Physiology**. v. 100, n. 2, p. 164-172. 2014.

FITZCHARLES, MA.; YUNUS, M.B. The Clinical Concept of Fibromyalgia as a Changing Paradigm in the Past 20 Years. **Pain Research and Treatment**. v. 2012, s.n., p.1-8. 2011.

FLORES, G. et al. Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. **Food Chemistry**. v. 134, n. 3, p. 1256–1262. 2012.

FONSECA, M.C.M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. **Espaço para o produtor**. Viçosa. 2012.

GAIAD, S.; CARVALHO, P. E. R. *Myrtaceae*. Árvore do conhecimento – Espécies arbóreas brasileiras. AGEITEC: Agência EMBRAPA de informação tecnológica. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT00fu1i7dcc02wyiv807nyi6ssr5gflc.html#>. Acesso em: 13 jun 2019.

GARMUS, T. T. et al. Extraction of phenolic compounds form pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, etanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 86, p. 4–14. 2014.

GOLAN, D.E. et al. **Princípios de Farmacologia**. A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2009.

GRANGES, G.; LITTLEJOHN, G. Pressure Pain Thershold in Pain- Free Subjects, in Patients with Chronic Regional Pain Syndromes, and in Patients with Fibromyalgia Syndrome. **Arthritis and Reumatism**. v. 36, n. 5, p.642-646. 1993.

HEIDARI, F.; AFSHARI, M.; MOOSAZADEH, M. Prevalence of fibromyalgia in general population and patients, a systematic review and meta-analysis. **Rheumatology International**. v.37, p.1527–1539. 2017.

HERVERA, A. et al. The Role of Nitric Oxide in the Local Antiallodynic and Antihyperalgesic Effects and Expression of -Opioid and Cannabinoid-2 Receptors during Neuropathic Pain in Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 334, n. 3, p 887– 896. 2010.

ISHIWATA, T.; GREENWOOD, B. N. Changes in thermoregulation and monoamine release in freely moving rats during cold exposure and inhibition of the ventromedial, dorsomedial, or posterior hypothalamus. **Journal of Comparative Physiology B**. s.v., s.n., p. 1-11. 2017.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. v. 413, p. 203-210. 2001.

KIA, S.; CHOY, E. Update on Treatment Guideline in Fibromyalgia Syndrome with Focus on Pharmacology. **Biomedicines**. v.5, n.20, p. 124. 2017.

KIRKPATRICK P. Antibacterial drugs: stitching together naturally. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.1, p. 748. 2002.

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.

LANGFORD, D.J. et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**. v. 7, n. 6, p. 447- 449. 2010.

- LEE, Y.; NASSIKAS, N.J.; CLAUW, D.J. The role of the central nervous system in the generation and maintenance of chronic pain in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and fibromyalgia. **Arthritis Research and Therapy**. v.13, n.211, p.1-10. 2011.
- LEUNG, V.; ZHANG, E.; PANG, D. S. J. Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. **Scientific Reports**. v. 6, n. 1667, p. 1-12. 2016.
- LOBAY, D. Rauwolfia in the Treatment of Hypertension. **Integrative Medicine**. v. 14, n. 13, p. 40-46. 2015.
- MACHADO, A. P. D. F. et al. Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. **Food Chemistry**. v. 231, p. 1–10. 2017.
- MACHADO, D. G. et al. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **European Journal of Pharmacology**. v. 587, s.n., p. 163-168. 2008.
- MAGINA, M. D. A. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**. v. 63, p. 345–350. 2009.
- MCKEMY, D. D. The Molecular and Cellular Basis of Cold Sensation. **American Chemical Society Neuroscience**. v. 4, p. 238-247. 2013.
- MIKA, J. et al. Effects of chronic doxepin and amitriptyline administration in naïve mice and in neuropathic pain mice model. **Neuroscience**. v. 294, p. 38–50. 2015.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**. v. 403, p. 853-858. 2000.
- NAGAKURA, Y. et al. Biogenic Amine Depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of Fibromyalgia. **Pain**. v. 146, p. 26-33. 2009.
- NAGAKURA, Y. et al. Monoamine system disruption induces functional somatic syndromes associated symptomatology in mice. **Physiology and Behavior**. v. 194, p. 505-514. 2018.
- OKIFUJI, A. et al. Management of fibromyalgia syndrome in 2016. **Pain Management**. v. 6, n. 4, p. 383-400. 2016.
- OLIVEIRA, R. N. et al. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. De diferentes localidades de Pernambuco. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 15, p. 39–43. 2005.
- PIETROVSKI, E. F., et al. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 60, p. 479–487. 2008.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012.

- REITZ, R. D.; KLEIN, R. M. Mirtáceas: Flora Ilustrada Catarinense [Myrtaceae: illustrated catarinense's flora]. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. Revilla, J., 2002. *Eugenia brasiliensis* In: REVILLA, J.(ed.) **Plantas úteis da Bacia Amazônica**. SEBRAE-AM/INPA, Manaus, p. 44. 1969.
- REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**. v. 109, n. 4, p. 883–890. 2008.
- ROBINSON, R. L. et al. Burden of Illness and Treatment Patterns for Patients with Fibromyalgia. **Pain Medicine**. v. 13, n. 10, p. 1366-1376. 2012.
- RODRIGUES, K. A. F. et al. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-leishmania agent: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2013, ID 279726. 2013.
- ROOKS, D.S. et al. Group exercise, education, and combination selfmanagement in women with fibromyalgia. **Archives of Internal Medicine**. v.167, n.20, p.2192-2200. 2007.
- RUSSELL, I. J. et al. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**. v. 35, p. 550–556. 1992.
- SCHAEFER, C. et al. The comparative burden of mild, moderate and severe Fibromyalgia: results from a cross-sectional survey in the United States. **Health Qual Life Outcomes**. v. 9, n. 71. 2011.
- SCHAPOVAL, E. E. S. et al. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 44, p. 137–142. 1994.
- SCHUG, S.A.; GODDARD, C. Recent advances in the pharmacological management of acute and chronic pain. **Annals of Palliative Medicine**. v.3, n.4, p.263-275. 2014.
- SENNA E.R. et al: Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **Journal of Rheumatology**. v. 31, p. 594-597, 2004.
- SIMÕES, R. R., et al. *Eugenia brasiliensis* leaves extract attenuates visceral and somatic inflammatory pain in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 217, p. 178-186. 2018.
- STAUD, R. Biology and therapy of fibromyalgia: pain in fibromyalgia syndrome. **Arthritis Research & Therapy**. v.8, n.3, p.1-7. 2006.
- SÜDHOF, T.C.; STARKE, K. Pharmacology of Neurotransmitter Release. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Springer. v. 184, p. 83-87. 2008.
- TAN, C. L.; KNIGHT, Z. A. Regulation of Body Temperature by the Nervous System. **Neuron**. v. 98, p. 31-48. 2018.

TEIXEIRA, L. L. et al. Potential antiproliferative activity of polyphenol metabolites against human breast cancer cells and their urine excretion pattern in healthy subjects following acute intake of a polyphenol-rich juice of grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam.). **Food & Function**. v. 8, n. 6, p. 2266–2274. 2017.

WHITE, L. A. et al. Employees with fibromyalgia: medical comorbidity, healthcare costs, and work loss. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**. v. 50, n. 1, p. 13-24. 2008.

WOLFE, F. et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. **Arthritis and Rheumatism**. v. 33, n. 2, p.160-172. 1990.

WOLFE, F. et al. The American College of Rheumatology Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia and Measurement of Symptom Severity. **Arthritis Care & Research**. v. 62, n. 5, p. 600-610. 2010.

WOOD, P.B. et al. Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. **European Journal of Neuroscience**. v.25, s.n., p. 3576-3586. 2007.

WOTTON, P. Moue *Grimace* Scale measures the agony of lab animals. Disponível em: <<https://www.popsoci.com/science/article/2010-07/squint-if-it-hurts/>>. Acesso em: 13 jun 2019.

YIN, T. et al. Therapeutic opportunities for targeting cold pain pathways. **Biochemical Pharmacology**. v. 93, p.125–140. 2015.

ZUNIC, L.; SKRBO, A.; DOBRACA, A. Historical Contribution of Pharmaceutics to Botany and Pharmacognosy Development. **Materia Socio Medica**. v.29, n.4, p.291-300. 2017.

ANEXO A – Localização dos *tender points* avaliados

| |
|--|
| <i>Tender points</i> (bilateral): |
| – Região suboccipital |
| – Região cervical |
| – Borda superior do trapézio (ponto médio) |
| – Região supraescapular |
| – Segunda costela (junção costochondral) |
| – Epicôndilo lateral |
| – Região glútea (laterosuperior) |
| – Região do trocânter maior |
| – Joelho (região medial) |

Fonte: Beppeler, 2018.

ANEXO B – Índice de Dor Generalizada (IDG)

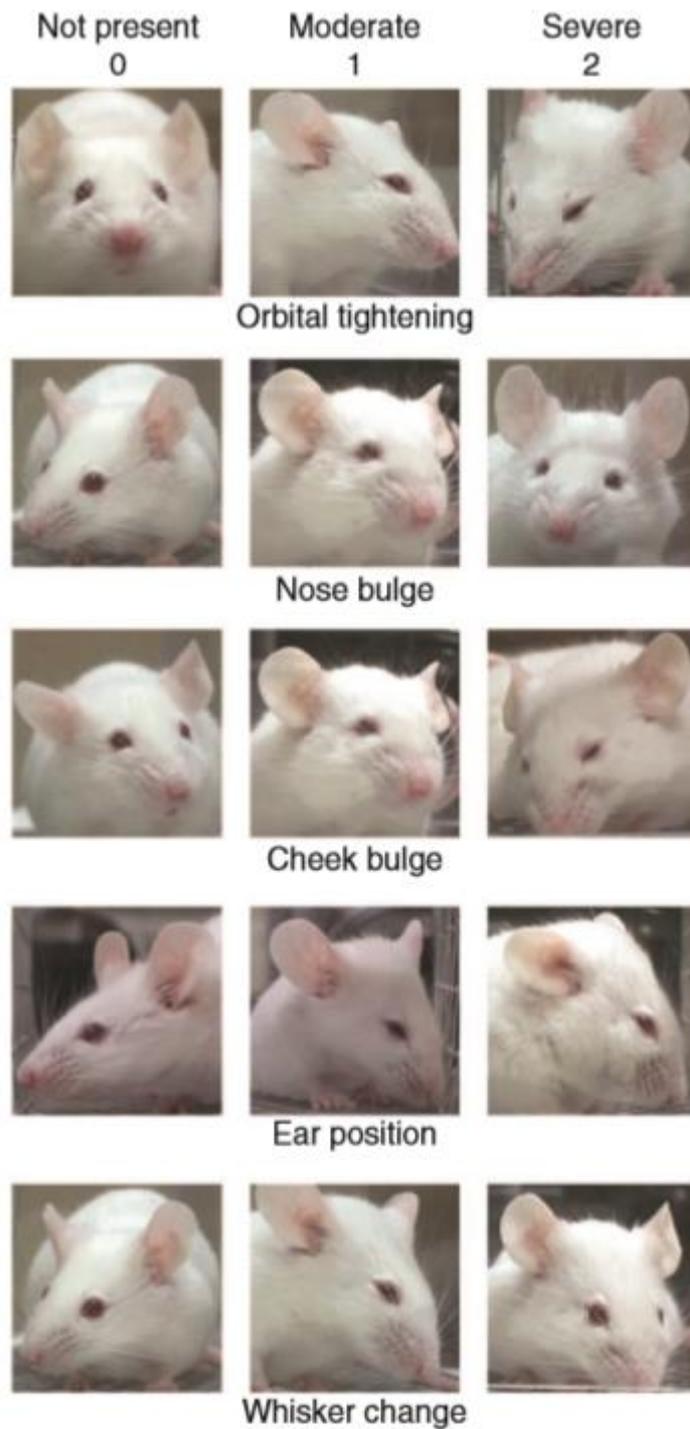
| | | |
|--------------------|-------------------|----------------|
| Mandíbula esquerda | Abdome | Coxa esquerda |
| Mandíbula direita | Dorso superior | Perna direita |
| Pescoço | Dorso inferior | Perna esquerda |
| Ombro direito | Quadril direito | Braço direito |
| Ombro esquerdo | Quadril esquerdo | Braço esquerdo |
| Tórax | Coxa direita | |
| Antebraço esquerdo | Antebraço direito | |

Fonte: Bepler, 2018.

ANEXO C – Escala de Severidade dos Sintomas (ESS)

| | |
|--|---|
| Determinar com que intensidade os 3 sintomas ocorreram na última semana: | Especificar a quantidade de sintomas somáticos, por exemplo: |
| – Fadiga | – Síndrome intestino irritável |
| – Sono não restaurador | – Depressão |
| – Sintomas cognitivos | – Cefaleia |
| 0: sem sintoma 1: leve 2: moderado 3: severo | 0: sem sintomas 1: poucos sintomas 2: número moderado de sintomas 3: grande número de sintomas |

Fonte: Bepler, 2018.

ANEXO D – Escala *Grimace*

Fonte: Langford et al., 2010.

