

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Larissa May Beppler

**EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PLANTA
Polygala paniculata NO MODELO DE FIBROMIALGIA
INDUZIDO PELA RESERPINA EM CAMUNDONGOS:
AVALIAÇÃO SENSORIAL E EMOCIONAL**

Florianópolis

2018

Larissa May Beppler

**EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PLANTA
Polygala paniculata NO MODELO DE FIBROMIALGIA
INDUZIDO PELA RESERPINA EM CAMUNDONGOS:
AVALIAÇÃO SENSORIAL E EMOCIONAL**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Neurociências.
Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto
Soares dos Santos

Florianópolis

2018

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

Beppler, Larissa May

Efeito do extrato hidroalcoólico da planta
Polygala paniculata no modelo de fibromialgia
induzido pela reserpina em camundongos: avaliação
sensorial e emocional / Larissa May Beppler ;
orientador, Adair Roberto Soares dos Santos, 2018.
103 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

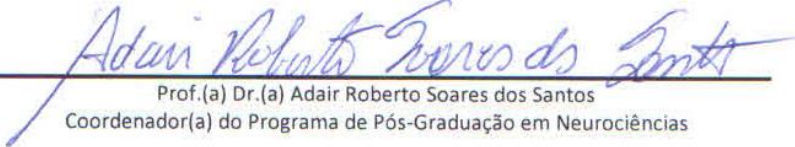
1. Neurociências. 2. Fibromialgia. 3. Dor. 4.
Analgesia. 5. *Polygala paniculata*. I. Santos, Adair
Roberto Soares dos. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Neurociências. III. Título.

Larissa May Beppler

**EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PLANTA
Polygala paniculata NO MODELO DE FIBROMIALGIA
INDUZIDO PELA RESERPINA EM CAMUNDONGOS:
AVALIAÇÃO SENSORIAL E EMOCIONAL**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do Título de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina.


Florianópolis, 30 de maio de 2018.


Prof.(a) Dr.(a) Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Banca examinadora:


Dr.(a) Adair Roberto Soares dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr.(a) Juliano Ferreira (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Ana Lúcia Severo Rodrigues (Universidade Federal de Santa Catarina)

AGRADECIMENTOS

À Deus,

À minha família por todo o apoio,

Ao Professor Adair, pela grande oportunidade de aprendizado, por proporcionar com que eu fizesse parte da grande família do LANDI, pelo incentivo, orientação, paciência, por conversar sobre as ideias que foram surgindo ao longo dessa incrível jornada e principalmente pela chance fazer ciência. Muito obrigada!

Ao Professor Eduardo, que foi parte essencial dessa caminhada, agradeço por sua orientação e paciência. Muito obrigada!

À todos os professores da Pós-graduação que tive oportunidade de conhecer e que compartilharam de seus conhecimentos.

Ao Professor Moacir Pizzolatti e seus alunos pelo extrato da planta *P. paniculata*.

Às grandes amigas que fiz no LANDI, vocês foram de extrema importância para a realização deste trabalho. Muito obrigada por todo apoio e paciência durante esse período.

À dona Vilma, seu Carlos e seu Nivaldo pelo companheirismo.

Aos camundongos, que foram utilizados neste projeto.

À CAPES pelo amparo financeiro.

À UFSC pelo programa de pós-graduação.

Por fim, agradeço a todos que fizeram parte desta trajetória e que contribuíram para a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

A fibromialgia, é uma síndrome de dor crônica generalizada associada a sintomas cognitivos e somáticos, como a depressão. Sua prevalência é maior no sexo feminino e o seu tratamento farmacológico é baseado principalmente em antidepressivos e anticonvulsivantes. Contudo a interrupção ou a troca do medicamento, demonstram a insatisfação dos pacientes. Portanto, a busca por novos tratamentos que reduzam os sinais e sintomas desta síndrome são de grande importância. As plantas medicinais são utilizadas há muito tempo para o tratamento de doenças de origens diversas. Uma dessas plantas é a *Polygala paniculata*, que em diversos estudos seu extrato mostrou efeito antinociceptivo, antidepressivo, neuroprotetor e anti-inflamatório. Por essa razão este trabalho, visa avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata* (EHPp) no comportamento sensorial e emocional de camundongos submetidos ao modelo de fibromialgia induzido pela reserpina. O tratamento com o extrato foi feito nas doses de 10, 30 e 100mg/kg pela via intragástrica duas horas antes dos testes comportamentais. O EHPp foi capaz de reduzir a nocicepção avaliada pelos testes de Von Frey, Placa Fria e Escala *Grimace*. O EHPp (10 e 100 mg/kg) e a amitriptilina (30 mg/kg) foram capazes de reverter o perfil tipo depressivo causado pela reserpina no teste do nado forçado, mas não conseguiram prevenir a hipolocomoção gerada pela reserpina no teste do campo aberto. Todos esses dados sugerem o potencial efeito antidepressivo e analgésico da *Polygala paniculata*, portanto mais estudos devem ser feitos sobre EHPp.

Palavras-chave: Fibromialgia. Dor. Analgesia. Planta medicinal. *Polygala paniculata*.

ABSTRACT

Fibromyalgia is a chronic generalized pain syndrome associated with cognitive and somatic symptoms, such as depression. Its prevalence is higher in females and its pharmacological treatment is mainly based on antidepressants and anticonvulsants, however the interruption or exchange of the drug, demonstrates the patients' dissatisfaction. Therefore, the search for new treatments that integrate the signs and symptoms of this syndrome are of great importance. Medicinal plants have long been used for the treatment of diseases of diverse origins. One such plant is *Polygala paniculata*, which in several studies showed its antinociceptive, antidepressant, neuroprotective and anti-inflammatory effect. For this reason, this study aims to evaluate the effects of the hydroalcoholic extract of the plant *Polygala paniculata* (EHPP) on the behavior of female mice in the animal model of fibromyalgia induced by reserpine. The treatment with the extract was done at doses of 10, 30 and 100 mg / kg intragastric two hours before the behavioral tests. EHPP was able to prevent nociception caused by reserpine as assessed by Von Frey, Cold Plate and *Grimace* scale tests. EHPP (10 and 100mg / kg) and amitriptyline (30mg / kg) were able to reverse the depressed profile caused by reserpine in the forced swimming test but were unable to prevent reserpine-generated hypolocomotion in the open field test. All these data suggest its potential antidepressant and analgesic effect, therefore more studies should be done about EHPP.

Keywords: Fibromyalgia. Pain. Analgesia. Medicinal plant. *Polygala paniculata*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto da planta <i>Polygala paniculata</i>	36
Figura 2 – Esquema do protocolo experimental.	45
Figura 3 – Fotografia do teste de filamento de Von Frey.	48
Figura 4 – Fotografia do teste da Placa Fria.	49
Figura 5 – Fotografia do teste de Suspensão de cauda.	50
Figura 6 – Fotografia do teste do Nado Forçado.	51
Figura 7 – Fotografia do teste da Sacarose.	52
Figura 8 – Fotografia do teste do <i>Marble Burying</i>	53
Figura 9 – Fotografia do teste do campo aberto.	54
Figura 10 – Avaliação temporal da alodínia mecânica (teste de Von Frey) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos.	57
Figura 11 - Avaliação temporal da hiperalgesia térmica ao frio (teste da placa fria) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos.	58
Figura 12 - Efeito da reserpina no modelo de fibromialgia sobre as expressões faciais dos animais avaliado através da Escala <i>Grimace</i>	59
Figura 13 - Fotografias dos animais do grupo SAL (A) e do grupo RES (B) e (C).	60
Figura 14 - Avaliação do comportamento tipo depressivo (teste de suspensão pela cauda) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos.	61
Figura 15 - Avaliação do comportamento tipo depressivo (teste do nado forçado) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos.	62
Figura 16 - Avaliação do comportamento anedônico (teste da sacarose) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos.	63
Figura 17 - Avaliação do comportamento tipo ansioso (teste do <i>Marble Burying</i>) no modelo de fibromialgia induzido pela administração de reserpina em camundongos.	64

Figura 18 - Avaliação do decurso temporal (teste de Von Frey) do efeito do extrato da planta <i>P. paniculata</i> no modelo animal de fibromialgia induzida pela reserpina.....	65
Figura 19 - Avaliação do extrato da planta <i>P. paniculata</i> na sensibilidade térmica (teste da Placa Fria) no modelo animal de fibromialgia.....	66
Figura 20 - Avaliação do EHPp sobre o componente emocional associado a dor (Escala <i>Grimace</i>) no modelo de fibromialgia induzido pela administração de reserpina em camundongos.....	67
Figura 21 - Avaliação do efeito do EHPp no comportamento tipo depressivo (teste da suspensão pela cauda) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos.....	68
Figura 22 - Análise do EHPp no comportamento tipo depressivo (teste do nado forçado) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos.....	69
Figura 23 - Efeito da reserpina e avaliação do EHPp sobre a locomoção (teste do campo aberto) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos.....	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Especificação dos <i>tender points</i>	22
Quadro 2 – Índice de Dor Generalizada.....	23
Quadro 3 – Escala de Severidade dos Sintomas.....	23
Quadro 4 – Diferentes espécies de <i>Polygala</i> e seus efeitos em estudos pré-clínicos encontrados na literatura.....	34
Quadro 5 – Identificação dos grupos dos animais utilizados na primeira etapa de experimentos deste projeto e descrição dos tratamentos.....	44
Quadro 6 – Identificação dos grupos dos animais utilizados na segunda etapa de experimentos deste projeto e descrição dos tratamentos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT – Antidepressivos tricíclicos
Amit – Amitriptilina
ATP – Adenosina trifosfato
CID – Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde
COMT – Catecol O-metiltransferase
DA – Dopamina
EHPp – Extrato Hidroalcoólico de *Polygala paniculata*
EPM – Erro Padrão da Média
ESS – Escala de Severidade dos Sintomas
FM – Fibromialgia
FDA – Food and Drug Administration
HPA – Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IL-1 β – Interleucina 1beta
IL-1RA – Interleucina 1RA
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
IDG – Índice de Dor Generalizada
LANDI – Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
MAO – Monoamino Oxidase
MAPK – *Mitogen-activated protein kinases*
NMDA – N metil D aspartato
PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato salina)
PET – Tomografia por Emissão de Pósitrons
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa
TRP – Potencial Receptor Transiente
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
VMAT – Transportador de Monoaminas Vesicular
5-HT – Serotonina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	HISTÓRIA	21
1.2	DIAGNÓSTICO DA FIBROMIALGIA	21
1.3	PREVALÊNCIA DA FIBROMIALGIA	23
1.4	FISIOPATOLOGIA DA FIBROMIALGIA	24
1.5	TRATAMENTO DA FIBROMIALGIA	29
1.6	MODELOS EXPERIMENTAIS DE FIBROMIALGIA	30
1.7	RESERPINA	32
1.8	<i>Polygala paniculata</i>	33
2	JUSTIFICATIVA.....	39
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	OBJETIVOS GERAIS	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	ANIMAIS.....	43
4.2	INDUÇÃO DO MODELO DE FIBROMIALGIA	44
4.3	TRATAMENTO	45
4.4	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL	47
4.4.1	Avaliação da sensibilidade a estímulo mecânico	47
4.4.1.1	Teste de filamento de Von Frey	47
4.4.2	Avaliação da sensibilidade a estímulo térmico	48
4.4.2.1	Teste da Placa Fria	48
4.4.3	Avaliação subjetiva da dor	49
4.4.3.1	Escala <i>Grimace</i>	49
4.4.4	Avaliação do comportamento tipo depressivo	50
4.4.4.1	Teste de Suspensão pela Cauda.....	50
4.4.4.2	Teste do Nado Forçado	50
4.4.4.3	Teste da Sacarose (<i>Splash Test</i>)	51
4.4.5	Avaliação do comportamento tipo ansioso.....	52

4.4.5.1	Teste do <i>Marble Burying</i>	52
4.4.6	Avaliação locomotora	53
4.4.6.1	Teste do campo aberto	53
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
6	RESULTADOS	57
6.1	AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO DOS ANIMAIS TRATADOS COM RESERPINA.....	57
6.2	ANÁLISE DA EMOCIONALIDADE DOS ANIMAIS TRATADOS COM RESERPINA	60
6.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PLANTA <i>Polygala paniculata</i> NO COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO DOS ANIMAIS COM FIBROMIALGIA.	64
6.4	ANÁLISE DA AÇÃO DO EXTRATO DA PLANTA <i>Polygala paniculata</i> NA EMOCIONALIDADE DOS ANIMAIS COM FIBROMIALGIA.	67
6.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS SUBMETIDOS A ADMINISTRAÇÃO DE RESERPINA E TRATADOS COM O EXTRATO DA PLANTA <i>Polygala paniculata</i> . 69	
7	DISCUSSÃO	73
8	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA

Inicialmente a fibromialgia (FM) era conhecida como fibrosite, termo criado em 1904 por Gowers. Em 1950, Graham apresentou o conceito de síndrome dolorosa, porque a mesma não apresentava uma doença orgânica de base para gerar o quadro. Smythe e Moldofsky criaram o termo fibromialgia e identificaram os tender points (BELLATO et al., 2012). A palavra fibromialgia tem origem no latim e no grego, significando uma condição dolorosa no tecido muscular e fibroso. Seu código de acordo com a Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID 10) é M79,7 (JUNIOR; GOLDENFUM; SIENA, 2012).

1.2 DIAGNÓSTICO DA FIBROMIALGIA

Em 1990, o Colégio Americano de Reumatologia, propôs critérios para diagnosticar a fibromialgia. Para preencher os critérios de classificação da síndrome, os pacientes teriam que apresentar história de dor generalizada há pelo menos três meses e a presença de dor no lado esquerdo e direito do corpo, no esqueleto axial e acima e abaixo da cintura, sendo tudo isso associado a presença de dor a palpação em 11 dos 18 *tender points* no exame físico e sintomas associados como fadiga, distúrbios do sono, rigidez matinal, depressão, entre outros (WOLFE et al., 1990). Os tender points são áreas que apresentam um baixo limiar a dor à pressão e os pacientes que sofrem com fibromialgia possuem uma diminuição no limiar de dor corporal, tornando esses pontos mais sensíveis a palpação (GRANGES; LITTLEJOHN, 1993). A especificação dos *tender points* estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Especificação dos *tender points*.

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

Fonte: Adaptado de WOLFE et al (1990).

Entretanto, após 20 anos da classificação proposta pelo Colégio Americano de Reumatologia, os critérios foram reavaliados por meio de um novo estudo multicêntrico, pois alguns pacientes poderiam melhorar e não referir a dor esperada a palpação dos *tender points*, o que os deixaria fora de um dos critérios diagnósticos propostos pelo Colégio e também porque durante o exame físico do paciente os *tender points* eram pouco utilizados para o diagnóstico (WOLFE et al., 2010). Ao longo desse período, os conhecimentos clínicos foram se somando, demonstrando a importância dos sintomas associados à síndrome e não somente a dor como parte significativa do diagnóstico. Esses sintomas afetam a qualidade de vida desses pacientes e acabam limitando suas atividades de vida diárias (FITZCHARLES; YUNUS, 2011).

Atualmente, os novos critérios para o diagnóstico da fibromialgia são baseados em um Índice de Dor Generalizada (IDG) (*Widespread Pain Index-WPI*) (Quadro 2), na Escala de Severidade dos Sintomas (ESS) (*Sympton Severity Scale- SS*) (Quadro 3), na presença de dor há pelo menos três meses e que o paciente não tenha outra enfermidade que possa causar o quadro algico. A ESS leva em consideração três pontos principais como o sono não restaurador, fadiga e sintomas cognitivos associados a sintomas somáticos, por exemplo, síndrome do intestino irritável, problemas de memória, cefaleia, insônia, depressão, perda do apetite, fraqueza muscular, entre outros. Portanto, para o diagnóstico são necessários IDG ≥ 7 e ESS ≥ 5 ou IDG 3-6 e ESS ≥ 9 . Os *tender points* foram suprimidos desses novos critérios (WOLFE et al., 2010).

Quadro 2 – Índice de Dor Generalizada.

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	

Soma das áreas em que o paciente sentiu dor na última semana. Pontuação varia de 0 a 19.

Fonte: Adaptado de WOLFE et al. (2010).

Quadro 3 – Escala de Severidade dos Sintomas.

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

A pontuação é feita através da soma dos 3 sintomas com os sintomas somáticos. O número de pontos varia de 0 a 12.

Fonte: Adaptado de WOLFE et al. (2010).

Como a fibromialgia é uma dor crônica generalizada ela pode acontecer associada ou não a outras doenças deste espectro, tornando necessária a adequada avaliação do paciente levando-se em consideração a importância dos diagnósticos diferenciais realizados através de um histórico médico e psicossocial e um exame clínico detalhado. Isto torna-se necessário uma vez que algumas condições clínicas podem mimetizar o quadro clínico da fibromialgia como as doenças reumatológicas, doenças musculoesqueléticas não inflamatórias, doenças neurológicas, transtornos mentais e a dor relacionada ao uso de medicamentos como por exemplo as estatinas e os bisfosfonatos (HÄUSER et al., 2017).

1.3 PREVALÊNCIA DA FIBROMIALGIA

Em estudo realizado por Marques e colaboradores foi observado que a população geral apresenta uma prevalência de 0,2- 6,6%, as áreas urbanas variando de 0,7-11,4% enquanto na zona rural a variação é de

0,1-5,2%. Este estudo encontrou uma prevalência de 2,4-6,8% em mulheres (MARQUES et al., 2017). Por meio de uma meta-análise Heidari e colaboradores encontraram que a prevalência desta síndrome na população geral é de 1,78%. Eles também analisaram esse índice por meio da Organização Mundial da Saúde (OMS) e suas regiões de estudo e com isso, verificaram uma prevalência de 2,41% nas Américas, 2,64% na Europa, 1,62% no Pacífico Ocidental e 4,43% no Mediterrâneo Oriental. A prevalência total encontrada no sexo feminino foi de 3,98% e no masculino de 0,01%. Este estudo também observou que 15,20% dos pacientes com doença reumatológica apresentam esta síndrome (HEIDARI et al., 2017).

1.4 FISIOPATOLOGIA DA FIBROMIALGIA

É de vital importância a capacidade do corpo em perceber estímulos nocivos, pois esta habilidade é extremamente necessária para o bem-estar e sobrevivência dos indivíduos (BASBAUM et al., 2009). A partir do momento em que a dor deixa de apresentar sua função fisiológica, ela tem o poder de modificar aspectos primordiais nas vidas das pessoas por ela acometidas e passa a ser considerada uma doença.

Os sinais dolorosos chegam a medula espinal e ascendem ao encéfalo, principalmente o tálamo, córtex e sistema límbico, responsáveis pela percepção da dor e seu componente afetivo. O prejuízo na maneira como a dor central é processada pode depender de alguns importantes aspectos, entre eles destacam-se: alterações na via descendente e inibitória da dor e sensibilização central. Fazem parte da via descendente regiões do mesencéfalo e do tronco cerebral que se comunicam com o corno dorsal da medula espinal. Estruturas estas que possuem a capacidade de modular o que o corpo recebe de estímulo das fibras aferentes primárias e dos neurônios do corno dorsal da medula espinal, podendo inibir ou facilitar o sinal doloroso. A substância cinzenta periaquedutal se comunica com a medula ventral rostromedial e com o lócus coeruleus que são essenciais no controle descende, retornando a medula espinal (BANNISTER; DICKENSON, 2016).

As vias serotoninérgica, noradrenérgica e opioidérgica participam ativamente da via analgésica descendente. Após um estímulo nocivo, essas vias liberam neurotransmissores como a norepinefrina, serotonina e opióides endógenos que possuem a capacidade de modular a liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato. Tudo isso acontece para que a sensibilidade a dor diminua frente ao estímulo doloroso. Esse caminho normal de resposta esperado frente a esse tipo de estímulo está

lesado ou inexistente em pacientes com dor crônica (LEE et al., 2011). Embora a fisiopatologia da fibromialgia ainda não esteja elucidada, fortes indícios apontam para sensibilização central, alterações do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal e de aminas biogênicas (STAUD, 2006). A intensidade com que a experiência de dor é vivenciada por um indivíduo está associada a fatores cognitivos como a catastrofização, a qual está relacionada a baixos limiares de dor resultando em quadro de alodínia (sensação dolorosa gerada por um estímulo inócuo) e hiperalgesia (aumento da resposta dolorosa frente a um estímulo nocivo) (STAUD, 2012). A fibromialgia representa o ponto máximo da síndrome de dor crônica generalizada. Esses pacientes mostram-se geralmente sensíveis a estímulos dolorosos e não dolorosos, como o toque, o frio, o calor, o som, a luz, entre outros estímulos. Os impulsos que chegam aos nociceptores periféricos são levados ao SNC (sistema nervoso central) por fibras de condução rápida do tipo A- δ mielinizadas e por fibras de condução lenta do tipo C não mielinizadas as quais estão associadas a dor secundária nos quadros de dor crônica, resultado principalmente de mecanismos de origem central, já que a dor secundária tem relação com a somação temporal ou *Wind up*, que ocorre quando o estímulo é aplicado regularmente gerando um aumento na intensidade dolorosa, mecanismo este que envolve os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), pois os antagonistas destes receptores conseguem inibir o *Wind up*. A sensibilização das vias aferentes periféricas e centrais da dor, bem como a modificação da resposta ao stress e fatores psicológicos contribuem para a amplificação da dor presente nesta síndrome. Algumas mudanças musculares vêm sendo encontradas, como fibras vermelhas irregulares no músculo trapézio, alterações no pH muscular e baixos níveis de fosfocreatina e ATP (adenosina trifosfato) podem contribuir para induzir e manter a sensibilização central (STAUD, RODRIGUEZ, 2006; STAUD et al., 2005; MENDELL, WALL, 1965).

Devido a alterações nos mecanismos de dor central nos neurônios da coluna dorsal da medula espinal esses pacientes apresentam principalmente hiperalgesia secundária (ocorre quando existe expansão do local de hipersensibilidade para áreas circunjacentes onde não existe dano tecidual). A sensibilização central ocorre devido ao aumento na atividade dos neurônios da coluna dorsal da medula espinal e pela propagação dessa hiperatividade por vários segmentos espinais. Isso acontece através da liberação de proteína quinase C, óxido nítrico, ciclooxigenase e de neurotransmissores como glutamato e substância P (STAUD, 2002). Quando existe um aumento além do esperado com relação à amplitude, extensão corporal e duração de uma experiência

sensorial, a qual está relacionada a um estímulo periférico usual, isso provavelmente retrata uma síndrome de amplificação central, devido a um aumento na excitabilidade ou uma redução no caráter da via inibitória. Em adição, contribuem para manutenção da sensibilização central a plasticidade sináptica, alterações na microglia, astrócitos, excitabilidade da membrana, junções *gap* e transcrição gênica (WOOLF, 2011).

Crofford e colaboradores (1994) investigaram o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em pacientes com fibromialgia. Os autores observaram que os pacientes com fibromialgia possuem uma alteração na função do eixo HPA, pois a concentração de cortisol em urina de 24 horas, estava substancialmente diminuída quando comparado a indivíduos saudáveis e o cortisol total e livre plasmático avaliado a noite estava elevado. De forma semelhante, as concentrações de neuropeptídeo Y estavam menores nos indivíduos com FM, enquanto a concentração de adrenocorticotropina mostrou-se mais elevada nesses pacientes (CROFFORD et al., 1994).

Estudos utilizando exames de imagem vêm demonstrando alterações na via dopaminérgica em pacientes com dor crônica. Em 2007, Wood e colaboradores estudaram pacientes com fibromialgia e indivíduos saudáveis como controles, para avaliar o possível papel da dopamina (DA). Os dois grupos foram expostos a um estímulo doloroso gerado por salina hipertônica e um estímulo não doloroso por salina normal. Os autores observaram que os pacientes com FM sentiram mais dor com a injeção de salina hipertônica que os controles saudáveis. Através da Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET), observou-se que durante o estímulo doloroso os pacientes saudáveis liberaram DA nos gânglios basais o que não foi observado em pacientes com FM. Este pode ser um fator subjacente para explicar pelo menos em parte a dor generalizada presente em pacientes com fibromialgia (WOOD et al., 2007). A dopamina é sintetizada a partir do aminoácido tirosina, por meio da ação da enzima tirosina hidroxilase, na primeira etapa via de produção de catecolaminas, que darão origem a norepinefrina e a epinefrina. Essa síntese ocorre no citoplasma neuronal e posteriormente ela é armazenada no interior de vesículas sinápticas por meio da ação do transportador de monoaminas vesicular (VMAT) (GOLAN, 2009).

Albrecht e colaboradores (2016) utilizaram tomografia por emissão de pósitrons (PET) e *fallypride* (antagonista do receptor de dopamina D2 e D3) para avaliar se a sinalização estriatal e extraestriatal de dopamina (DA) difere em indivíduos com dor crônica. Este grupo observou que pacientes com fibromialgia tem baixa disponibilidade de ligação ao receptor cortical de dopamina D2/D3 quando comparado aos

pacientes saudáveis. Essas diferenças foram encontradas em áreas como córtex cingulado anterior e giro fusiforme. A baixa ligação ao receptor de DA cortical pode contribuir para alterações no processamento cognitivo em pacientes com FM, o que é uma queixa comum. Portanto, a alteração na função DA nesses pacientes pode contribuir com a percepção de dor nessa síndrome (ALBRECHT et al., 2016).

Descoberta no século XIX, a serotonina (5-HT), é uma monoamina produzida a partir do triptofano. Para que a sua síntese ocorra é necessário a ação da enzima triptofano hidroxilase. Seu armazenamento é feito no interior de vesículas sinápticas, por meio do transportador de monoaminas vesicular (VMAT) (GOLAN, 2009). Esta molécula tem influência sobre os sistemas nervoso, endócrino, imune e gastrointestinal. Sua ação tem sido vinculada ao sono, dor, função gastrointestinal e apetite. Alterações em suas concentrações são encontradas em pacientes com depressão. Por ter envolvimento no processo álgico, a 5-HT tem sido encontrada em baixas concentrações no líquor e no soro de pacientes com FM (ARREOLA et al., 2015).

A depressão pode resultar da associação de fatores ambientais com a predisposição genética, mas ainda não existe o completo esclarecimento da mesma. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar os possíveis mecanismos que atuam para a manifestação da depressão. Uma das hipóteses que é mais aceita está relacionada a uma diferença nas concentrações dos neurotransmissores monoaminérgicos. Outra hipótese relevante relacionada a depressão são as alterações gliais. De fato, um crescente número de estudos vem demonstrando que uma possível falha na função astrocitária pode gerar um desequilíbrio glutamatérgico e distúrbios sinápticos gerando as alterações sensoriais e emocionais presentes na fibromialgia. Ademais, alterações nas funções dos oligodendrócitos podem causar problemas na rede de comunicação e conexões neuronais e um desequilíbrio na resposta imune por parte da micróglia causando neuroinflamação. Essa associação de fatores contribui para a complexidade e o entendimento da natureza fisiopatológica dessas doenças (CZÉH; NAGY, 2018).

A glia é composta pela micróglia, astrócitos e oligodendrócitos no sistema nervoso central, células gliais satélites e células de Schwann no sistema nervoso periférico. Quando o corpo recebe um estímulo doloroso ou uma lesão ocorre, as células gliais modificam as suas características morfológicas e funções, dentre elas, alterações iônicas, modulação transcricional, fosforilação de MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), hipertrofia e proliferação. Sabe-se que a via das MAPK possui papel de destaque na sinalização entre a glia e os neurônios. Elas são

estimuladas por mediadores pró-inflamatórios, gerados pela glia como as citocinas, quimiocinas entre outros. É responsável também pela produção de glutamato, prostaglandina E2 e ATP. Dentre as proteínas de origem pró-inflamatória, o TNF- α (fator de necrose tumoral α) tem importância na indução, sensibilização central e na dor persistente (JI et al., 2013). Em estudo utilizando Ressonância magnética com espectroscopia foi constatado aumento nas concentrações de glutamato/glutamina na amígdala direita juntamente com um incremento nas concentrações de inositol, na amígdala e tálamo direitos, que foram associados a dores mais intensas, piora da fadiga e depressão, sugerindo uma alteração no processo emocional mais as mudanças no processamento da dor sabidamente conhecidas nesses pacientes (VALDE'S et al., 2010).

As citocinas são proteínas solúveis, produzidas por várias células como os macrófagos, mastócitos e células dendríticas. Elas atuam na resposta imunológica, assim como atuam no processo inflamatório e colaboram para a defesa do organismo contra agentes infecciosos (ABBAS et al., 2012). Estudos que pesquisam o perfil de citocinas na fibromialgia são de grande ajuda para o entendimento da síndrome. Entre esses estudos, Tsilioni e colaboradores relataram aumento nas concentrações de IL-6 (interleucina 6) e TNF- α no soro quando comparados a controles saudáveis (TSILIONI et al., 2016). Várias evidências vêm demonstrando alterações nas concentrações de citocinas em pacientes com fibromialgia. Üçeyler e colaboradores (2011) em uma revisão sistemática, relataram que os pacientes com fibromialgia apresentavam aumento da concentração sérica de IL-1RA, IL-6 e IL-8 e plasmática de IL-8 quando comparado ao controle. O estudo também destaca que alguns fatores podem alterar as concentrações de citocinas como a produção circadiana, atividade física, depressão e quadros infecciosos, o que deve ser levado em consideração no momento da coleta para a dosagem das citocinas (ÜÇEYLER et al., 2011).

Outra pesquisa avaliou o perfil de citocinas relacionado ao índice de massa corporal, observou aumento nas concentrações de IL-6 e redução de TNF- α e IL-1 β , mas não foi encontrado diferença estatística entre as concentrações das proteínas em relação ao índice de massa corporal (HERNANDEZ et al., 2010). Em contraste a estes achados, Garcia-Lozano e colaboradores relataram diminuição nas concentrações de IL-8, IL-6, TNF- α e não encontraram associação entre comorbidades como ansiedade e depressão com as concentrações de citocinas (GARCIA-LOZANO et al., 2008). Os estudos acima relatados vêm apontando para achados divergentes quanto aos níveis dessas proteínas

em pacientes com fibromialgia e associação com outros sintomas (MENZIES; LYON, 2010).

1.5 TRATAMENTO DA FIBROMIALGIA

Uma vez cronicado, o quadro algíco, tem alto impacto na qualidade de vida dos pacientes e das pessoas com as quais compartilham suas vidas, tanto no ambiente familiar quanto profissional. Esta situação contribui para o elevado gasto com saúde e um alto custo social pelo absenteísmo e possível antecipação da aposentadoria em pacientes com fibromialgia (SCHUG; GODDARD, 2014). Lacasse e colegas em estudo realizado em Quebec, Canadá, avaliaram os gastos e a produtividade de pacientes com fibromialgia utilizando a média de três meses, o que eles encontraram foi que cada pessoa perdeu em média 5,59 dias de trabalho devido a síndrome dolorosa e tiveram um gasto médio de 950,51 dólares com despesas médicas e com tratamento medicamentoso (LACASSE; BOURGAULT; CHOINIÈRE, 2016). Na Alemanha, entre 2011 e 2014, foi verificado um gasto médio com internação hospitalar de 3,740 euros por paciente (ROMEYKE et al., 2017). Por se tratar de uma síndrome altamente complexa de dor crônica generalizada associada a sintomas como distúrbios do sono, fadiga e depressão seu tratamento vem sendo realizado com abordagem multidisciplinar, utilizando ações visando tanto o tratamento farmacológico quanto o tratamento não-farmacológico (LAWSON, 2008).

Quando a terapêutica farmacológica é necessária para o tratamento da FM, a escolha deve ser feita com prudência e guiada pelo perfil clínico do paciente, efeitos adversos e se existe resposta ao fármaco escolhido ou não. Uma avaliação continua deve ser feita e caso não se observe melhora do quadro clínico ou um efeito colateral relevante, deve-se suspender a terapia. Atualmente, a escolha farmacológica está centrada em antidepressivos tricíclicos (amitriptilina), anticonvulsivantes (pregabalina e gabapentina), inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (duloxetina e milnacipram), inibidores seletivos da recaptação 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). Nos Estados Unidos, de acordo com o Colégio Americano de Reumatologia, três drogas foram aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso, a duloxetina, a pregabalina e o

milnacipran. Foi realizado um estudo, com pacientes que possuem seguro saúde, entre 2009 e 2011 que analisou os tratamentos farmacológicos utilizados por eles. Observou-se que 14% utilizam duloxetine, 9% pregabalina e 4% milnacipran. A adesão ao tratamento com duloxetine foi maior quando comparado aos outros fármacos que também receberam aprovação, sendo superior também aos fármacos que não receberam aprovação como a ciclobenzaprina, a gabapentina e o tramadol. A interrupção do recurso terapêutico de escolha após 6 meses foi maior que 50% para todas as drogas. Assim como a troca de medicamento ou associação com outras medicações para alívio da dor também são usuais, o que demonstra a insatisfação dos pacientes. O que reitera a necessidade na busca por novas terapias que sejam mais efetivas e com poucos efeitos adversos (LIU et al., 2016).

Plantas medicinais e seus compostos também são usados para o tratamento da fibromialgia, como o extrato de *Rosmarinus officinalis*, o ácido oleanólico, a *Ginko biloba*, a capsaicina de uso tópico e a nabilona, pois vem demonstrando resultados semelhantes aos encontrados com os tratamentos farmacológicos, por exemplo, a nabilona foi capaz de melhorar o sono, a dor e o humor dos pacientes quando comparado com a amitriptilina (NASCIMENTO et al., 2013). Estratégias não farmacológicas são bem-vindas no manejo de pacientes com FM. A balneoterapia também vem sendo recomendada, visto que estudos demonstram seu potencial em atenuar os sintomas e a sua frequência (ABLIN; HÄUSER; BUSKILA, 2013). Alongamentos, caminhadas e treinamentos simples de força tem demonstrado eficácia em amenizar sintomas emocionais, físicos e sociais em pacientes que já fazem uso de tratamentos farmacológicos (ROOKS et al., 2007). Técnicas psicológicas podem ser usadas para o controle do nível de estresse e relaxamento, assim como a terapia cognitivo-comportamental são recomendados. Outras intervenções relacionadas a terapias alternativas e complementares como o Tai Chi e a acupuntura também estão sendo utilizados (ABLIN et al., 2013).

1.6 MODELOS EXPERIMENTAIS DE FIBROMIALGIA

Vários modelos animais têm sido desenvolvidos para tentar compreender os mecanismos e possíveis tratamentos para a fibromialgia, entre eles, o modelo de estresse ao frio repetido, estresse sonoro imprevisível, injeção intramuscular de salina ácida e o modelo que utiliza a reserpina (NAGAKURA et al., 2012).

Com o modelo de estresse ao frio repetido os animais apresentam alodínia mecânica e térmica por mais de 12 dias. De acordo com o protocolo o animal é exposto ao frio (4°C) durante a noite do primeiro dia. A temperatura é então alternada entre 24°C e 4°C a cada trinta minutos durante o dia, até o quarto dia (NISHIYORI; UEDA, 2008).

No modelo de estresse sonoro imprevisível, o animal é colocado em uma caixa sonora por 30 minutos no primeiro, terceiro e quarto dias. Nesta caixa eles são expostos a sons com amplitude entre 20 e 105 dB em várias frequências por 5 ou 10 segundos cada. Os animais apresentam aumento dos níveis de adrenalina favorecendo a hiperalgesia mecânica encontrada neste modelo. Observa-se também aumento na pontuação de ansiedade dos animais, hiperalgesia visceral e temporomandibular no décimo quarto dia após sua exposição ao estresse sonoro (KHASAR et al., 2005).

O modelo de injeção intramuscular de salina ácida, consiste da administração de duas injeções de 100 µl de salina ácida com pH 4,0. Os animais são anestesiados por via inalatória e a injeção é aplicada no músculo gastrocnêmio no primeiro dia e cinco dias após no mesmo músculo. Os animais apresentam hiperalgesia mecânica muscular e cutânea durando 2 semanas ou mais. Este modelo não apresentou hiperalgesia térmica (SLUKA et al., 2001).

Para tentar elucidar a relação entre a diminuição de aminas biogênicas e a dor encontrada nos pacientes com a síndrome, Nagakura e colaboradores utilizaram as propriedades presentes na reserpina. O estudo foi realizado com ratos Sprague-Dawley, machos e fêmeas, onde a reserpina foi administrada pela via subcutânea, 1 mg/kg, por três dias consecutivos. O limiar de pressão muscular foi avaliado utilizando o aparato Randall-Selito e o Von Frey foi feito para avaliar o limiar de resposta tátil. Demonstrou-se respectivamente a diminuição dos limiares de pressão muscular e de resposta tátil em machos até o 10º dia e em fêmeas até o 7º dia e até o 21º dia em machos e ao 14º dia em fêmeas (NAGAKURA et al., 2009).

Hernandez-Leon e colegas também avaliaram ratos machos e fêmeas no mesmo modelo e o que encontraram é que a reserpina gera um quadro de alodínia e hiperalgesia em ambos os sexos, mas nas fêmeas em que foi realizado ovariectomia bilateral, a nocicepção foi maior do que nas que não passaram por esse procedimento cirúrgico no limiar de pressão muscular, já com relação a alodínia não foi observado diferença. Outro ponto interessante desse estudo, foi que os pesquisadores investigaram as diferentes fases do ciclo estral e constataram que após a indução com a reserpina todas as ratas estavam na mesma fase do ciclo

estral e que não houve diferença com relação a hiperalgesia e alodínia entre as fêmeas conhecendo ou não a fase do ciclo estral em que estavam, o que mostra que o modelo de fibromialgia induzido pela reserpina tem a capacidade de induzir a nocicepção mesmo frente as diferentes mudanças que ocorrem no sistema endócrino dos animais (HERNANDEZ-LEON et al., 2018).

As concentrações de serotonina, dopamina e noradrenalina foram significativamente reduzidas por até vinte e um dias após a indução do modelo, no tálamo, medula espinal e córtex pré-frontal após o tratamento dos ratos com a dose de 1 mg/kg de reserpina. Para estudar o comportamento tipo-depressivo foi utilizado o teste do nado forçado, notando-se que o tempo de imobilidade foi maior nos ratos tratados com reserpina quando comparado ao controle, com efeito até o 14º dia. Neste protocolo também foram avaliados fármacos utilizados na clínica, como a pregabalina, duloxetine, pramipexole e diclofenaco. A maioria reduziu a hiperalgesia mecânica com exceção do diclofenaco (NAGAKURA et al., 2009).

Este modelo preenche os três tipos de validades. A validade de face pois apresenta diminuição prolongada no limiar a pressão muscular e da alodínia correspondendo, respectivamente, a dor muscular e a outros sintomas associados. Assim como a característica de induzir um quadro tipo depressivo nos animais, uma comorbidade associada ao quadro de FM. Sobre a validade de constructo o modelo não gera uma doença orgânica e com relação a patogênese apresenta a alteração das aminas biogênicas presente na clínica. E por último o modelo preenche a validade preditiva, isomorfismo farmacológico, pois os fármacos utilizados na clínica para tratamento como a pregabalina e a duloxetine atenuaram a nocicepção induzida pela reserpina (NAGAKURA et al., 2009).

1.7 RESERPINA

Extraída das raízes da *Rauwolfia serpentina*, a reserpina é um alcaloide (SINGH, 1955). Encontrada na região sul e sudeste da Ásia, este arbusto vem sendo utilizado na Índia há séculos para o tratamento de muitas doenças como insônia, hipertensão e perturbação mental. Sua fórmula química é C₃₃H₄₀N₂O₉ e com massa molecular de 609 gramas, sua absorção ocorre em 1 a 2 horas após sua administração pela via oral, no sangue sua meia vida é de aproximadamente 5 horas, no plasma sua eliminação varia entre 45 a 168 horas, sendo que ela possui a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (LOBAY, 2015). A reserpina tem como mecanismo de ação a inibição do transportador de monoaminas

vesicular (VMAT) o qual é um antiportador de prótons, pois se liga irreversivelmente a esses transportadores nas membranas das vesículas secretoras nos neurônios pré-sinápticos, impedindo a ligação de neurotransmissores intracelulares ao transportador. Foram identificados dois tipos desse transportador, o VMAT1, presente em tecidos endócrinos e células parácrinas e o VMAT2 encontrado em neurônios monoaminérgicos do sistema nervoso central, pois apresenta grande afinidade por monoaminas. A reserpina compete com as monoaminas para se ligar ao VMAT, ligando-se três vezes mais ao VMAT2 (SÜDHOF, STARKE, 2008; LOBAY, 2015). Uma vez que essa ligação ocorra, a função dessas vesículas de estocar as monoaminas é perdida, fazendo com que esses neurotransmissores fiquem no citoplasma, onde sofrerão a degradação pela monoamino oxidase (MAO). Com a metabolização da reserpina e/ou o fim da sua utilização e com o passar do tempo a célula começa a produzir novas vesículas que irão estocar os transmissores restabelecendo a função celular (GOLAN, 2009). Dentre seus efeitos colaterais a depressão vem sendo descrita há muito tempo (SARWER-FONER, OGLE, 1956; SHEPHERD, 1956). Sendo este efeito oriundo da depleção de monoaminas, relacionadas principalmente com a transmissão da serotonina e da norepinefrina (RANG et al., 2012).

1.8 *Polygala paniculata*

O uso de plantas medicinais vem desde o início da civilização humana e a habilidade para o cultivo dessas ervas vem sendo desenvolvida e preservada desde então em todos os povos (ZUNIC et al., 2017). As plantas apresentam uma grande diversidade química o que as torna extremamente importantes do ponto de vista farmacológico. O Brasil dispõe de um vasto território, que contém uma grande biodiversidade o que garante uma fonte para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas (BASSO et al., 2005). As plantas do gênero *Polygala* pertencem à família *Polygalaceae*, com mais de 700 espécies espalhadas em todo o mundo (LÜDTKE; SOUZA-CHIES; MIOTTO, 2013). No Quadro 4 estão apresentados alguns dos efeitos descritos em estudos pré-clínicos de diferentes espécies de *Polygala*.

Quadro 4 – Diferentes espécies de *Polygala* e seus efeitos em estudos pré-clínicos encontrados na literatura.

Espécie	Efeito	Referência
<i>Polygala cyparissias</i>	Anti-hiperalgésico	KLEIN-JUNIOR et al., 2012.
<i>Polygala cyparissias</i>	Anti- nociceptivo	CAMPOS et al., 1997.
<i>Polygala tenuifolia</i>	Melhora do aprendizado e memória	LI et al., 2014.
<i>Polygala tenuifolia</i>	Atividade ansiolítica e sedativo-hipnótica	YAO et al., 2010.
<i>Polygala tenuifolia</i>	Antiamnésico	XU et al., 2011.
<i>Polygala tenuifolia</i>	Evita degeneração axonal e prejuízo da memória	KUBOYAMA et al., 2017.
<i>Polygala tenuifolia</i>	Antidepressivo	SHIN et al., 2014.
<i>Polygala tenuifolia</i>	Reduz o armazenamento de lipídios nos adipócitos	WANG et al., 2017.
<i>Polygala tenuifolia</i>	Anticonvulsivo	CHEN et al., 2016.
<i>Polygala sabulosa</i>	Antinociceptivo	RIBAS et al., 2008.
<i>Polygala japonica</i>	Induz LTP no hipocampo, possível efeito cognitivo	SUN et al., 2012.
<i>Polygala senega</i>	Possível potencial anticâncer (câncer de pulmão)	PAUL et al., 2010.

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

A planta *Polygala paniculata* (figura 1), objeto deste estudo, vem sendo utilizada pela medicina popular para o tratamento de asma, possui efeito expectorante e atividade anti-inflamatória. Seu uso é feito na forma de chá (NEWALL, 1996). Conhecida popularmente como gelol (GIRALDI; HANAZAKI, 2010), barba de São Pedro (MAUTONE et al., 1990), bromil, mimosa e vassourinha branca (LAPA et al., 2009). Os estudos fitoquímicos no extrato clorofórmio da planta demonstraram a presença de xantonas, esteróis (CRISTIANO et al., 2003) e cumarina (HAMBURGER; GUPTA; HOSTETTMANN, 1985) e no extrato butanol o flavonol rutina (MARKHAM; TERNAL, 1976).

A rutina é um flavonoide (GANESHPURKAR; SALUJA, 2016), que em estudos farmacológicos vem mostrando atividades antioxidante (SCHWEDHELM et al., 2003), cardioprotetora (ANNAPURNA et al., 2009), anticarcinogênica (LIN et al., 2011), potencial efeito anticonvulsivante (NIEOCZYM et al., 2014), efeito antidepressivo (MACHADO et al., 2008), efeito neuroprotetor no modelo de isquemia

focal transiente em ratos atenuando a apoptose e aumentando a atividade enzimática de antioxidantes endógenos (KHAN et al., 2009), preveniu a morte neuronal e o prejuízo na memória espacial em um modelo de isquemia cerebral repetida (PU et al., 2007).

Por ser um tipo de ácido fenólico, as xantonas, são amplamente encontradas nas plantas medicinais, atuando em uma grande variedade de atividades biológicas como: antidiabética, anti-oxidativa, anti-inflamatória e antiviral (RUAN et al., 2017).

Cumarinas foram isoladas pela primeira vez em 1820 por Vogel, através da *Dipteryx odorata* Wild. Ela está presente em vegetais, café, frutas e vinho. Entre algumas de suas atividades farmacológicas estão propriedades anticoagulantes, anti-inflamatórias, antioxidante, anticâncer e atuam como inibidores da monoamino oxidase (MAO) e da acetilcolinesterase (STEFANACHI et al., 2018). A acetilcolina tem papel relevante na cognição. A enzima que a hidroliza é a acetilcolinesterase, a qual é encontrada nos neurônios pós-sinápticos. Quando existe um comprometimento da via colinérgica como observado na Doença de Alzheimer, déficits cognitivos começam a ocorrer e um dos tratamentos preconizados é com os inibidores de acetilcolinesterase. Os neurotransmissores serotonina, dopamina e noradrenalina são metabolizados pela MAO ou pela COMT. Por isso inibidores da MAO já vem sendo utilizados no tratamento da depressão e agora no tratamento da Doença de Parkinson com o intuito de atrasar a progressão da doença (RAMSAY; TIPTON, 2017).

Os fitoesteróis estão presentes em várias espécies de plantas, inclusive as que são utilizadas para consumo humano. Estudos farmacológicos vêm apontando algumas de suas propriedades como: atividade anabólica no músculo esquelético, melhora no desempenho esportivo e efeito hipoglicêmico (TARKOWSKA; STRNAD, 2016).



Figura 1 - Foto da planta *Polygala paniculata*.

Fonte: CO, L. L.; Phytoimages.siu.edu.

Em estudo realizado utilizando o extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata* por Bettio e colaboradores (2011) demonstrou que após uma hora de administração de uma dose do extrato este diminuiu consideravelmente o tempo de imobilidade no teste do nado forçado e não modificou a atividade locomotora no teste do campo aberto quando comparado ao controle nas doses de 0,01, 0,1, 10 e 30 mg/kg. Este trabalho também investigou a influência do sistema monoaminérgico sobre o efeito antidepressivo da *P. paniculata*, já que o mesmo apresentou um efeito tipo antidepressivo no teste do nado forçado como relatado anteriormente. Para compreender a relação entre o sistema monoaminérgico e o efeito antidepressivo desse extrato, foram utilizados antagonistas dos receptores de serotonina, dopamina e noradrenalina. Observou-se que a planta *Polygala paniculata* apresenta um efeito tipo antidepressivo possivelmente por interagir com os receptores 5-HT_{2A} visto que o pré-tratamento com cetanserina potencializou o efeito do extrato, com receptores D₁ e D₂ pois a SCH 23390 e a sulpirida reverteram o efeito do extrato e com os receptores α_2 e β já que o propranolol e a ioimbina também reverteram o efeito do extrato, nos respectivos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico (BETTIO et al., 2011).

Para avaliar um possível mecanismo antinociceptivo do extrato da planta *Polygala paniculata*, Lapa e colaboradores fizeram uso de alguns modelos que induzem nocicepção como o ácido acético, formalina,

capsaicina e cinamaldeído, glutamato e injeção intratecal de aminoácidos excitatórios e citocinas pró-inflamatórias. Com isso foi possível observar, por exemplo, no modelo de nociceção induzido pelo glutamato que o extrato apresentou um efeito antinociceptivo nas doses de 0,005, 0,01, 0,1 e 1,0 mg/kg, assim como um tempo de ação de até 8 horas após sua administração pela via oral. Com o composto rutina isolado da planta, foi possível constatar seu efeito antinociceptivo nas doses de 1, 3, 10, 30 e 100 mg/kg. O modelo da formalina tem duas fases, sendo a primeira neurogênica e a segunda inflamatória, na qual o efeito antinociceptivo do extrato mostrou-se claramente efetivo podendo sugerir uma possível ação anti-inflamatória. Este trabalho demonstrou também a ação do extrato sobre a injeção intratecal de citocinas (IL-1 β e TNF- α), onde o extrato foi efetivo em diminuir o comportamento álgico induzido pelo modelo nos animais e também foi capaz de agir diminuindo o comportamento nociceptivo gerado pelo NMDA. Foram utilizadas várias doses do extrato neste estudo e não foram constatados efeitos colaterais ou alterações motoras relevantes (LAPA et al., 2009).

Esta espécie de *Polygala* também demonstrou efeito protetor contra a neurotoxicidade induzida por metilmercúrio, um importante poluente ambiental. Os animais expostos a este agente apresentaram déficit motor o qual foi suprimido pelo uso do extrato da *Polygala*. Sua ação sobre enzimas antioxidantes como a glutationa peroxidase e a glutationa redutase também foi objeto de avaliação dos pesquisadores. Uma vez exposto ao metilmercúrio a atividade da enzima glutationa peroxidase foi reduzida no córtex cerebral e no cerebelo dos camundongos, o que foi evitado pela administração do extrato. Com relação a enzima glutationa redutase o poluente aumentou sua atividade nessas mesmas regiões cerebrais, mas o extrato inibiu este efeito no cerebelo. O efeito de neuroproteção demonstrado pelo extrato pode ser devido a sua ação antioxidante (FARINA et al., 2005). Esta planta demonstrou ação antifúngica, assim como seus isolados, a rutina e o aurapteno (JOHANN et al., 2011). Outro efeito interessante, foi demonstrado por Barros, em que o extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata* (EHPp) foi utilizado em um modelo de transtorno do estresse pós-traumático e foi capaz de minimizar os comportamentos de medo e tipo-depressivo nos animais (BARROS, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Exercendo um poder quase debilitante sobre o bem-estar físico e mental das pessoas o quadro algico muitas vezes associado ao transtorno depressivo maior, tem relevância e urgência na pesquisa, para tentar compreender seus mais variados mecanismos fisiopatológicos e suas possíveis causas. O empenho na busca por novos tratamentos farmacológicos na pesquisa pré-clínica é de suma importância para que novas perspectivas sejam criadas e cada vez mais plantas com provável efeito relacionado a esta importante questão possam ser investigadas. Visto que, a planta *Polygala paniculata* tem demonstrado efeitos relevantes em modelos experimentais que avaliaram a dor e a depressão, esses dados amparam a sua escolha como tratamento em um modelo de fibromialgia.

A compreensão dos mecanismos da dor crônica e de sua associação de comorbidades é de suma importância, por isso modelos animais com robustez e que atendam as validades de face, constructo e preditiva devem ser considerados para o estudo de novos alvos terapêuticos para o possível desenvolvimento de novos tratamentos que integrem os sinais e sintomas desta síndrome de dor crônica generalizada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

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

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento nociceptivo dos animais tratados com reserpina.
- Analisar a emocionalidade, como depressão e ansiedade, dos animais tratados com reserpina.
- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata* no comportamento nociceptivo dos animais com fibromialgia.
- Examinar a ação do extrato da planta *Polygala paniculata* na emocionalidade dos animais com fibromialgia.
- Avaliar a atividade locomotora dos animais submetidos ao tratamento com reserpina e tratados com o extrato da planta *Polygala paniculata*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a presente pesquisa, foram utilizados um total de 142 camundongos *Swiss* fêmeas, com idade entre 2 e 3 meses, obtidos do Biotério Central da Universidade de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina. Após a sua chegada, os animais foram alocados no Biotério Setorial do Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), no Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS/CCB) sendo mantidos neste mesmo local. Estes animais permaneceram em mini-isolador (caixas de polipropileno, 32x20x21), cada caixa com 4 animais, foi acoplada ao sistema de estantes de mini-isolador (ALESCO, série venti-life), o sistema de ventilação gera um fluxo contínuo e de baixa velocidade, o que garante uma troca de ar ideal e por consequência uma melhor qualidade de vida aos animais. Os animais foram mantidos em condições controladas em um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro, a temperatura do ambiente em 22°C, recebendo água e ração *ad libitum*. A ração é proveniente do Biotério Central da UFSC, sendo de natureza industrial e adequada para a nutrição de camundongos, a água utilizada para os animais foi filtrada. Antes do início de cada experimento, os animais foram avaliados quanto ao seu limiar mecânico por meio do teste de Von Frey, previamente aos protocolos de experimentação para que a distribuição dos grupos fosse homogênea antes da realização dos testes comportamentais. Os animais foram mantidos em ambientação por 1 hora na sala de experimentação antes do início dos testes comportamentais. Todos os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê do Uso Ético dos Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) nº do protocolo: 8939170718 e 8600150517.

Cumprе salientar que durante todo o processo metodológico dos experimentos foi resguardada de maneira rigorosa a integridade física dos animais, dentro do esperado para a adequada resposta ao modelo. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

4.2 INDUÇÃO DO MODELO DE FIBROMIALGIA

O modelo empregado no presente estudo foi adaptado do estudo de Nagakura e colaboradores (2009), o qual faz uso de reserpina para a indução do modelo (NAGAKURA et al., 2009).

Para a indução do quadro de fibromialgia foi utilizada a reserpina na dose de 0,25 mg/kg, a administração foi feita pela via subcutânea, uma vez por dia, por três dias consecutivos, no período matutino (KLEIN et al., 2014). Especificamente foi preparada uma solução estoque de reserpina (Sigma Aldrich - USA) com 10 mg em 1 ml de PBS e 5% de Tween 80. A partir desta foi preparada a dose de 0,25 mg/kg de reserpina necessária para a indução do modelo. Após os três dias consecutivos de administração de reserpina pela via subcutânea, os protocolos experimentais foram iniciados, sendo os dias de experimentos contados a partir da última dose de reserpina administrada, portanto, 1º, 2º, 3º dias, por exemplo, após a indução do modelo. Para o adequado estudo do modelo de fibromialgia, este projeto foi dividido em duas etapas, sendo que na primeira etapa foram utilizados dois grupos de animais, identificados como SAL e RES (animais em que foi induzido o quadro de fibromialgia), conforme descrito no Quadro 5, para avaliar de maneira mais precisa o comportamento dos animais e definir como a segunda etapa seria desenvolvida, com o intuito de investigar a ação do extrato da planta *P. paniculata* no modelo de fibromialgia induzida pela reserpina de acordo com o protocolo experimental apresentado na figura 2.

Quadro 5 – Identificação dos grupos dos animais utilizados na primeira etapa de experimentos deste projeto e descrição dos tratamentos.

Grupos	Tratamento
Grupo SAL	Administrado o veículo da reserpina, pela via (s.c.), durante três dias consecutivos.
Grupo RES	Administrado reserpina, pela via (s.c.), durante três dias consecutivos

Fonte: Elaborado pela autora.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

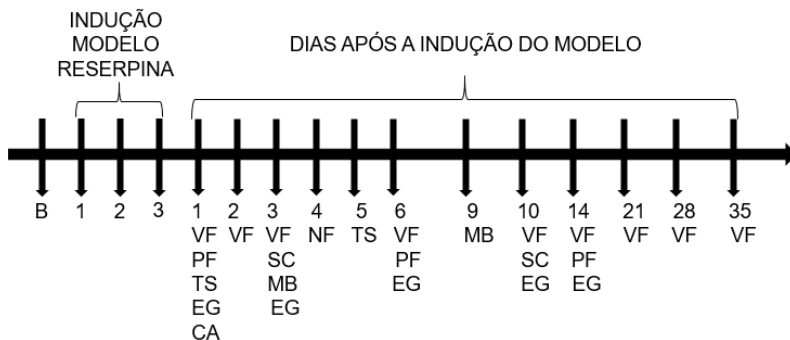


Figura 2 - Esquema do protocolo experimental. Legenda dos testes comportamentais: Von Frey (VF); Placa Fina (PF); Teste Sacarose (TS); Escala *Grimace* (EG); Campo Aberto (CA); Suspensão Cauda (SC); *Marble Burying* (MB); Nado Forçado (NF).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 TRATAMENTO

A planta *Polygala paniculata* foi colhida na Praia de Daniela (Florianópolis), em fevereiro de 2013, foi identificada pelo Professor Olavo de Araújo Guimarães e está depositada no Herbário UPGB da Universidade Federal do Paraná sob o número 26027. O extrato hidroalcoólico da planta foi preparado por Ana Paula Ruani e Tiago Tizziani, que fazem parte da equipe de pesquisa orientada pelo Professor Moacir Geraldo Pizzolatti, do Departamento de Química da UFSC. Para fazer o extrato foi utilizada a planta inteira, que foi seca e triturada, sendo então macerada com 80% de etanol-água. Com a evaporação do etanol, restou o concentrado da planta, o extrato.

A solução usada no tratamento dos animais, foi feita através da diluição do extrato em NaCl 0,9% (cloreto de sódio 0,9%), para cada dose desejada. Após os três dias consecutivos de indução do modelo de fibromialgia os animais foram tratados pela via intragástrica (i.g.) com salina e com extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* (EHPP) nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg. Os animais foram tratados duas vezes por dia com o EHPP ou veículo conforme o grupo de estudo (Quadro 6). Os testes foram realizados duas horas após os animais receberem o extrato pela via (i.g.). Este esquema de tratamento foi baseado no *time-course* realizado através do teste de filamento de Von Frey com as três doses do

EHPp. O tempo máximo de administração do tratamento com o extrato foi de dez dias. A Amitriptilina, na dose de 30 mg/kg, diluída em NaCl 0,9% (JESSE; WILHELM; NOGUEIRA, 2010), foi utilizada para o tratamento de um grupo de animais para comparar a sua ação com a do EHPp nos testes de emocionalidade e na avaliação locomotora, 1 hora após a sua administração pela via (i.g.).

Quadro 6 – Identificação dos grupos dos animais utilizados na segunda etapa de experimentos deste projeto e descrição dos tratamentos.

Grupos	Tratamento
Grupo Salina+Salina	Administrado o veículo da reserpina, pela via (s.c.), durante três dias consecutivos e os animais foram tratados pela via (i.g.) com o veículo do extrato da planta <i>P. paniculata</i> .
Grupo Salina+EHPp(100mg/kg)	Administrado o veículo da reserpina pela via (s.c.), durante três dias consecutivos e os animais foram tratados pela via (i.g.) com o EHPp na dose de 100mg/kg.
Grupo Reserpina+Salina	Administrado reserpina, pela via (s.c.), durante três dias consecutivos e os animais foram tratados pela via (i.g.), com o veículo do extrato da planta <i>P. paniculata</i> .
Grupo Reserpina+EHPp(10 mg/kg)	Administrado reserpina pela via (s.c.), durante três dias consecutivos e os animais foram tratados pela via i.g. com o EHPp na dose de 10mg/kg.
Grupo Reserpina+EHPp(30mg/kg)	Administrado reserpina pela via (s.c.), durante três dias consecutivos e os animais foram tratados pela via (i.g.), com o EHPp na dose de 30mg/kg.
Grupo Reserpina+EHPp(100mg/kg)	Administrado reserpina pela via (s.c.), durante três dias consecutivos e os animais foram tratados pela via (i.g.), com o EHPp na dose de 100mg/kg.
Grupo Reserpina+Amit (30 mg/kg)	Administrado reserpina pela via (s.c.), durante três dias consecutivos e os animais foram tratados pela via (i.g.), com a Amit. dose de 30mg/kg.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

A fibromialgia é uma síndrome de dor crônica generalizada associada a alterações neuropsicológicas como depressão, ansiedade, distúrbios do sono entre outros. Portanto, os testes comportamentais foram realizados para averiguar a nocicepção e as alterações de emocionalidade neste modelo. Os testes de suspensão de cauda e nado forçado foram feitos com baixa luminosidade, com a utilização de luz vermelha na sala e filmados através de uma câmera de filmagem modelo *Logitech HD 270* conectada ao computador. Não foram filmados os testes de Von Frey, placa fria, *Marble Burying*, Escala *Grimace* e Sacarose.

4.4.1 Avaliação da sensibilidade a estímulo mecânico

4.4.1.1 Teste de filamento de Von Frey

Para avaliar a alodínia mecânica nos camundongos, foi utilizado o teste de filamento de Von Frey de acordo com o método *up & down* modificado de Chaplan et al. (1994). De acordo com o descrito para o teste, os camundongos foram colocados individualmente e aclimatados durante 30 minutos em caixas de acrílico (9 cm x 7 cm x 11 cm) sobre plataformas de malha de arame fenestradas e elevadas à uma altura de 30 cm, para permitir acesso à superfície ventral da pata traseira direita (BOBINSKI, et al., 2011) (figura 3). Filamentos de Von Frey (0,02; 0,07; 0,16; 0,4; 1,4; 4,0 gramas; VFH, Stoelting, Chicago, EUA) foram aplicados verticalmente sobre a superfície plantar do membro posterior direito até o filamento curvar-se ligeiramente. O primeiro filamento a ser usado foi o 0,4 g e a força do próximo filamento foi diminuída ou aumentada de acordo com a resposta de retirada da pata (HERVERA et al., 2010). A frequência de resposta de retirada foi avaliada após 6 aplicações (duração média de 1s cada) dos filamentos de von Frey, sendo o limiar de resposta calculado utilizando o programa Microsoft Excel®.



Figura 3 – Fotografia do teste de filamento de Von Frey.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.2 Avaliação da sensibilidade a estímulo térmico

4.4.2.1 Teste da Placa Fria

Para avaliar a sensibilidade térmica ao frio, o camundongo foi exposto ao aparato da placa fria (figura 4), teste este realizado com algumas modificações, sendo observado se o animal mexe ou lambe a pata ou se permanece na ponta dos dedos das patas. Os animais foram ambientados previamente, por 5 minutos, sobre a placa do aparato. Na placa fria foi utilizada a temperatura de 10°C, durante o teste foram avaliadas as alterações anteriormente descritas para a retirada do animal, caso o mesmo não as apresente o tempo máximo de permanência foi de dois minutos (MIKA et al., 2015). Este teste avalia o quão sensível o animal é ao frio e é um teste rápido de ser avaliado (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017).

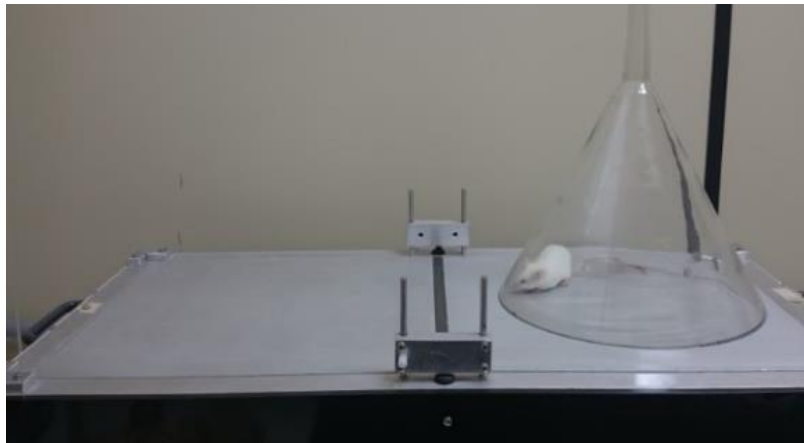


Figura 4 – Fotografia do teste da Placa Fria.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.3 Avaliação subjetiva da dor

4.4.3.1 Escala *Grimace*

A escala *Grimace* foi desenvolvida por Langford e colaboradores para avaliar expressões faciais de dor dos camundongos o que pode auxiliar no entendimento da experiência de dor espontânea dos camundongos. Neste método são avaliados o fechamento ocular através do estreitamento da área orbital com o fechamento da pálpebra. A protuberância do nariz analisando a extensão arredondada da pele visível na ponte do nariz. A protuberância do rosto através da aparência convexa do músculo da bochecha a partir de sua posição original. Na posição das orelhas observa-se orelhas separadas e para trás a partir da sua posição original. A mudança nas vibrissas é visualizada a partir da alteração de sua posição normal para trás, contra o rosto, para frente ou juntos. Essas informações recebem um valor de 0 (não presente), 1 (moderadamente visível), 2 (severo). Essa avaliação foi feita com algumas modificações, os animais foram ambientados em caixas de acrílico (9 cm x 7 cm x 11 cm) por 30 minutos e posteriormente observados para atribuir os valores especificados anteriormente relacionados a cada expressão facial (LANGFORD et al., 2010).

4.4.4 Avaliação do comportamento tipo depressivo

4.4.4.1 Teste de Suspensão pela Cauda

Para avaliação do comportamento tipo depressivo e possível atividade antidepressiva da planta *Poygala paniculata*, o teste utilizado foi o de suspensão pela cauda conforme exemplificado na figura 5, com algumas modificações, onde os camundongos foram avaliados por 6 minutos, os quais ficaram isolados por compartimentos, suspensos a 30 cm do chão por uma fita adesiva, sendo avaliado o tempo de imobilidade. O teste foi realizado com baixa luminosidade, foi filmado e as imagens foram registradas para posterior avaliação (STERU et al., 1985).



Figura 5 – Fotografia do teste de Suspensão de cauda.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.4.2 Teste do Nado Forçado

O teste do nado forçado (figura 6), desenvolvido por Porsolt e colaboradores, com adaptações, foi elaborado para avaliar propriedades antidepressivas de compostos. Neste teste o animal é colocado, individualmente, em um cilindro, preenchido com água a $\pm 25^{\circ}\text{C}$. A sala onde foi realizado o teste foi iluminada com luz vermelha, e as imagens gravadas para posterior visualização. O animal não tem como escapar desta situação, o que no início do teste leva a tentativas para tentar sair do aparato como nadar, escalar, lutar e mergulhar. O tempo de duração do teste é de cinco minutos, sendo contado o tempo que o animal passa estando imóvel. Após este período o animal é retirado da água, secado e retorna a sua caixa (KLOET; MOLENDJIK, 2016).



Figura 6 – Fotografia do teste do Nado Forçado.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.4.3 Teste da Sacarose (*Splash Test*)

O teste da sacarose também é utilizado para avaliar um comportamento tipo depressivo, o que diminuiria o comportamento de autolimpeza do animal (ISINGRINI et al., 2010) foi realizado com luz ambiente, com algumas adaptações. Os animais foram ambientados por dez minutos em caixas de acrílico (medida de 13 cm de comprimento por 8 cm de altura). Foi utilizado um borrifador para esguichar uma solução de sacarose a 10% na parte dorsal dos animais, em um total de três esguichos, o que provoca o comportamento de *grooming* (figura 7). Os camundongos foram avaliados por 5 minutos para determinar o tempo total de *grooming* de cada animal (HU et al., 2017).



Figura 7 – Fotografia do teste da Sacarose.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.5 Avaliação do comportamento tipo ansioso

4.4.5.1 Teste do *Marble Burying*

O *Marble Burying* é um teste sensível para identificar um comportamento tipo-ansioso nos animais (KEDIA; CHATTARJI, 2014). Assim como é sensível para avaliar o comportamento depressivo-doloroso e para verificar a ação farmacológica de drogas utilizadas para essas doenças (WILKERSON et al., 2018). O diazepam é eficaz em diminuir o número de bolas enterradas pelos animais (COLLA et al., 2015). É um teste também utilizado para avaliar o comportamento repetitivo/estereotipado, pois o comportamento de enterrar as bolas de vidro é compatível com o comportamento de escavação repetitivo nesses animais (THOMAS et al., 2009). O teste foi realizado de acordo com o protocolo de Kedia e Chattarji, com algumas modificações. Os animais foram colocados em caixas de acrílico com maravalha, até 5 cm de altura, individualmente para habituação por 10 minutos. Foram então removidos para que 20 bolinhas de vidro fossem colocadas a uma distância equivalente (figura 8). Os animais então retornaram para esse ambiente onde ficaram por 20 minutos para explorar. As bolinhas de vidro que estavam com 2/3 de sua superfície cobertas por maravalha foram computadas (KEDIA; CHATTARJI, 2014).



Figura 8 – Fotografia do teste do *Marble Burying*.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.6 Avaliação locomotora

4.4.6.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a atividade locomotora dos animais. O aparato (figura 9) utilizado para camundongos é feito de acrílico preto, com base cinza claro dividido com linhas pretas, é quadrado e tem o tamanho de 50 cm de comprimento por 40 cm de altura. Foram feitas algumas modificações no teste. O animal foi colocado no centro do aparato e avaliado por 5 minutos. Os fatores examinados foram: número de cruzamentos nos quadrados periféricos, número de cruzamentos nos quadrados centrais e a locomoção total (periferia+ central). O cruzamento é contado quando o animal atravessa o quadrado com as quatro patas (PRUT; BELZUNG, 2003). O teste foi realizado com luz vermelha e as imagens foram registradas para posterior avaliação.



Figura 9 – Fotografia do teste do campo aberto.

Fonte: Elaborado pela autora.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através do programa Graph Pad Prism versão 5.01 (USA). Os resultados estão representados como média \pm erro padrão da média (E.P.M) e para representação da Escala *Grimace* foi utilizado a mediana e intervalo interquartil. Quando foi feita a comparação somente entre dois grupos foi utilizado o teste *t de student* não pareado. Para avaliar a Escala *Grimace* foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis. Já para a comparação entre mais de dois grupos foi utilizada a ANOVA de uma ou duas vias com o teste *post hoc* de Bonferroni. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO DOS ANIMAIS TRATADOS COM RESERPINA.

Para avaliar o modelo animal de fibromialgia em camundongos fêmeas, foi primeiramente realizado a padronização deste modelo no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), o teste de filamento de Von Frey foi realizado para avaliar a sensibilidade ao estímulo mecânico. Este estudo demonstra que ambos os grupos de animais saíram de um mesmo basal (B) de limiar mecânico e que após a indução do modelo com reserpina (RES) por três dias consecutivos, seus limiares diferiram a partir do 1º dia após a administração de reserpina. Os resultados mostrados na figura 10 indicam que os animais que receberam reserpina tiveram a sensibilidade mecânica aumentada. Destaca-se uma acentuada queda no limiar mecânico no grupo RES nos dias 1, 2, 3, 6, 10, 14 e 21 [F (9, 162)= 15,12; $p < 0,001$] após o vigésimo oitavo dia não foram observadas diferenças estatísticas quando comparado ao grupo salina.

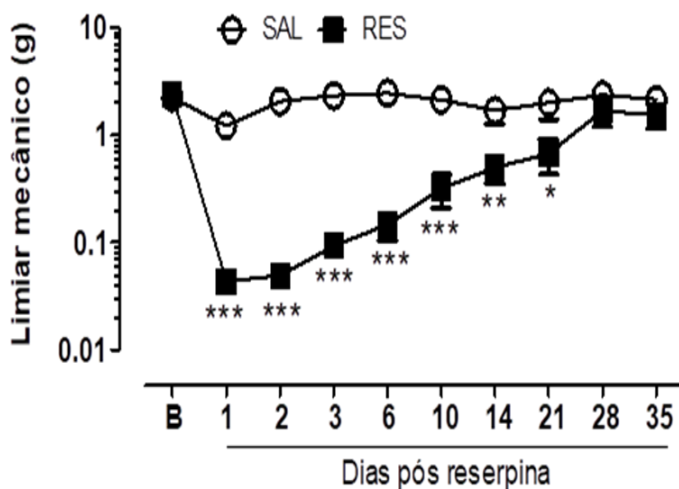


Figura 10 – Avaliação temporal da alodínia mecânica (teste de Von Frey) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos. B representa os valores referente a avaliação basal da alodínia

mecânica dos animais. Os valores expressam a média \pm EPM de 10 animais por grupo. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ indicam a diferença estatística em relação ao grupo SAL. (ANOVA de duas vias de medidas repetidas).

Fonte: Elaborado pela autora.

Para avaliar a sensibilidade térmica ao frio, foi utilizado o teste da Placa Fria. Os resultados demonstram que o grupo que recebeu reserpina (RES) apresentou aumento na sensibilidade térmica ao frio. Isso fica em evidência nos dias 1 e 6 [F(3,54)=26,26; $p < 0,0001$] após o último tratamento com reserpina, onde se observa uma redução no tempo de permanência na superfície da placa nos animais que receberam a reserpina quando comparado ao grupo salina (SAL) (figura 11).

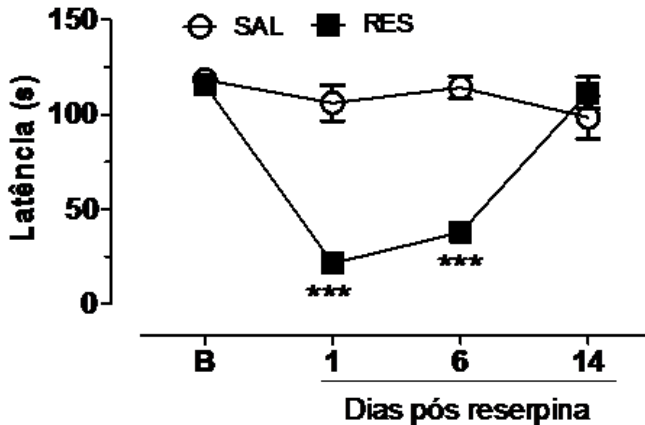


Figura 11 - Avaliação temporal da hiperalgesia térmica ao frio (teste da placa fria) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos. B, representa os valores referente a avaliação basal da sensibilidade térmica dos animais. Os valores expressam a média \pm EPM de 10 animais por grupo. *** $p < 0,001$ indicam a diferença estatística em relação ao grupo SAL. (ANOVA de duas vias de medidas repetidas).

Fonte: Elaborado pela autora.

A escala *Grimace*, foi utilizada com a finalidade de avaliar o componente emocional, que normalmente é subjetivo em humanos, frente ao quadro doloroso dos animais tratados com reserpina. Os dados da escala *Grimace* apresentados na figura 12 mostram que os dois grupos de animais tinham um score próximo de zero quando seu basal (B) foi

avaliado previamente a indução do modelo. Após os três dias consecutivos de administração de reserpina, foi possível observar diferenças nas expressões faciais dos camundongos. Nota-se que o grupo RES apresentou aumento na pontuação da escala nos dias 1, 3, 6 e 10 ($p < 0,05$), indicando que esses animais estavam apresentando algum grau de nocicepção quando comparado ao SAL, que se mostrou linear em seu score durante todo o experimento. Este resultado denota que foi possível visualizar por meio de expressões faciais que os animais estavam possivelmente vivenciando um quadro do tipo doloroso, como se observa nas fotografias demonstrando a diferença entre os dois grupos (Fig.13).

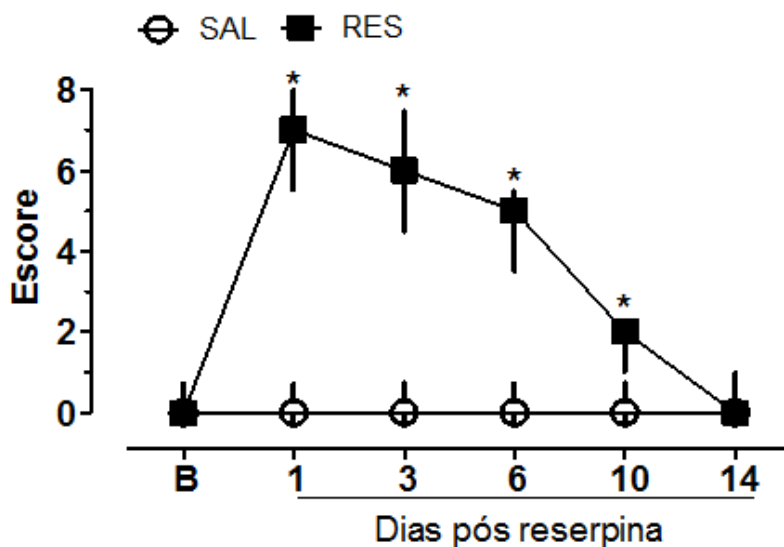
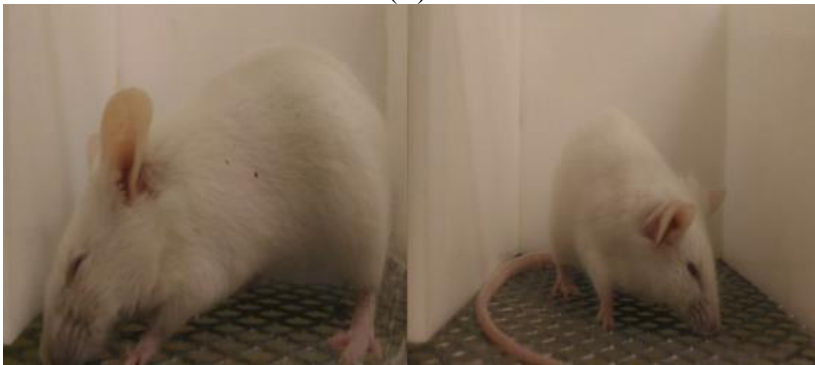


Figura 12 - Efeito da reserpina no modelo de fibromialgia sobre as expressões faciais dos animais avaliados através da Escala *Grimace*, após 3 dias consecutivos de administração de reserpina e salina pela via subcutânea. No gráfico: (B) avaliação basal dos dois grupos. Os valores expressam a mediana e o intervalo interquartil de 4-5 animais por grupo. * $p < 0,05$ indica a diferença estatística em relação ao grupo SAL. (Teste de Kruskal-Wallis).

Fonte: Elaborado pela autora.



(A)



(B)

(C)

Figura 13 - Fotografias dos animais do grupo SAL (A) e do grupo RES (B) e (C).

Fonte: Elaborado pela autora.

6.2 ANÁLISE DA EMOCIONALIDADE DOS ANIMAIS TRATADOS COM RESERPINA

Para analisar a emocionalidade neste modelo de fibromialgia, foram utilizados testes que avaliam características tipo depressivas e ansiosa nos animais. Constata-se através dos resultados obtidos com o teste de

suspensão pela cauda, utilizado para verificar um possível quadro tipo depressivo, na Figura 14A que o grupo RES apresentou um tempo de imobilidade maior quando comparado ao grupo SAL com t ($df=14$) = 4,948; $p < 0,001$ no terceiro dia após a indução do modelo. Contudo, não foi observado comportamento tipo depressivo significativo dos animais 10 dias após a indução do modelo, apesar do tempo de imobilidade do grupo RES ter sido maior que o grupo SAL (Fig. 14B).

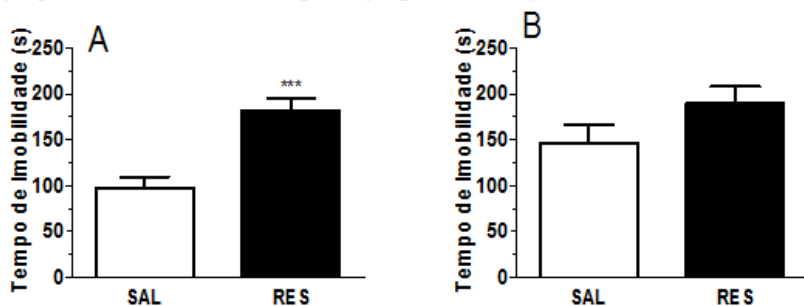


Figura 14 - Avaliação do comportamento tipo depressivo (teste de suspensão pela cauda) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos. O dado apresentado no gráfico A refere-se ao 3º dia e o gráfico B ao 10º dia após a indução do modelo. Os valores expressam a média \pm EPM de 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ indicam a diferença estatística em relação ao grupo SAL (teste *t de student* não pareado).

Fonte: Elaborado pela autora.

O teste de Nado forçado, também utilizado para verificação de características do tipo depressivas, foi realizado no 4º dia após a indução do modelo. A figura 15 mostra que o grupo RES apresentou um tempo de imobilidade significativamente maior quando comparado ao grupo SAL com t ($df=14$) = 4,949; $p < 0,001$.

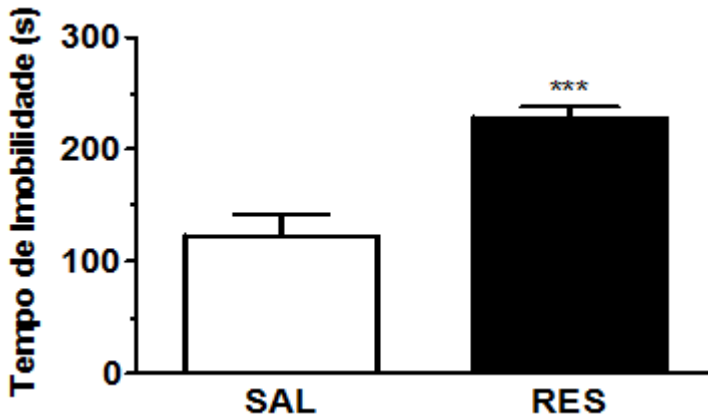


Figura 15 - Avaliação do comportamento tipo depressivo (teste do nado forçado) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos. Os dados apresentados são referentes ao 4^a dia após a indução do modelo. Os valores expressam a média \pm EPM de 8 animais por grupo. *** $p < 0,001$ indicam a diferença estatística em relação ao grupo SAL (teste *t de student* não pareado).

Fonte: Elaborado pela autora.

Do mesmo modo, o teste da Sacarose (*Splash Test*) foi utilizado para avaliar o comportamento do tipo anedônico presente na depressão, nos dias 1 e 5 após a indução do modelo, sendo contado o tempo de *grooming* dos animais. A figura 16 A e B mostra que não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos e nem entre os dias avaliados, apesar do tempo de autolimpeza do grupo RES ter sido menor no dia 1 e maior no dia 5 em relação ao grupo SAL.

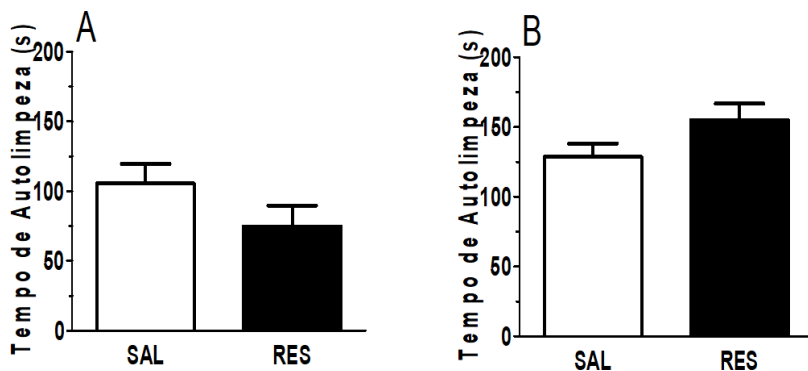


Figura 16 - Avaliação do comportamento anedônico (teste da sacarose) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos. Os dados apresentados no gráfico A são referentes ao 1º dia e o gráfico B ao 5º dia após a indução do modelo. Os valores expressam a média \pm EPM de 8 animais por grupo. Teste *t de student* não pareado.

Fonte: Elaborado pela autora.

Com o intuito de observar possíveis alterações relacionadas a um perfil tipo ansioso, foi utilizado o teste do *Marble Burying*, nos dias 3 e 9 após a indução do modelo. Este teste conta o número de bolas de vidro enterradas pelos animais no tempo de 20 minutos. A figura 17 A e B mostra que não foram observadas diferenças estatísticas no número de bolas de vidro enterradas pelos animais entre os grupos e nem entre os dias avaliados, apesar do número de bolas de vidro enterradas do grupo RES ter sido maior no dia 3 em relação ao grupo SAL. Por meio desta abordagem não foi possível verificar se a reserpina é capaz de promover um quadro do tipo ansioso.

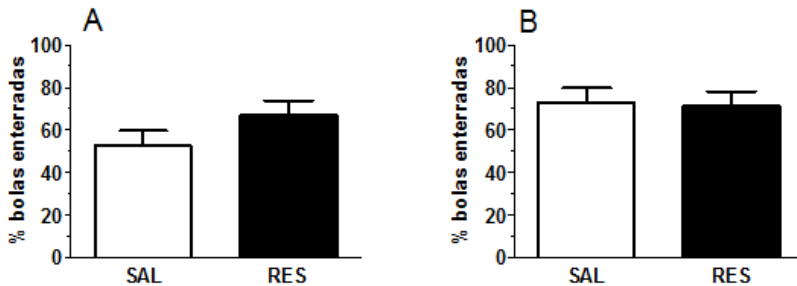


Figura 17 - Avaliação do comportamento tipo ansioso (teste do *Marble Burying*) no modelo de fibromialgia induzido pela administração de reserpina em camundongos. Os dados apresentados no gráfico A refere-se ao 3º dia e o gráfico B ao 9º dia após a indução do modelo. Os valores expressam a média \pm EPM de 8 animais por grupo. Teste *t de student* não pareado.

Fonte: Elaborado pela autora.

6.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PLANTA *Polygala paniculata* NO COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO DOS ANIMAIS COM FIBROMIALGIA.

A Figura 18 mostra que o extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata* (10-100 mg/kg) promoveu redução dependente da dose da alodínia mecânica (teste Von Frey) presente no modelo de fibromialgia induzida pela reserpina. Os dados apresentados na figura 18 A [$F(12,162)=11,32$; $p<0,0001$] e figura 18 B [$F(12,162)= 13,07$; $p<0,001$] mostram a redução no limiar mecânico dos animais Reserpina+Salina comparados ao Salina+Salina desde B1 até o 6º dia. Já os dados da figura 18 C [$F(18,216)=7,581$; $p<0,001$] e da figura 18 D [$F(18,216)= 8,770$; $p<0,001$] mostram que o extrato nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg foi capaz de alterar consideravelmente a sensibilidade mecânica causada pela reserpina (Reserpina+Salina) no 1º dia avaliado através do decurso temporal (gráfico C) com um tempo de ação de até 8 horas para a dose de 10 mg/kg e até 24 horas para as doses de 30 e 100mg/kg, apresentando diferença estatística até o 6º dia com as três doses (gráfico D).

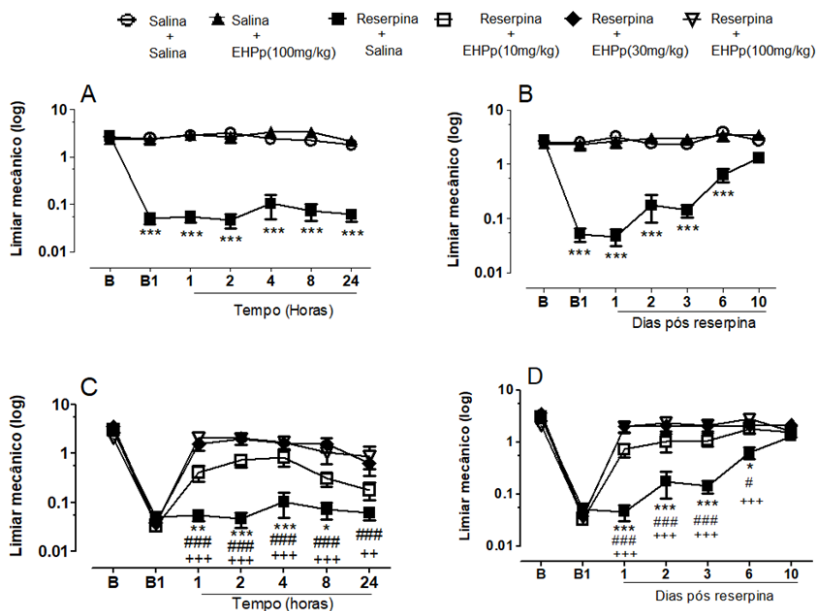


Figura 18 - Avaliação do decurso temporal (teste de Von Frey) do efeito do extrato da planta *P. paniculata* no modelo animal de fibromialgia induzida pela reserpina. Na figura (B1): basal após administração da reserpina. Os valores expressam a média \pm EPM de 10 animais por grupo. Os gráficos A e B mostram o decurso temporal e avaliação dos dias após indução do modelo, nos grupos controle $***p < 0,001$ em relação ao grupo Salina + salina. Os gráficos C e D demonstram a avaliação das doses de EHPp (10, 30 e 100 mg/kg). $***p < 0,001$ (10 mg/kg), $###p < 0,001$ (30 mg/kg), $+++p < 0,001$ (100 mg/kg) em relação ao grupo Reserpina + salina. (ANOVA de duas vias).

Fonte: Elaborado pela autora.

Para avaliar o efeito do extrato, na sensibilidade térmica através do teste da Placa fria (figura 19), foram escolhidas as doses de 10 mg/kg e 100 mg/kg, e o teste foi realizado no 1º dia após a indução do modelo com reserpina. As análises estatísticas por meio da ANOVA de uma via mostraram um efeito significativo [$F(4,39)=9,546$; $p < 0,001$]. Posteriores análises *post-hoc* por meio do teste de Bonferroni mostraram que o tempo de permanência na superfície do aparato para o grupo Reserpina+Salina foi menor quando comparado ao Salina+Salina ($p < 0,01$). Ainda, as análises demonstraram que o tratamento com o extrato nas doses de 10 mg/kg e 100mg/kg foram capazes de reduzir a alteração sensorial gerada pela reserpina.

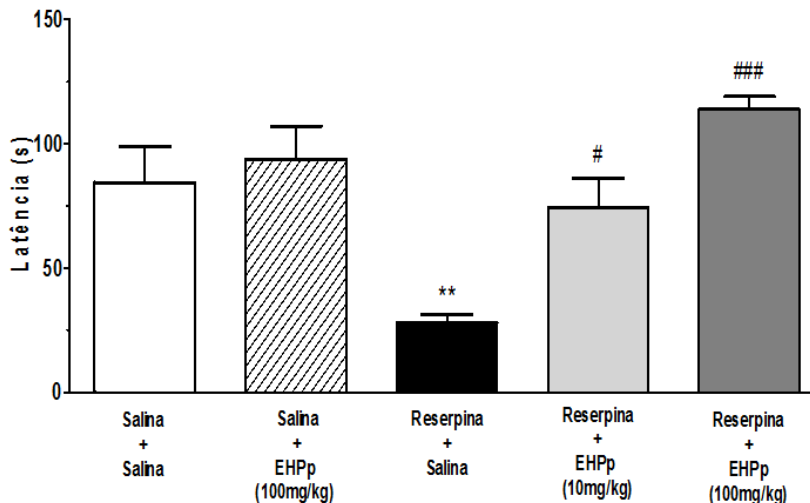


Figura 19 - Avaliação do extrato da planta *P. paniculata* na sensibilidade térmica (teste da Placa Fria) no modelo animal de fibromialgia. Os valores expressam a média \pm EPM de 8-10 animais por grupo. ** $p < 0,01$ diferença estatística em relação ao grupo Salina + Salina. # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ diferença estatística para o grupo Reserpina + Salina. (ANOVA de uma via).

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 20 mostra o resultado do teste da escala *Grimace*. As análises estatísticas por meio do teste de Kruskal-Wallis mostraram que houve diferença sobre a pontuação da expressão facial dos animais. A diferença com relação aos aspectos avaliados como por exemplo, a abertura ocular e a posição das orelhas, como descrito nos métodos foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os grupos Reserpina+Salina comparado ao Salina+Salina desde o B1 até o 10º dia. Com relação aos grupos que receberam tratamento com o EHPp, observa-se seu efeito na dose de 100 mg/kg do segundo ($p < 0,01$) ao terceiro dia ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo Reserpina+Salina. Não foram observadas diferenças estatísticas nos grupos tratados com o EHPp nas doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg quando comparados ao grupo Reserpina+Salina.

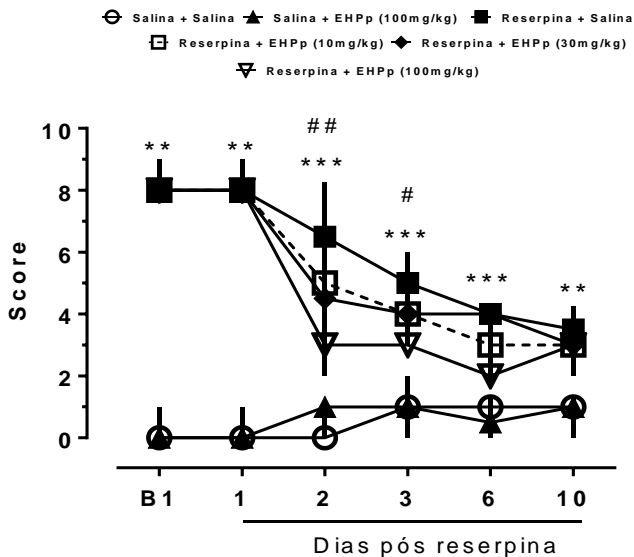


Figura 20 - Avaliação do EHPp sobre o componente emocional associado a dor (Escala *Grimace*) no modelo de fibromialgia induzido pela administração de reserpina em camundongos. Na figura (B1): basal dos animais após a indução do modelo. Os valores expressam a mediana e o intervalo interquartil de 10 animais por grupo. O gráfico mostra a diferença estatística entre o grupo Reserpina+Salina (** $p < 0,001$) comparado ao Salina+Salina. Nos grupos tratados com o EHPp, nota-se seu efeito a partir do 2º dia com a dose de 100mg/kg (## $p < 0,01$) até o 3º dia (# $p < 0,05$) quando comparado ao Reserpina+Salina. (Teste de Kruskal-Wallis).

Fonte: Elaborado pela autora.

6.4 ANÁLISE DA AÇÃO DO EXTRATO DA PLANTA *Polygala paniculata* NA EMOCIONALIDADE DOS ANIMAIS COM FIBROMIALGIA.

Para investigar o efeito do extrato na emocionalidade dos animais, com relação ao perfil tipo depressivo, as doses escolhidas foram a de 10mg/kg e a de 100mg/kg. Estas foram escolhidas por apresentarem efeito nos testes de Von Frey e na Placa fria. As análises estatísticas por meio da ANOVA de uma via mostraram um efeito significativo [$F(5,60) = 7,084$; $p < 0,001$] (Fig.21). Posteriores análises *post hoc* por meio do teste de Bonferroni mostraram que houve diferença no tempo de imobilidade entre o grupo Reserpina+Salina contraposto ao grupo

Salina+Salina ($p<0,01$). Ainda, as análises demonstraram que o tratamento com o extrato nas doses de 10mg/kg e 100mg/kg não foi capaz de prevenir a alteração gerada pela reserpina. Contudo, a amitriptilina na dose de 30mg/kg foi capaz de reverter o quadro gerado pela reserpina ($p<0,001$) quando comparado ao grupo Reserpina+Salina.

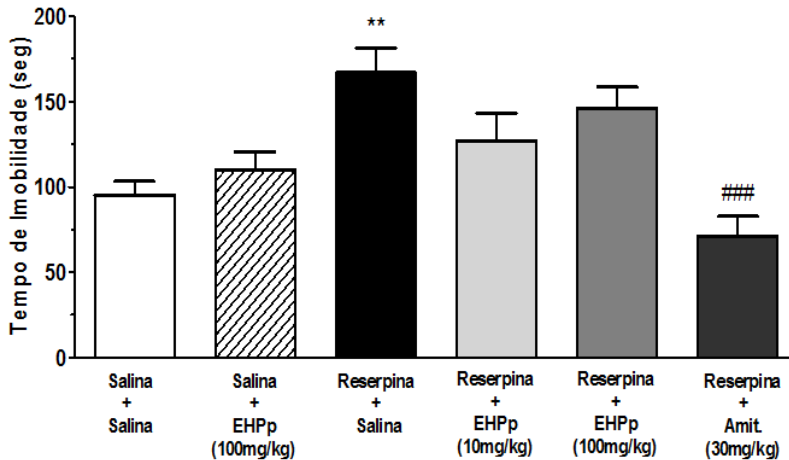


Figura 21 - Avaliação do efeito do EHPp no comportamento tipo depressivo (teste da suspensão pela cauda) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos. Teste realizado no 3º dia, após a indução do modelo. Os valores expressam a média \pm EPM de 10-12 animais por grupo. O grupo Reserpina+Salina diferiu estatisticamente (** $p<0,01$) quando comparado ao Salina+Salina. O EHPp não apresentou efeito nas doses de 10 e 100 mg/kg, mas a amitriptilina (30 mg/kg) diferiu estatisticamente (### $p<0,001$) do grupo Reserpina+Salina. (ANOVA de uma via).

Fonte: Elaborado pela autora.

Adicionalmente ao teste de suspensão pela cauda, foi investigado o efeito do extrato no teste do Nado Forçado (figura 22). As avaliações estatísticas por meio da ANOVA de uma via mostraram um efeito significativo [$F(5, 60) = 5,099; p<0,01$]. Posteriores análises *post hoc* por meio do teste de Bonferroni demonstram que houve diferença no tempo de imobilidade entre o grupo Reserpina+Salina contraposto ao grupo Salina+Salina ($p<0,05$). As análises também mostraram que o tratamento com o EHPp nas doses de 10mg/kg e 100mg/kg foram capazes de prevenir as alterações causadas pela reserpina ($p<0,05$ em ambas as doses), ainda a amitriptilina conseguiu reverter o efeito reserpina ($p<0,001$) quando comparado ao grupo Reserpina+Salina.

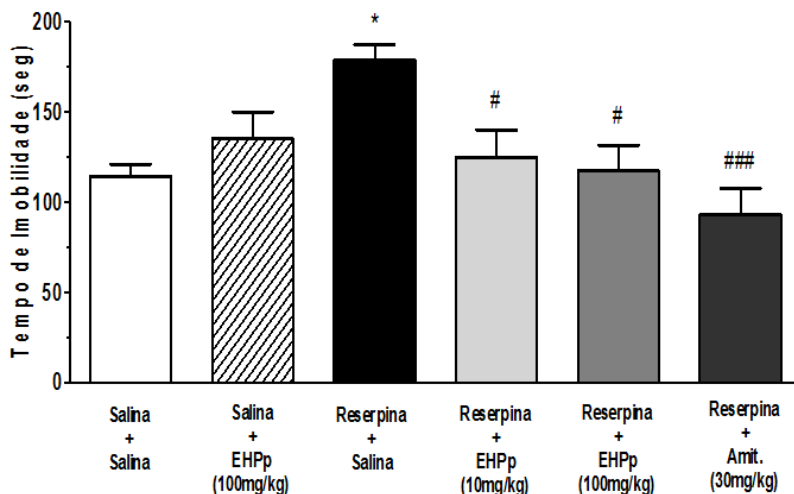


Figura 22 - Análise do EHPp no comportamento tipo depressivo (teste do nado forçado) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos. Os dados apresentados são referentes ao 4º dia após a indução do modelo. Os valores expressam a média \pm EPM de 10-12 animais por grupo. A figura mostra que o grupo Reserpina+Salina diferiu estatisticamente (* $p < 0,05$) quando contraposto ao grupo Salina+Salina. Os grupos tratados com o EHPp diferiram estatisticamente (# $p < 0,05$) quando comparados ao grupo Reserpina+Salina, assim como os animais tratados com Amitriptilina (30mg/kg) (### $p < 0,001$) (ANOVA de uma via).

Fonte: Elaborado pela autora.

6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA DOS ANIMAIS SUBMETIDOS A ADMINISTRAÇÃO DE RESERPINA E TRATADOS COM O EXTRATO DA PLANTA *Polygala paniculata*.

Para investigar a ação reserpina e do EHPp sobre a atividade locomotora dos animais, foi utilizado o teste do campo aberto, visando avaliar a locomoção espontânea dos animais com relação ao modelo de fibromialgia escolhido por este trabalho. As análises estatísticas por meio da ANOVA de uma via mostraram um efeito significativo [$F(4,47)=6,362$; $p < 0,001$] nos cruzamentos totais (Fig. 23 A). Subsequentes análises *post hoc* por meio do teste de Bonferroni mostraram que houve diferenças nos números de cruzamentos totais entre os grupos Reserpina+Salina ($p < 0,01$), Reserpina + EHPp (10 mg/kg, $p < 0,05$), Reserpina+EHPp (100mg/kg, $p < 0,05$) e Reserpina+Amit

(30mg/kg, $p < 0,001$) comparado ao Salina+Salina. Entretanto as análises demonstraram que o tratamento com EHPp não foi capaz de prevenir a hipolocomoção causada pela reserpina.

Com relação aos cruzamentos periféricos na Figura 23 B, as avaliações estatísticas por meio da ANOVA de uma via demonstram um efeito significativo [F(4,47)=6,394; $p < 0,001$]. Posteriores análises *post hoc* por meio do teste de Bonferroni mostraram diferenças estatísticas nos números de cruzamentos periféricos entre os animais dos grupos Reserpina+Salina ($p < 0,01$), Reserpina+EHPp (10mg/kg, $p < 0,05$) e Reserpina+Amit (30mg/kg, $p < 0,001$) quando comparados ao grupo Salina+Salina. Contudo, o extrato não foi capaz de reverter a redução na locomoção gerada pela reserpina. Com referência aos cruzamentos centrais, as avaliações estatísticas por meio da ANOVA de uma via revelam que não houve diferenças estatísticas entre os grupos [F(4,47)=1,278; $p > 0,05$] (Fig.23 C).

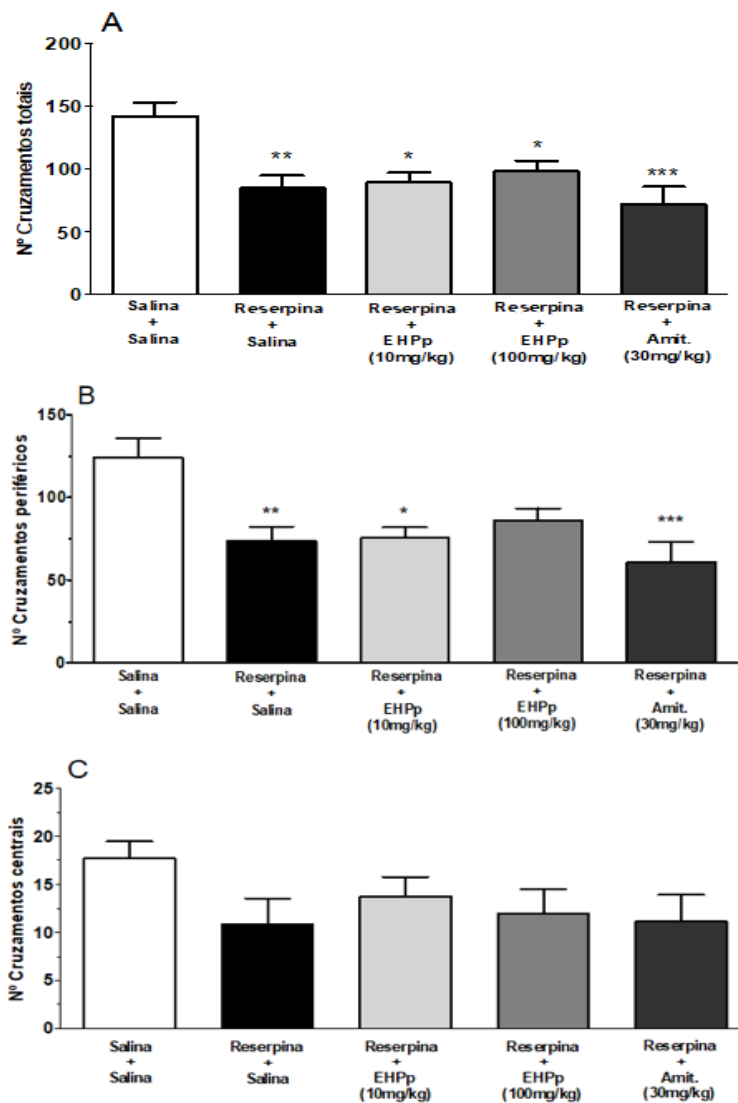


Figura 23 - Efeito da reserpina e avaliação do EHPp sobre a locomoção (teste do campo aberto) no modelo de fibromialgia induzida pela administração de reserpina em camundongos. Teste realizado no 1º dia após a indução do modelo. Os valores expressam a média \pm EPM de 8-12 animais por grupo. Os dados mostram a diferença estatística dos demais grupos em relação ao grupo Salina+Salina * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA de uma via).
Fonte: Elaborado pela autora.

7 DISCUSSÃO

Com o intuito de ampliar os conhecimentos até então existentes com relação aos modelos animais de fibromialgia, e tentar agregar novas formas de avaliação, a opção pela utilização de camundongos fêmeas, agrega novos dados a literatura para uma melhor compreensão do modelo animal visto que a prevalência desta síndrome é muito superior no sexo feminino (HEIDARI et al., 2017) e o modelo escolhido para esta pesquisa foi baseado nos conhecimentos obtidos com o desenvolvimento original de um modelo animal, elaborado por Nagakura e colaboradores que foi capaz de integrar as validações de face, constructo e preditiva (NAGAKURA et al., 2009).

Sabe-se que os pacientes com fibromialgia possuem uma sensibilidade aumentada a estímulos mecânicos, ao calor e ao frio. Em muitos casos essa resposta dolorosa ocorre com determinados estímulos que não geram dor em pessoas saudáveis (BRADLEY, 2009). Os dados encontrados no presente estudo após a indução do modelo de fibromialgia com reserpina demonstraram que os animais que receberam reserpina apresentaram uma alodínia mecânica do 1º ao 21º dia após a indução do modelo, que foi avaliada por meio do teste de filamento de Von Frey, esses achados são semelhantes aos encontrados por Nagakura e colaboradores em ratas, as quais apresentaram um baixo limiar mecânico de resposta tátil neste mesmo teste, presente até o 14º dia (NAGAKURA et al., 2009). Outro estudo, observou a presença de hiperalgesia mecânica e alodínia tátil do primeiro ao sétimo dia após a indução do modelo em ratas (HERNANDEZ-LEON et al., 2018).

A percepção da temperatura é de grande valia para evitar condições nocivas ao organismo (MCKEMY, 2013). O trato espinotalâmico é o responsável por levar as informações relacionadas a temperatura ao encéfalo. As fibras responsáveis pela condução do estímulo térmico, nesse caso o frio, são as fibras C e A δ . A dor ao frio se faz presente em muitas patologias tanto de origem central quanto periférica, o que faz com que as pessoas por ela acometidas possam vir a desenvolver um quadro de hiperalgesia ou alodínia ao frio (YIN et al., 2015). Existem vários receptores ao frio, dentre eles estão os canais iônicos como o TRP (potencial receptor transiente) sendo que o TRPM8, age como um detector ao frio e é sensível a pequenas variações de temperatura e o TRPA1 é encarregado pela sensação dolorosa ao frio (BELMONTE; BROCK; VIANA, 2009).

Na avaliação da sensibilidade térmica ao frio, verificado através da placa fria, esse estudo demonstrou que os animais expostos a

administração da reserpina tiveram seus limiares de sensibilidade ao frio reduzidos no 1º e 6º dia de testes. Corroborando os achados da presente pesquisa, um estudo utilizou o teste da acetona, para estudar a resposta ao frio, em ratos machos reserpinados, e encontraram um aumento na sensibilidade térmica do 1º ao 10º dia (OE et al., 2010). O hipotálamo é responsável pela temperatura corporal e as monoaminas atuam nessa região (CRANSTON; ROSENDORFF, 1967), a Área Pré Óptica, faz parte de um dos núcleos do hipotálamo e tem grande importância na regulação da temperatura (CONTRERAS et al., 2017), essa área é necessária para a resposta térmica ao frio uma vez que ela recebe os sinais oriundos da medula espinal por meio de estímulos sensoriais nos termorreceptores (TAN; KNIGHT, 2018). Outras regiões hipotalâmicas como a ventromedial, a dorsomedial e a posterior também interagem na resposta ao frio, como visto em um estudo que utilizou ratos para avaliar a regulação da temperatura por meio da temperatura corporal dos ratos e fez uso de microdiálise para mensurar as concentrações de monoaminas nessas regiões hipotalâmicas quando expostos a uma temperatura de 5°C por três horas. Eles observaram que durante a exposição ao frio houve aumento nas concentrações de 5-HT na região dorsomedial e do metabólito da DA, o ácido 3,4 di- hidroxifenilacético na região posterior, indicando que essas áreas podem fazer parte da produção de calor quando o animal é exposto ao frio (ISHIWATA; GREENWOOD, 2017). Outro estudo avaliou no bulbo de gatos que a norepinefrina e a serotonina estão envolvidas na via aferente de regulação da temperatura (LEE et al., 1977). Como a reserpina altera as concentrações normais de monoaminas diminuindo-as consideravelmente, esses dados também ajudam a explicar o aumento da sensibilidade ao frio encontrada no teste da placa fria.

Na busca por tentar um método de investigação nociceptiva que envolva não somente testes desenvolvidos na linha de quantificação da sensibilidade mecânica e térmica, este estudo fez uso de uma avaliação subjetiva para tentar ampliar os conhecimentos e tentar caracterizar de maneira qualitativa o quadro nociceptivo gerado pela reserpina. Isto foi possível por meio da utilização da escala *Grimace*, na qual as características das expressões faciais exibidas pelos animais são pontuadas. O presente estudo demonstrou por meio desta ferramenta que os animais expostos a ação da reserpina, apresentaram mudanças faciais perceptíveis, que provavelmente revelam um quadro nociceptivo, do 1º ao 10º dia após a indução do modelo, quando comparados aos animais que receberam o veículo da reserpina. Até o presente momento alguns estudos fizeram uso desta escala em modelos de laparotomia com associação ao tratamento com analgésicos (MATSUMIYA et al., 2012),

indução cirúrgica de infarto do miocárdio (FALLER et al., 2014), vasectomia (LEACH et al., 2012), injeção intra-plantar de carragenina (LEUNG et al., 2016), portanto essas pesquisas fortalecem e apoiam o uso deste método para mensurar o quadro algico no animal e o efeito de tratamentos analgésicos.

O presente estudo verificou que o extrato da *P. paniculata* inibiu a nocicepção causada pela reserpina, averiguada através dos testes de Von Frey e placa fria nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, com um tempo de ação avaliado no decurso temporal de até 8 horas para a dose de 10 mg/kg e até 24 horas para as doses de 30 e 100mg/kg. A propriedade antinociceptiva desse extrato já havia sido previamente investigada por Lapa e colaboradores (2009) que mostraram que o extrato administrado pela via oral apresentou um efeito protetor nas doses de 0,001 a 10 mg/kg com relação ao comportamento nociceptivo induzido por modelos como a injeção intraperitoneal de ácido acético, formalina, capsaicina, glutamato e injeção intratecal de aminoácidos excitatórios e citocinas pró-inflamatórias. A dose de 0,1 mg/kg foi escolhida para investigar o tempo de ação do extrato por meio do teste da injeção intraplantar de glutamato na pata do animal, demonstrando um efeito antinoceptivo de até 8 horas após o tratamento (LAPA et al., 2009).

Alguns fármacos vêm sendo testados no modelo animal de fibromialgia induzida pela reserpina. Ogino e colaboradores relataram em seus estudos que os agonistas de receptores 5-HT_{2c} (Locarserin, YM 348 e Vabicaserin) foram capazes de reduzir a hiperalgesia muscular nos animais submetidos a este modelo (OGINO et al., 2013). Já em um modelo de fibromialgia induzido pelo estresse ao frio, Nishiyori e colegas constataram em seus estudos que a injeção intratecal de antidepressivos como milnacipran, paroxetina e amitriptilina em animais apresentou um efeito analgésico na hiperalgesia térmica (NISHIYORI et al., 2011). A reserpina, em ratos, causa uma diminuição no limiar de pressão muscular, o estudo realizado por Kiso e colaboradores demonstrou que a pregabalina (10 e 30 mg/kg) e a duloxetina (30 mg/kg) foram capazes de aumentar o limiar de pressão muscular nesses animais. A pregabalina foi capaz de elevar a concentração de norepinefrina e a duloxetina também foi capaz de aumentar as concentrações de dopamina, serotonina e norepinefrina no corno dorsal da medula espinal (KISO et al., 2018).

As expressões faciais são estudadas há muito tempo, pois através delas são expressas tanto emoções quanto um indicio de dor. Elas são de grande valia para tentar compreender a dor em pacientes que não podem se comunicar verbalmente, como os neonatos e pacientes em coma (ARIF-RAHU, GRAP, 2010; PRKACHIN, 2009). O extrato também se

mostrou efetivo na dose de EHPp 100mg/kg utilizada neste estudo na análise por meio da escala *Grimace*, fortalecendo os dados encontrados nos outros testes que avaliaram a sensibilidade mecânica e térmica. Ao que consta este é o primeiro estudo que investigou o efeito da *P. paniculata* por meio dessa escala.

O próximo passo para adequada compreensão do modelo de fibromialgia foram os testes realizados para o estudo da emocionalidade, onde foi possível analisar o perfil tipo depressivo devido ao uso da reserpina nos animais nos testes de suspensão de cauda no terceiro dia e no nado forçado no quarto dia, pois estes animais tiveram um tempo de imobilidade maior, o que caracterizaria um quadro tipo depressivo. Nagakura e colaboradores utilizando esse modelo em ratos, também verificaram aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado nos dias 3, 5, 7 e 14 que se seguiram após a indução do modelo (NAGAKURA et al., 2009). Estudos utilizaram o modelo em camundongos machos *Swiss* na dose de 0,25 mg/kg por três dias consecutivos conseguindo a mesma resposta no nado forçado, obtida por este estudo, mas no primeiro dia após a indução com reserpina (SOUZA et al., 2014; KLEIN et al., 2016).

Assim como em trabalho realizado por Liu e colaboradores que obtiveram dados semelhantes aos nossos, nos testes do nado forçado e suspensão pela cauda em camundongos machos C57BL/6 após a administração das três doses de 1 mg/kg de reserpina, em dias consecutivos (LIU et al., 2014). Também foi encontrado o perfil tipo depressivo no teste do nado forçado em ratos submetidos a administração de reserpina por 14 dias na dose de 0,2 mg/kg (ANTKIEWICZ-MICHALUK et al., 2014). Associado a estes testes, o da sacarose não demonstrou diferença estatística nos dias em que foi realizado, não foram encontrados dados na literatura sobre esse teste com o modelo de fibromialgia utilizado neste estudo. Atualmente, as pesquisas apontam para prováveis mecanismos que podem estar envolvidos na depressão, dentre eles: alterações no eixo HPA, fatores ambientais e genéticos e a hipótese das monoaminas. Esta última é explicada devido a diminuição de 5-HT, DA e NA na fenda sináptica, que vem sendo encontrada pelo exame de PET em pacientes com depressão. Isso também poderia ocorrer por alterações nos receptores, gerando prejuízo na ligação dos neurotransmissores, afetando sua transmissão (JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2017). Algumas regiões cerebrais estão sendo relacionadas a depressão como córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala por alterações encontradas nesses pacientes através de exames de imagem. Todos os circuitos de comunicação neural que fazem parte da depressão

estão intimamente relacionados a ação das monoaminas, pois a área tegmental ventral responsável pela DA, *locus coeruleus* pela NA e a rafe dorsal pela 5-HT mandam projeções para todas essas regiões (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Uma vez que a reserpina sabidamente diminui as concentrações de monoaminas e tem como efeito colateral a depressão, sua utilização no modelo animal de fibromialgia conseguiu induzir um perfil tipo depressivo nos animais o que fortalece a validade de face e de constructo deste modelo.

Foi utilizado o teste do *Marble Burying*, mas não foi constatado por meio desse teste um perfil tipo ansioso nos animais que pudesse ser causado pela reserpina, também não foi encontrado na literatura esta abordagem específica em outros estudos nesse modelo. Esse teste foi utilizado em outro estudo com objetivo de avaliar possíveis efeitos ansiolíticos do ácido ascórbico e da cetamina, mas não foram encontradas diferenças nesse teste específico para as doses utilizadas no trabalho, entretanto o ácido ascórbico e a cetamina demonstraram efeito tipo ansiolítico nos testes do labirinto em cruz elevado, caixa claro/escuro e campo aberto (FRAGA et al., 2018). O *Marble Burying* também não foi capaz de demonstrar diferença com a ação do ácido ursólico mas foi sensível ao diazepam. Já em outros testes que avaliaram o perfil tipo ansioso dos animais como o teste do campo aberto e o teste do labirinto em cruz elevado foi possível observar o efeito tipo ansiolítico do ácido ursólico (COLLA et al., 2015). Muitas vezes associada ao quadro depressivo e a dor, a ansiedade gera prejuízo na qualidade de vida dos pacientes. A sua fisiopatologia ainda não foi esclarecida, mas a diminuição na concentração de 5-HT no líquido desses pacientes foi encontrada. A noradrenalina também parece estar envolvida, visto que alguns estudos encontraram um aumento na concentração plasmática desse neurotransmissor (NUTT et al., 2002). Atualmente, o tratamento farmacológico inicial de escolha para a ansiedade é realizado com o uso de inibidores seletivos da receptação de serotonina (LEICHSENRING; LEWEKE, 2017). Talvez outros testes que avaliem esse comportamento tipo ansioso, possam ser válidos para trazer mais robustez aos dados aqui obtidos. Já que esse teste é relacionado ao comportamento de escavação encontrado nesses animais e tem mostrado sua utilidade para investigar principalmente comportamentos repetitivos (THOMAS et al., 2009). Outro fator que pode ter contribuído para esse resultado é o fato de que a reserpina depleta as concentrações tanto de 5-HT quanto de NA, o que neste último caso difere dos dados encontrados na clínica.

Foi avaliado se o extrato seria capaz de exercer efeito no perfil tipo depressivo induzido pela reserpina que foi encontrado nos animais. Para

isso escolhemos a menor e a maior dose efetiva dada pelos testes da placa fria e pelo teste do Von Frey. No teste de suspensão de cauda não foi observado efeito do extrato em nenhuma das doses, já no teste do nado forçado as duas doses de escolha mostraram efeito protetor significativo, reduzindo o tempo de imobilidade dos animais que foram tratados em comparação ao grupo que foi tratado somente com salina.

Em pesquisa sobre a ação do extrato da *P. paniculata* no perfil tipo depressivo, Bettio e colaboradores, mostraram um efeito antidepressivo nas doses de 0,01-30mg/kg no teste do nado forçado (BETTIO et al., 2011). Os antidepressivos tricíclicos (ADT), como a amitriptilina, tem como mecanismos de ação o bloqueio da captação de serotonina e norepinefrina (RANG et al., 2012). Os resultados descritos nesse trabalho fortalecem sua ação antidepressiva, já que a amitriptilina foi capaz de reverter o quadro tipo depressivo induzido pela reserpina no teste da suspensão pela cauda e no nado forçado. Da mesma forma, esse antidepressivo tricíclico, na dose de 30mg/kg, foi eficaz em diminuir o tempo de imobilidade no nado forçado em um modelo de lesão por constrição crônica em camundongos (JESSE; WILHELM; NOGUEIRA, 2010). O provável mecanismo de ação do EHPp aponta para uma interação com o sistema monoaminérgico e os receptores 5-HT_{2A}, D₁ e D₂, α_2 e β , nos respectivos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico (BETTIO et al., 2011) combinado com um importante efeito de um dos compostos presentes nesse extrato, a cumarina, que possui efeito como inibidor da MAO (STEFANACHI et al., 2018) uma vez que pacientes com depressão também apresentam aumento na atividade da MAO, o que diminui substancialmente as monoaminas, o que levou a utilização de inibidores da MAO como antidepressivos para o tratamento da depressão (JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2017).

O teste do campo aberto mostrou que os animais que receberam a reserpina, apresentaram uma redução no número de cruzamentos quando comparados ao grupo Salina/Salina. Um estudo averiguou o efeito de três doses distintas de reserpina (0,1; 0,5 e 1mg/kg), aplicadas por 4 dias consecutivos na atividade locomotora de camundongos machos da linhagem *Swiss*. Os pesquisadores observaram redução nessa atividade a partir do segundo dia após a indução do modelo com a dose de 1mg/kg e no vigésimo dia todas as doses foram capazes de reduzir a locomoção dos animais. Com sessenta dias os animais tiveram suas atividades locomotoras restabelecidas (FREITAS et al., 2016). Nenhuma das três doses do EHPp, nem a amitriptilina não foram capazes de reverter a hipolocomoção encontrada nos animais que receberam a reserpina. Esse resultado também foi encontrado em outro estudo, neste mesmo modelo

de fibromialgia, mas o tratamento foi realizado com resveratrol, óleo de farelo de arroz e pregabalina, com o teste do campo aberto sendo realizado no primeiro dia após a indução do modelo, e os tratamentos não conseguiram reverter a hipolocomoção gerada pela reserpina (KLEIN et al., 2016). O tratamento realizado com canabidiol não se mostrou efetivo para alterar a redução na locomoção causada pela reserpina avaliada em ratos (PERES et al., 2016).

A dopamina tem função primordial no controle motor, na motivação e no circuito de recompensa (CACHOPE; CHEER, 2014). Com relação ao controle motor, sua produção ocorre na substância nigra para posteriormente ser liberada no estriado (OLGUÍN et al., 2016). Quando existe uma alteração na produção da dopamina, a Doença de Parkinson é imediatamente associada a este quadro, pois a sabida redução na dopamina, gera os conhecidos sintomas motores como tremor, lentidão dos movimentos, rigidez, instabilidade postural os quais só vão se manifestar com uma degeneração de neurônios dopaminérgicos na substancia nigra maior que 80% (KLINGELHOEFER; REICHMANN, 2015). Como já foi descrito nesse trabalho a reserpina sabidamente reduz as monoaminas, dentre elas, a dopamina, que apresenta relevante papel na função locomotora e como resultado isso pôde ser verificado através da diminuição na atividade exploratória e na locomoção dos animais que foram tratados com a reserpina. Os tratamentos empregues nesse trabalho não se mostraram efetivos em reverter a hipolocomoção encontrada nesse modelo animal de fibromialgia. Com relação ao tratamento com o fármaco antidepressivo (amitriptilina), o qual não foi capaz de restabelecer a atividade locomotoras dos animais, é possível que possa ter ocorrido a associação da conhecida ação da reserpina como colocado previamente com um dos efeitos colaterais encontrados nos antidepressivos tricíclicos que é o seu efeito sedativo (RANG et al., 2012), pois durante a realização do teste do Campo Aberto foi observado que alguns dos animais do grupo Reserpina+Amit (30mg/kg), deambularam pouco ficando parados em um ponto do aparato. Como o EHPp não conseguiu reverter a hipolocomoção, isso sugere que o extrato não possui ação estimulante, como pode ser visto quando o animal é tratado, por exemplo, com o metilfenidato o que gera hiperlocomoção (SOUZA et al., 2016).

Apesar de não ter efeito na locomoção, os tratamentos com o EHPp e com a amitriptilina foram eficientes em alterar o perfil tipo depressivo encontrado nos animais que receberam a reserpina, o que pode demonstrar um possível efeito do extrato relacionado com a serotonina e a noradrenalina. Esse achado vai ao encontro de um estudo que também

identificou que o extrato pode exercer sua função nos sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (BETTIO et al., 2011). Todos esses dados, fortificam a ação do EHPp, uma vez que os tratamentos preconizados para a fibromialgia fazem uso, por exemplo, de inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina (WELSCH et al., 2018) e inibidores seletivos da recaptação de serotonina (WALITT et al., 2016). Outro resultado interessante é relacionado a ação do extrato em inibir os efeitos deletérios causados pela injeção intraplantar de glutamato (LAPA et al., 2009). Uma vez que alterações glutamatérgicas, são encontradas em pacientes com FM os tratamentos com anticonvulsivantes vem demonstrando eficácia no manejo da dor crônica (WIFFEN et al., 2013), assim como tem sido encontrado aumento nos níveis de glutamato em pacientes com depressão e ansiedade (MILADINOVIC; NASHED; SINGH, 2015) e por se tratar de uma síndrome muito complexa, possíveis tratamentos que atuem na transmissão glutamatérgica podem se mostrar de grande importância para esses pacientes (HARRIS, 2010).

Os resultados encontrados por essa pesquisa fortalecem e trazem mais robustez aos dados encontrados na literatura relacionados ao modelo animal de fibromialgia induzido pela reserpina, por agregar novas formas de avaliação para a adequada compreensão dessa síndrome e pela tentativa de lançar a luz na busca por novas terapêuticas que possam ser de fato efetivas no tratamento de doenças complexas como a dor crônica e a depressão.

A dor crônica gera grandes desafios com relação a forma de manejo farmacológico, devido à baixa eficácia e seus efeitos colaterais, sendo que esses medicamentos deveriam tratar englobando os sintomas físico e psicológicos para benefício do paciente (MITSU; ZACHARIOU, 2016). Todos esses dados associados as pesquisas prévias utilizadas para este estudo reforçam a ação do extrato hidroalcoólico da planta *P. paniculata* em diferentes quadros de indução do perfil nociceptivo e tipo depressivo, estimulando a busca para o entendimento do seu possível mecanismo de ação. Tudo isso ajuda a fortalecer a procura por novos tratamentos que atuem de forma ampla contribuindo para a melhora global do paciente e não só atuando em apenas uma via, mas unindo e equilibrando os personagens destes caminhos que por alguma razão não estão fazendo seu percurso normal. Portanto, mais estudos são necessários para tentar compreender o real mecanismo de ação do EHPp, apesar dos bons resultados encontrados por esse estudo, expandindo os conhecimentos até então existentes e investigando as ações do extrato em outras patologias que compartilhem de alterações semelhantes as encontradas nessa síndrome dolorosa.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se com este trabalho que a reserpina foi capaz de induzir um quadro nociceptivo de longo prazo, fazendo com que os animais apresentassem alodínia mecânica e hiperalgesia térmica, além de gerar um quadro tipo depressivo. O que demonstra que este modelo de estudo para fibromialgia agrega duas significativas alterações encontradas em pacientes que sofrem com essa síndrome dolorosa.

Através dessa pesquisa foi possível avaliar a ação do EHPp nesse modelo, o qual mostrou ter efeito antinociceptivo e antidepressivo nos animais. Mais estudos são necessários para tentar elucidar os mecanismos de ação do extrato planta *Polygala paniculata*, sobre a dor e a depressão.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e Molecular**. 7ªedição, p.8. Elsevier. 2012.

ABLIN, J. et al. Treatment of fibromyalgia syndrome: Recommendations of recent evidence-based interdisciplinary guidelines with special emphasis on complementary and alternative therapies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2013, s.n., p.1-7. 2013.

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.

ALBRECHT, D.S. et al. Differential dopamine function in fibromyalgia. **Brain Imaging and Behavior**. v.10, n.3, p.829-839. 2016.

American Psychiatry Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5. 5ªedição. Washington: American Psychiatric Association, 2013.

ANNAPURNA, A. et al. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**.v.61, s.n., p.1365-1374. 2009.

ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. et al. Antidepressant-like effect of tetrahydroisoquinoline amines in the animal model of depressive disorder induced by repeated administration of a low dose of reserpine: behavioral and neurochemical studies in the rat. **Neurotoxicity Research**. v.26, s.n., p.85-98. 2014.

ARIF-RAHU, M.; GRAP, M. J. Facial expression and pain in the critically ill noncommunicative patient: State of science review. **Intensive and Critical Care Nursing**.v.26, n.6, p.343-352. 2010.

ARREOLA, R. et al. Immunomodulatory Effects Mediated by Serotonin. **Journal of Immunology Research**. v.2015, s.n., p. 1-21. 2015.

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.

BARROS, T. F. Avaliação comportamental e bioquímica do efeito do extrato de *Polygala paniculata* na neuroinflamação induzida pelo modelo de transtorno de estresse pós-traumático em camundongos. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Universidade federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Santa Catarina. 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.

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, s.n, p. 13-30. 2009.

BETTIO, I. E. B. et al. Antidepressant-like effect of extract from *Polygala paniculata*: Involvement of the monoaminergic systems. **Pharmaceutical Biology**. v.49, n.12, p.1277-1285. 2011.

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.

CACHOPE, R.; CHEER, J. F. Local control of striatal dopamine release. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**.v.8, n. 188, p. 1-7. 2014.

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

CHEN, C. Y. et al. 3,4,5-Trimethoxycinnamic acid, one of the constituents of *Polygalae Radix* exerts anti-seizure effects by modulating GABAergic systems in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**.v.131, s.n., p.1-5. 2016.

CONTRERAS, C. et al. Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. **Redox Biology**.v.12, s.n., p.854-863. 2017.

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

CRISTIANO R.; PIZZOLATTI M.G.; DELLE MONACHE F. et al. Two xanthenes from *Polygala paniculata* and confirmation of the 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxy-xanthone at trace level by HRGC-MS. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Journal of Biosciences**, v.58, s.n., p.490–494, 2003.

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

COLLA, A. R. S. et al. Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**.v. 758, s.n, p.171-176. 2015.

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.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**.v.10, n.284, p. 1-17. 2017.

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.

FARINA, M. et al. Protective effects of Polygala paniculata extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, s.n., p. 1503-1508. 2005.

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

FRAGA, D. B. et al. Anxiolytic effects of ascorbic acid and ketamine in mice. **Journal of Psychiatric Research**.v. 100, s.n., p.16-23. 2018.

FREITAS, C. M. et al. Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. **Psychopharmacology**. v. 233, s.n, p.457–467.2016.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**.v.25, s.n., p.149-164. 2016.

GARCIA-LOZANO, J.R. et al. Correlation Between Cytokines and Anxious- Depressive Symptoms in Patients With Fibromyalgia. **Reumatología Clínica**. v.4, n.4, p. 136-139. 2008.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**.v.24, n.2, p. 395-406. 2010.

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.

GOLAN, D.E. et al. **Princípios de Farmacologia. A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.122. 2009.

HAMBURGER, M.; GUPTA, M.; HOSTETTMANN, K. Coumarins from *Polygala paniculata*. **Planta Medica.** s.v., s.n., p. 215-217. 1985.

HARRIS, R.E. Elevated excitatory neurotransmitter levels in the fibromyalgia brain. **Arthritis Research & Therapy.** v.12, n.141, p.1-2. 2010.

HÄUSER, W. et al. Diagnostic confounders of chronic widespread pain: not always fibromyalgia. **Pain Reports.** v.2, s.n., p.1-11. 2017.

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.

HERNANDEZ, M.E. et al. Proinflammatory cytokine levels in fibromyalgia patients are independent of body mass index. **BioMedCentral Research Notes.** v.3, n.156, p. 1-5. 2010.

HERANDEZ-LEON, A. et al. Sex differences and estradiol involvement in hyperalgesia and allodynia in an experimental model of fibromyalgia. **Hormones and Behavior.** v.97, s.n., p.39-46. 2018.

HERVERA, A. et al. The Role of Nitric Oxide in the Local Antiallodynic and Antihyperalgesic Effects and Expression of μ -Opioid and Cannabinoid-2 Receptors during Neuropathic Pain in Mice. **Journal of**

Pharmacology and Experimental Therapeutics. v.334, n.3, p 887–896, 2010.

HU, C. et al. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **PLOS One.** v.12, n.9, p.1-15. 2017.

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.

ISINGRINI, E. et al. Association between Repeated Unpredictable Chronic

Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice. **Plos One.** v.5, n.4, p.1-8. 2010.

JESSE, C. R.; WILHEIM, E. A.; NOGUEIRA, C. W. Depression-like behavior and mechanical allodynia are reduced by bis selenide treatment in mice with chronic constriction injury: a comparison with fluoxetine, amitriptyline, and bupropion. **Psychopharmacology.** v. 212, s.n., p.513–522. 2010.

JESULOLA, E.; MICALOS, P.; BAGULEY, I. J. Understanding the Pathophysiology of Depression: From Monoamines to the Neurogenesis Hypothesis model -are we there yet?. **Behavioural Brain Research.**s.v., s.n., p. 1-44. 2017.

JI, R.R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and Pain: Is Chronic Pain a Gliopathy?. **Pain**. v.154, n. 01, p.1-46. 2013.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of five species of *Polygala*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.42, s.n., p.1065-1075. 2011.

JUNIOR, M. H.; GOLDENFUM, M. A.; SIENA, C. A. F. Fibromialgia: aspectos clínicos e ocupacionais. Revista da Associação Médica Brasileira. v.58, n.3, p.358-365. 2012.

KEDIA, S.; CHATTARJI, S. Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. **Journal of Neuroscience Methods**.v. 233, s.n., p.150–154. 2014.

KHAN, M. M. et al. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. **Brain Research**.v.1292, s.n., p.123-135. 2009.

KHASAR, S. G.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Repeated sound stress enhances inflammatory pain in the rat. **Pain**.v.116, s.n., p. 79-86. 2005.

KIA, S.; CHOY, E. Update on Treatment Guideline in Fibromyalgia Syndrome with Focus on Pharmacology. **Biomedicines**. v.5, n.20, p. 1-24. 2017.

KISO, T. et al. Effects of pregabalin and duloxetine on neurotransmitters in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of fibromyalgia. **European Journal of Pharmacology**.s.v., s.n., p. 1-20. 2018.

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.

KLEIN, C. P. et al. Coadministration of Resveratrol and Rice Oil Mitigates Nociception and Oxidative State in a Mouse Fibromyalgia-Like Model. **Pain Research and Treatment**. v.2016, s.n., p.1-11. 2016.

KLEIN-JUNIOR, L.C. et al. Antihyperalgesic Activity of the Methanol Extract and some Constituents Obtained From *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v.111, s.n., p.145-153. 2012.

KLINGELHOEFER, L.; REICHMAN, H. Pathogenesis of Parkinson disease—the gut–brain axis and environmental factors. **Neurology/Nature Reviews**.v.11, s.n., p.625-636. 2015.

KLOET, E.R. DE; MOLENDJIK, M.L. Coping With the Forced Swim Stressor: Towards Understanding na Adaptive Mechanism. **Neural Plasticity**.v.2016, s.n., p.1-13. 2016.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**.v.455, n.7215, p.894-902. 2008.

KUBOYAMA, T. et al. Polygalae Radix Extract Prevents Axonal Degeneration and Memory Deficits in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Frontiers in Pharmacology**. v. 8, n.805, p.1-11. 2017.

LACASSE, A.; BOURGAULT, P.; CHOINIÈRE, M. Fibromyalgia-related costs and loss of productivity: a substantial societal burden. **BioMed Central Musculoskeletal Disorders**.v.17, n.168, p. 1-9. 2016.

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.

LAPA, F.R. et al. Antinociceptive Properties of the Hydroalcoholic Extract and the Flavonoid Rutin Obtained from *Polygala paniculata* L. in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v.104, s.n., p.306-315.2009.

LAWSON, K. Treatment options and patient perspectives in the management of fibromyalgia: future trends. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**.v.4, n.6, p.1059-1071. 2008.

LEACH, M.C. et al. The Assessment of Post-Vasectomy Pain in Mice Using Behaviour and the Mouse Grimace Scale. **PLoS ONE**. v. 7, n.4, p.1-9. 2012.

LEE, H. K. et al. Response of Temperature-Sensitive Medullary Neurons to Acetylcholine, Norepinephrine, and 5-Hydroxytryptamine^{1,2}. **Brain Research Bulletin**.v.2, s.n., p.381-388. 1977.

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.

LEICHSENDRING, F.; LEWEKE, F. Social Anxiety Disorder. **The New England Journal of Medicine**.v.376, s.n., p. 2255-2264. 2017.

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.

LI, Z. Memory- Enhancing Effects of the Crude Extract of *Polygala tenuifolia* on Aged Mice. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2014, s.n., p.1-10. 2014.

LIN, JP. et al. Rutin Inhibits Human Leukemia Tumor Growth in a Murine Xenograft Model in Vivo. **Environmental Toxicology**.s.v., s.n., p. 1-5. 2011.

LIU, S.B. et al. Attenuation of Reserpine-Induced Pain/Depression Dyad by Gentiopicroside Through Downregulation of GluN2B Receptors in the Amygdala of Mice. **Neuromolecular Medicine**. v.16, s.n., p.350-359. 2014.

LIU, Y. et al. Treatment Patterns Associated with ACR-Recommended Medications in the Management of Fibromyalgia in the United States. **Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy**. v.22, n.3, p.263-271. 2016.

LOBAY, D. Rauwolfia in the Treatment of Hypertension. **Integrative Medicine**. v.14, n.13, p. 40-46. 2015.

LÜDTKE, R.; SOUZA-CHIES, T. T.; MIOTTO, S. T. S. O gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) na região Sul do Brasil. **Hoehnea**.v.40, n.1, p.1-50. 2013.

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.

MALETIC, V.; RAISON, C. L. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. **Frontiers in Bioscience**.v.14, s.n., p.5291-5338. 2009.

MARKHAM, K. R.; TERNAL, B. ¹³C NMR of flavonoids -II, Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. **Tetrahedron**.v.32, s.n., p.2607-2612. 1976.

MARQUES, A.P. et al. Prevalence of fibromyalgia: literature review update. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 57, n. 4, p. 356-363. 2017.

MATSUMIYA, L.C. Using the Mouse Grimace Scale to Reevaluate the Efficacy of Postoperative Analgesics in Laboratory Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v.51, n. 1, p.42-49. 2012.

MAUTONE, L. et al. Daninhas ocorrentes na zona serrana do estado do rio de janeiro - município de petrópolis – 1. **Acta Botanica Brasilica**.v.4, n.2, p. 123- 135. 1990.

MCKEMY, D. D. The Molecular and Cellular Basis of Cold Sensation. **American Chemical Society Neuroscience**.v.4, s.n., p. 238-247.2013.

MENDELL, L. M.; WALL, P. D. Responses of single dorsal cord cells to peripheral cutaneous unmyelinated fibres. **Nature**.v.206, n.4979, p.97-99.1965.

MENZIES, V.; LYON, D. Integrated Review of the association of Cytokines with Fibromyalgia and Fibromyalgia Core Symptoms. **Biological Research for Nursing**. v.11, n.4, p.387-394. 2010.

MIKA, J. et al. Effects of chronic doxepin and amitriptyline administration in naïve mice and in neuropathic pain mice model. **Neuroscience**. v.294, s.n., p.38–50. 2015.

MILADINOVIC, T.; NASHED, M. G.; SINGH, G. Overview of Glutamatergic Dysregulation in Central Pathologies. **Biomolecules**.v. 5, s.n., p.3112-3141. 2015.

MITSI, V.; ZACHARIOU, V. Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. **Neuroscience**. v. 338, s.n., p.81–92. 2016.

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, s.n., p.26-33. 2009.

NAGAKURA, Y; ITO, H; SHIMIZU, Y. Animals Models of Fibromyalgia. **New Insights into Fibromyalgia**. Dr. William S. Wilke. p.41-58. 2012.

NASCIMENTO, S. S. et al. Efficacy and Safety of Medicinal Plants or Related Natural Products for Fibromyalgia: A Systematic Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**.v.2013, s.n., p.1-10. 2013.

NEWALL, A.C.; ANDERSON, A.L.; PHILLIPSON, D.J. **Herbal Medicines**.

The Pharmaceutical Press, London, p. 241. 1996.

NIEOCZYM, D. et al. Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**.s.v., s.n., p. 1-9. 2014.

NISHIYORI, M.; UEDA, H. Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse modelo of fibromyalgia. **Molecular Pain**.v.4, n.52, p. 1-6. 2008.

NISHIYORI, M. et al. Permanent relief from intermittent cold stressinduced fibromyalgia-like abnormal pain by repeated intrathecal administration of antidepressants. **Molecular Pain**.v.7, n.69, p.1-10. 2011.

NUTT, D. J. et al. Generalized anxiety disorder: comorbidity, comparative biology and treatment. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. v.5, s.n., p.315-325. 2002.

OE, T. et al. Reserpine causes biphasic nociceptive sensitivity alteration in conjunction with brain biogenic amine tones in rats. **Neuroscience**. v.169, s.n., p.1860-1871. 2010.

OGINO, S. et al. Systemic administration of 5-HT_{2C} receptor agonists attenuates muscular hyperalgesia in reserpine-induced myalgia model. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v.108, s.n., p.8–15. 2013.

OLGUÍN, H. J. et al. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**.v.2016, s.n., p.1-13. 2016.

PAUL, S. et al. In Vitro and In Vivo studies Demonstrate Anticancer Property of Root Extract of *Polygala senega*. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**. v.3, n.3, p.188-196. 2010.

PERES, F. F. et al. Cannabidiol Prevents Motor and Cognitive Impairments Induced by Reserpine in Rats. **Frontiers in Pharmacology**.v.7, n. 343, p.1-10. 2016.

PRKACHIN, K. M. Assessing pain by facial expression: Facial expression as nexus. **Pain Research and Management**.v.14, n.1, p. 53-58. 2009.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**. v.463, p.3– 33. 2003.

PU, F. et al. Neuroprotective Effects of Quercetin and Rutin on Spatial Memory Impairment in an 8-Arm Radial Maze Task and Neuronal Death Induced by Repeated Cerebral Ischemia in Rats. **Journal of Pharmacological Sciences**.v.104, s.n., p. 329-334. 2007.

RAMSAY, R. R.; TIPTON, K. F. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. **Molecules**.v.22, n. 1192, p. 1-46. 2017.

RANG, H.P.; DALE, M.M. et al. Farmacologia. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier.p.216. 2012.

RIBAS, C.M. et al. Antinociceptive Effect of the Polygala sabulosa Hydroalcoholic Extract in mice: Evidence for the Involvement of Glutamatergic Receptors and Cytokine Pathways. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v.103, s.n., p.43-47. 2008.

ROMEYKE, T. et al. Severe forms of fibromyalgia with acute exacerbation of pain: costs, comorbidities, and length of stay in inpatient care. **ClinicoEconomics and Outcomes Research**. v.9, s.n., p.317–325. 2017.

ROOKS, D.S. et al. Group exercise, education, and combination self-management in women with fibromyalgia. **Archives of Internal Medicine**. v.167, n.20, p.2192-2200. 2007.

RUAN, J. et al. Chemical and Biological Research on Herbal Medicines Rich in Xanthones. **Molecules**. v.22, n.1698, p.1-19. 2017.

SARWER-FONER, G.J.; OGLE, W. Psychosis and enhanced anxiety produced by Reserpine and chlorpromazine. **Canadian Medical Association Journal**. v.74, p.526-532. 1956.

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.

SCHWEDHELM, E. et al. Clinical Pharmacokinetics of Antioxidants and Their Impact on Systemic Oxidative Stress. **Clinical Pharmacokinetics**.v.42, n.5, p.437-459. 2003.

SHEPHERD, M. Reserpine: Problems Associated with the use of a So-Called “Tranquillizing Agent”. **Proceeding of the Royal Society of Medicine**. Section of Psychiatric. v.n., s.n., p.33-36. 1956.

SHIN, I.J. et al. Preclinical Evidence of Rapid-Onset Antidepressant-Like Effect in Radix Polygalae Extract. **PLOS ONE**. v.9, n.2, p.1-10. 2104.

SINGH, I. Reserpine in hypertension. **British Medical Journal**. s.v., s.n., 813-816. 1955.

SLUKA, K. A.; KALRA, A.; MOORE, S. A. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. **Muscle Nerve**. v.24, s.n., p.37-46. 2001.

SOUZA, A.H. et al. The effects of Pha 1b, a spider toxin, calcium channel blocker, in a mouse fibromyalgia model. **Toxicon**. v.81, s.n., p.37-42. 2014.

SOUZA, L. S. et al. Lithium and valproate prevent methylphenidate-induced mania-like behaviors in the hole board test. **Neuroscience Letters**.v.629, s.n., p.143-148. 2016.

STAUD, R. Evidence of Involvement of Central Neural Mechanisms in Generating Fibromyalgia Pain. **Current Rheumatology Reports**. v.4, s.n., p.299–305. 2002.

STAUD, R. et al. Effects of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist

Dextromethorphan on Temporal Summation of Pain Are Similar in Fibromyalgia Patients and Normal Control Subjects. **The Journal of Pain**. v.6, n. 5, p. 323-332. 2005.

STAUD, R. Biology and therapy of fibromyalgia: pain in fibromyalgia syndrome. **Arthritis Research & Therapy**.v.8, n.3, p.1-7. 2006.

STAUD, R.; RODRIGUEZ, M.E. Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome. **Nature Clinical Practice Rheumatology**. v.2, n.2, p. 90-98. 2006.

STAUD, R. Abnormal endogenous pain modulation is a shared characteristic of many chronic pain conditions. **Expert Review of Neurotherapeutics**. v.12, n.5, p.577-585. 2012.

STEFANACHI, A. et al. Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. **Molecules**.v.23, n.250, p.1-34. 2018.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**. v.85, s.n., p.367-370, 1985.

SÜDHOF, T.C.; STARKE, K. Pharmacology of Neurotransmitter Release. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Springer. v.184, p.83-87. 2008.

SUN, F. et al. Polygalasaponin F induces long-term potentiation in adult rat hippocampus via NMDA receptor activation. **Acta Pharmacologica Sinica**. v.33, s.n., p.431-437. 2012.

TAN, C. L.; KNIGHT, Z. A. Regulation of Body Temperature by the Nervous System. **Neuron**.v.98, s.n., p. 31-48. 2018.

TARKOWSKA, D.; STRNAD, M. Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones. **Planta**. s.v., s.n., p.1-11.2016.

THOMAS, A. et al. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. **Psychopharmacology**. v.204, n.2, p.361–373, 2009.

TSILIONI, I. et al. Neuropeptides CRH, SP, HK-1, and anti-inflammatory cytokines IL-6 and TNF are Increased in Serum of Patients with Fibromyalgia Syndrome, Implicating Mast Cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.356, s/n, p.664-672. 2016.

ÜÇEYLER, N. et al. Systematic review with meta-analysis: cytokines in fibromyalgia syndrome. **BioMedCentral Musculoskeletal Disorders**. v.12, n.245, p.1-15. 2011.

VALDE´S, et al. Increased Glutamate/Glutamine Compounds in the Brains of Patients With Fibromyalgia. **Arthritis & Rheumatism**. v. 62, n. 6, p. 1829–1836. 2010.

WALITT, B. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors for fibromyalgia syndrome. **Cochrane Database of Systematic Reviews**.v.6, n. CD011735, p. 1-65. 2016.

WANG, CC. et al. Polygala tenuifolia extract inhibits lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes and high-fat diet–induced obese mouse model and affects hepatic transcriptome and gut microbiota profiles. **Food & Nutrition Research**. v.61, s.n., p.1-16. 2017.

WELSCH, P. et al. Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) for fibromyalgia (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**.v.2, n.CD010292, p.1-108. 2018.

WIFFEN, P. J. et al. Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia – an overview of Cochrane reviews (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**.v.11, n. CD010567, p. 1-26. 2013.

WILKERSON, J. L. Evaluation of different drug classes on transient sciatic nerve injury-depressed marble burying in mice. **Pain**.s.v., s.n., p. 1-29. 2018.

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.

WOOLF, C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**. v.152, n.3, p.1-31. 2011.

XU, S. et al. Cognitive- Enhancing Effects of Polygalasaponin Hydrolysis in A β 25-35 – Induced Amnesic Mice. **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2011, s.n., p.1-12. 2011.

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

YAO, Y. et al. Anxiolytic and sedative-hypnotic activities of polygala saponins from *Polygala tenuifolia* in mice. **Pharmaceutical Biology**. v.48, n.7, p.801-807. 2010.

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.