



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

Scheila Iria Kraus

**EFEITO DA PLANTA MEDICINAL *Condalia buxifolia* NO MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL
TIPO I: POTENCIAL AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E TIPO-
ANTIDEPRESSIVA**

Florianópolis

2019

Scheila Iria Kraus

**EFEITO DA PLANTA MEDICINAL *Condalia buxifolia* NO MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL
TIPO I: POTENCIAL AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E TIPO-
ANTIDEPRESSIVA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós
Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito para a
obtenção do Título de mestre em Neurociências
Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos
Santos
Coorientadora: Profa. Dra. Róli Rodrigues Simões

Florianópolis

2019

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

Kraus, Scheila Iria
EFEITO DA PLANTA MEDICINAL *Condalia buxifolia* NO MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL TIPO I :
POTENCIAL AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E TIPO-ANTIDEPRESSIVA /
Scheila Iria Kraus ; orientador, Adair Roberto Soares
Santos, coorientadora, Róli Rodrigues Smões, 2019.
113 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Síndrome da Dor Complexa Regional
tipo I. 3. Plantas medicinais. 4. *Condalia buxifolia*. I.
Santos, Adair Roberto Soares. II. Smões, Róli Rodrigues.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

Scheila Iria Kraus

**EFEITO DA PLANTA MEDICINAL *Condalia buxifolia* NO MODELO
EXPERIMENTAL DE SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL
TIPO I: POTENCIAL AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E TIPO-
ANTIDEPRESSIVA**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Cristiane Ribeiro De Carvalho.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Geisson Marcos Nardi
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador

Florianópolis, 02 de agosto de 2019.

Este trabalho é dedicado a minha família que jamais
mediu esforços para que eu estivesse aqui.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é, em minha opinião, um dos sentimentos mais bonitos cultivados pelo ser humano. Ela nos permite ver a vida com mais leveza e entender todos os processos como parte de um crescimento. Por isso eu sou muito grata.

Grata ao universo pela vida e por tudo que está contido nela.

Grata aos meus pais que, independente da distância, sempre estiveram ao meu lado, me fornecendo todo o suporte necessário para seguir em frente. Grata principalmente a você, mãe, que é sem dúvida o meu maior exemplo de força, honestidade e humildade.

Grata a minha irmã por cuidar de mim e me incentivar desde sempre, e também ao meu cunhado, que é o seu apoio e alicerce. Sou especialmente grata aos dois por terem me dado o meu maior presente, que é a alegria de ser tia do Joaquim.

Grata ao professor Adair, meu orientador, por me acolher em seu laboratório e compartilhar todo o seu conhecimento. É inspiradora a sua alegria em ensinar.

Grata a minha coorientadora Róli, por me auxiliar nos experimentos e estar sempre disposta a discutir ciência.

Grata às amigas maravilhosas que fiz durante todo o período no LANDI. Thayza, Kelly, Carol, Barbara, Cibelle, Jhenifer, Tassi, Marcos, Mirieli e tantos outros. Vocês são pessoas grandiosas, e poder aprender e conviver com vocês todos os dias é uma honra imensa para mim. Não há palavras no mundo que descrevam o quão agradecida eu sou pelas mãos estendidas e ombros amigos que recebi de vocês durante todo esse tempo.

Grata aos amigos e colegas de outros laboratórios, em especial do PPGNeuro, onde conheci pessoas e profissionais extraordinários, com os quais aprendi muito.

Sou grata também a todos os professores do PPGNeuro, que nos motivam e inspiram a cada aula. O mundo é um lugar melhor por conta de vocês.

Sou grata aos membros da banca, que se disponibilizaram a avaliar e contribuir com este trabalho.

Sou grata a todos os servidores da UFSC que, diariamente, fazem tudo isso ser possível.

Sou grata a Capes pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

E, finalmente sou grata aos animais que cederam suas vidas em prol do desenvolvimento da ciência.

À todos vocês, o meu mais sincero muito obrigada!

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."
(Albert Einstein)

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante.”
(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Introdução: A Síndrome da Dor Complexa Regional (SDCR) é caracterizada por um quadro doloroso que surge, geralmente, após um trauma em alguma extremidade do corpo. Seus sintomas incluem presença de dor espontânea e contínua sem que haja estímulos, dor induzida por estímulos inócuos (alodinia) e sensibilidade exagerada à dor (hiperalgesia), além de outras características como edema e disfunção vascular periférica. A SDCR é dividida em dois tipos, sem e com a presença de lesão nervosa, respectivamente. A SDCR tipo I (SDCR-I, sem lesão nervosa) é, em grande parte das vezes, causada por isquemia e reperfusão sanguínea (IR) e, frequentemente, pode avançar do estado agudo para o crônico, tornando-se de difícil tratamento. Além disso, pacientes com SDCR-I costumam apresentar diversas comorbidades, como ansiedade, depressão e problemas de memória, tornando o quadro ainda mais preocupante. Na busca por alternativas terapêuticas com efeitos colaterais reduzidos e maior eficácia, as plantas medicinais tem sido um importante alvo. A planta medicinal *Condalia buxifolia*, pertencente à família Rhamnaceae, é descrita na literatura com atividades antibacterianas, anti-inflamatórias e antinociceptivas, tornando-se uma estratégia em potencial para o tratamento da SDCR-I e comorbidades associadas. **Objetivo:** Verificar o efeito do extrato metanólico de *C. buxifolia* (EMCb) nas respostas sensoriais e emocionais de animais submetidos ao modelo de SDCR-I. **Metodologia:** Para os experimentos foram utilizados camundongos Swiss fêmeas com dois meses de idade. A indução da SDCR-I se deu por uma isquemia (através de um torniquete) na pata traseira direita dos animais, seguida de reperfusão. O tratamento com veículo, EMCb (10 - 100 mg/kg), e sertralina (15 mg/kg, usada como controle positivo) foi realizado por via intragástrica (i.g.), duas vezes ao dia, do 3º ao 28º dia após IR. As avaliações foram realizadas ao longo de todo o experimento e consistiram em: alodinia ao estímulo mecânico (teste de von Frey), hiperalgesia térmica ao frio (teste da acetona), edema, comportamento tipo-ansioso e locomoção (caixa claro/escuro e campo aberto), memória (reconhecimento de objetos), comportamento tipo-depressivo (preferência por sacarose, borrifagem de sacarose, nado forçado e suspensão pela cauda) e bem-estar (teste do ninho). **Resultados:** Inicialmente, foi observado que o EMCb (10 – 100 mg/kg) promoveu redução dependente da dose na alodinia mecânica, sendo o efeito antinociceptivo (analgésico) da dose de 100 mg/kg mais prolongado e eficaz. O EMCb (100 mg/kg) também foi capaz de reduzir a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica ao frio, do 3º ao 28º dia, e o edema de pata, do 3º ao 14º dia após a IR. Além disso, o EMCb também amenizou o comportamento tipo-depressivo e recuperou o bem-estar dos animais submetidos a IR. Ademais, não foram encontradas alterações no comportamento tipo-ansioso e memória no modelo utilizado. **Conclusão:** O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, os efeitos antinociceptivos e tipo-antidepressivos de EMCb em um modelo de dor crônica que mimetiza condições relacionadas à SDCR-I.

Palavras-chave: Síndrome da Dor Complexa Regional. Plantas Mediciniais. *Condalia buxifolia*.

ABSTRACT

Introduction: Complex Regional Pain Syndrome (CRPS) is characterized by a painful condition that usually arises after trauma to some end of the body. Its symptoms include the presence of spontaneous and continuous pain without stimuli, pain induced by innocuous stimuli (allodynia) and exaggerated pain sensitivity (hyperalgesia), in addition to other characteristics such as edema and peripheral vascular dysfunction. CRPS is divided into two types, without and with the presence of nerve injury, respectively. CRPS type I (CRPS-I without nerve damage) is most often caused by ischemia and reperfusion (IR) and can often progress from acute to chronic pain, making it difficult to treat. In addition, patients with CRPS-I often have several comorbidities, such as anxiety, depression and memory problems, making the situation even more worrying. In the search for therapeutic alternatives with reduced side effects and greater efficacy, medicinal plants have been an important target. The medicinal plant *Condalia buxifolia*, belonging to the Rhamnaceae family, is described in the literature with antibacterial, anti-inflammatory and antinociceptive activities, becoming a potential strategy for the treatment of CRPS-I and associated comorbidities. **Objective:** To verify the effect of methanolic extract *C. buxifolia* (MECb) on the sensory and emotional responses of animals submitted to the CRPS-I model. **Methodology:** Two months old female Swiss mice were used for the experiments. CRPS-I was induced by ischemia (through a tourniquet) in the right hind paws of the animals, followed by reperfusion. Treatment with vehicle, MECb (10 - 100 mg / kg), and sertraline (15 mg / kg, used as a positive control) was performed intragastrically (ig) twice daily from the 3rd to the 28th day after IR. Evaluations were performed throughout the experiment and consisted of: mechanical allodynia (von Frey test), cold hyperalgesia (acetone test), edema, anxious-like behavior and locomotion (light / dark box and open field), memory (object recognition), depressive-like behavior (sucrose preference, splash test, forced swimming and tail suspension) and welfare (nest testing). **Results:** Initially, it was observed that MECb (10 - 100 mg / kg) promoted dose-dependent reduction in mechanical allodynia, with the most prolonged and effective antinociceptive (analgesic) effect of the 100 mg/kg dose. MECb (100 mg / kg) was also able to reduce mechanical allodynia and cold thermal hyperalgesia from days 3 to 28, and paw edema from days 3 to 14 after IR. In addition, MECb also reduced depressive-like behavior and restored the welfare of the animals after IR. Moreover, no alterations in anxious-like behavior and memory were found in the model used. **Conclusion:** The present study demonstrated for the first time the antinociceptive and antidepressant-like effects of EMCb in a chronic pain model that mimics conditions related to CRPS-I.

Keywords: Complex Regional Pain Syndrome. Medicinal Plants. *Condalia buxifolia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação das fibras aferentes primárias e tipos de dor.	28
Figura 2: Representação da via anatômica da dor.	30
Figura 3: Sinais clínicos em membros superiores de pacientes com SDCR-I.	34
Figura 4: Sinais clínicos em membros inferiores de pacientes com SDCR-I.	35
Figura 5: Mediadores envolvidos na sensibilização periférica.	40
Figura 6: Mecanismos envolvidos na sensibilização central.....	41
Figura 7: Reorganização cortical e plasticidade mal adaptativa em um paciente com SDCR-I.....	44
Figura 8: Principais mecanismos envolvidos na patogênese da SDCR-I.....	45
Figura 9: <i>Condalia buxifolia</i> Reissek.....	51
Figura 10: Principais compostos químicos de <i>Condalia buxifolia</i>	53
Figura 11: Indução da dor pós-isquêmica crônica (DPIC).....	60
Figura 12: Desenho experimental 1.....	62
Figura 13: Desenho experimental 2.....	62
Figura 14: Teste de von Frey.....	63
Figura 15: Teste da acetona.....	64
Figura 16: Mensuração do edema de pata.....	65
Figura 17: Teste da preferência por sacarose.....	66
Figura 18: Teste da borrifagem de sacarose.....	67
Figura 19: Teste de Suspensão pela cauda.....	68
Figura 20: Teste do nado forçado.....	69
Figura 21: Teste do Ninho.....	70
Figura 22: Teste do campo aberto.....	71
Figura 23: Teste da caixa claro/escuro.....	72
Figura 24: Teste de reconhecimento de objetos.....	73
Figura 25: Avaliação do efeito do EMCb no decurso temporal.....	76
Figura 26: Efeito do EMCb na alodinia mecânica induzida pelo modelo de DPIC...77	
Figura 27: Efeito do EMCb na hiperalgesia térmica ao frio no modelo de DPIC. ...78	
Figura 28: Efeito de EMCb no edema de pata decorrente do modelo de DPIC.....79	
Figura 29: Efeito do EMCb no teste de preferência por sacarose.....	80
Figura 30: Efeito do EMCb no teste da caixa claro/escuro.....	81
Figura 31: Efeito do EMCb no teste do campo aberto.....	82

Figura 32: Efeito do EMCb no teste de reconhecimento de objetos	83
Figura 33: Efeito de EMCb no teste do ninho.....	84
Figura 34: Efeito do EMCb no teste da borrifagem de sacarose.....	85
Figura 35: Efeito de EMCb no teste de suspensão pela cauda.....	86
Figura 36: Efeito do EMCb no teste do nado forçado.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios clínicos para o diagnóstico da SDCR.	36
Tabela 2: Possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da SDCR.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD – Avaliação diária
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASIC - Canal iônico sensível ao ácido
ATP – Trifosfato de adenosina
B1 – Basal 1
B2 – Basal 2
BP – Basal pós
°C – Graus Célsius
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
cm - Centímetros
DPIC - Indução da dor pós-isquêmica crônica
DSI - Dor simpaticamente independente
DSM - Dor simpaticamente mantida
DSR - Distrofia simpático-reflexa
DT – Decurso temporal
EMCb - Extrato metanólico de *Condalia buxifolia*
E.P.M. – Erro Padrão da Média
g - Grama
GABA - Ácido gama-aminobutírico
GRD - Gânglio da raiz dorsal
h - Hora
IASP – Associação Internacional de Estudo da Dor
i.g. – Via intragástrica
i.p. - Via intraperitoneal
IR - Isquemia e reperfusão
K⁺ - Íon potássio
kg - Quilograma
LANDI - Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação
µm – Micrômetro
mg - Miligrama
min - Minuto
mm – Milímetro
ml - Mililitro
m/s – Metros por segundo
NL – Não lesionado
n° - Número
Na⁺ - Íon sódio
NaOH - Hidróxido de sódio
NMDA - N-metil D-Aspartato
ω-3 - Ômega-3
ω-6 - Ômega-6
O - Oeste
OMS - Organização Mundial da Saúde
PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal (do inglês, *Periaqueductal Gray Matter*)
PB – Núcleo Parabraquial (do inglês, *Parabrachial nucleus*)
pH – Potencial hidrogeniônico
PKA - Proteína cinase A

PGE2 - Prostaglandina E2
rAAC - Córtex cingulado anterior rostral
RL - Radicais livres
RVM – Bulbo Rostroventral (do inglês, *Rostral ventral medulla*)
s - Segundos
S – Sul
SDCR - Síndrome da Dor Complexa Regional
SDCR-I - Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I
SNC – Sistema Nervoso Central
SMDB - Santa Maria Departamento de Biologia
SP – Substância P
TRPV1 - Receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UFMS - Universidade Federal de Santa Maria
V - Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

δ - Gama

Δ - Delta

μ - Mi

ω - ômega

< - menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	DOR E NOCICEPÇÃO.....	27
1.1.1	Classificação da dor	31
1.2	SINDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL	32
1.2.1	Contexto histórico	32
1.2.2	Descrição e diagnóstico	33
1.2.3	Epidemiologia	36
1.2.4	Fisiopatologia	37
1.2.4.1	Isquemia e reperfusão.....	38
1.2.4.2	Sensibilização periférica e central.....	39
1.2.4.3	Manifestações mal adaptativas em pacientes com SDCR-I.....	42
1.2.5	Comorbidades	45
1.2.6	Tratamentos	47
1.3	MODELO EXPERIMENTAL DA SDCR-I	47
1.4	PLANTAS MEDICINAIS	48
1.4.1	<i>Condalia buxifolia</i>	50
2	JUSTIFICATIVA	55
3	OBJETIVOS	57
3.1	OBJETIVO GERAL.....	57
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1	ANIMAIS.....	59
4.2	INDUÇÃO DA LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO DA PATA	59
4.3	PREPARO DO EXTRATO E TRATAMENTOS	60
4.4	DESENHO EXPERIMENTAL.....	61
4.5	TESTES PARA AVALIAR A NOCICEPÇÃO	63

4.5.1	Teste de von Frey.....	63
4.5.2	Teste da acetona.....	64
4.5.3	Mensuração do edema da pata.....	64
4.6	TESTES PARA AVALIAR O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E BEM-ESTAR	65
4.6.1	Preferência por sacarose.....	65
4.6.2	Teste da borrifagem de sacarose.....	66
4.6.3	Suspensão pela cauda.....	67
4.6.4	Nado forçado.....	68
4.6.5	Ninho.....	69
4.7	TESTES PARA AVALIAR O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO	70
4.7.1	Campo aberto	70
4.7.2	Caixa Claro/Escuro	71
4.8	TESTE PARA AVALIAR A MEMÓRIA	72
4.8.1	Reconhecimento de objetos.....	72
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
5	RESULTADOS.....	75
5.1	DESENHO EXPERIMENTAL 1.....	75
5.1.1	Avaliação da alodinia mecânica no decurso temporal após indução da DPIC...	75
5.1.2	Efeito do EMCb na alodinia mecânica dos animais submetidos ao modelo de DPIC	76
5.1.3	Efeito do EMCb na hiperalgesia térmica ao frio nos animais submetidos ao modelo de DPIC	77
5.1.4	Efeito do EMCb no edema de pata dos animais submetidos ao modelo de DPIC	79
5.1.5	Efeito do EMCb sobre o consumo de sacarose nos animais submetidos ao modelo de DPIC	79
5.1.6	Animais submetidos ao modelo de DPIC não apresentaram alterações na locomoção e no comportamento tipo-ansioso no teste da caixa claro/escuro.....	80

5.1.7	Animais submetidos ao modelo de DPIC não apresentaram alterações na locomoção e no comportamento tipo-ansioso no teste do campo aberto	81
5.1.8	Animais submetidos ao modelo de DPIC não apresentaram alterações de memória no teste de reconhecimento de objetos.....	82
5.2	DESENHO EXPERIMENTAL 2.....	83
5.2.1	Efeito do tratamento com EMCb no bem-estar dos animais submetidos ao modelo de DPIC	83
5.2.2	Efeito do tratamento com EMCb no teste de borrifagem de sacarose em animais submetidos ao modelo de DPIC.....	84
5.2.3	Efeito do tratamento com EMCb no teste da suspensão pela cauda em animais submetidos ao modelo de DPIC.....	85
5.2.4	Efeito do tratamento com EMCb no teste de nado forçado em animais submetidos ao modelo de DPIC.....	86
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÕES	97
8	REFERÊNCIAS	99
9	ANEXOS	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A percepção dolorosa desempenha papéis fisiológicos e adaptativos importantes em um organismo saudável, uma vez que atua como mecanismo de alerta, indicando a presença de estímulos nocivos e acionando as respostas protetoras apropriadas (WOOLF; SALTER, 2000; JULIUS; BASBAUM, 2001). Nesse sentido, a dor torna-se um sintoma clinicamente relevante para a detecção e avaliação de doenças, induzindo um comportamento de precaução e limitando os possíveis danos (MILLAN, 1999; WOOLF, 2011). No entanto, em certas condições, a dor passa a assumir um caráter patológico, que leva a quadros de hipersensibilidade onde, de função de alerta, a dor passa a ser crônica e muitas vezes debilitante (BAUSBAUM, 2009).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *International Association for the Study of Pain*, IASP) define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER; TREEDE, 2008). A partir desta definição, pode-se inferir que a dor apresenta um universo complexo e muitas vezes subjetivo, o qual envolve componentes sensoriais e emocionais. O componente emocional refere-se às expectativas e/ou experiências prévias do indivíduo, enquanto o componente sensorial, denominado nocicepção, é determinado pela estimulação das fibras aferentes primárias que transmitem o sinal nociceptivo até o sistema nervoso central (SNC) (RUSSO; BROSE, 1998; STEEDS, 2016).

O termo nocicepção, derivado de *noci* (do latim, dano ou lesão), é utilizado para descrever os processos de transdução, transmissão e percepção dos sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo, o qual pode ser de origem térmica, mecânica ou química (LOESER; TREEDE, 2008). A transdução de um estímulo em um impulso elétrico ocorre em terminais nervosos especializados, denominados nociceptores. Estes correspondem às terminações nervosas livres dos neurônios de primeira ordem (sensoriais), cuja função é preservar a homeostasia tecidual, sinalizando assim uma lesão real ou potencial (KLAUMANN et al., 2008; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). O estímulo externo é responsável por causar alterações conformacionais no receptor, alterando o seu potencial de

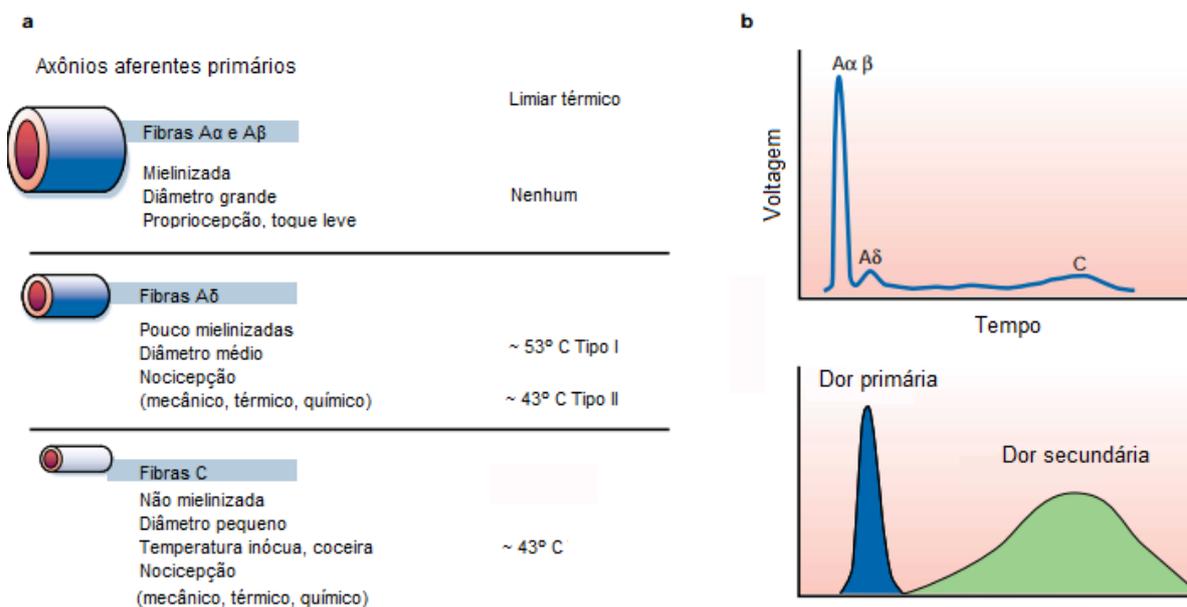
membrana e facilitando a condução da informação ao SNC (FEIN, 2011). De acordo com Julius e Basbaum (2001), os neurônios sensoriais, que conduzem tais estímulos, podem ser classificados em três grandes grupos, segundo seu calibre (diâmetro), seu grau de mielinização e sua velocidade de condução (Figura 1):

→ Fibras A α /A β : fibras calibrosas ($\geq 10 \mu\text{m}$ de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30-100 m/s). De modo geral, na ausência de dano tecidual, essas fibras são responsáveis por transmitir informações inócuas (como tato, pressão e vibração);

→ Fibras A δ : mielinizadas, com diâmetro (2 a 6 μm) e velocidade de condução intermediária (1,2-30 m/s), essas fibras encarregam-se, principalmente, da modulação da primeira fase da dor;

→ Fibras C: são fibras de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μm), não mielinizadas e de velocidade de condução lenta (0,5-2 m/s), responsáveis pela segunda dor ou dor difusa, de queimação persistente.

Figura 1: Classificação das fibras aferentes primárias e tipos de dor.



Legenda: (A) - Tipos de fibras aferentes primárias e suas principais características; (B) – Descarga elétrica de fibras nociceptivas e Relação intensidade X tempo da dor. Fonte: adaptado de JULIUS; BASBAUM, 2001.

As fibras aferentes primárias projetam-se ao corno dorsal da medula espinal, o qual é organizado em estruturas anatômica e fisiologicamente distintas, denominadas lâminas de Rexed (MELLO; DICKENSON, 2008). As fibras A δ projetam-se para as lâminas I e V, mais superficiais e profundas, respectivamente. As fibras A β , as quais são responsáveis pela

resposta ao toque leve, se dirigem para as lâminas III, IV e V, enquanto as fibras C projetam-se mais superficialmente entre as lâminas I e II (BASBAUM et al., 2009) (Figura 2).

Os neurônios de projeção das lâminas I e V representam a principal saída da informação nociceptiva no corno dorsal para o encéfalo (BASBAUM; JESSELL, 2000). Esses neurônios constituem a origem de múltiplas vias ascendentes, incluindo os tratos espinotalâmico e espinoreticulotalâmico, os quais enviam mensagens de dor para o tálamo e para o tronco encefálico, respectivamente. O primeiro é particularmente relevante para os aspectos sensório-discriminativos da experiência de dor (localização e intensidade do estímulo), enquanto o segundo é recrutado em situações de dores mal localizadas (BASBAUM et al., 2009).

Uma vez que o estímulo chega ao tronco encefálico e ao tálamo, é projetado a diversas regiões corticais. Não existe uma região encefálica particular para o processamento da dor (APKARIAN et al., 2005). Ao invés disso, o estímulo doloroso pode resultar na ativação de um grupo distinto de estruturas, as quais podem estar associadas com propriedades sensório-discriminativas (como o córtex somatossensorial), bem como podem relacionar-se com aspectos emocionais (como o giro cingulado anterior, hipotálamo, hipocampo, amígdala e o córtex insular) (BASBAUM et al., 2009).

É importante salientar que, além das vias ascendentes da dor, o organismo também possui mecanismos descendentes, os quais visam suprimir as aferências nociceptivas, modificando a experiência dolorosa (Figura 2, setas amarelas). A modulação (facilitação ou inibição) da dor compreende um circuito complexo de aferências em múltiplas áreas, incluindo o hipotálamo, a amígdala, o córtex cingulado anterior rostral (rAAC), a substância cinzenta periaquedutal (PAG), além de eferências da PAG para o bulbo (MILLAN, 2002; YOSHIMURA; FURUE, 2006). Os principais moduladores que atuam no processo descendente da dor consistem no sistema opiodérgico, GABAérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, dopaminérgico, adenosinérgico, além de canabinóides endógenos (MILLAN, 2002). Os mecanismos pelos quais cada neurotransmissor atua são bastante complexos. A noradrenalina, serotonina e dopamina, por exemplo, exercem papéis duais na nocicepção, uma vez que dependem do tipo de receptor envolvido, do sítio (local) de ação no corno dorsal e/ou da comunicação cruzada (*cross talk*) entre a sinalização neuroquímica local e as vias descendentes (MILLAN, 2002).

1.1.1 Classificação da dor

A dor pode ser classificada de diversas maneiras, no entanto, de forma didática, ela é organizada de acordo com a sua duração e origem. Com relação à duração é, geralmente, diferenciada em aguda ou crônica:

- a) Dor Aguda: é relacionada, temporalmente, à lesão causadora. É decorrente de uma ativação direta dos nociceptores após um estímulo nocivo (traumas, intervenções cirúrgicas, reações inflamatórias, dentre outros) e surge como um sinal de alerta. Sua duração pode ser extremamente curta (alguns minutos), ou prolongada (algumas semanas).
- b) Dor Crônica: é referida como uma dor que perdura por mais de 3 meses, ou que ultrapassa o período usual de recuperação esperado para a causa desencadeante da dor (alguns consideram esse limite como sendo de 6 meses). A dor crônica não apresenta utilidade a qualquer processo fisiológico e, desta forma, não assume qualquer outra função senão a de causar sofrimento ao indivíduo, em seu aspecto mais amplo: físico, emocional e financeiro (LOESER; MELZACK, 1999; ORR et al., 2017).

Com relação à sua origem, Chimenti e colaboradores (2018) explicam que a dor pode ser classificada em:

- a) Nociceptiva: causada por uma lesão real ou ameaça de lesão a um tecido não neuronal, por meio da ativação de nociceptores, como, por exemplo, uma contusão.
- b) Neuropática: caracterizada por uma lesão direta do Sistema Nervoso Somatossensorial, tanto central quanto periférico, como no caso de neuropatias diabéticas.
- c) Nociplástica: identificada por uma nocicepção alterada, que leva à ativação dos nociceptores periféricos mesmo não havendo evidência de lesão, como a fibromialgia.

1.2 SÍNDROME DA DOR COMPLEXA REGIONAL

1.2.1 Contexto histórico

A Síndrome da Dor Complexa Regional (SDCR) foi descrita, pela primeira vez, no século XVI, pelo cirurgião francês Ambroise Paré, o qual se referiu a contraturas e dores experienciadas pelo rei Charles IX após um procedimento de sangria (FELIU; EDWARDS, 2010). Posteriormente, em 1864, Silas Weir Mitchell, considerado o pai da neurologia, forneceu a primeira descrição detalhada da SDCR. Mitchell dedicou os primeiros anos de sua carreira médica a cuidar de soldados que sofriam de dor em queimação secundária a ferimentos por armas de fogo, durante a Guerra Civil Americana (IOLASCON et al., 2015). Dentre as doenças descritas por Mitchell, destaca-se uma síndrome caracterizada por dor crônica em queimação, localizada distalmente ao local de lesão do nervo periférico e associada a distúrbios cutâneos. Para referir-se a esse quadro, o médico empregou o termo *causalgia*, que tem sua origem do grego “*Kausis*”, que significa fogo, e “*Algos*” que está relacionado à dor (MITCHELL, 1872).

Em 1900, durante o 29º Congresso da Sociedade Alemã de Cirurgia, o médico Paul Sudeck descreveu complicações de traumas nos membros, caracterizadas por edema, limitações da função motora e dor resistente à terapia. Assim, a síndrome foi reportada, por muitos anos, como atrofia de Sudeck (SUDECK, 1900). Em 1916, um cirurgião militar de Estrasburgo, durante a Primeira Guerra Mundial, sugeriu que a *causalgia* era em decorrência da exacerbação da atividade simpática, realizando a primeira simpatectomia periarterial para tratamento do paciente (IOLASCON et al., 2015). Em 1946, James A. Evans teorizou que o trauma é responsável por gerar atividade em aferentes simpáticos, configurando um reflexo na medula espinal, que estimula a atividade em eferentes simpáticos e resulta em alterações distróficas na periferia do membro. Para essa condição, Evans introduziu o termo *distrofia simpático-reflexa* (DSR) (EVANS, 1946; SEBASTIN, 2011).

No entanto, em alguns trabalhos posteriores, não foi possível a observação de um arco reflexo, sugerindo que o sistema nervoso simpático pode não estar envolvido em todos os casos da síndrome (HARDEN, 2000). Desta forma, em 1986, Roberts usou o termo “dor simpaticamente mantida” (DSM) para descrever o quadro, enquanto Campbell e colegas empregaram o termo “dor simpaticamente independente” (DSI), a fim de incluir os pacientes

com lesões nervosas que não respondiam ao bloqueio simpático (STANTON-HICKS, 2000; FELIU; EDWARDS, 2010). As controvérsias relacionadas às terminologias e classificações imprecisas da síndrome foram, por muito tempo, responsáveis por diagnósticos errados e, conseqüentemente, tratamentos insuficientes para os pacientes que sofriam com esta doença (GRIEPP, 2000).

Com o intuito de resolver esses problemas, A IASP, em 1993, designou uma força tarefa para revisar a nomenclatura e desenvolver critérios diagnósticos da síndrome, os quais foram publicados em 1994 (CORDON; LEMONICA, 2002; SEBASTIN, 2011). A equipe internacional de especialistas concordou com o termo Síndrome da Dor Complexa Regional (SDCR), o qual foi escolhido por alguns motivos, como explicam Stanton-Hicks e colaboradores (1995):

- Síndrome: refere-se aos sinais e sintomas, que são caracterizados por eventos distintos e correlacionados;
- Dor: sintoma essencial para o diagnóstico, podendo envolver quadros de alodinia¹ ou hiperalgesia²;
- Complexa: relacionada às variadas características clínicas de um único indivíduo ao longo do tempo (inflamação, alterações autonômicas, cutâneas, motoras e distróficas);
- Regional: grande parte dos casos envolve uma determinada região do corpo, embora a dor possa se expandir para além da área de lesão inicial.

1.2.2 Descrição e diagnóstico

A Síndrome da Dor Complexa Regional é, atualmente, definida como uma dor contínua regional (espontânea ou evocada), desproporcional em relação ao tempo e ao curso natural de qualquer trauma/lesão identificável, não estando restrita a um dermatomo específico ou raiz nervosa, e marcada por anormalidades motoras, sensoriais, sudomotoras e vasomotoras, bem como alterações tróficas com progressão variável (BRUEHL, 2015; STANTON-RICKS, 2019).

¹ Alodinia: sensação de dor frente a um estímulo inócua.

² Hiperalgesia: sensibilidade aumentada à dor.

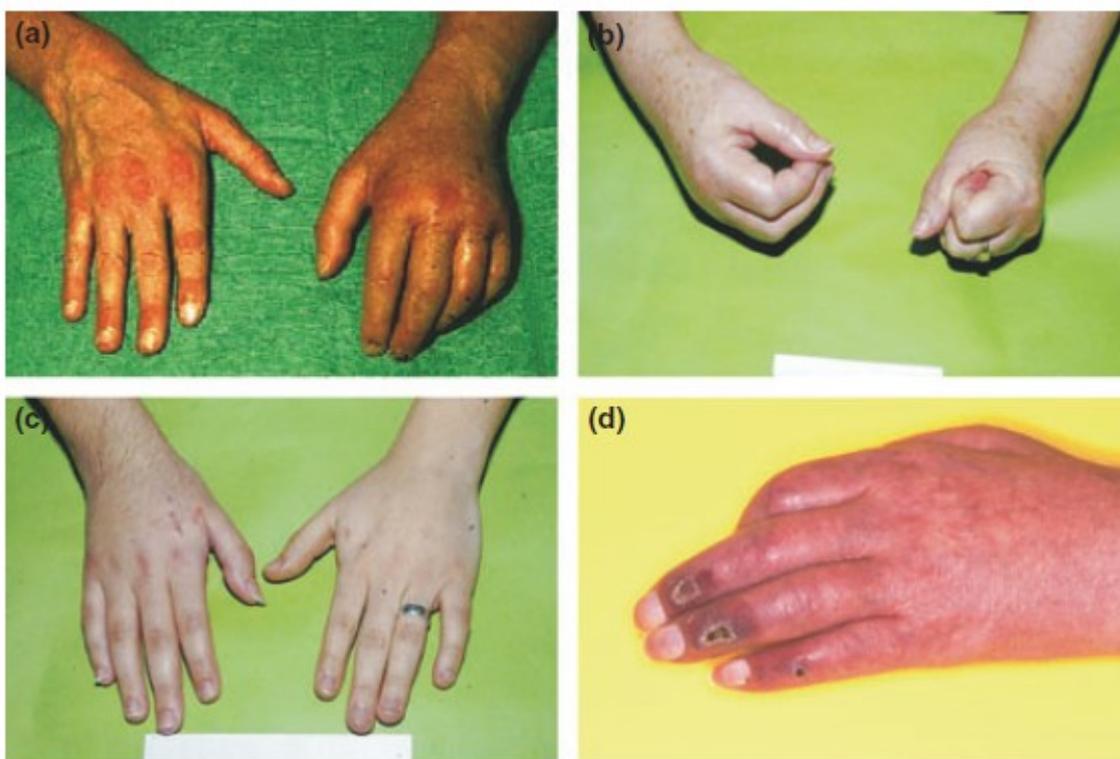
Clinicamente, a SDCR pode ter início após um trauma, geralmente em uma extremidade, podendo ser uma fratura distal, lesão nervosa, lesão pós-cirúrgica, síndromes de compressão nervosa, tumores ou até mesmo problemas cardiovasculares, como o infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico (FELIU; EDWARDS, 2010).

De acordo com Mersky e Bogduk (1994), a SDCR pode ser classificada em dois tipos:

- Tipo I: conhecida como distrofia simpático-reflexa, trata-se de uma neuropatia desenvolvida a partir de um trauma, geralmente em uma extremidade, porém sem que ocorra lesão nervosa;
- Tipo II: conhecida como causalgia, apresenta os mesmos sinais e sintomas do tipo I, porém é distinguida pela identificação de uma lesão nervosa, mesmo que parcial (LOHNBERG; ALTMAIER, 2013).

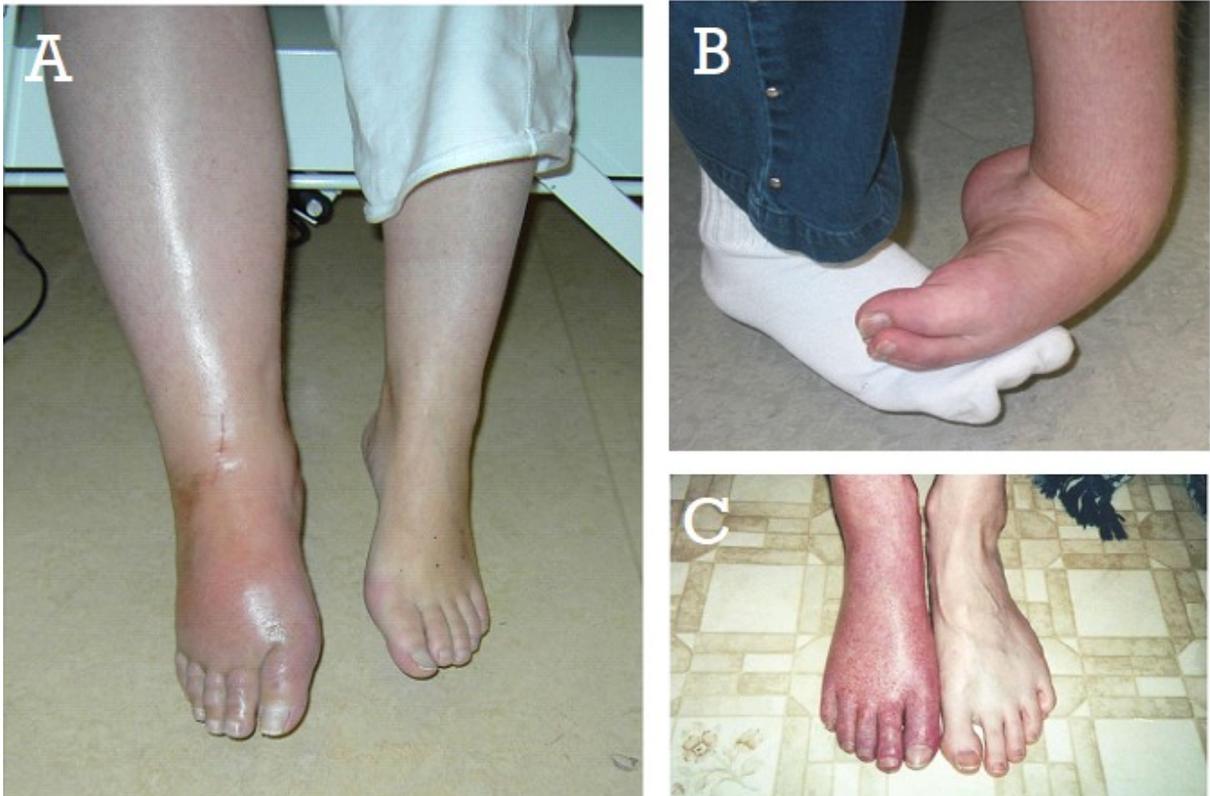
As figuras 3 e 4 demonstram os aspectos clínicos relacionados à SDCR do tipo I (SDCR-I), a qual é alvo de estudo deste trabalho.

Figura 3: Sinais clínicos em membros superiores de pacientes com SDCR-I.



Legenda: (A) - Edema, alteração da coloração da pele e comprometimento da função da mão esquerda após fratura distal do rádio. (B) - Edema e mobilidade prejudicada na tentativa de flexionar os dedos da mão direita após cirurgia de liberação do túnel do carpo. (C) - Hipertricose da mão direita. (D) - Contraturas, alteração da coloração e distúrbios tróficos da pele. Fonte: MAIHOFNER et al., 2010.

Figura 4: Sinais clínicos em membros inferiores de pacientes com SDCR-I.



Legenda: (A) - Hiperemia, edema e hiperidrose em membro inferior direito. (B) - Dystonia relacionada a SDCR no tornozelo e pé esquerdo com flexão plantar e inversão do tornozelo e flexão dos dedos, edema e hipertricose também são visíveis. (C) - Alteração na coloração da pele no membro inferior direito. Fonte: MARINUS et al., 2011.

Com relação ao diagnóstico da SDCR, alguns testes podem auxiliar, tais como: exames de raios-X, termografia, medições do fluxo sanguíneo periférico por laser Doppler, testes quantitativos de suor, testes sensoriais quantitativos, avaliação da resposta cutânea simpática, teste de força muscular, além de outros (STANTON-HICKS, 2000; SHIM et al., 2019). Contudo, ainda não existe um teste diagnóstico padrão-ouro, sendo, desta forma, o diagnóstico feito através da avaliação de critérios clínicos de exclusão (BORCHERS; GERSHWIN, 2014). De acordo com a versão mais atual da “Síndrome da dor complexa regional: diagnóstico prático e diretrizes de tratamento (4ª edição)”, publicada pela IASP, os critérios clínicos para o diagnóstico da SDCR seguem o exposto abaixo na Tabela 1:

Tabela 1: Critérios clínicos para o diagnóstico da SDCR.

1) Dor contínua, que é desproporcional a qualquer evento incitante.
2) Deve informar pelo menos um sintoma³ em três das quatro seguintes categorias: <ul style="list-style-type: none"> • Sensorial: relatos de hiperalgesia e/ou alodinia; • Vasomotor: relatos de assimetria de temperatura e/ou alterações na cor da pele e/ou assimetria da cor da pele; • Sudomotor/Edema: relatos de edema e/ou alterações de sudorese (hiperidrose); • Motor/Trófico: Relatos de diminuição da amplitude de movimento e/ou disfunção motora (fraqueza, tremor, distonia) e/ou alterações tróficas (cabelo, unha ou pele)
3) Deve exibir pelo menos um sinal⁴ no momento da avaliação em duas ou mais das seguintes categorias: <ul style="list-style-type: none"> • Sensoriais: Evidência de hiperalgesia (ao pinçar) e/ou alodínia (ao toque leve e/ou à pressão somática profunda e/ou movimento articular); • Vasomotor: Evidências de assimetria de temperatura e/ou alterações na cor da pele e/ou assimetria; • Sudomotor / Edema: evidência de edema e/ou alterações de sudorese (hiperidrose); • Motor / Trófico: evidência de diminuição da amplitude de movimento e / ou disfunção motora (fraqueza, tremor, distonia) e / ou alterações tróficas (cabelo, unha, pele).
4) Não haver outro diagnóstico que explique melhor os sinais e sintomas.

Fonte: adaptado de SHIM, 2019.

1.2.3 Epidemiologia

Até o momento, alguns estudos epidemiológicos foram realizados com o intuito de identificar a incidência e a prevalência da SDCR, no entanto, ainda não são encontrados dados

³ Sintoma corresponde a qualquer alteração da percepção normal que o paciente tem de seu próprio corpo, podendo ou não consistir um início de doença.

⁴ Sinal expressa todas as características clínicas avaliadas por outrem.

para o Brasil (CORDON; LEMONICA, 2002; MARINUS et al., 2011). Estima-se que, nos Estados Unidos, a SDCR-I acometa 5,46 em cada 100.000 habitantes por ano (DRUMMOND, 2010). Já na Holanda, esse índice atinge 26,2 em cada 100.000 habitantes/ano (DE MOS et al., 2007). O estudo de Ott e Maihöfner (2018), realizado na Alemanha, constatou que 88% dos casos se referem à SDCR do tipo I, e 12% do tipo II. O mesmo estudo ainda mostrou que 71% dos acometidos são mulheres, com uma predominância entre os 50 e 70 anos de idade. Além disso, sabe-se que os membros superiores são os mais afetados, sendo fraturas, contusões, entorse e cirurgia os eventos precipitantes mais comuns para o desenvolvimento da síndrome (SANDRONI et al., 2003; DE MOS et al., 2007).

1.2.4 Fisiopatologia

A fisiopatologia da SDCR-I ainda não está completamente elucidada, no entanto, sabe-se que os sinais clínicos podem ser resultado de processos multifatoriais, que envolvem mecanismos periféricos e centrais (PARKITNY et al., 2013). A tabela 2 lista os principais mecanismos envolvidos na patogênese da SDCR-I, dos quais alguns serão discutidos com maiores detalhes na sequência. É importante salientar que, dada à diversidade de apresentação desta síndrome, a contribuição individual de cada um dos mecanismos pode variar de acordo com as particularidades do paciente e o decurso da doença (SEBASTIN, 2011).

Tabela 2: Possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da SDCR.

- **Lesão nervosa;**
- **Disfunção por isquemia/reperfusão e estresse oxidativo;**
- **Sensibilização periférica e central;**
- **Alterações no sistema nervoso simpático;**
- **Resposta imune;**
- **Plasticidade mal adaptativa;**
- **Fatores genéticos;**
- **Fatores psicológicos.**

Fonte: Adaptado de BRUEHL, 2015.

1.2.4.1 Isquemia e reperfusão

Acredita-se que um mecanismo bastante importante na patogênese da SDCR-I seja decorrente de uma lesão causada por isquemia e reperfusão (IR) (CODERRE et al., 2004). A IR é uma condição patológica caracterizada por uma restrição inicial do suprimento sanguíneo a um órgão ou tecido específico do corpo, seguida da subsequente restauração da perfusão e concomitante reoxigenação (ELTZSCHIG; ECKLE, 2011).

Esse processo leva a um desequilíbrio na oferta e demanda metabólica dentro do órgão isquêmico, resultando em uma hipóxia tecidual (diminuição da oferta de oxigênio), além de disfunções microvasculares e danos na barreira celular endotelial (ELTZSCHIG; ECKLE, 2011). A redução da oferta de oxigênio é responsável pela diminuição do pH intracelular e da produção de ATP (trifosfato de adenosina). Como consequência, as células iniciam a produção de ATP anaerobicamente, no entanto, essa produção é insuficiente para manter a função de ATPases como, por exemplo a bomba de sódio e potássio ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$), o qual é mais importante transportador responsável pela manutenção das concentrações intracelulares de K^+ e Na^+ . A perda funcional desta bomba iônica resulta na redução dos gradientes iônicos e, conseqüentemente, o potencial de membrana é perdido e os neurônios sofrem despolarização (KALOGERIS et al., 2017).

Além disso, a IR pode ainda promover a ativação de programas de morte celular, que incluem a apoptose (fragmentação nuclear, ruptura da membrana plasmática, danos mitocondriais), a morte celular associada à autofagia (vacuolização citoplasmática com perda de organelas) e a necrose (inchaço progressivo da célula e ruptura da membrana) (HOTCHKISS et al., 2009; ELTZSCHIG; ECKLE, 2011).

A restauração do fluxo sanguíneo para um órgão isquêmico é essencial para prevenir danos irreversíveis aos tecidos (HALLADIN et al., 2015). No entanto, a reperfusão, embora necessária para reverter o quadro isquêmico, piora as lesões já presentes no período de isquemia (SILVEIRA; YOSHIDA, 2004). A formação de quantidades excessivas de radicais livres (RL), associada à intensa participação dos neutrófilos, amplifica a reação inflamatória, com conseqüente edema, necrose e agravamento das condições clínicas teciduais (KALOGERIS et al., 2017).

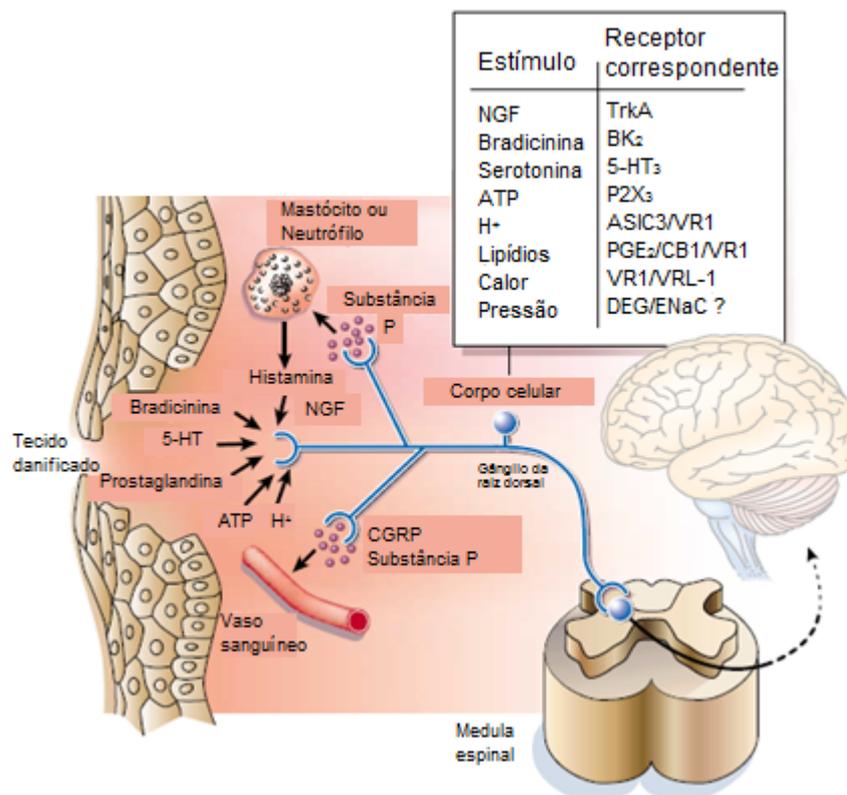
1.2.4.2 Sensibilização periférica e central

O processo inflamatório constitui uma das primeiras respostas observadas após um dano tecidual, podendo ser crucial para o desenvolvimento da SDCR-I (BRUEHL, 2015). O dano é geralmente acompanhado por alterações no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular, ativação e migração de células do sistema imune, além de mudanças na liberação de fatores tróficos e fatores de crescimento (JULIUS; BASBAUM, 2001). Além disso, também é observado o acúmulo de fatores endógenos, os quais são liberados a partir de nociceptores ativados, plaquetas ou células não neuronais que residem ou se infiltram na área lesionada, como mastócitos, basófilos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos (BASBAUM, 2009).

Tais fatores endógenos são chamados, coletivamente, de “sopa inflamatória” e representam uma ampla gama de moléculas sinalizadoras, tais como neurotransmissores excitatórios (glutamato), neuropeptídeos [substância P (SP), peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e galanina], eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos), neurotrofinas [fator de crescimento neuronal (NGF)], citocinas pró-inflamatórias [interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α)], além de proteases extracelulares (BASBAUM 2009; WOOLF, 2011) (Figura 5).

A interação destas substâncias pró-inflamatórias/pró-álgicas com os receptores presentes na membrana dos nociceptores leva a um aumento da excitabilidade das fibras nervosas e, por consequência, desencadeia um quadro de hipersensibilidade mecânica e térmica. Esta condição é reconhecida como sensibilização periférica, e normalmente, é resolvida após o reparo do tecido (JULIUS; BASBAUM, 2001). Entretanto, em algumas situações, como na SDCR-I, a dor perde o seu caráter fisiológico, tornando-se um quadro patológico crônico. Assim, com a persistência de um processo inflamatório e a estimulação sustentada dos nociceptores, são observadas alterações neuroplásticas, tanto no sistema nervoso periférico quanto central (BASBAUM, 2009).

Figura 5: Mediadores envolvidos na sensibilização periférica.



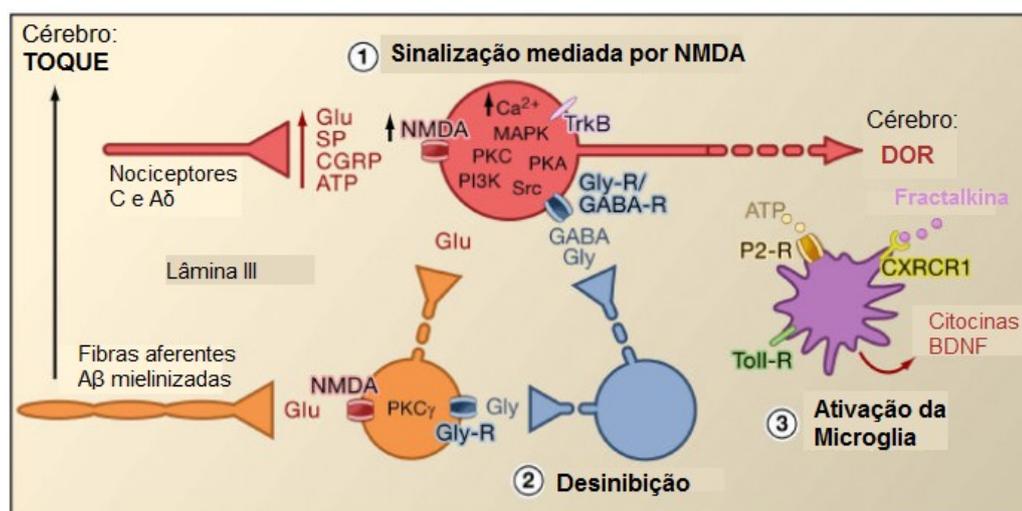
Legenda: a complexidade molecular da sensibilização periférica envolve diversos mediadores inflamatórios liberados no local da lesão. Alguns dos principais componentes da “sopa inflamatória” incluem peptídeos (bradicinina), lipídios (prostaglandinas), neurotransmissores (glutamato e serotonina) e neurotrofinas (NGF). Tais mediadores são responsáveis por sensibilizar os terminais dos nociceptores através da interação com receptores expressos na superfície celular (indicados na caixa). A ativação dos nociceptores é responsável por conduzir a informação ao corno dorsal da medula e, em seguida, para o encéfalo. Além disso, o processo de inflamação neurogênica é observado, onde, principalmente, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) induzem a vasodilatação e o extravasamento do plasma, bem como a ativação de células não neuronais, como mastócitos e neutrófilos. Fonte: Adaptado de JULIUS; BASBAUM, 2001.

A sensibilização central, por sua vez, refere-se a um estado de hiperexcitabilidade estabelecido no SNC, conduzindo a um aumento no processamento dos sinais nociceptivos (WOOLF, 2011). De fato, já se sabe que pacientes com SDCR-I apresentam concentrações elevadas de mediadores como SP, CGRP e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) tanto na circulação sistêmica quanto no fluido cerebrospinal, os quais podem estar envolvidos na estimulação excessiva de neurônios a nível medular e encefálico, desencadeando a sensibilização central e a cronificação da dor (OKUDAN; CELIK; 2006; BIRKLEIN et al., 2018).

Além disso, diversos outros mecanismos são implicados na sensibilização central, sendo que os principais constituem em alterações na transmissão glutamatérgica, perda do controle inibitório e interações gliais (WOOLF, 2011) (Figura 6). A sensibilização mediada

pelo sistema glutamatérgico consiste na ativação e suprarregulação de receptores como o N-Metil-D-Aspartato (NMDA), o qual é sensível ao glutamato, aumentando a transmissão do sinal nociceptivo da medula espinal ao córtex cerebral. Desta maneira, neurônios nociceptivos sensibilizados da medula espinal se tornam mais responsivos à entrada de sinais periféricos e podem, inclusive, disparar na ausência destes sinais (MARINUS et al., 2011). O sistema GABAérgico é um dos responsáveis pelo controle inibitório da dor, sendo que, em situações de lesão, essa via inibitória pode ser perdida, facilitando a excitabilidade neuronal e consequente hiperalgesia. A ativação microglial, por sua vez, leva a liberação de diversas moléculas sinalizadoras, incluindo citocinas (TNF- α , IL1- β e IL-6), as quais auxiliam no processo de sensibilização neuronal, levando a uma dor persistente (BASBAUM, 2009) (Figura 6).

Figura 6: Mecanismos envolvidos na sensibilização central.



Legenda: 1) Sensibilização mediada por receptores glutamatérgicos/NMDA: Após intensa estimulação ou lesão persistente, as fibras C e A δ liberam uma variedade de neurotransmissores (glutamato, SP, CGRP, ATP) na medula espinal (em vermelho). Como consequência, receptores NMDA *silentes* são ativados, conduzindo a um aumento de cálcio intracelular e ativando diversas vias de sinalização dependentes de cálcio e segundos mensageiros (MAPK, PKC, PKA). Essa ativação aumenta a excitabilidade neuronal com facilitação da transmissão do sinal nociceptivo. 2) Desinibição: em condições normais, interneurônios inibitórios (azul) liberam GABA e glicina para diminuir a excitabilidade e modular a transmissão nociceptiva. No entanto, perante a uma lesão, essa inibição pode ser perdida, resultando em hiperalgesia. 3) Ativação microglial: a lesão periférica promove a liberação de ATP e da quimiocina fractalina, que estimulam células gliais. A ativação do receptor purinérgico (CX3CR1) e de receptores toll-like na microglia (em roxo), estimula a liberação de BDNF, promovendo o aumento na excitabilidade neuronal e da resposta aos estímulos nocivos (hiperalgesia) e inócuos (alodínia). A microglia ativada também libera citocinas (TNF α , IL-1 β e IL-6) e outros fatores que contribuem para a sensibilização central. Fonte: Adaptado de BASBAUM et al., 2009.

1.2.4.3 Manifestações mal adaptativas em pacientes com SDCR-I

A dor crônica é uma condição comum e debilitante associada a mudanças morfológicas e funcionais do SNC. De fato, estudos de imagem demonstram que, em condições severas como na SDCR-I, a plasticidade mal adaptativa não está relacionada somente com a patogênese da doença, mas também com a manutenção e duração do quadro (BRUEHL, 2015, MANCINI et al. 2018).

Uma das principais manifestações observadas em pacientes com a SDCR-I caracteriza-se pelas alterações sensoriais, que incluem a dificuldade de localizar estímulos, a sensibilidade alterada à dor, ou até mesmo percepções distorcidas sobre sua imagem corporal (muitos pacientes relatam perceber o membro afetado como muito maior do que ele realmente é) (STANTON-HICKS, 2019). De fato, estas alterações podem estar relacionadas com a reorganização do mapa somatotrópico do córtex somatossensorial primário (S1) (MANCINI et al., 2018), bem como do córtex somatossensorial secundário (S2) (PLEGER et al, 2006). Nesse sentido, o estudo de Maihofner e colaboradores (2004) demonstrou uma redução da

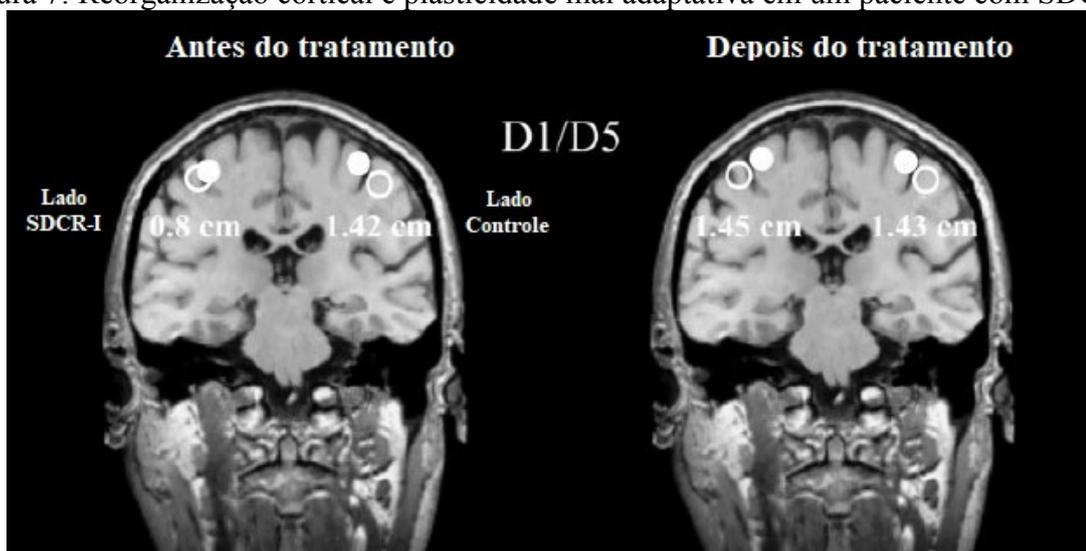
representação da mão afetada no lado contralateral do córtex somatossensorial, correlacionando tal alteração com os sintomas observados no paciente, como hiperalgesia mecânica e alodinia. Após um ano de tratamento bem sucedido, os sintomas foram reduzidos e a reorganização cortical de S1 também se inverteu (figura 7).

Além disso, é comum, em pacientes com SDCR-I, a presença de distúrbios de movimento acentuados, tais como distonia, mioclonia, paresia e tremor (MARINUS et al., 2011). Estas alterações são consideradas, em grande parte, dependentes de disfunções do SNC. De fato, Pleger e colaboradores (2014) observaram um aumento na densidade de substância cinzenta no córtex motor primário contralateral ao membro afetado, sendo esse achado inversamente relacionado à diminuição da densidade de substância branca da capsula interna dentro do hemisfério ipsilateral à lesão. A interação entre a substância branca e cinzenta sugerem mecanismos compensatórios do sistema motor, possivelmente devido à disfunção motora.

Dada a importância dos processos de isquemia e reperfusão, sensibilização periférica e central, bem como da plasticidade mal adaptativa na patogênese da SDCR-I, a figura 8 resume e ilustra as principais características da doença, bem como os mecanismos fisiopatológicos envolvidos.

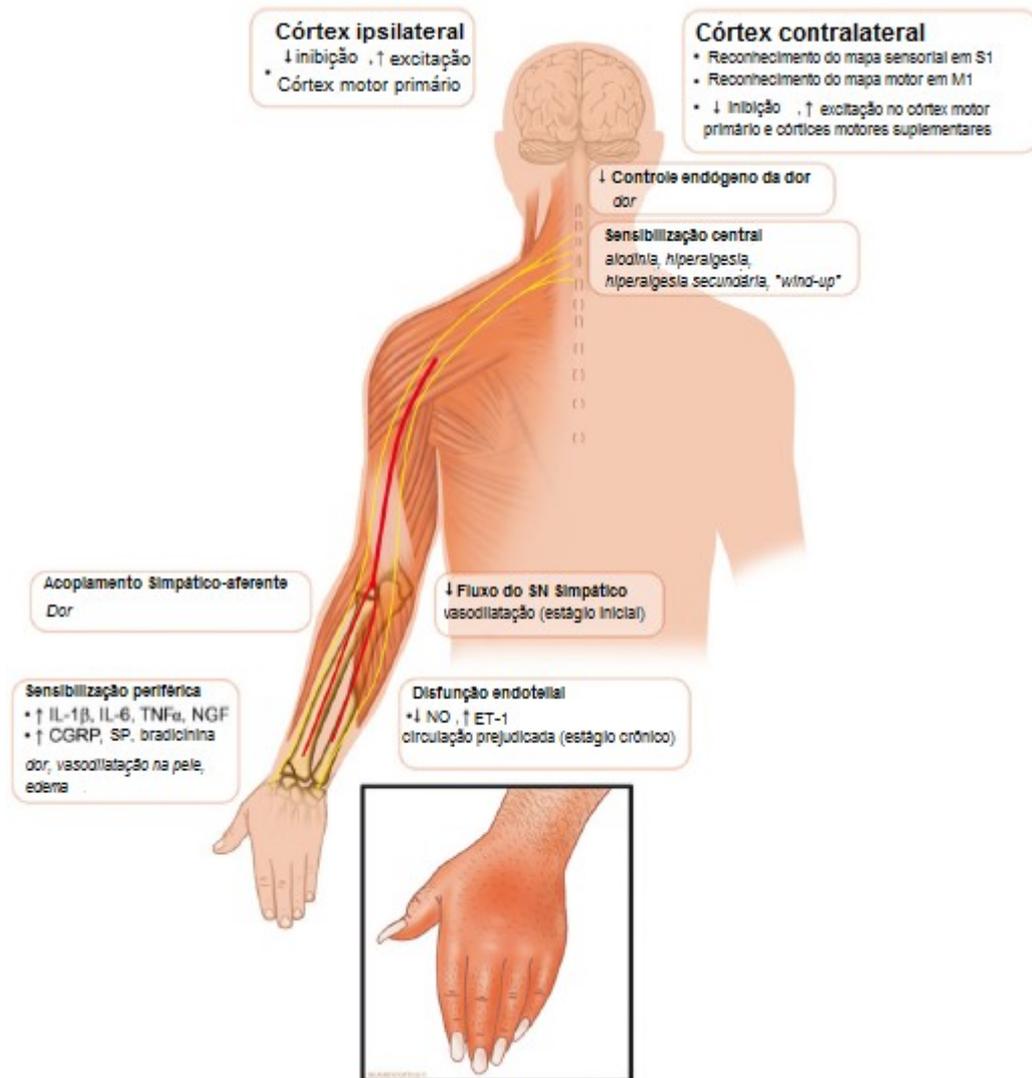
Somado ao exposto, já se sabe que muitas comorbidades associadas a dores crônicas, como a depressão, a ansiedade e alguns problemas de memória ocorrem em decorrência de alterações observadas no SNC. O próximo tópico visa discutir tais comorbidades.

Figura 7: Reorganização cortical e plasticidade mal adaptativa em um paciente com SDCR-I.



Legenda: Neste caso a mão esquerda foi afetada. (A) A representação da extensão cortical da mão (distância entre o primeiro dedo - D1, círculos abertos - e o quinto dedo - D5, círculos preenchidos) se mostrou diminuída de 1,42 cm no lado saudável para 0,8 cm no lado afetado. As alterações somatotópicas correlacionaram-se com os sintomas da doença. (B) Normalização da somatotopia no giro pós-central um ano após a terapia bem-sucedida. Fonte: Adaptado de MAIHOFNER et al., 2004.

Figura 8: Principais mecanismos envolvidos na patogênese da SDCR-I.



Legenda: Ilustração das características clínicas e possíveis processos fisiopatológicos subjacentes. IL = interleucina; TNF = fator de necrose tumoral; NGF = fator de crescimento do nervo; CGRP = Peptídeo Relacionado com o Gene da Calcitonina; SP = substância P; NO = óxido nítrico; ET = endotelina. Fonte: adaptado de MARINUS et al. (2011).

1.2.5 Comorbidades

Por tratar-se de uma condição duradoura e incapacitante, a dor crônica está frequentemente associada a diversas comorbidades, tais como depressão, ansiedade, distúrbios do sono, fadiga e problemas de memória. Essas comorbidades são responsáveis por reduzir a qualidade de vida do paciente, aumentar as ausências no trabalho, além de prejudicar as relações sociais e familiares e diminuir a resposta ao tratamento (TAJERIAN et al, 2014).

A depressão, por exemplo, acomete cerca de 40 a 60% dos pacientes com dor crônica, tornando o quadro ainda mais preocupante (SHENG et al., 2017). Ademais, já está bem estabelecida a existência de uma correlação entre a severidade da dor e o grau de depressão, ou seja, quanto mais grave o quadro doloroso maiores serão as complicações relacionadas à depressão (FISHBAIN et al., 1997). É comum, na clínica, a queixa de pacientes que sofrem com SDCR-I e são afetados por transtornos depressivos e, em casos mais graves, tendências suicidas (BRINKERS et al., 2018). Os mecanismos biológicos envolvidos nos quadros de dor e depressão consistem, principalmente, na ativação de áreas encefálicas relacionadas aos componentes emocionais da dor, como o sistema límbico; a contribuição de mecanismos inflamatórios, como as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL6, que se encontram elevadas em pacientes com dor e depressão (WALKER et al., 2014; MILLER; RAISON, 2016); além de outros mecanismos moleculares, como o sistema glutamatérgico, serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico, endocanabinóides e neurotrofinas (BDNF) (DOAN et al., 2015).

A ansiedade é outra condição bastante comum em indivíduos com dor crônica, e geralmente está associada aos quadros depressivos (ASMUNDSON; KATZ, 2009). Em pacientes com a SDCR-I, além de ser um agravante para a doença, a ansiedade pode ser um fator de risco para o seu desenvolvimento. Dilek e colaboradores (2012) demonstraram que, em um grupo de indivíduos que havia sofrido fratura no radio distal, os que apresentavam personalidade mais ansiosa tiveram um risco aumentado para a SDCR-I. Além disso, estudos clínicos evidenciaram que pacientes com SDCR-I apresentam expressivos problemas cognitivos como déficits de atenção, de aquisição e consolidação de novas memórias (LIBON et al., 2010). De fato, Weiner e colaboradores (2006) observaram também que dores crônicas estão associadas à redução do desempenho em testes neuropsicológicos que avaliam a memória, a linguagem e o controle executivo.

1.2.6 Tratamentos

Por tratar-se de um quadro complexo, ainda não existe um protocolo padrão para o tratamento da SDCR-I, no entanto, abordagens multidisciplinares e multiprofissionais costumam apresentar melhores resultados (CORDON; LEMONICA, 2002).

As principais abordagens terapêuticas para a SDCR-I incluem a farmacoterapia, que possui como intenção primária reduzir os sintomas causados pela doença (BORCHERS; GERSHWIN, 2014); a fisioterapia, que busca minimizar o edema, dessensibilizar o membro doloroso e normalizar as sensações ao toque (FREEDMAN et al., 2014); e a psicoterapia, que visa o tratamento das respostas emocionais ligadas à dor (BUSSA et al., 2015)

As intervenções farmacológicas propostas para a SDCR-I são variadas, entretanto, para a maioria delas, há uma escassez de evidências/estudos científicos devidamente controlados e randomizados que provem o seu benefício (GASPAR; ANTUNES, 2011; FREEDMAN et al., 2014). Como já mencionado, o estágio inicial da síndrome envolve um componente inflamatório evidente, sendo a utilização de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) uma boa estratégia para a melhoria dos sintomas locais nesta fase (GASPAR; ANTUNES, 2011).

A fim de promover a analgesia e a melhora dos sintomas associados, são indicados analgésicos não opioides, opioides e alguns fármacos coadjuvantes, como antidepressivos tricíclicos (amitriptilina e nortriptilina), antidepressivos inibidores seletivos para a receptação de serotonina (fluoxetina e sertralina), além de anticonvulsivantes (carbamazepina, gabapentina e pregabalina) (FREEDMAN et al., 2014; SHIM et al., 2019). Apesar de esses medicamentos promoverem bons resultados, tais abordagens terapêuticas são limitadas, uma vez que o uso a longo prazo pode ser responsável por diversos efeitos adversos, como intolerância e dependência, além de, muitas vezes, ser de custo inacessível.

1.3 MODELO EXPERIMENTAL DA SDCR-I

A busca por estratégias que auxiliem no tratamento, cura e prevenção de diversas doenças têm sido motivo de muitos estudos dentro da Neurociência. Neste contexto, diversos modelos experimentais tanto *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* quanto *in silico* são propostos com o

intuito de construir conhecimentos sobre o assunto. As pesquisas pré-clínicas relacionadas à dor, especialmente crônica, são de extrema relevância, uma vez que buscam promover não só a redução dos sintomas, mas também a resolução do quadro subjacente.

Como já mencionado, as lesões causadas por isquemia e reperfusão desempenham um papel importante na patogênese da SDCR-I. Nesse sentido, Coderre e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo de dor pós-isquêmica crônica (DPIC) em ratos, o qual foi, posteriormente, adaptado e caracterizado para camundongos (MILLECAMPS et al., 2010; BRATTI, 2011). O modelo consiste na aplicação de um torniquete no tornozelo do animal, visando a instauração de um processo isquêmico. Decorrido o tempo de 3h o torniquete é removido e a reperfusão é permitida. Importante salientar que durante todo o tempo de isquemia os animais devem permanecer anestesiados. As respostas fisiológicas observadas nos animais consistem em hiperemia local com extravasamento plasmático, posterior surgimento de hiperalgesia a estímulos mecânicos e térmicos ao frio, bem como alodinia mecânica no membro afetado (CODERRE et al., 2004), sendo estes sintomas semelhantes aos encontrados em pacientes com SDCR-I (STANTON-HICKS, 2019). Além disso, já se sabe que alguns fármacos utilizados na clínica, como a dexametasona, a gabapentina e a morfina, possuem importantes efeitos neste modelo de dor pós-isquêmica crônica (CODERRE; BENNETT, 2008; BRATTI, 2001).

De acordo com estas informações, pode-se inferir que o modelo em questão cumpre os critérios de validação propostos por Willner (1984), onde:

- a) Validade de face: refere-se às semelhanças entre as respostas fisiológicas e comportamentais do modelo ao caso clínico;
- b) Validade preditiva: relaciona-se à sensibilidade aos efeitos farmacológicos e intervenções não farmacológicas que são eficazes para a doença em humanos;
- c) Validade de constructo: identifica-se pelos processos que resultam na patologia humana e são recapitulados com o modelo.

1.4 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas para fins medicinais, no tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Apesar dos avanços da medicina moderna na última década, as plantas ainda possuem uma importante

contribuição na saúde mundial (CALIXTO, 2000; DUTRA et al., 2016). De fato, o interesse em medicamentos derivados de plantas tem aumentado significativamente em todo o mundo. Este interesse é, especialmente, observado em países desenvolvidos, principalmente na Europa e nos Estados Unidos (MISHRA, TIWARI, 2011; HARVEY et al., 2015). Estima-se que cerca de 40% dos medicamentos terapêuticos disponíveis são derivados de fontes naturais como plantas e microorganismos (CALIXTO, 2000). Em algumas áreas terapêuticas, como a oncologia, a quantidade de princípios ativos derivados de plantas atinge até 60% (CALIXTO, 2000; DUTRA et al. 2016).

O Brasil é detentor da maior diversidade genética de plantas do mundo, possuindo cerca de 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e conta com a ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações. Nesse sentido, o interesse institucional e popular a respeito do uso de plantas com fins medicinais vem ganhando espaço no país. Em meados da década de 1980, diversos documentos foram elaborados com fins de inserir o uso plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Básica de Saúde (FONSECA, 2012).

Considerando o exposto, o Conselho Nacional de Saúde (CNS) criou, em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), a qual prevê a inclusão de diversas terapias complementares como opções terapêuticas no Sistema Único de Saúde (SUS). Tais alternativas incluem o uso de plantas medicinais e, além disso, a política ainda preconiza o desenvolvimento de uma Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que pode servir de guia para a população (BRASIL, 2010).

De forma adicional, o governo elaborou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que foi aprovada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. O objetivo dessa política é garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2015). Sendo assim, o uso de plantas com fins medicinais é incentivado no Brasil, tornando relevantes os estudos que envolvam tais aspectos. Em contrapartida, há uma crescente necessidade de estudos científicos que visem a confirmação dos efeitos terapêuticos, bem como a segurança de plantas utilizadas pela população. Frente ao exposto, esta dissertação busca ir de encontro

com as políticas públicas nacionais, de valorização e cientificação do uso popular de plantas medicinais.

1.4.1 *Condalia buxifolia*

Condalia buxifolia pertence à família de plantas Rhamnaceae, que são angiospermas da ordem Rosales. As Rhamnáceas possuem 58 gêneros e cerca de 900 espécies, que se encontram na forma de árvores, arbustos ou vinhas. Sua distribuição é cosmopolita, no entanto, são mais comumente encontradas nas regiões tropicais e subtropicais (TORTOSA, NOVARA, 1992). As plantas desta família apresentam diversos constituintes químicos, tais como alcaloides ciclopeptídicos (MOREL et al., 1995), ciclopeptídeos (MOREL et al., 1979), flavonoides, antocianinas, taninos, esteroides, triterpenos e saponinas (SHAH et al., 1986).

O gênero *Condalia*, por sua vez, compreende 18 espécies, as quais são distribuídas ao longo de todo continente americano. As principais espécies são: *C. buxifolia*, *C. correllii*, *C. ericoides*, *C. globosa*, *C. hookeri*, *C. montana*, *C. mexicana*, *C. weberbaeuri*, dentre outras (JOHNSTON, 1962). No Brasil, o gênero é representado apenas pela espécie *Condalia buxifolia*.

A planta *Condalia buxifolia* Reissek (Figura 9) foi descrita, em 1861, por Siegfried Reissek. É popularmente conhecida como coronilha-folha-de-buxo ou espinilho, sendo encontrada na forma de arbusto ou como árvore de aproximadamente quatro metros de altura. Sua distribuição no Brasil se dá desde o estado do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul. Além disso, é encontrada no Uruguai, Argentina e Bolívia. Na medicina popular, é utilizada através de infusão das cascas do caule e da raiz, sendo identificados efeitos antitérmicos, anti-inflamatórios e antidiarreicos (BASTOS, 1989).

Figura 9: *Condalia buxifolia* Reissek

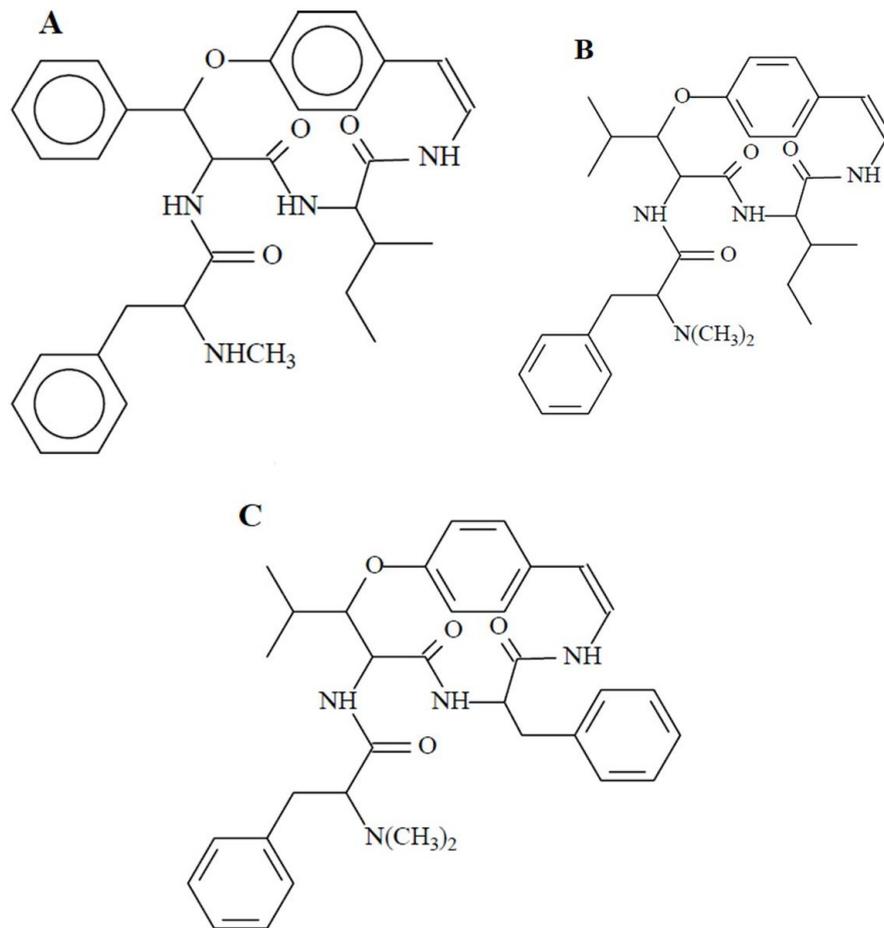
Fonte: Flora Digital, 2019.

Estudos fitoquímicos com a espécie *C. buxifolia* identificaram, na raiz, alcaloides ciclopeptídicos adoeutina-Y' (Figura 10B) (MARCHAND; MONSEUR, 1968), scutianina-B (Figura 10C) (TSCHESCHE et al., 1971) e condalina-A (Figura 10A) (MOREL et al., 2002; SIMÕES et al., 2015). Na casca do caule, por sua vez, foram encontrados triterpenos taraxerol e lupeol, com potentes ações anti-inflamatórias, além do esteroide β -sitosterol (MALDANER, 2005). Morel e colaboradores (2002) revelaram que os alcaloides condalina-A e scutianina-B apresentam atividade antibacteriana *in vitro* contra cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Micrococcus luteus*) e Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella setubal* e *Escherichia coli*). Além disso, o perfil lipídico de *C. buxifolia* apresentou componentes como o ácido linolênico e o ácido linoleico (ZYGLADO et al., 1992), os quais são ácidos graxos poli-insaturados pertencentes à família ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6), respectivamente. Esses são importantes componentes das membranas celulares, atuando como precursores de diversas substâncias, tais como as envolvidas na manutenção da pressão arterial e da resposta inflamatória (LOTTEMBERG, 2009).

Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o extrato metanólico da casca da raiz de *Condalia buxifolia* (EMCb) apresenta um importante efeito antinociceptivo em camundongos. Simões e colaboradores (2015) realizaram uma análise fitoquímica do extrato, identificando uma grande quantidade de alcaloides. Além disso, quando administrado por via intragástrica (i.g.), uma hora antes dos experimentos, o EMCb foi capaz de promover uma

redução na resposta nociceptiva de origem inflamatória (2ª fase) e no edema de pata induzidos pela injeção intraplantar (i.pl.) de formalina, sendo que os efeitos antinociceptivos e antiedematogênicos perduraram por até 4 e 6h após sua administração. O EMCb também preveniu as contorções induzidas pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético, além de diminuir a nocicepção e edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de capsaicina, salina ácida e glutamato. Não obstante, o EMCb também foi capaz de aumentar a latência no teste da placa quente e, aliado a este resultado, o estudo demonstrou o envolvimento do sistema opioide no mecanismo de ação do EMCb, uma vez que o seu efeito (na dose de 300 mg/kg, i.g.) foi revertido pela naloxona (antagonista de receptores opioides). Simões e colaboradores (2017) também demonstraram que o tratamento prolongado com o EMCb (100 mg/kg, i.g.) foi capaz de prevenir a hiperalgesia mecânica e térmica ao calor em um modelo de incisão plantar (que mimetiza condições de dor pós-operatória), bem como preveniu o aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e a neurotrofina NGF. De forma adicional, Simões e colaboradores (2016) demonstraram que o EMCb preveniu a nocicepção induzida pelos ativadores da via PLC/PKC e AMPc/PKA, como o PMA e a forskolina e PGE2. Além disso, o EMCb também foi capaz de reduzir a ativação da PKA (proteína quinase A), demonstrada por análise do conteúdo da proteína fosforilada, sugerindo que o EMCb possa atuar por interação com essa via de sinalização. É importante salientar que não foram observados efeitos sedativos ou alterações na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto. Além disso, o tratamento crônico (30 dias) não promoveu alterações macroscópicas nos órgãos vitais (fígado, coração, rins e pulmões), nem alterações no hemograma e de parâmetros de bioquímica sanguínea (glicemia, ureia, creatinina, ácido úrico, AST, ALT, GGT, colesterol total, HDL e LDL), bem como não mudou o perfil de ingesta de água e ração dos animais expostos ao tratamento (SIMÕES et al., 2017).

Figura 10: Principais compostos químicos de *Condalia buxifolia*.



Legenda: A) Alcaloide condalina A; B) Alcaloide Adoutina Y'; C) Alcaloide Scutianina B.
Fonte: adaptado de MALDANER, 2005.

2 JUSTIFICATIVA

A dor é o motivo mais comum para busca de atendimentos ao pronto-socorro, sendo responsável por 70% das consultas de emergência (TODD, 2017). Apesar das percepções dolorosas constituírem um alerta do qual o organismo se utiliza para sinalizar um processo de agressão, a problemática da dor, principalmente crônica, acompanha a humanidade a medida que interfere na homeostasia do indivíduo e prejudica gravemente suas relações familiares e sociais (DUEÑAS et al., 2016).

A SDCR-I é uma condição dolorosa, geralmente crônica, que está associada a diversas comorbidades psiquiátricas, como depressão e ansiedade, além de problemas cognitivos, como prejuízos de memória (DAVIS et al., 2011). Ademais, já se sabe que a coexistência entre a dor crônica e a depressão, por exemplo, acaba por agravar ambas as situações, tornando o tratamento ainda mais difícil (SHENG et al., 2017).

Por abranger um quadro complexo, de etiologia variada, os recursos terapêuticos utilizados para a SDCR-I são, por muitas vezes, insuficientes ou associados a diversos efeitos indesejáveis quando utilizados em longo prazo. Desta forma, torna-se de extrema importância o estudo de alternativas que possam contribuir para o tratamento da SDCR-I, bem como nos processos adjacentes. Os produtos à base de plantas medicinais são de grande interesse, uma vez que podem auxiliar ou até mesmo substituir as terapias convencionais, reduzindo os custos e efeitos colaterais se comparados aos medicamentos sintéticos (BOYD et al., 2013).

Vale salientar que os principais fármacos utilizados como analgésicos atualmente são derivados de plantas ou sintetizados com base em produtos naturais. Além disso, é comum, no Brasil, a utilização da infusão de folhas, caules e raízes de diversas plantas para o tratamento das mais variadas condições dolorosas. Sendo assim, é indiscutível a relevância da contribuição das plantas medicinais para o entendimento de mecanismos relacionados à geração, manutenção e controle da dor (DUTRA et al 2016).

A planta medicinal *C. buxifolia* apresenta inúmeras propriedades terapêuticas, sendo descrita na literatura com potenciais antibacterianos (MOREL et al., 2002) e antinociceptivos em modelos de dor aguda (SIMÕES et al., 2015) e prolongada, atuando por vias como a do TRPV1, além de reduzir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (SIMÕES et al., 2016). Tais mecanismos podem estar envolvidos não apenas na dor da SDCR-I, mas também

nas comorbidades associadas, indicando uma possível estratégia terapêutica (SOCALA e WLAZ, 2016).

Somado a isso, o estudo das propriedades de *C. buxifolia* se torna ainda mais relevante quando analisado um dado do Conselho Estadual do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul (CONSEMA), que afirma que a espécie se enquadra na lista das espécies em perigo de extinção. Desta maneira, torna-se primordial a conscientização da população, bem como de órgãos governamentais para a sua preservação (CONSEMA, 2002).

Frente ao exposto, a justificativa deste trabalho se concentra na importância do entendimento a respeito da atuação de *C. buxifolia* no modelo experimental de SDCR-I, bem como nos comportamentos associados, visando a validação do uso popular da planta em condições de dor crônica, além da conscientização da população sobre a necessidade de sua preservação. Ademais, o presente estudo pode contribuir para o desenvolvimento de novos fitoterápicos que tenham eficácia e segurança comprovados, indo de encontro com as políticas públicas já mencionadas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do extrato metanólico de *Condalia buxifolia* (EMCb) nas respostas sensoriais e emocionais decorrentes do modelo experimental da Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Avaliar o potencial antinociceptivo de EMCb na alodinia mecânica e hiperalgesia térmica ao frio decorrentes do modelo de SDCR-I;
- ii) Investigar o efeito de EMCb no edema de pata decorrente do modelo de SDCR-I;
- iii) Identificar a relação dos comportamentos tipo-depressivo, tipo-ansioso e de memória associados ao modelo de SDCR-I, bem como os efeitos de EMCb em tais comportamentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para os experimentos foram utilizados 126 camundongos Swiss fêmeas com 2 meses de idade, pesando entre 25 e 30 g. Os mesmos foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI), onde permaneceram ambientados a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em um ciclo claro/escuro de 12h cada, com acesso à água filtrada (Jojaco filtros) e ração (marca BioBase) *ad libitum*. Antes de cada experimento houve a aclimação dos animais, durante uma hora, no laboratório. Todos os experimentos passaram por análise e aprovação do comitê de ética institucional da UFSC (Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, nº 4122190717), estando de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório, bem como com as investigações experimentais da dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

4.2 INDUÇÃO DA LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO DA PATA

A lesão que reproduziu a SDCR do tipo I nos camundongos seguiu o modelo padronizado por Bratti (2011), com alterações. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com hidrato de cloral (7%, 0,6 ml/kg). Após a constatação da perda do estado de consciência, que foi verificado através do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais, três anéis elásticos com 1,2 mm de diâmetro interno (Elástico Ligadura 60.06.118 Morelli) foram posicionados próximo à articulação do tornozelo no membro posterior direito, de modo a fazer um torniquete (Figura 11), que permaneceu na região por 3 horas. Durante todo o período de oclusão, os animais foram mantidos sob anestesia com reforços de 20% do volume inicial. Decorrido o período de isquemia, o anel foi cortado permitindo a reperfusão sanguínea no membro. Importante salientar que os animais que pertenceram aos grupos não lesionados receberam apenas a anestesia. Após o procedimento, os animais foram mantidos em observação até voltarem a deambular pela caixa-moradia e, posteriormente, retornaram ao biotério do laboratório.

Figura 11: Indução da dor pós-isquêmica crônica (DPIC).



Fonte: a autora, 2019.

4.3 PREPARO DO EXTRATO E TRATAMENTOS

A coleta do material biológico de *Condalia buxifolia* foi realizada em Lavras do Sul (30° 48' 46" S 53° 53' 42" O), na província do Rio Grande do Sul, Brasil. A espécie foi coletada e identificada pela botânica Nelci Rolim Bastos, sendo comparada com a amostra depositada no herbário do departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), com identificação SMDB 3296.

O extrato metanólico da casca das raízes de *C. buxifolia* (EMCb) foi preparado através da secagem do material à 50°C e, posteriormente, o mesmo foi moído em aparato específico (Longen Scientific, modelo WSL-3004, Diadema, SP/Brasil). A extração foi realizada com metanol, utilizando um aparato Soxhlet, por 12h. O material resultante foi filtrado e o metanol foi removido em um evaporador rotativo (BUCHI R3, Flawil, Galen/Suíça). A solução final administrada aos animais consistiu na diluição do extrato em 5% de etanol e salina 0,9%. À solução final, foram acrescentados 20 microlitros de hidróxido de sódio (NaOH), afim de estabilizar o pH em 7.4. Os grupos que foram tratados com veículo receberam uma solução de 5% de etanol, NaOH e salina 0,9%.

Para os animais que pertenceram ao grupo Sertralina (usada como controle positivo), foi utilizada uma solução de Sertralina (Cloridrato de Sertralina, Fagron do Brasil) diluída em 1% de tween 20% e salina 0,9%. Todos os tratamentos foram realizados duas vezes ao dia (7h e 17h), por via intragástrica (i.g.- gavagem).

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos em duas etapas com o intuito de minimizar o estresse dos animais. O desenho experimental 1 buscou identificar quais comportamentos estavam associados ao modelo de dor pós-isquêmica crônica DPIC (tipo-depressivo, tipo-ansioso e déficit de memória), bem como o efeito do EMCb em tais comportamentos, além dos parâmetros de dor (nociceptivos). O desenho experimental 2 visou avaliar a resposta do EMCb na nocicepção e comportamento tipo-depressivo relacionados ao modelo de DPIC.

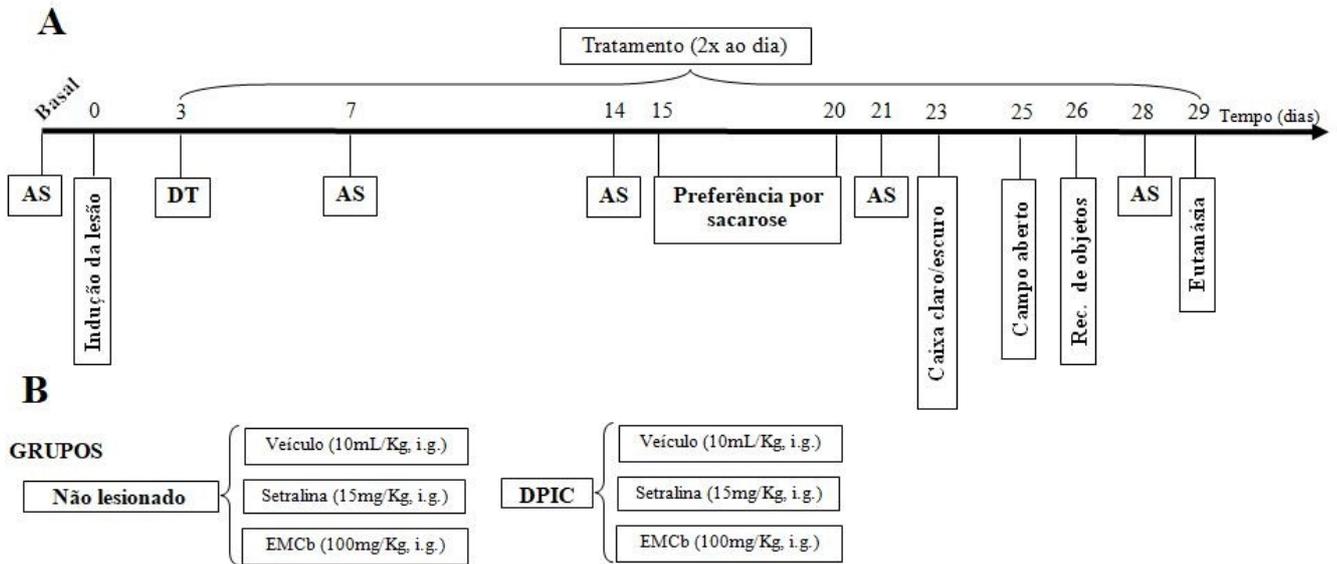
Antes da indução da lesão, foram realizados testes basais de alodinia mecânica (teste de von Frey - descrito no item 4.4.1), a fim de identificar o limiar de resposta dos animais. A partir dos resultados obtidos, os animais foram divididos em grupos de forma randomizada. É importante destacar que os experimentos foram conduzidos de forma cega, e seguiram orientações preconizadas pelo guia ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (KILKENNY et al., 2010).

No terceiro dia após indução da lesão, os testes de nocicepção foram realizados novamente com o intuito de verificar a instauração dos processos álgicos. Uma vez constatados, realizou-se o primeiro tratamento (com veículo, sertralina e EMCb). Na sequência, foi conduzido o decurso temporal, onde os animais foram avaliados (1, 2, 3, 4 e 5 h após o tratamento) com relação a alodinia mecânica, com o teste de von Frey.

A avaliação semanal (AS) consistiu em: alodinia mecânica pelo teste de von Frey, hiperalgesia ao frio pelo teste da acetona e mensuração do edema de pata. Os experimentos dos dias AS foram conduzidos de modo que, inicialmente, eram realizadas todas as avaliações (testes), e na sequência era feito o tratamento. Decorrido o tempo de 2 h (definido como melhor tempo no decurso temporal), os testes eram repetidos. Deste modo, foi possível observar efeitos rápidos e prolongados do tratamento.

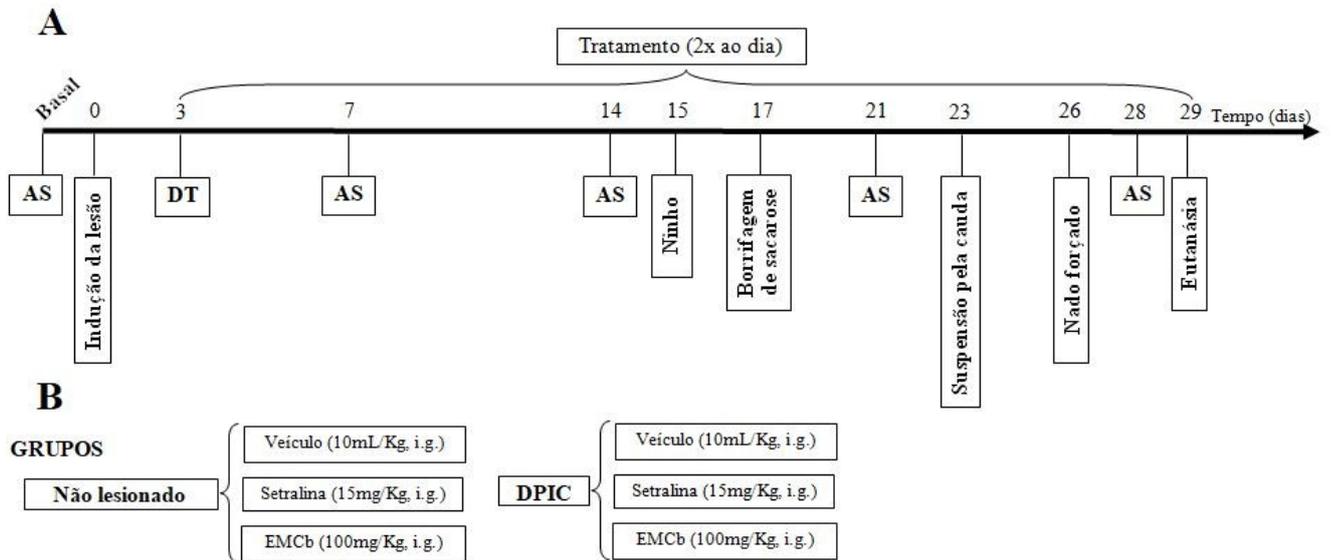
Os experimentos que avaliaram os comportamentos tipo-depressivo, tipo-ansioso e de memória foram conduzidos a partir da segunda semana após a indução da lesão, conforme cronologia indicada nas figuras 12A e 13A. Os grupos experimentais correspondentes ao desenho experimental 1 e ao 2 são encontrados nas figuras 12B e 13B, respectivamente.

Figura 12: Desenho experimental 1.



Legenda: A) Desenho experimental 1; B) Grupos experimentais. AS: Avaliação semanal. DT: decurso temporal. Número de animais por grupo = 7.

Figura 13: Desenho experimental 2.



Legenda: A) Desenho experimental 2; B) Grupos experimentais. AS: Avaliação semanal. DT: decurso temporal. Número de animais por grupo = 11-12.

4.5 TESTES PARA AVALIAR A NOCICEPÇÃO

4.5.1 Teste de von Frey

A fim de avaliar a alodinia mecânica dos animais, utilizou-se o teste de von Frey, estando de acordo com o método *up & down*, descrito por Chaplan e colaboradores (1994), com modificações. Os camundongos foram dispostos, individualmente, 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, permitindo o acesso à superfície ventral da pata traseira direita. Desta forma, foram aclimatados por aproximadamente uma hora. Filamentos de von Frey (0,02; 0,07; 0,16; 0,4; 1,4; 4,0; 8,0 gramas; VFH) foram aplicados verticalmente sobre a superfície plantar do membro posterior direito até que observado o sutil encurvamento do mesmo (figura 14). O primeiro filamento utilizado foi o de 0,4 g, sendo que o próximo filamento foi aumentado ou diminuído de acordo com a resposta de retirada da pata. A frequência de resposta é considerada após até 6 aplicações dos filamentos de von Frey, sendo o limiar calculado através do programa Microsoft Excel® e expresso em uma porcentagem de 50% do limiar de resposta.

Figura 14: Teste de von Frey.

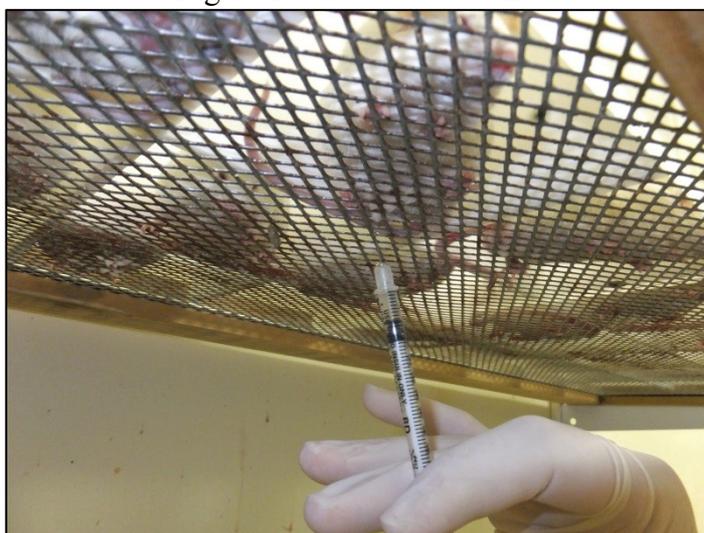


Fonte: A autora, 2019.

4.5.2 Teste da acetona

A hiperalgesia térmica ao frio foi verificada através do método da gota de acetona descrito por Choi e colaboradores (1994), com modificações. Os camundongos foram dispostos no aparato descrito no item 4.5.1, onde foi possível o acesso à superfície ventral das patas. Com o auxílio de uma seringa, uma gota de acetona foi aplicada sobre o calcanhar da pata traseira direita (lesionada) (Figura 15). Os animais não lesionados tendem a ignorar o estímulo ou, ocasionalmente, responder com uma pequena e breve retirada da pata. Os animais submetidos ao modelo de isquemia/reperfusão, por sua vez, tendem a responder, na maioria das vezes, com uma retirada claramente exagerada, em amplitude e duração. Os comportamentos analisados foram classificados de acordo com a seguinte escala: 0 = nenhuma resposta; 1 = rápida retirada da pata, carimbada ou agitação (inferior a 1s); 2 = repetida carimbada, agitação ou elevação da pata (inferior a 3 s); 3 = comportamentos anteriores por mais de 3s, lamber a pata por mais de 3s. Um ponto adicional foi considerado em casos de vocalizações.

Figura 15: Teste da acetona.



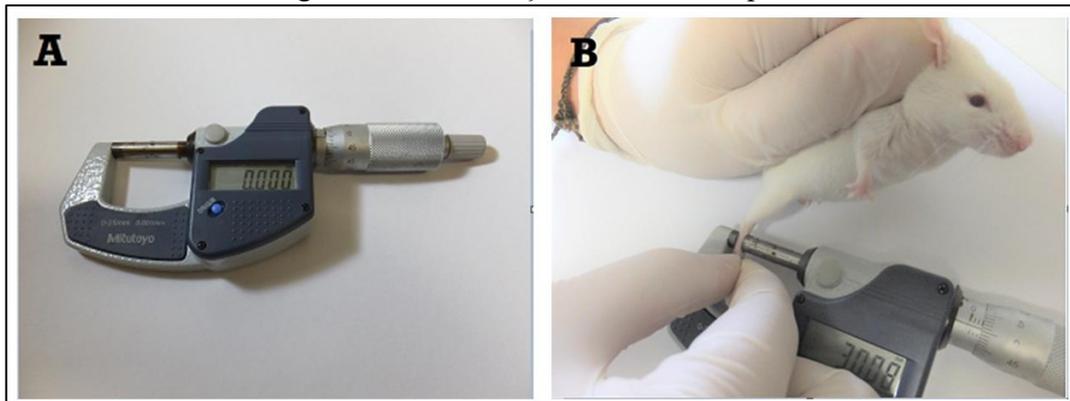
Fonte: a autora, 2019.

4.5.3 Mensuração do edema da pata

Para medir-se a espessura da pata foi utilizado um micrômetro digital (MDC-SX – Mitutoyo, Figura 16A). A pata lesionada do animal foi posicionada no medidor do aparato,

sendo que este era fechado até observar-se que a pata ficava firme, porém não apertada. Em seguida, abria-se, cuidadosamente, o medidor até que a pata soltasse, considerando o valor obtido neste momento (Figura 16B). O delta (Δ) foi calculado a partir da diferença da espessura da pata pré-lesionada em relação às espessuras encontradas nas medições após a lesão.

Figura 16: Mensuração do edema de pata.



Legenda: a figura A representa o equipamento utilizado para mensuração do edema de pata (Micrômetro Digital - MDC-SX – Mitutoyo). A figura demonstra o processo de mensuração do edema de pata. Fonte: a autora, 2019.

4.6 TESTES PARA AVALIAR O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E BEM-ESTAR

4.6.1 Preferência por sacarose

Este teste seguiu o protocolo descrito por Serchov e colaboradores (2016a), com modificações. Os animais foram alocados em grupos de 2-3 por caixa e, antes do teste, foram habituados à presença de duas garrafas de água na caixa, durante três dias. No terceiro dia, uma das garrafas foi substituída por outra que continha uma solução de sacarose 1%, permanecendo nessa conformação por mais três dias (Figura 17). Importante salientar que as garrafas foram trocadas de posição todos os dias, a fim de eliminar o viés de lateralidade. A ingestão de água e da solução de sacarose foi inferida diariamente, através do peso das garrafas. A preferência pela sacarose foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Preferência por sacarose} = \frac{V(\text{solução de sacarose})}{[V(\text{solução de sacarose}) + V(\text{água})]} \times 100\%$$

Sendo que V representa o volume consumido de cada líquido.

Figura 17: Teste da preferência por sacarose

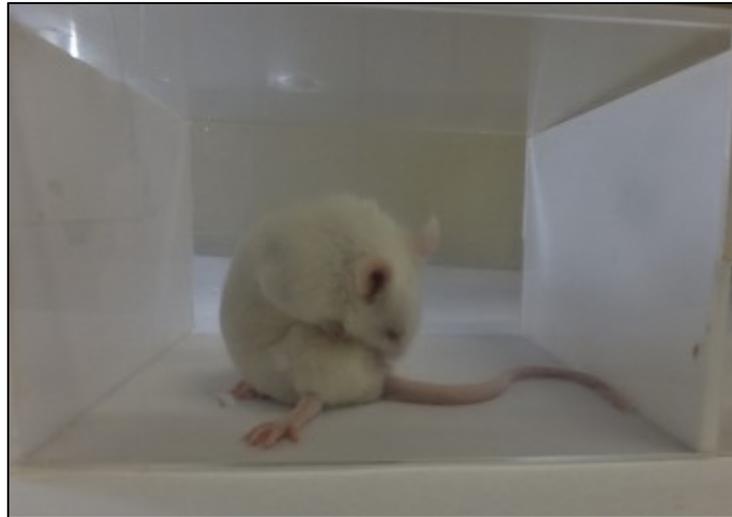


Legenda: a autora, 2019.

4.6.2 Teste da borrifagem de sacarose

Este teste seguiu o protocolo descrito por Isingrini e colaboradores, (2010), com modificações. Trata-se de borrifar 1mL de solução de 10% de sacarose no dorso do animal, que estava disposto, individualmente, em uma caixa acrílica (30 x 30 x 20 cm). Devido à sua viscosidade, a solução de sacarose “suja” o pelo do animal, induzindo um comportamento de limpeza (*grooming*) (Figura 19). Depois de aplicar a solução de sacarose, a frequência (duração) e a latência para o início do comportamento de *grooming* foram observadas por 5min. Os indícios de falta de autocuidado e comportamento motivacional são considerados como paralelos a alguns sintomas de depressão, como a anedonia (WILLNER, 2005). O aparato foi limpo com uma solução de etanol 10% entre os testes, a fim de eliminar pistas olfativas aos animais.

Figura 18: Teste da borrifagem de sacarose.



Legenda: a autora, 2019.

4.6.3 Suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda foi realizado conforme descrito por Steru e colaboradores (1985), com algumas modificações. O teste objetiva submeter os animais a um estresse inevitável e inescapável de curto prazo (no caso, o de ser suspenso pela cauda) e observar o tempo que os mesmos levam para desenvolver uma postura imóvel. A duração da imobilidade é inferida como um índice de “desespero comportamental”, onde longas durações de imobilidade implicam em maiores graus do comportamento tipo-depressivo, sendo este um teste bastante utilizado na triagem de drogas antidepressivas (JUSZCZAK et al., 2006). Os camundongos foram colocados em uma sala, com controle de ruídos, onde foram suspensos a 50 cm acima do chão por meio de uma fita adesiva presa na ponta da cauda e em uma superfície plana (bancada) (Figura 20). É importante ressaltar que os animais não tiveram acesso a nenhuma parede ou compartimento que pudesse favorecer a subida. O teste foi registrado, com o auxílio de uma câmera de vídeo, durante um período de 6 min. O tempo de imobilidade foi analisado de forma que foram considerados imóveis os animais que não apresentaram movimentos ativos ou qualquer movimento corporal.

Figura 19: Teste de Suspensão pela cauda.



Legenda: a autora, 2019.

4.6.4 Nado forçado

O teste do nado forçado seguiu o protocolo desenvolvido por Porsolt e colaboradores (1977), com modificações. O teste baseia-se no comportamento de desamparo aprendido, sendo largamente utilizado em estudos pré-clínicos com intuito de avaliar o potencial antidepressivo de novos fármacos (ALMEIDA et. al., 2011). Os animais foram posicionados em cilindros plásticos, com 45 cm de profundidade e 6 cm de diâmetro, preenchidos até a altura de 30 cm com água na temperatura de 25 °C (Figura 21). O tempo de imobilidade e a latência para a mesma foram avaliados durante um período de 6 minutos. A água do cilindro foi trocada após teste com cada animal, a fim de eliminar possíveis pistas olfativas.

Figura 20: Teste do nado forçado.

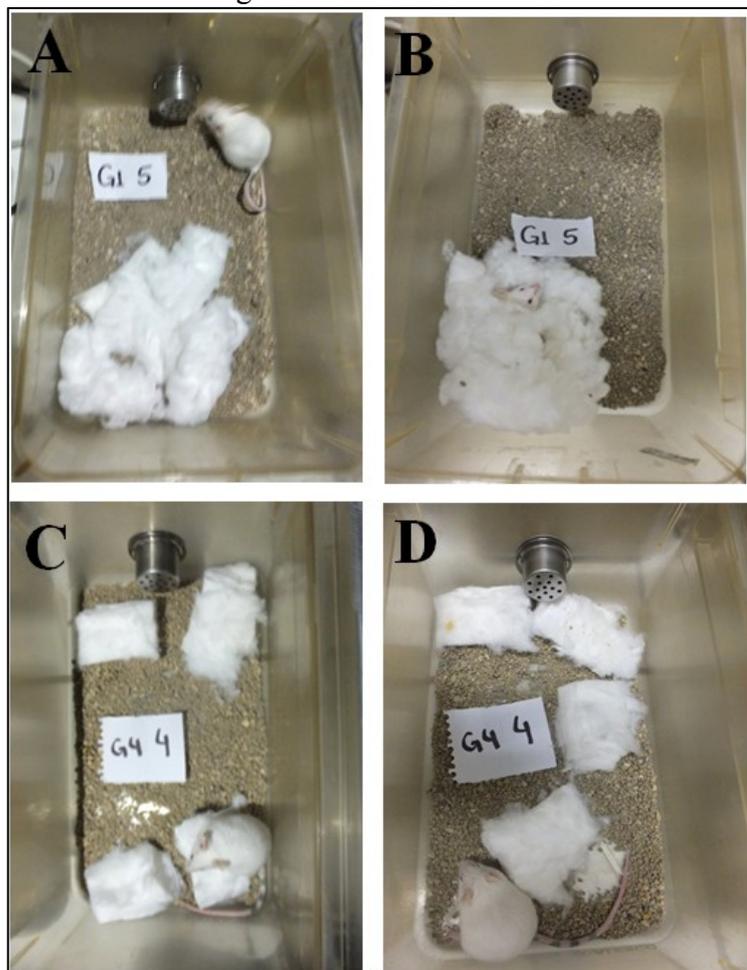


Fonte: a autora, 2019.

4.6.5 Ninho

O teste do ninho foi realizado conforme protocolo descrito por Deacon (2006), com modificações. O comportamento de construir ninhos é inato para muitos animais, inclusive roedores. A construção de ninhos se dá, principalmente, por questões reprodutivas e fuga de predadores, podendo, também, indicar o bem-estar dos animais (GASKILL et al., 2013). Ao início do ciclo escuro, os animais foram dispostos individualmente em caixas contendo um fundo sólido (areia de gato sem cheiro) e pedaços de algodão (4 pedaços de 2,5 g cada, com dimensões 5 x 7 cm). Foram então deixados para que construíssem os seus ninhos. Decorrido o tempo de uma hora, uma foto foi tirada de cada caixa, a fim de contabilizar o primeiro escore (Figura 18A e C). Após 12h da indução do ninho, os animais foram retirados e uma nova foto foi feita (Figura 18B e D). A avaliação da construção de ninhos levou em conta os tempos de 1h e 12h, seguindo a pontuação: 1 – O algodão quase não foi tocado (mais de 90% intacto); 2 – o algodão foi parcialmente desfiado (50 - 90% ainda permanece intacto); 3 – o algodão foi desfiado, no entanto, ainda não é observada a construção do ninho; 4 – há a construção de um ninho, porém ainda é plano; 5 – o ninho possui “paredes” que podem ou não cobrir totalmente o animal. Importante salientar que, de acordo com Deacon (2006), a pontuação pode ser feita utilizando números com casas decimais (por exemplo, 2,5; 3,5 etc), aumentando a proximidade com o observado.

Figura 21: Teste do Ninho.



Legenda: as figuras A e C representam o primeiro escore contabilizado no teste do ninho (1h após indução), enquanto as figuras B e D representam o segundo escore (12h após indução). O animal das figuras A e B foi capaz de construir um ninho, indicando que o seu bem-estar não está prejudicado. Já o animal das figuras C e D não construiu o ninho e, aparentemente, não interagiu ativamente com o algodão. Fonte: a autora, 2019.

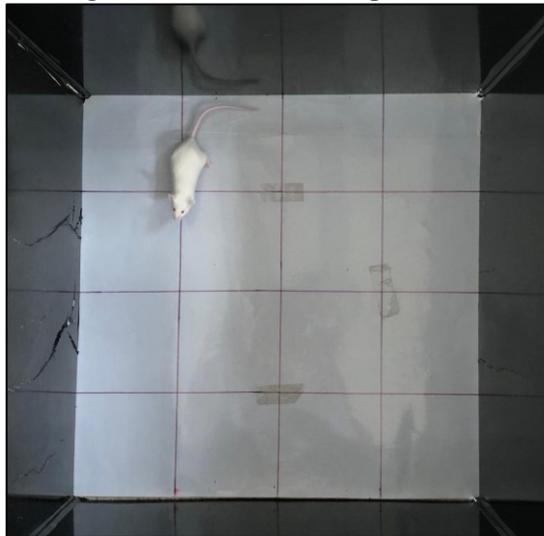
4.7 TESTES PARA AVALIAR O COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO

4.7.1 Campo aberto

O Campo Aberto é um teste utilizado para observar a atividade motora e comportamento exploratório geral, além de parâmetros relacionados ao comportamento tipo-ansioso dos animais (MECHAN et al., 2002). O aparato consiste em uma arena aberta feita de madeira lisa com uma área quadrada de 60 cm × 40 cm × 40 cm (Figura 22). Os animais foram posicionados no centro do aparato, permitindo-lhes livre exploração. Com auxílio de uma câmera de vídeo, o experimento foi filmado durante 5 min. Os parâmetros de locomoção

(número de cruzamentos) e ansiedade (tempo de permanência no centro do aparato) foram avaliados. A arena foi limpa com uma solução de etanol 10% entre os testes, a fim de eliminar pistas olfativas aos animais.

Figura 22: Teste do campo aberto.

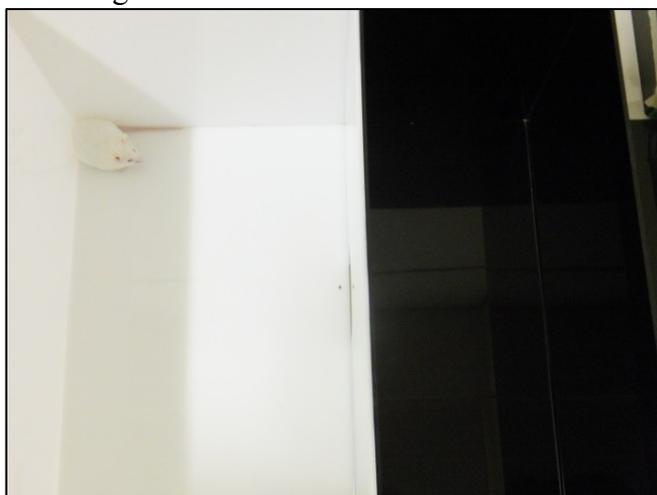


Fonte: a autora, 2019.

4.7.2 Caixa Claro/Escuro

O teste da caixa claro/escuro foi realizado conforme descrito por Serchov e colaboradores (2016b), com modificações. O teste baseia-se na aversão natural de roedores a áreas iluminadas e em seu comportamento exploratório espontâneo, gerando, desta maneira, um conflito entre explorar o novo ambiente ou esquivar-se da luz, sendo este teste bastante sensível aos efeitos de drogas ansiolíticas. O aparato consiste em uma caixa com dois compartimentos, um claro e o outro escuro, sendo há uma passagem entre eles (Figura 23). Os animais foram posicionados no compartimento claro, permitindo a livre exploração do aparato durante 5 min. O tempo em que o animal permaneceu no compartimento escuro, bem como sua avaliação de risco (quando o animal coloca as patas dianteiras no compartimento claro, no entanto, retorna para o escuro) foram associados ao comportamento tipo-ansioso. O número de entradas no compartimento claro, por sua vez, foi considerado um parâmetro de locomoção. O aparato foi limpo com uma solução de etanol 10% entre os testes, a fim de eliminar pistas olfativas aos animais.

Figura 23: Teste da caixa claro/escuro.



Fonte: a autora, 2019.

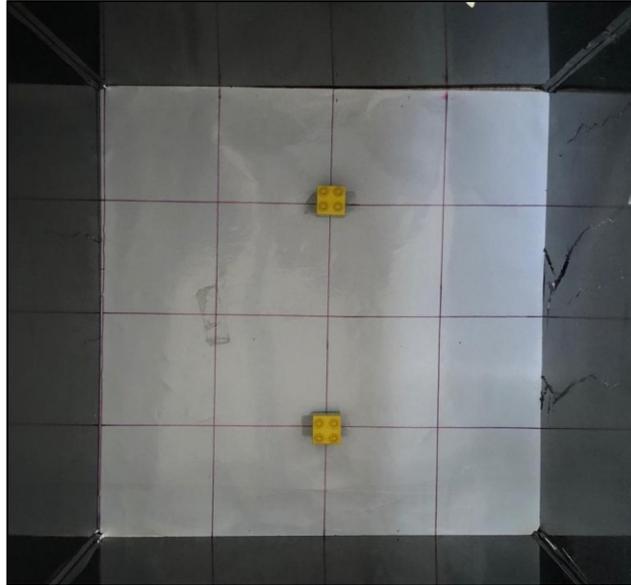
4.8 TESTE PARA AVALIAR A MEMÓRIA

4.8.1 Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado de acordo com Leger e colaboradores (2013). O aparato utilizado foi o campo aberto descrito no item 4.7.1. O experimento consiste em três etapas: habituação, familiarização e teste. Todas as etapas foram filmadas com o auxílio de uma câmera de vídeo. Na primeira etapa os animais foram habituados ao campo aberto durante 5 minutos. Na etapa seguinte, 24 h após, eles foram reexpostos à arena com a presença dos dois objetos iguais (peças de lego) (Figura 24), registrando-se o tempo de exploração (em segundos) de cada um dos objetos na caixa durante um tempo total de 5 min. A terceira etapa foi realizada depois de 30 min. Os animais foram novamente colocados na arena, no entanto, um dos objetos foi substituído por outro de cor e tamanho diferente (cubo de madeira). O tempo de exploração de cada um dos objetos foi registrado por 5 min. Os seguintes parâmetros foram considerados como exploração: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 2 cm de distância. O índice de discriminação foi representado em porcentagem e fez uso da seguinte fórmula (onde t representa o tempo em segundos e 3 representa o objeto novo):

$$\text{Índice de discriminação} = \frac{t(s)_3}{t(s)_2 + t(s)_3} \times 100\%$$

Figura 24: Teste de reconhecimento de objetos.



Fonte: a autora, 2019.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa Graph Pad Prism *version 6* (GraphPad Software®, San Diego, CA). A fim de avaliar a distribuição gaussiana dos resultados, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Uma vez constatada a normalidade dos dados (paramétricos), prosseguiu-se com a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni ou de Tukey. Além disso, para o teste de reconhecimento de objetos foi utilizado o teste *t de student*, contra um valor hipotético de 50%. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Os dados foram representados como média + erro padrão da média (E.P.M.).

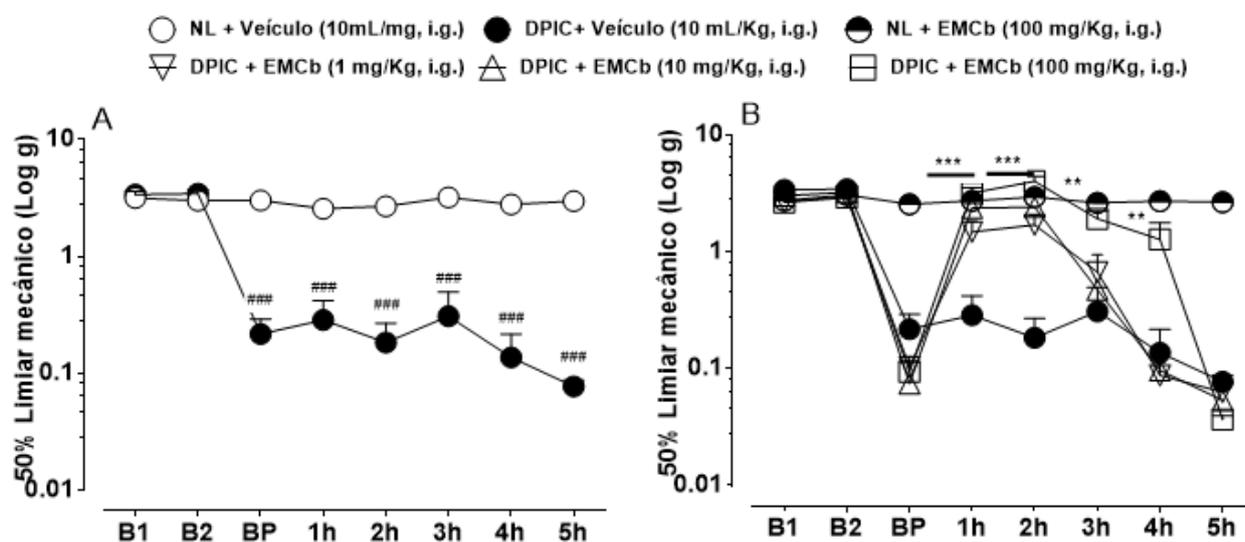
5 RESULTADOS

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL 1

5.1.1 Avaliação da alodinia mecânica no decurso temporal após indução da DPIC

A fim de identificar o limiar basal dos animais foi realizado o teste de von Frey em dois dias consecutivos, representados na figura 25 como B1 (basal 1) e B2 (basal 2). No terceiro dia após indução da lesão o teste foi repetido (representado na figura 25 como BP – basal pós), constatando-se a instauração dos processos álgicos. A figura 25A demonstra a diferença de limiar entre os grupos Não lesionado + veículo e Dor pós-isquêmica crônica + veículo [$F_{(7, 48)} = 10,70$; $p < 0,0001$]. A figura 25B representa os efeitos do EMCb (1, 10 e 100 mg/kg) no teste de von Frey por cinco horas consecutivas após o primeiro tratamento. Todas as doses reduziram a alodinia mecânica na primeira e na segunda hora, no entanto, apenas a dose de 100 mg/kg foi capaz de manter o seu efeito até a 4ª hora após o tratamento [$F_{(28, 192)} = 7,150$; $p < 0,0001$]. Com base nestes dados, optou-se por utilizar apenas a dose de 100 mg/kg para os experimentos subsequentes.

Figura 25: Avaliação do efeito do EMCb no decurso temporal.

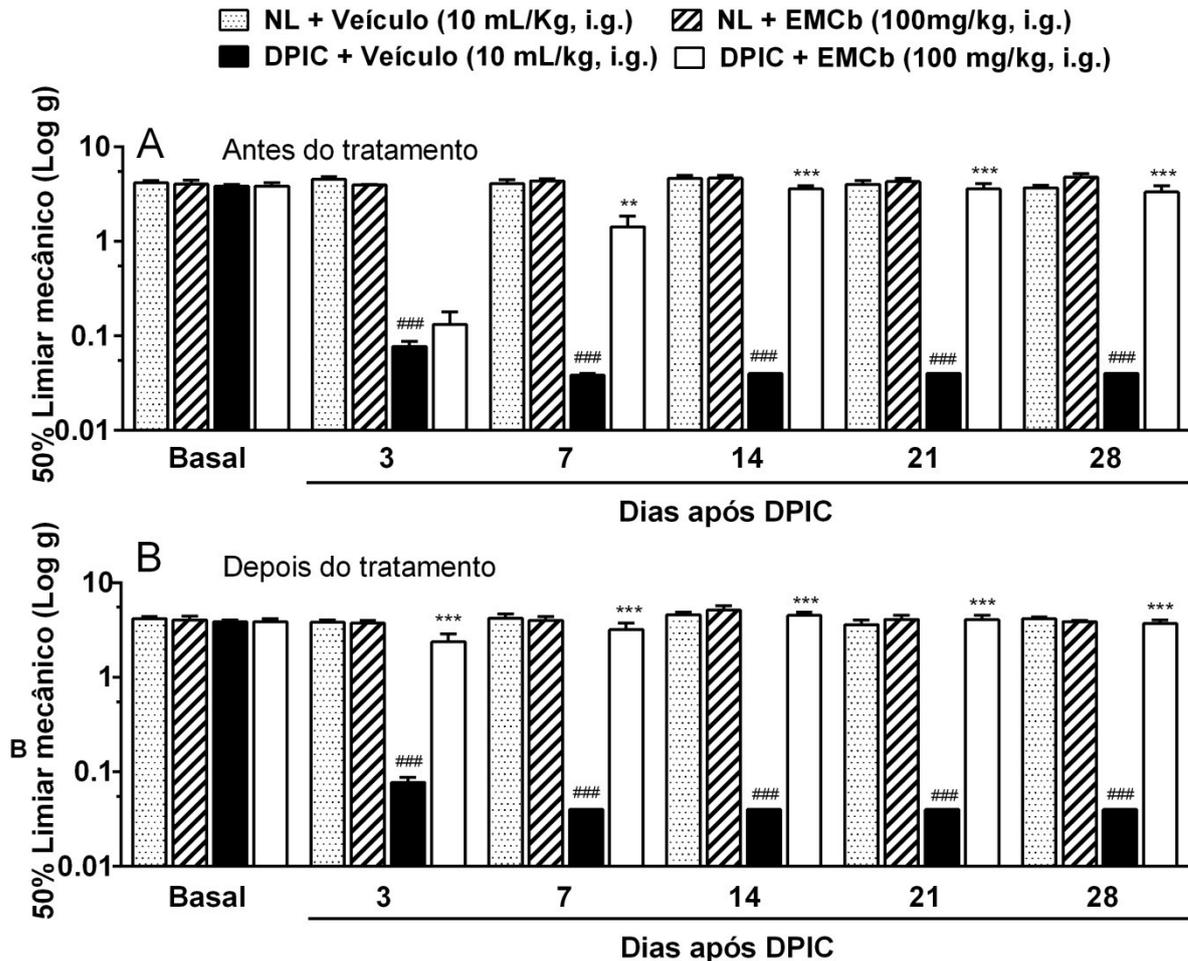


Legenda: O painel A indica as diferenças entre os grupos NL + veículo e DPIC + veículo; O painel B apresenta as diferenças entre o grupo DPIC + veículo e DPIC + EMCb (1, 10 e 100 mg/kg). Cada linha representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) com medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os sustentados (###) denotam a significância entre os grupos NL + Veículo e DPIC + Veículo. ### $p < 0,0001$. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos DPIC + Veículo e DPIC + EMCb. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$. DPIC: Dor pós-isquêmica crônica; EMCb: Extrato metanólico de *C. buxifolia*; NL: não lesionado.

5.1.2 Efeito do EMCb na alodinia mecânica dos animais submetidos ao modelo de DPIC

A figura 26 demonstra a resposta de alodinia mecânica dos animais ao longo de todo experimento. As avaliações foram realizadas nos dias 3, 7, 14, 21 e 28 após indução do modelo de DPIC. A figura 26A demonstra as respostas de alodinia antes do primeiro tratamento diário, já na figura 26B são representadas as respostas dos animais após 2 horas de tratamento (melhor tempo definido no decurso temporal). É possível observar que a partir do terceiro dia, os animais que passaram pelo procedimento de IR apresentaram uma redução significativa em seu limiar mecânico [$F_{(15, 90)} = 12,39$; $p < 0,0001$]. A reversão deste quadro foi observada no grupo DPIC + EMCb após o primeiro tratamento, realizado no dia 3. Além disso, a partir do sétimo dia o efeito é observado mesmo antes do tratamento diário, indicando um aumento da duração da resposta antinociceptiva do EMCb. [$F_{(15, 90)} = 6,443$; $p < 0,0001$].

Figura 26: Efeito do EMCb na alodinia mecânica induzida pelo modelo de DPIC.



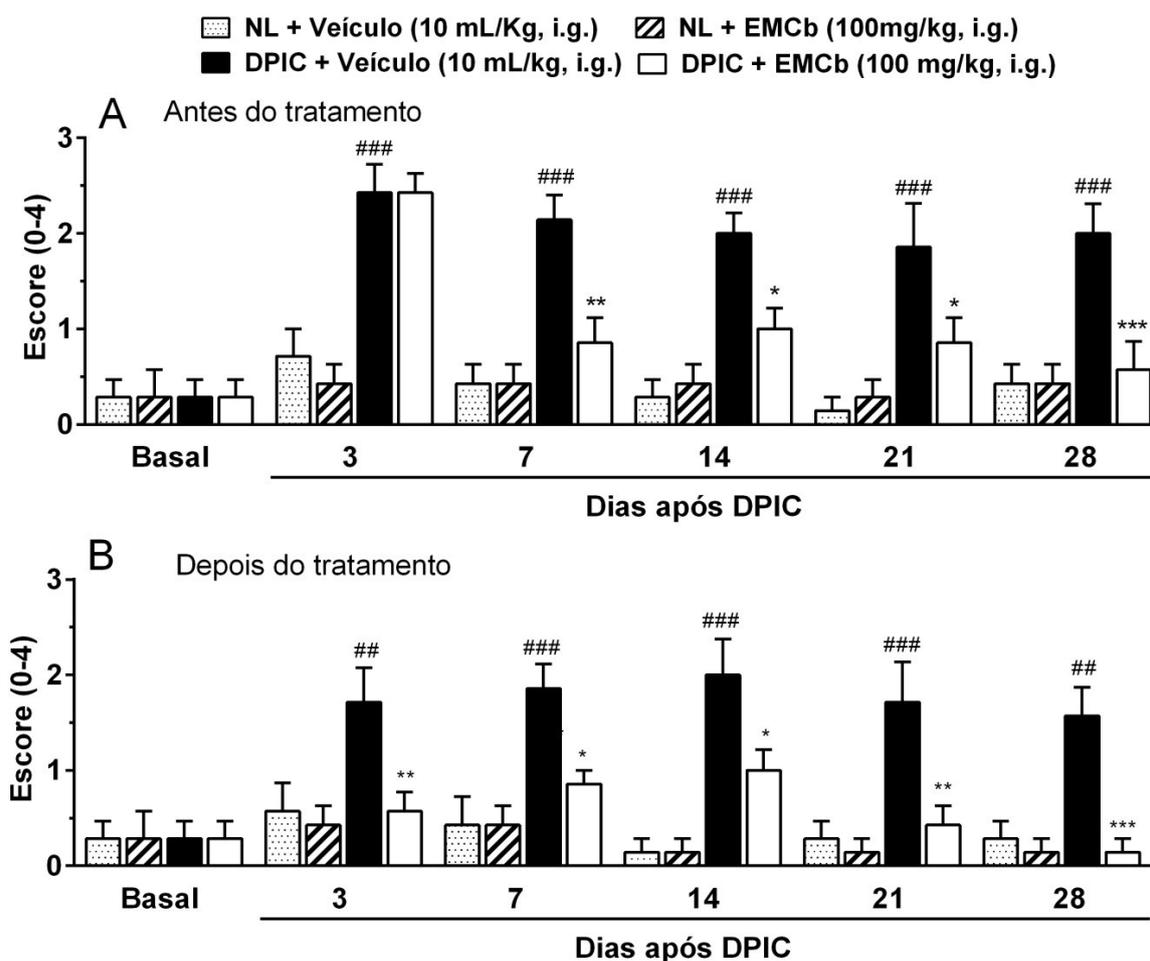
Legenda: O painel A representa as avaliações antes do tratamento, enquanto o painel B demonstra as avaliações após 2h do tratamento. Cada coluna representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) de medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni. Os sustenidos (###) denotam a significância entre os grupos NL + Veículo e DPIC + Veículo. ### $p < 0,0001$. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos DPIC + Veículo e DPIC + EMCb. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$. DPIC: Dor pós-isquêmica crônica; NL: não lesionado.

5.1.3 Efeito do EMCb na hiperalgesia térmica ao frio nos animais submetidos ao modelo de DPIC

Os dados representados na figura 27 indicam a hiperalgesia térmica ao frio dos animais nos dias 3, 7, 14, 21 e 28 após indução do modelo de DPIC. A figura 27A corresponde às respostas antes do primeiro tratamento diário, enquanto a figura 27B representa o escore depois de 2 h do tratamento. É possível observar que a partir do terceiro dia, os animais que passaram pelo processo de IR tiveram um aumento expressivo em seu em

seu escore térmico, sendo que o grupo DPIC + veículo manteve-se assim até o final do experimento (28 dias). Já o grupo DPIC + EMCb apresentou uma redução do escore a partir do primeiro tratamento, no terceiro dia [$F_{(15, 90)} = 3,838$; $p < 0,0001$] [$F_{(15, 90)} = 1,951$; $p < 0,0280$]. Estes achados estendem os dados anteriores e mostram que o EMCb é efetivo em reduzir a nocicepção associada a estímulos de frio.

Figura 27: Efeito do EMCb na hiperalgesia térmica ao frio no modelo de DPIC.

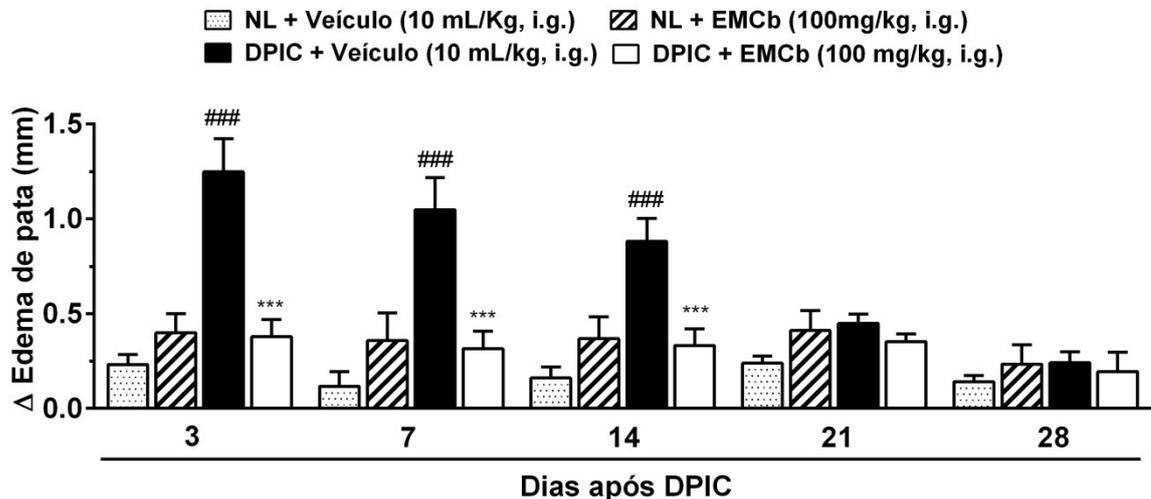


Legenda: O painel A representa as avaliações diárias antes do tratamento, enquanto o painel B demonstra as avaliações após 2h do tratamento. Cada coluna representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) com medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni. Os sustentados (###) denotam a significância entre os grupos NL + Veículo e DPIC + Veículo. $## < 0,01$; $### < 0,0001$. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos DPIC + Veículo e DPIC + EMCb. $* < 0,05$; $** < 0,01$; $*** < 0,0001$. DPIC: Dor pós-isquêmica crônica; EMCb: Extrato metanólico de *C. buxifolia*; NL: não lesionado.

5.1.4 Efeito do EMCb no edema de pata dos animais submetidos ao modelo de DPIC

A figura 28 demonstra o decurso temporal do edema de pata após indução do modelo de DPIC. Todas as avaliações foram realizadas após o tratamento diário. É possível observar que, a partir do terceiro dia, o grupo DPIC + veículo desenvolveu um edema de pata significativo, se comparado ao grupo NL + veículo. Este edema persistiu até o 14º dia, quando não foram mais observadas diferenças entre os grupos. Além disso, o tratamento com EMCb foi capaz de reduzir significativamente o edema de pata do 3º ao 14º dia após IR [$F_{(12, 72)} = 6,169$; $p < 0,0001$].

Figura 28: Efeito de EMCb no edema de pata decorrente do modelo de DPIC.



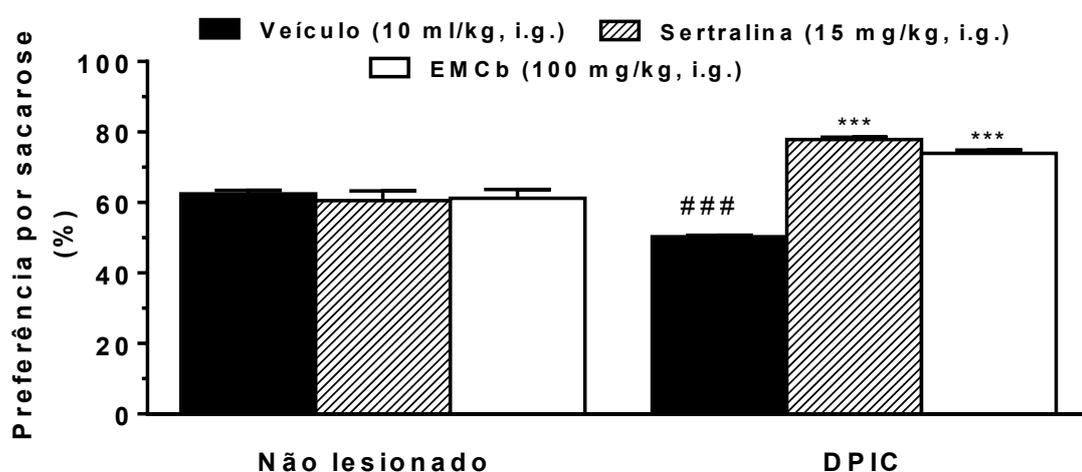
Legenda: Cada coluna representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) com médias repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os sustentados (###) denotam a significância entre os grupos NL + Veículo e DPIC + Veículo. ### $p < 0,0001$. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos DPIC + Veículo e DPIC + EMCb. *** $p < 0,0001$. DPIC: Dor pós-isquêmica crônica; EMCb: extrato metanólico de *C. buxifolia*; NL: não lesionado.

5.1.5 Efeito do EMCb sobre o consumo de sacarose nos animais submetidos ao modelo de DPIC

Os dados representados na figura 29 mostram a avaliação do comportamento tipo-depressivo no teste de preferência por sacarose, o qual foi realizado a partir do 15º após procedimento de IR. É possível observar que o grupo DPIC + veículo apresentou redução significativa no consumo de sacarose, se comparado ao seu respectivo grupo controle (NL +

veículo). Além disso, foi observado que a porcentagem de sacarose consumida era maior nos grupos DPIC + Sertralina e DPIC + EMCb [$F_{(5, 30)} = 55,72$; $p < 0,0001$]. Desta forma, os dados sugerem que o modelo de DPIC utilizado possui associação com o comportamento tipo-depressivo, e o tratamento com EMCb possui atividade tipo-antidepressiva, comparando-se com a sertralina, que foi utilizada como controle positivo.

Figura 29: Efeito do EMCb no teste de preferência por sacarose.



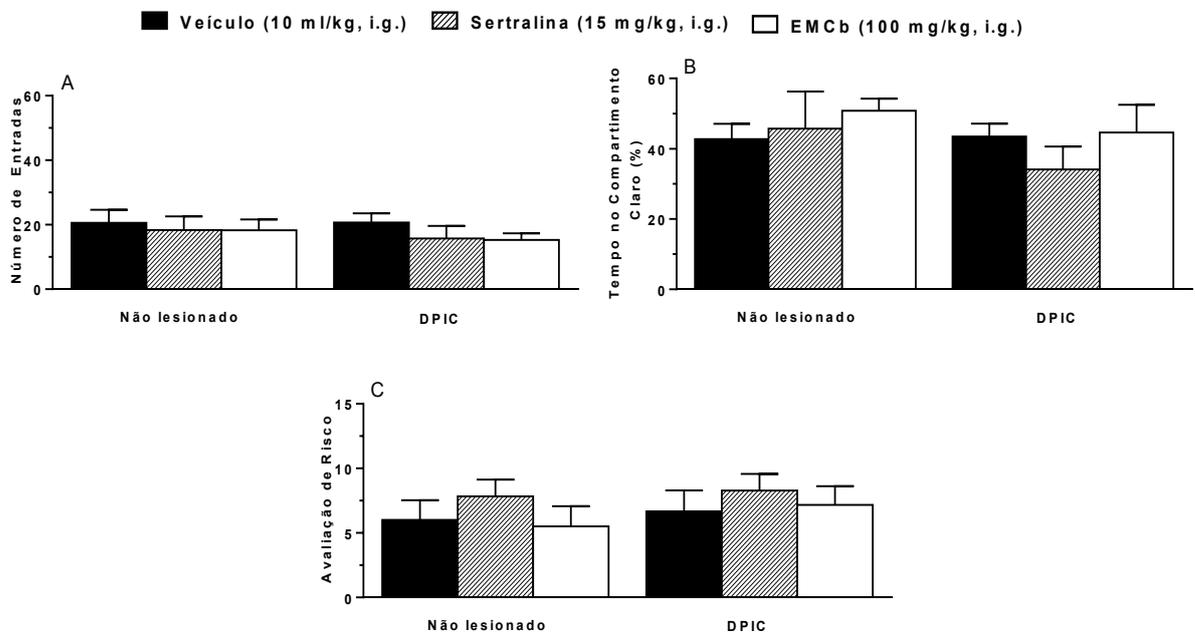
Legenda: Cada coluna representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. Os sustentados (#) denotam significância entre os grupos NL + veículo e DPIC + Veículo. ### $p < 0,01$. Os asteriscos (*) denotam diferença entre o grupo DPIC + veículo e DPIC + Sertralina ou DPIC + EMCb *** $p < 0,01$. DPIC: Dor pós isquemia crônica; EMCb: extrato metanólico de *Condalia buxifolia*; NL: não lesionado.

5.1.6 Animais submetidos ao modelo de DPIC não apresentaram alterações na locomoção e no comportamento tipo-ansioso no teste da caixa claro/escuro

A figura 30 mostra as respostas dos animais no teste da caixa claro/escuro, realizada no 23º dia após indução do modelo de DPIC. A figura 30A indica o número de entradas (transições) entre o compartimento claro e escuro do aparato, sendo um parâmetro de locomoção. É possível observar que não houve diferenças significativas entre os grupos [$F_{(5, 30)} = 0,4476$; $p = 0,8116$], inferindo desta maneira, que o modelo e o tratamento não alteraram os aspectos locomotivos dos animais. As figuras 30B e 30C, por sua vez, indicam o tempo de permanência do compartimento claro e a avaliação de risco, respectivamente. Estes parâmetros estão relacionados ao comportamento tipo-ansioso dos animais, sendo que não

foram observadas diferenças significativas entre os grupos [$F_{(5, 30)} = 0,6814$; $p = 0,6410$] [$F_{(5, 30)} = 0,8651$; $p = 0,5159$].

Figura 30: Efeito do EMCb no teste da caixa claro/escuro

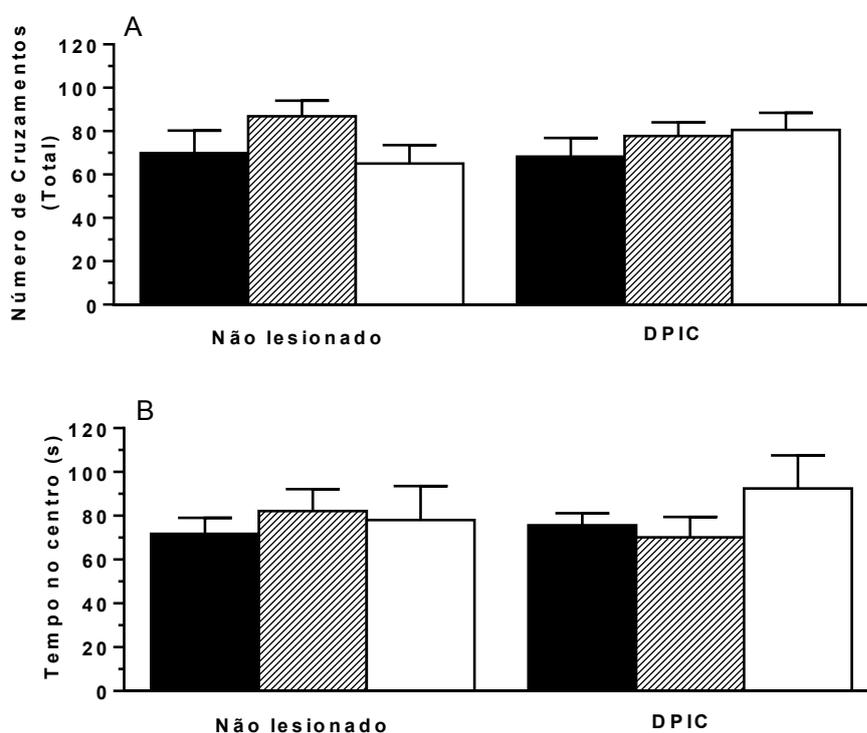


Legenda: O painel A representa o número de entradas em cada compartimento do aparato, o painel B indica o tempo de permanência do compartimento claro; e o painel C demonstra a avaliação de risco do animal. Cada coluna representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão de média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. DPIC: Dor pós-ísquêmica crônica; EMCb: extrato metanólico de *Condalia buxifolia*; NL: não lesionado.

5.1.7 Animais submetidos ao modelo de DPIC não apresentaram alterações na locomoção e no comportamento tipo-ansioso no teste do campo aberto

Os dados da figura 31 mostram os parâmetros de locomoção e comportamento tipo-ansioso no teste do campo aberto, que foi realizado no 25º dia após indução do modelo. A Figura 31A indica o número total de cruzamentos nos quadrantes do aparato, demonstrando que não houve diferença significativa entre os grupos [$F_{(5, 30)} = 1,164$; $p = 0,3495$]. A figura 31B, por sua vez, demonstra que não foram encontradas diferenças entre os grupos se considerado o tempo de permanência no centro do aparato [$F_{(5, 30)} = 0,6281$; $p = 0,6796$]. Em conjunto, estes achados sugerem que tais comportamentos podem não estar relacionados ao modelo de DPIC utilizado.

Figura 31: Efeito do EMCb no teste do campo aberto.

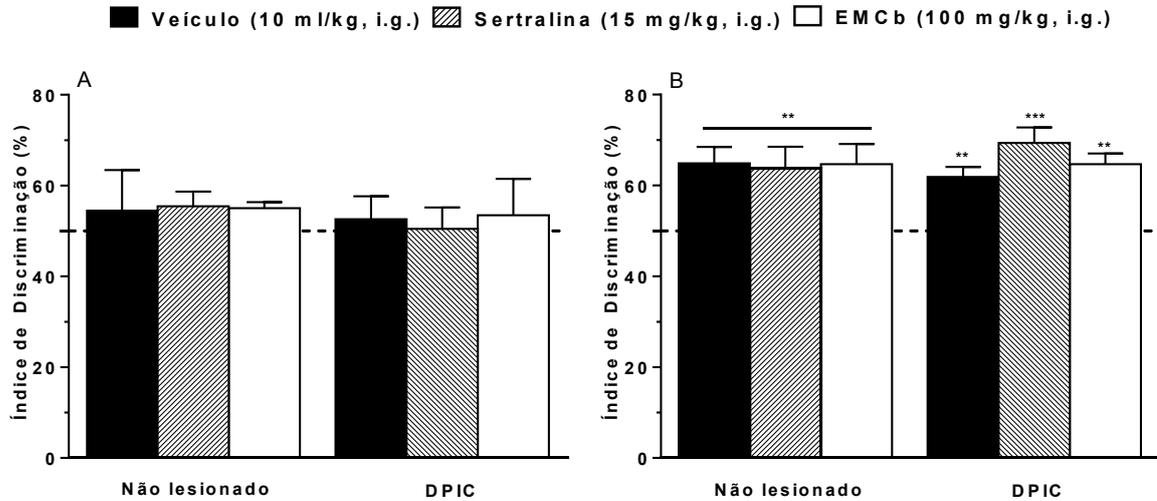


Legenda: O painel A representa o número de cruzamentos em cada quadrante do aparato, enquanto o painel B indica o tempo de permanência no centro do aparato. Cada coluna representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. DPIC: Dor pós-isquêmica crônica; EMCb: extrato metanólico de *Condalia buxifolia*; NL: não lesionado.

5.1.8 Animais submetidos ao modelo de DPIC não apresentaram alterações de memória no teste de reconhecimento de objetos

Os dados representados na figura 32 relacionam-se ao teste de memória, realizado no 26º após indução do modelo de DPIC. A figura 32 A se refere ao treino, onde os animais eram expostos a dois objetos de cor e tamanho igual. É possível observar que não houve preferência pelos objetos em nenhum dos grupos. A figura 32 B representa a fase de teste, realizada 30min após o treino, onde um dos objetos era substituído pelo outro de cor e tamanho diferente. Os dados demonstram que todos os animais, nesta fase, exploraram mais o objeto novo, indicando que haviam aprendido a tarefa. Assim, estes dados sugerem que o modelo de DPIC e o tratamento não alteraram parâmetros de memória de curto prazo dos animais.

Figura 32: Efeito do EMCb no teste de reconhecimento de objetos



Legenda: Cada coluna representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por teste t de *student* contra um valor hipotético de 50%. DPIC: Dor pós isquemia crônica; EMCb: extrato metanólico de *Condalia buxifolia*; NL: não lesionado.

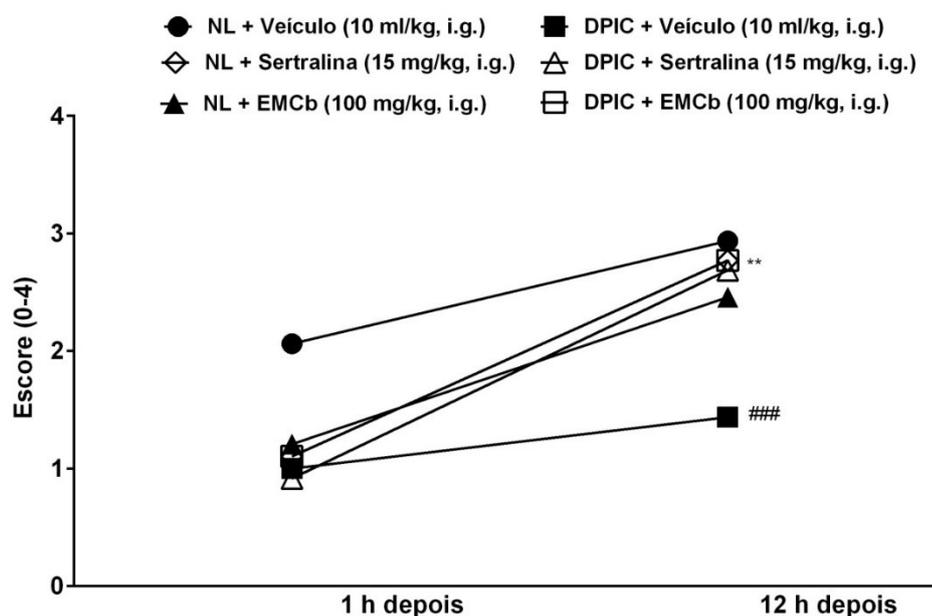
5.2 DESENHO EXPERIMENTAL 2

No desenho experimental 2, todas as avaliações de nocicepção (teste de von Frey, teste da acetona e mensuração do edema) foram realizadas novamente, verificando-se que os animais submetidos ao modelo de DPIC apresentaram aumento da alodinia mecânica, hiperalgesia ao frio e edema semelhantes aos encontrados no desenho experimental 1 (resultados em anexo). Assim, após a confirmação da indução da DPIC os animais foram avaliados frente a resposta emocional (comportamento tipo-depressivo) e de bem-estar.

5.2.1 Efeito do tratamento com EMCb no bem-estar dos animais submetidos ao modelo de DPIC

A figura 33 representa os escores do ninho 1 e 12 h após início do teste. É possível observar que decorrido o tempo de 12 h, todos os animais foram capazes de construir os seus ninhos, exceto os que pertenciam ao grupo DPIC + veículo. Além disso, houve diferença significativa entre os grupos DPIC + veículo e DPIC + EMCb, indicando que o EMCb foi capaz de melhorar o bem-estar dos animais submetidos ao procedimento de IR [$F_{(5, 50)} = 4,217$; $p = 0,0028$]. O mesmo efeito não foi observado para a sertralina.

Figura 33: Efeito de EMCb no teste do ninho.

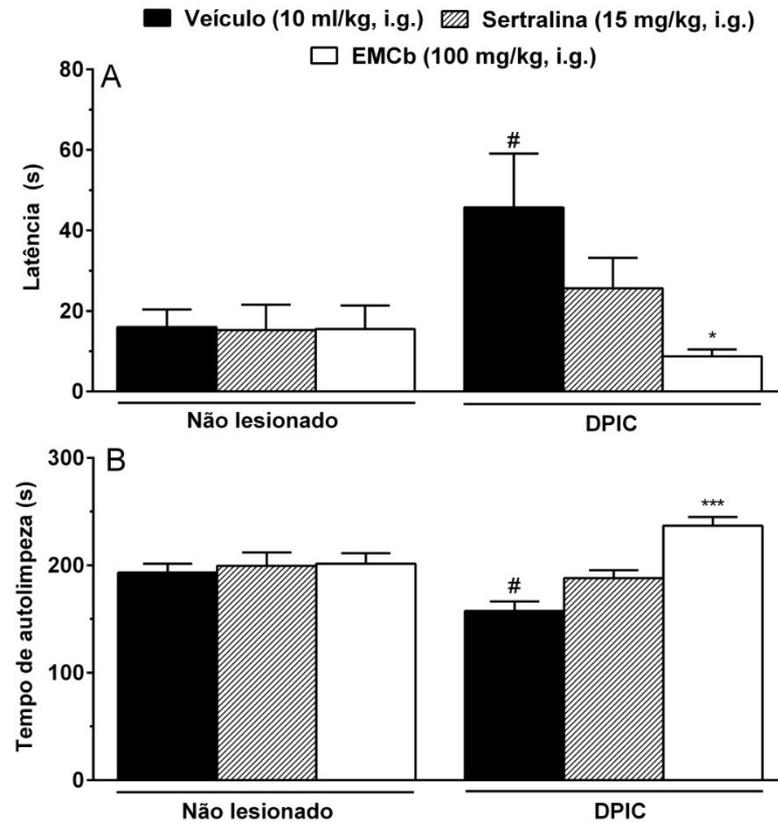


Legenda: Cada linha representa a média de 11 animais. O teste estatístico se deu por análise de variância de duas via (ANOVA) com medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os sustentados (#) denotam significância entre os grupos NL + veículo e DPIC + Veículo. Os asteriscos (*) denotam diferença entre o grupo DPIC + veículo e DPIC + Sertralina ou DPIC + EMCb. DPIC: Dor pós-isquêmica crônica; EMCb: extrato metanólico de *Condalia buxifolia*; NL: não lesionado.

5.2.2 Efeito do tratamento com EMCb no teste de borrifagem de sacarose em animais submetidos ao modelo de DPIC

Os dados representados na figura 34 dizem respeito ao teste de borrifagem de sacarose nos animais submetidos ao modelo de DPIC e seus respectivos controles. A figura 34A representa a latência para a primeira autolimpeza dos animais. Este resultado demonstra que os animais do grupo DPIC + veículo tiveram um tempo de latência maior se comparados ao grupo NL + veículo. Além disso, o EMCb foi capaz de reduzir significativamente o tempo de latência, o que não foi observado para a sertralina [$F_{(5, 50)} = 3,065$; $p = 0,0172$]. A figura 34B, por sua vez, representa o tempo total de autolimpeza dos animais. É possível observar que os animais DPIC + veículo tiveram um tempo de autolimpeza reduzido, se comparado ao grupo NL + veículo. Ademais, o EMCb foi capaz de reverter este comportamento significativamente, o que não é observado para o grupo DPIC + sertralina [$F_{(5, 50)} = 8,838$; $p < 0,0001$].

Figura 34: Efeito do EMCb no teste da borrifagem de sacarose.



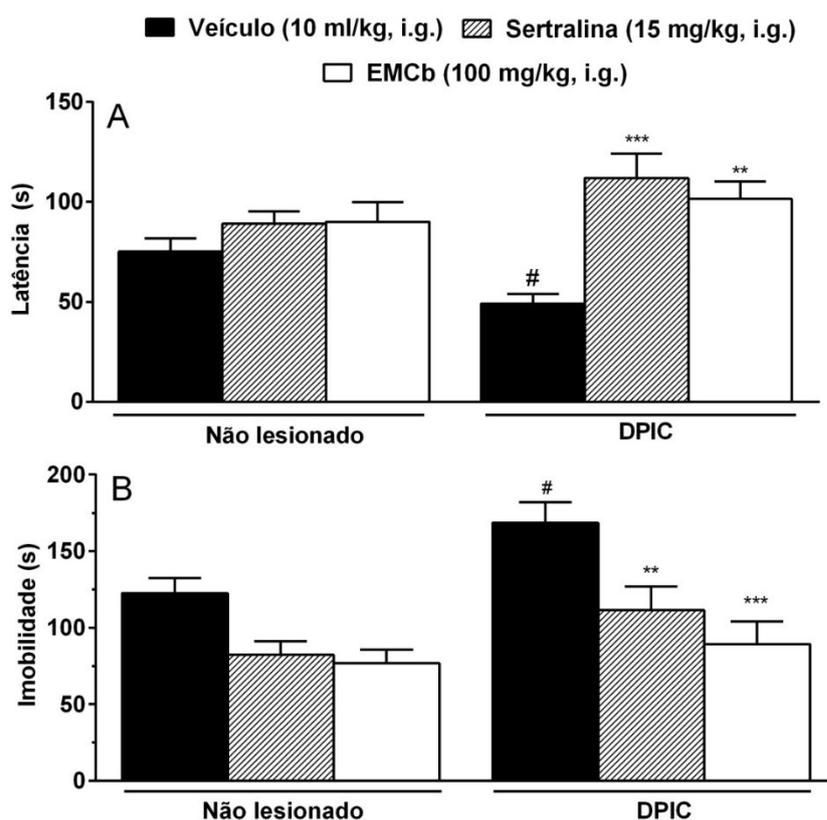
Legenda: Cada coluna representa a média de 11 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. Os sustenidos (#) denotam significância entre os grupos NL + veículo e DPIC + Veículo. # $P < 0.05$. Os asteriscos (*) denotam diferença entre o grupo DPIC + veículo e DPIC + Sertralina ou DPIC + EMCb. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ DPIC: Dor pós isquemia crônica; EMCb: extrato metanólico de *Condalia buxifolia*; NL: não lesionado.

5.2.3 Efeito do tratamento com EMCb no teste da suspensão pela cauda em animais submetidos ao modelo de DPIC

Outro teste utilizado para avaliar o comportamento tipo-depressivo foi o teste da suspensão pela cauda, realizado no 23º dia após indução do DPIC. Os dados representados na figura 35 demonstram os parâmetros de latência (figura 35A) e imobilidade (figura 35B) de animais submetidos ao modelo de DPIC e tratados com EMCb ou sertralina. É possível observar que os animais do grupo DPIC + veículo tiveram uma redução no período de latência, se comparado ao grupo NL + veículo. Os grupos DPIC + sertralina e DPIC + EMCb apresentaram aumento no tempo de latência [$F_{(5, 50)} = 7,194$; $p < 0,0001$]. Além disso, o

grupo DPIC + veículo também apresentou um aumento significativo no tempo de imobilidade, enquanto os tratamentos com sertralina e EMCb reverteram o quadro [$F_{(5, 50)} = 7,479$; $p < 0,0001$].

Figura 35: Efeito de EMCb no teste de suspensão pela cauda.



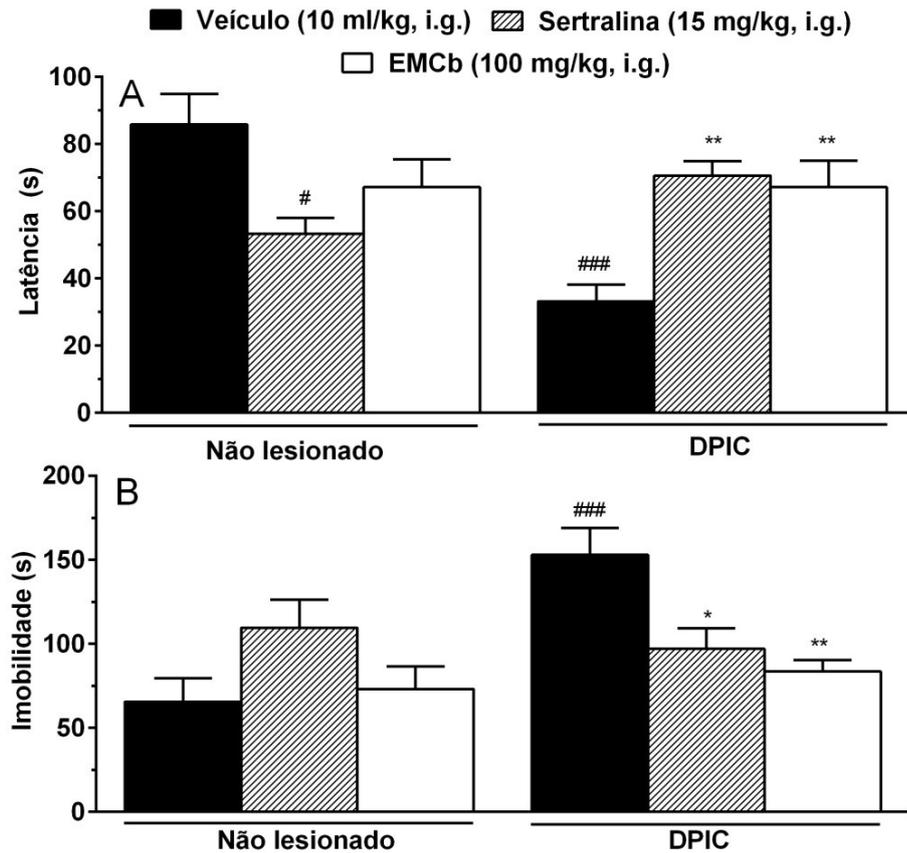
Legenda: Cada coluna representa a média de 11 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. Os sustentados (#) denotam significância entre os grupos NL + veículo e DPIC + Veículo. # $p < 0,05$. Os asteriscos (*) denotam diferença entre o grupo DPIC + veículo e DPIC + Sertralina ou DPIC + EMCb. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. DPIC: Dor pós-isquêmica crônica; EMCb: extrato metanólico de *Condalia buxifolia*; NL: não lesionado.

5.2.4 Efeito do tratamento com EMCb no teste de nado forçado em animais submetidos ao modelo de DPIC

A figura 36 demonstra parâmetros relacionados ao comportamento tipo-depressivo observado no teste de nado forçado, realizado 26 dias após indução do modelo. Na figura 36A é observado o tempo de latência dos animais, que foi reduzido significativamente no grupo DPIC + veículo, se comparado ao grupo NL + veículo. Já nos grupos DPIC + sertralina e

DPIC + EMCb o período de latência foi restaurado [$F_{(5, 50)} = 7,063$; $p < 0,0001$]. A figura 36B corresponde ao tempo de imobilidade dos animais, onde é possível observar que o mesmo é reduzido em animais DPIC + veículo e recuperado nos animais tratados sertralina ou EMCb [$F_{(5, 50)} = 5,356$; $p = 0,0005$]

Figura 36: Efeito do EMCb no teste do nado forçado.



Legenda: Cada coluna representa a média de 11 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. Os sustenidos (#) denotam significância entre os grupos NL + veículo e DPIC + Veículo. # $p < 0,05$. Os asteriscos (*) denotam diferença entre o grupo DPIC + veículo e DPIC + Sertralina ou DPIC + EMCb. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$. DPIC: Dor pós-isquêmica crônica; EMCb: extrato metanólico de *Condalia buxifolia*; NL: não lesionado.

6 DISCUSSÃO

A Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I consiste em uma condição dolorosa, caracterizada por dor espontânea ou induzida desproporcional ao evento incitante, a qual surge acompanhada por uma ampla variedade de alterações autonômicas e motoras em combinação variável (BORCHES; GERSHWIN, 2014).

Devido à sua natureza complexa e diversidade de mecanismos fisiopatológicos envolvidos, o tratamento da SDCR-I permanece como alvo de muitos estudos. As abordagens utilizadas atualmente englobam aspectos multidisciplinares e multiprofissionais. Dentre as terapias não farmacológicas, a fisioterapia e a psicoterapia apresentam-se com bons resultados (SHIM et al., 2019). Além disso, estudos pré-clínicos demonstram que alternativas, como a eletroacupuntura e o exercício físico, podem ser promissoras para a SDCR-I (BRATTI, 2011; MAZZARDO-MARTINS et al., 2018). Os tratamentos farmacológicos, por sua vez, consistem no uso de anti-inflamatórios em sua fase inicial, enquanto em fases mais prolongadas e crônicas, é indicado o uso de analgésicos, antidepressivos e anticonvulsivantes. Embora estes medicamentos representem uma importante estratégia no tratamento da SDCR-I, eles são por muitas vezes insuficientes, além de estarem associados a efeitos adversos e baixa adesão por parte do paciente (ROWBOTHAM, 2006).

Desta forma, apesar dos grandes avanços na medicina moderna, diversos estudos enfatizam a importância dos produtos naturais, principalmente os metabólitos secundários originados de plantas, para a terapêutica atual, bem como para o entendimento de mecanismos relacionados com o processamento e tratamento da dor, como a caracterização dos tipos de receptores e dos ligantes endógenos envolvidos (CALIXTO, 2000; DUTRA et al., 2016).

Nesse sentido, é importante salientar que o Brasil é detentor da maior biodiversidade de plantas do mundo, representando em torno de 20% de todas as espécies do planeta (CALIXTO, 2003). Esse grandioso patrimônio genético, já escasso em países desenvolvidos, possui um valor econômico-estratégico inestimável em diversas atividades, inclusive e principalmente no campo de desenvolvimento de novos fármacos. Perante a este contexto, órgãos governamentais do país buscam incentivar o uso de plantas medicinais como terapia complementar do Sistema Único de Saúde, visando a consolidação de conhecimentos populares e o acesso a tratamentos adequados. Sendo assim, o entendimento das propriedades

de plantas como *C. buxifolia* torna-se de extrema relevância, uma vez que o seu uso popular já é bem estabelecido e poucos estudos na literatura abordam sua eficácia e segurança.

Tendo em vista o exposto, vários são os esforços e pesquisas que buscam compreender as alterações que ocorrem em decorrência da SDCR-I, bem como novas abordagens terapêuticas que possam auxiliar o seu tratamento. Nesse sentido, Coderre e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo animal em ratos com sinais comparáveis aos descritos em humanos com SDCR-I. O modelo consiste na instauração de uma isquemia através de um torniquete (anel elástico) e posterior reperfusão na pata do animal (GROENEWEG et al., 2009). Anos mais tarde, Ludwing e colaboradores (2007) elaboraram outro modelo animal, onde realizavam uma ligadura na artéria femoral de ratos durante 3 horas, com posterior liberação e reperfusão da mesma. A principal diferença entre os modelos do grupo de Coderre e do grupo de Ludwing consiste no fato de que a ligadura da artéria femoral reduz o fluxo sanguíneo para a pata a quase zero, no entanto, as veias são poupadas, o que não é observado no modelo com o torniquete. Assim, o modelo descrito por Coderre e colaboradores (2004) possui maiores semelhanças com o que ocorre na clínica, uma vez que as lesões que desencadeiam a SDCR-I costumam atingir as artérias e veias da mesma forma (BRATTI, 2011). Em 2010, Millecamps e colaboradores adaptaram o modelo do torniquete para camundongos, sendo então caracterizado por Bratti (2011).

O modelo utilizado neste trabalho segue o descrito por Millecamps e colaboradores (2010), com modificações. Com base em estudos pilotos do nosso laboratório, que demonstraram que com um anel elástico a alodinia e a hiperalgesia apresentavam-se reduzidas a partir do 14º dia, optou-se pela indução do torniquete com três anéis elásticos.

A alodinia e a hiperalgesia são os primeiros sintomas observados em pacientes com SDCR-I, e indicam processos de sensibilização periférica e central (REIMER et al., 2016). Nesse sentido, o presente trabalho buscou investigar, no primeiro momento, se o modelo utilizado era capaz de reproduzir tais aspectos, clássicos da SDCR-I. De fato, foi possível observar que, a partir do terceiro dia, os animais que passaram pelo procedimento da IR da pata desenvolveram alodinia mecânica e hiperalgesia térmica ao frio, comportamentos observados por 4 semanas após a indução da lesão, corroborando com os achados na literatura (BRATTI, 2011).

Visto que o modelo confirmou os comportamentos nociceptivos descritos anteriormente, o presente trabalho buscou avaliar os possíveis efeitos do EMCb na alodinia

mecânica e hiperalgesia térmica dos animais. O primeiro resultado demonstrou que o EMCb, nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg, foi capaz de reverter os quadros de alodinia mecânica na primeira e segunda hora após o tratamento. Esse efeito foi observado até a 4ª hora no grupo tratado com a dose de 100 mg/kg. Com base neste dado e em estudos anteriores, optou-se pela continuidade dos experimentos apenas com a dose de 100 mg/kg.

Adicionalmente, os efeitos do tratamento com EMCb na alodinia mecânica e hiperalgesia térmica ao frio foram observados até o 28º dia após IR, sendo que a partir do 7º dia foi verificado a redução de tais comportamentos mesmo antes do primeiro tratamento diário. Estes achados indicam que ocorreu um aumento da duração do efeito do EMCb e estão de acordo com o estudo de Simões e colaboradores (2017), o qual demonstra uma importante atividade de EMCb na hiperalgesia mecânica e térmica induzidas pelo modelo de incisão plantar (que mimetiza condições de dor pós-operatória).

Os efeitos analgésicos de EMCb podem ser em decorrência de sua atuação no sistema opioidérgico, uma vez que Simões e colaboradores (2015) observaram que sua atividade é revertida quando administrada a naloxona (um antagonista dos receptores opioides). Somado a isso, estudos fitoquímicos com *C. buxifolia* revelam que a planta possui grandes quantidades de alcaloides ciclopeptídeos, como a Condalina-A, os quais possuem importante ação analgésica (SIMÕES, et al., 2015). Ademais, o EMCb também foi capaz de reduzir as concentrações de citocinas pró-inflamatórias na periferia, como a IL-1 β e o TNF- α , as quais contribuem para a indução e manutenção da hiperalgesia (MARCHAND et al., 2005). De fato, um estudo recente demonstrou que a imunoglobulina G sérica purificada de pacientes com SDCR persistente grave, ao ser transferida para camundongos com lesão na pata traseira, provoca características importantes da condição clínica, como a ativação da microglia no encéfalo dos animais. O mais interessante é que o bloqueio da citocina pró-inflamatória IL-1 β foi capaz de prevenir e reverter essas alterações (HELYES et al., 2019), demonstrando o importante efeito dessa citocina na patogênese da SDCR.

Além dos efeitos analgésicos, o presente trabalho também identificou o potencial anti-edematoso do EMCb no modelo de DPIC, do 3º ao 14º dia após a indução da lesão. O edema é um aspecto bastante comum em pacientes com SDCR-I, sendo responsável por muitas vezes causar desconforto e perda de função do membro afetado. É gerado em resposta a um processo inflamatório local, onde há a liberação de diversos mediadores como a PGE2,

aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, histamina, serotonina e outros peptídeos (HUYGEN et al., 2002). De fato, Simões e colaboradores (2015) demonstram que EMCb atua por inibir mediadores como a PGE2, indicando que a inibição deste prostanoide pode estar associada ao mecanismo de ação envolvido no efeito antiedema de pata dos animais.

Em conjunto, estes dados fornecem as primeiras evidências do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do EMCb em um modelo de nocicepção crônica. A dor crônica representa uma condição clinicamente relevante, uma vez que não possui papel fisiológico estabelecido, sendo frequentemente relacionada com a redução significativa da qualidade de vida do indivíduo, além de ser responsável por aumentar as taxas de absenteísmo, reduzir a produtividade e levar ao abandono do trabalho (PHILLIPS; HARPER, 2011). Ademais, já se sabe que a dor crônica está associada a diversas comorbidades, como comprometimentos cognitivos (MACRACKEN; IVERSON, 2001), depressão (FISHBAIN, 1997) e ansiedade (DERSH et al., 2002).

Estas alterações neuropsicológicas também são bastante evidenciadas em pacientes com a SDCR-I, inclusive, alguns estudos sugerem que indivíduos que apresentam comportamentos ansiosos, por exemplo, possuem fator de risco aumentado para o seu desenvolvimento (DILEK et al., 2012). Embora essa relação seja observada com frequência na clínica, poucos são os estudos que buscam elucidar os mecanismos envolvidos em tais comorbidades, bem como abordagens terapêuticas que procurem amenizar a dor juntamente com os fatores associados (LYNCH, 1992; BRINKERS et al., 2018). Desta maneira, o presente trabalho buscou investigar os comportamentos envolvidos com o modelo de DPIC, bem como o efeito do tratamento com EMCb e setralina (usada como controle positivo) em tais comportamentos.

A fim de identificar as possíveis relações do modelo com o comportamento tipo-ansioso e problemas de memória, este estudo fez uso dos testes da caixa claro/escuro, campo aberto e reconhecimento de objetos. Embora clinicamente a SDCR-I esteja bastante relacionada com estes fatores, o presente trabalho não identificou nenhuma alteração do modelo relacionada a tais comportamentos. Estes achados diferem dos encontrados Barros (2017) e corroboram em parte com Tajerian e colaboradores (2014), que demonstram comportamento tipo-ansioso e déficit de memória nos testes do labirinto em O e na memória social, porém não observam alterações no campo aberto e reconhecimento de objetos. As divergências podem ser em decorrência da linhagem animal utilizada (ambos os estudos

utilizam camundongos C57BL/6), bem como escolha do modelo e tempo de avaliação. Tajerian e colaboradores (2014) utilizam um modelo de fratura na tíbia a fim de mimetizar SDCR-I e avaliam após 7 semanas da indução.

Outro achado interessante deste trabalho é de que o modelo de DPIC utilizado não alterou os parâmetros locomotores dos animais. Além disso, os tratamentos com sertralina e EMCb também não tiveram efeitos no número de cruzamentos (campo aberto) e número de entradas (caixa claro/escuro), indicando que os tratamentos também não causam alterações na locomoção. Estes dados confirmam o observado por Nucci e colaboradores (2012), que demonstram não haver diferenças na deambulação dos animais submetidos ao modelo de DPIC.

Em contrapartida, o comportamento tipo-depressivo foi observado em todos os testes utilizados. Os testes de preferência por sacarose e de borrifagem de sacarose são descritos na literatura com o intuito de identificar a anedonia dos animais, ou seja, a perda de interesse em atividades que normalmente desfrutavam (neste caso, o desejo nato de consumir a sacarose). Este parâmetro é intimamente ligado aos quadros clínicos de depressão, sendo um dos sintomas considerados em seu diagnóstico (SCHEGGI et al., 2018). Já os testes de nado forçado e suspensão pela cauda foram utilizados com o intuito de avaliar o comportamento do animal frente a estressores inescapáveis, sendo quantificado o tempo em que o animal realiza comportamentos relacionados à fuga e o tempo em que fica imóvel, sendo estes interpretados como desespero comportamental ou passividade, respectivamente (PORSOLT et al., 1977; STERU et al., 1985).

O presente estudo demonstrou que o modelo de DPIC utilizado foi capaz de induzir comportamentos anedônicos, uma vez que reduziu o consumo de sacarose e o tempo de autolimpeza, bem como aumentou a latência para a autolimpeza no teste da borrifagem. Além disso, foi possível observar que os grupos que sofreram a IR e foram tratados com EMCb ou sertralina tiveram um aumento no consumo de sacarose, no entanto, apenas os tratados com EMCb apresentaram respostas tipo-antidepressivas no teste da borrifagem. Com relação aos testes de nado forçado e suspensão pela cauda, o presente trabalho observou que, em ambos, o modelo de DPIC reduziu o período de latência e aumentou os tempos de imobilidade, indicando, novamente, a associação do comportamento tipo-depressivo a este modelo. De forma adicional, foi possível confirmar que os animais tratados com EMCb ou sertralina não

apresentaram os comportamentos tipo-depressivos em relação aos testes de nado forçado e suspensão pela cauda.

De fato, já é bem estabelecida na literatura a íntima relação entre quadros de dor crônica acompanhados de depressão severa e, em casos mais graves, ideação suicida (BRINKERS et al., 2018). Estima-se que aproximadamente 40 a 60 % dos pacientes com dor crônica desenvolvem depressão, e a associação entre estas condições é frequentemente relacionada a uma redução da resposta ao tratamento, bem como é capaz de aumentar os sintomas dolorosos ao longo do tempo (SHENG et al., 2017). Os fatores envolvidos na patogênese da dor crônica e da depressão são múltiplos e complexos, sendo que poucos estão elucidados até o momento. Sabe-se que aspectos neurobiológicos, ambientais e cognitivos são fundamentais neste processo, no entanto, a influência de cada um destes fatores é dependente do indivíduo e do estágio da doença (GOESLING et al., 2013).

Embora este estudo não tenha analisado os parâmetros bioquímicos relacionados ao modelo, a literatura documenta que uma das principais evidências que une a fisiopatologia da dor crônica e da depressão é a neuroinflamação (WALKER et al., 2014). A liberação de mediadores inflamatórios na periferia, como as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL6, além de gerarem uma inflamação e sensibilização local, podem atingir regiões encefálicas, como o hipocampo, levando a um processo de sensibilização central (MILLER; RAISON, 2016). Os mecanismos pelos quais as citocinas sistêmicas atuam no encéfalo não são completamente elucidados, uma vez que estas substâncias não atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) (KRAYCHETE et al., 2006). No entanto, acredita-se que as citocinas pró-inflamatórias chegam ao encéfalo por meio dos órgãos circunventriculares (áreas onde os capilares são fenestrados), gerando, assim, a ativação microglial e a perpetuação do processo inflamatório (MILLER; RAISON, 2016)

Corroborando com isso, já se sabe que pacientes com a SDCR-I apresentam concentrações elevadas de mediadores como SP, CGRP e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) tanto na circulação sistêmica quanto no fluido cerebrospinal (OKUDAN; CELIK; 2006; BIRKLEIN et al., 2018). Deste modo, pode-se inferir que a frequente relação entre pacientes com a SDCR-I e o desenvolvimento de depressão, se deve, pelo menos em parte, aos processos neuroinflamatórios.

Como já mencionado, o tratamento com EMCb reduziu significativamente o comportamento tipo-depressivo nos animais submetidos ao modelo da DPIC. Nesse sentido, o

estudo de Simões e colaboradores (2017) demonstrou o efeito de EMCb na redução de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , indicando que os efeitos observados podem ser em decorrência deste mecanismo de ação. Ademais, o estudo de Simões e colaboradores (2015) também observou que as atividades antinociceptivas de EMCb podem estar relacionadas com a sua atuação no receptor TRPV1, o qual também já se sabe ter envolvimento com o mecanismo de ação de potenciais drogas antidepressivas (SOCALA e WLAZ, 2016).

Outro achado importante deste estudo relaciona-se ao bem-estar dos animais. Utilizando o teste do ninho, foi possível observar que os animais submetidos ao modelo de DPIC reduziram significativamente a construção de seus ninhos, que é inferida como um comportamento natural de roedores e indica o seu bem-estar. Em contrapartida, os animais que sofreram o processo de IR e foram tratados com EMCb apresentaram melhora significativa na construção de seus ninhos. Esse resultado relaciona-se ao observado na clínica, onde frequentemente os pacientes com SDCR-I relatam redução na qualidade de vida e desinteresse pelas atividades diárias (GOH et al, 2017). Assim, observamos que o EMCb poderia também estar atuando sobre estes fatores, e auxiliando pacientes com a doença.

Por fim, ressalta-se que os dados obtidos neste trabalho são pioneiros em demonstrar os efeitos do extrato metanólico de *Condalia buxifolia* em um modelo de dor crônica, bem como nos fatores emocionais associados, tornando-se uma estratégia promissora para o tratamento da Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, o presente estudo conclui que:

- 1) O EMCb foi capaz de reverter a alodinia mecânica e hiperalgesia térmica ao frio, bem como o edema de pata observados no modelo de DPIC;
- 2) O modelo de DPIC utilizado não induziu comportamento tipo-ansioso e déficit de memória em camundongos Swiss fêmeas nos tempos avaliados;
- 3) O EMCb foi capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo e promover o bem-estar de animais submetidos ao modelo de DPIC.

O conjunto destas conclusões fornece evidências científicas do para o uso popular de *Condalia buxifolia* em condições de dor crônica e fatores emocionais associados. Além disso, o presente estudo corrobora com o proposto pela Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares e pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, visando o uso de recursos naturais para o tratamento adequado de toda a população.

Com relação às perspectivas deste trabalho, identificamos como importante o estudo dos parâmetros bioquímicos relacionados com as respostas comportamentais obtidas, além da identificação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo e tipo-antidepressivo de *Condalia buxifolia* no modelo experimental de Síndrome da Dor Complexa Regional do tipo I, garantindo assim, sua eficácia e segurança.

8 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. N. et al. Modelos animais para o estudo de drogas antidepressivas. In: CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. *Protocolos de Psicofarmacologia Comportamental*. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011.
- APKARIAN, A. V. et al. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **European Journal of Pain**. v.9, s.n., p. 463–484. 2005.
- ASMUNDSON, G.J.G.; KATZ, J. Understanding the co- occurrence of anxiety disorders and chronic pain: state- of- the- art. **Depression and Anxiety**. v. 26, n. 10. s.p. 2009.
- BARROS, W. Prejuízo cognitivo-emocional de camundongos submetidos ao modelo da síndrome da dor complexa regional tipo I. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2017.
- BASBAUM, A.I.; JESSELL, T. The Perception of Pain. In: Kandel, E.R.; Schwartz, J.; Jessell, T., editors. **Principles of Neural Science**. New York: Appleton and Lange. p. 472-491. 2000.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v. 139, n. 2, p. 267-284. 2009.
- BASTOS, N. R. A família Rhamnaceae R. Br. No Rio Grande Do Sul. Gêneros *Conddalia Cav* e *Scutia Comm*. **Pesquisa Botânica**, v. 40, p. 69-84.1989.
- BIRKLEIN, F. et al. Complex Regional Pain Syndrome – phenotypic characteristics and potencial biomarkers. **Neurology**. 2018.
- BORCHERS, A.T.; GERSHWIN, M.E. Complex Regional Pain Syndrome: a comprehensive and critical review. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, s.n., p. 242-265. 2014.
- BOYD, A. et al. Herbal medicinal products or preparations for neuropathic pain and fibromyalgia. **Cochrane Database Systematic Reviews**. s.v., n. 5, s.p. 2013.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5ª edição. Brasília. ANVISA, v II, p. 992. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS (PNPIC-SUS). Brasília – DF 2015. 2ª Edição. 2015.
- BRATTI, T. Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da Síndrome da Dor Complexa Regional Tipo I e camundongos. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis. 2011.

- BRINKERS, M. et al. Psychiatric Disorders in Complex Regional Pain Syndrome (CRPS): The Role of the Consultation-Liaison Psychiatrist. **Pain Research and Management**. 2018.
- BRUEHL, S. Complex regional pain syndrome. 2015.
- BUSSA, M. et al. Complex regional pain syndrome type I: a comprehensive review. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 59, n. 6, p. 685–697. 2015.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p.179-189. 2000.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39. 2003.
- CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63. 1994.
- CHIMENTI, R. L.; FREY-LAW, L. A.; SLUKA K. A. A mechanism-based approach to physical therapist management of pain. **Physical Therapy**. v. 98, s.n., p. 302–314. 2018.
- CHOI, Y. et al. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Pain**. v.59, n. 3, p. 369-376. 1994.
- CODERRE, T. J. et al. Chronic post-ischemia pain (CPIP): A novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain**, v. 112, n. 1–2, p. 94–105. 2004.
- CODERRE, T. J.; BENNETT, G. J. Editorial: Objectifying CRPS-I. **Pain**, v. 138, n. 1, p. 3-4. 2008.
- CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, RIO GRANDE DO SUL. Decreto estadual CONSEMA n. 42.099 de 31 de dezembro de 2002.
- CORDON, F.C.O.; LEMONICA, L. Síndrome Dolorosa Complexa Regional: Epidemiologia, Fisiopatologia, Manifestações Clínicas, Testes Diagnósticos e Propostas Terapêuticas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 52, n. 5, p. 618 – 627. 2002.
- DAVIS, J. A. et. al. Incidence and impact of pain conditions and comorbid illnesses. **Journal of Pain Research**. v. 4, s.n., p. 331–345. 2011.
- DERSH, J.; POLATIN, P.B.; GATCHEL, R.J. Chronic pain and psychopathology: Research findings and theoretical considerations. **Psychosom Med**. v.64:773–86. 2002.
- DE MOS, M. et al. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. **Pain**. v.129, s.n., p. 12–20. 2007.

DEACON, R. J. Assessing nest building in mice. **Nature Protocol**, v.1, n. 3, p. 1117-1119. 2006.

DILEK, B. et al. Anxious personality is a risk factor for developing complex regional pain syndrome type I. **Rheumatology International**. v. 32, s.n., p. 915-920. 2012.

DOAN, L.; MANDERS, L.; WANG, J. Neuroplasticity Underlying the Comorbidity of Pain and Depression. **Neural Plasticity**, s.v., s.n., s.p. 2015.

DRUMMOND, P. D. Sensory disturbances in complex regional pain syndrome: clinical observations, autonomic interactions, and possible mechanisms. **Pain Medicine**. v.11, s.n., p. 1257–1266. 2010.

DUBIN A, E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 120, n. 11, s.p. 2010.

DUEÑAS, M. A review of chronic pain impact on patients, their social environment and the health care system. **Journal of Pain Research**, v. 9, s.n., p. 457–467. 2016.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, s.n., p. 4-29. 2016.

ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation **Nature Medicine**. v. 17, n. 11, p. 1391-1401. 2011.

EVANS, J. Reflex sympathetic dystrophy. **Surgery, gynecology & obstetrics**. v. 82, s.n., p. 36–43. 1946.

FEIN, A. Nociceptores: as células que sentem dor. Ribeirão Preto – SP: **Dor On Line**, p.106. 2011.

FELIU, M. H.; EDWARDS, C. L. Psychologic factors in the development of complex regional pain syndrome: History, myth, and evidence. **Clinical Journal of Pain**. v. 26, s.n., p. 258–63. 2010.

FISHBAIN, D. A. et al. Chronic pain-associated depression: antecedent or consequence of chronic pain? A review. **The Clinical Journal of Pain**, v. 13, n. 2, p. 116–137. 1997.

FLORA DIGITAL. Disponível em:

http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php, acesso em 20/07/19.

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

- FREEDMAN, M. et al. Complex Regional Pain Syndrome: Diagnosis and Treatment. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics**, v. 25, n. 2, p. 291–303. 2014.
- GASKILL, B. N. et al. Nest Building as an Indicator of Health and Welfare in Laboratory Mice. **Journal of Visualized Experiments**. v. 82, s.n., p. 51012. 2013.
- GASPAR, A.T.; ANTUNES, F. Síndrome doloroso regional complexo tipo I. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, s.n., p. 1031-1040. 2011.
- GOESLING, J.; CLAUW D.J.; HASSETT, A.L. Pain and Depression: An Integrative Review of Neurobiological and Psychological Factors. **Curr Psychiatry Rep**. 15:421. 2013.
- GOH, E.L.; CHIDAMBARAM, S.; MA, D. Complex regional pain syndrome: a recent update. **Burns Trauma**. 19;5:2. 2017.
- GRIEPP M. A. Follow-up study of 14 young adults with complex regional pain syndrome type I. **Journal of Neuroscience Nursing**. 2000.
- GROENEWEG, G. et al. Regulation of peripheral blood flow in Complex Regional Pain Syndrome: clinical implication for symptomatic relief and pain management. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 10, p. 116. 2009.
- HALLADIN, N. L. et al. Lower limb ischemia and reperfusion injury in healthy volunteers measured by oxidative and inflammatory biomarkers. **Perfusion**. v. 30, s.n., p. 64-70. 2015.
- HARDEN, R. A clinical approach to complex regional pain syndrome. **Clinical Journal of Pain**. v. 16, s.n., p. 26–32. 2000.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature reviews Drug discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129. 2015.
- HELYES, Z. et al. Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1–induced mechanisms. **PNAS**, 116 (26) 13067-13076, 2019.
- HOTCHKISS, R.S. et al. Cell death. **New England Journal of Medicine**. v. 361, s.n., p. 1570–1583. 2009.
- HUYGEN F. J. et al. Evidence for local inflammation in complex regional pain syndrome type 1. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 1, p. 47-51. 2002.
- IOLASCON, G. et al. Complex regional pain syndrome (CRPS) type I: historical perspective and critical issues. In: Brandi, L.M. **Clinic Cases Miner Bone Metab**. 12(Suppl. 1): p.4-10. 2015.

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. 4, s.n., p. 1-8. 2010.

JOHNSTON, M.C. Revision of *Condalia* including microrhamnus (Rhamnaceae). **Brittonia**, v. 14, n. 4, p. 332-368, 1962.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210. 2001.

JUSZCZAK, G. R.; SLIWA, A. T.; WOLAK, P. The usage of video analysis system for detection of immobility in the tail suspension test in mice. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. v. 85, s.n., p. 332–338. 2006.

KALOGERIS, T. et al. **Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury**. [s.l: s.n.]. v. 298. 2017.

KILKENNY, C.; BROWNE, W.J.; CUTHILL, I.C.; EMERSON C.; ALTMAN, D. **The Arrive Guidelines**. Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments. 2010.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**. v. 13, n. 1, p. 1-12. 2008.

KRAYCHETE, D.C. et al. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. *Rev Bras Reumatol*. v. 46. n.3. p. 199-206. 2006.

LEGER et al. Object recognition test in mice. **Nature protocols**, v. 8 n. 12 p. 2531-37. 2013.

LIBON, D. J. et al. Neuropsychological deficits associated with complex regional pain syndrome. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 16, n. 3, p. 566–573. 2010.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**. v. 353, n. 9164, p.1607-1609. 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto Protocol Of Iasp Basic Pain Terminology. **Pain**. v. 137, n. 3, p. 473-477. 2008.

LOHNBERG, J. A.; ALTMAIER, E. M. A review of psychosocial factors in complex regional pain syndrome. **Journal of Clinical Psychology in Medical Settings**. v.20, s.n., p. 247–254. 2013.

LOTTEMBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 595-607. 2009.

LUDWIG, J. et al. Behavioral and sensory changes after direct ischemia-reperfusion injury in rats. **European Journal of Pain**, v. 11, n. 6, p. 677-684. 2007.

LYNCH, M. E. Psychological aspects of reflex sympathetic dystrophy: a review of the adult and paediatric literature. **Pain**, v. 49, n. 3, p. 337-347. 1992.

MCCRACKEN, L.M.; IVERSON, G.L. Predicting complaints of impaired cognitive functioning in patients with chronic pain. *J Pain Symptom Manage.* v.21:392-6. 2001

MAIHOFNER, C. et al. Cortical reorganization during recovery from complex regional pain syndrome. **Neurology**, v. 63, n. 4, p. 693-701. 2004.

MAIHOFNER, C. et al. Complex regional pain syndromes: new pathophysiological concepts and therapies. **European Journal of Neurology**. v. 17, n. 5, p. 649-660. 2010.

MALDANER, G. Estudo dos metabólitos secundários de *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia* e suas atividades antimicrobianas. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Maria. 2005.

MANCINI, F. et al. Preserved cortical maps of the body in Complex Regional Pain Syndrome. *bioRxiv*. 2018.

MARCHAND, D.; MONSEUR, X. Alcaloides peptídiques, VII (5). Le myrianthines-A, B et C, alcaloides du *Myrianthus arcoreus* P. Beauv (Urticacées). **Annales Pharmaceutiques françaises**, v. 26, p. 771-778. 1968.

MARCHAND F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 7, p. 521 - 532. 2005.

MARINUS, J. et al. Clinical features and pathophysiology of complex regional pain syndrome. **Lancet Neurology**. v. 10, s.n., p. 637-648. 2011.

MAZZARDO-MARTINS, L. et al. Electroacupuncture induces antihyperalgesic effect through endothelin-B receptor in the chronic phase of a mouse model of complex regional pain syndrome type I. **Pflügers Archiv**, v. 470, n. 12, p. 1815-1827. 2018.

MECHAN, A. O. et al. A comparison between Dark Agouti and Sprague-Dawley rats in their behavior on the elevated plus-maze, open-field apparatus and activity meters and their response to diazepam. **Psychopharmacology**. v.159, s.n., p.188-195. 2002.

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

MERSKY, H.; BOGDUK, N. Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms. 2nd ed. Seattle: **IASP Press**; 1994.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. v. 57, n. 1, p. 1-164. 1999.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. v. 66, s.n., p. 355-474. 2002.

MILLECAMPS, M. et al. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). **Pain**. v. 151, n. 1, p. 174-183. 2010.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature**, v. 16, n. 1, p. 22-34. 2015.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807. 2011.

MITCHELL, S.W. Injuries of nerves and their consequences. **JB Lippincott**, Philadelphia. 1872.

MOREL, A. F. et al. *Phytochemistry*. v. 18, p. 473 – 477. 1979.

MOREL, A. F. et al. Antibacterial cyclopeptide alkaloids from the bark of *Condalia buxifolia*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 561-568. 2002.

MOREL, A. F.; MACHADO, E. C.; WESSJOHANN, L. A. Cyclopeptide alkalids of *Discaria febrifuga* (Rhamnaceae). **Phytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 431 – 434. 1995.
of Neurobiological and Psychological Factors. **Curr Psychiatry Rep**. 15:421. 2013.

NUCCI, C. et al. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain *Journal of Ethnopharmacology*. V. 146, p 170-178. 2012.

OKUDAN, B.; CELIK, C. Determination of inflammation of reflex sympathetic dystrophy at early stages with Tc-99 m HIG scintigraphy: preliminary results. **Rheumatology International**. v. 26, s.n., p. 404–408. 2006.

ORR, P.M.; SHANK, B.C.; BLACK, A.M. The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. **Critical Care Nursing Clinics of North America**. v. 29, s.n., p. 407–418. 2017

OTT, S.; MAIHÖFNER, C. Signs and Symptoms in 1,043 Patients with Complex Regional Pain Syndrome. **The Journal of Pain**. v.19, n. 6, p. 599-611. 2018.

PARKITNY, L. et al. Inflammation in complex regional pain syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Neurology**, v. 80, n. 1, p. 106–117. 2013.

PHILLIPS, C. J.; HARPER, C. The economics associated with persistent pain. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**. v. 5, n. 2, p. 127-130, 2011.

- PLEGER, B. et al. Patterns of cortical reorganization parallel impaired tactile discrimination and pain intensity in complex regional pain syndrome. **Neuroimage**, v. 32, n. 2, p 503 – 510. 2006.
- PLEGER, B. et al. Complex Regional Pain Syndrome Type I Affects Brain Structure in Prefrontal and Motor Cortex. **PLoS One**. v. 9, n. 1, s.p. 2014.
- PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**. v. 229, n. 2, p. 327-36. 1977.
- REIMER, M. et al. Sensitization of the Nociceptive System in Complex Regional Pain Syndrome. **PLoS One**, v. 11, n. 5, s.p. 2016.
- ROWBOTHAM, M. C. Pharmacologic management of complex regional pain syndrome. **The Clinical Journal of Pain**, v. 22, n. 5, p. 425-429. 2006.
- RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**. v. 49, s.n., p. 123-133. 1998.
- SANDRONI, P. et al. Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population based study. **Pain**. v.103, s.n., p. 199–207. 2003.
- SCHEGGI, S.; MONTIS, M.G.; GAMBARANA, C. Making Sense of Rodent Models of Anhedonia. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 11, p. 1049–1065. 2018.
- SEBASTIN, S. J. Complex regional pain syndrome. **Indian Journal of Plastic Surgery**. v. 44, n. 2, p. 298-307. 2011
- SERCHOV, T.; CALKER, D.; BIBER, K. Sucrose Preference Test to Measure Anhedonic Behaviour in Mice. **Bio-protocol**. v. 6, s.n., s.p. 2016a.
- SERCHOV, T.; CALKER, D.; BIBER, K. Light/Dark Transition Test to Assess Anxiety-like Behavior in Mice. **Bio-Protocol**, v. 6, n. 19, s.p. 2016b.
- SHAH, A. H. et al. *Fitoterapia*, v. 6, p. 57. 1986.
- SHENG, J. et al. The Link between Depression and Chronic Pain: neural Mechanisms in the Brain. **Neural Plasticity**. s.v., s.n., s.p. 2017.
- SHIM, H. et. al. Complex regional pain syndrome: a narrative review for the practising clinician. **British Journal of Anaesthesia**. 2019.
- SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W. B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**. v.3, s.n., p.367-738. 2004

SIMÕES, R.R. Pharmacological evidence favouring the traditional use of the root bark of *Condalia buxifolia* Reissek in the relief of pain and inflammation in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. 175; 370–377. 2015.

SIMÕES, R.R.; Oral treatment with methanolic extract of the root bark of *Condalia buxifolia* Reissek alleviates acute pain and inflammation in mice: Potential interactions with PGE₂, TRPV1/ASIC and PKA signaling pathways. **Journal of Ethnopharmacology**. 185; 319–326. 2016

SIMÕES, R.R. et al. Ameliorate potencial of santadardized extract of *Condalia buxifolia* Reissek in attenuating the postoperative pain: evidence for the inhibition of AMPA and kainate in the spinal cord. **UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences**, v. 5, p 24 – 39. 2017.

SOCAŁA, K.; WLAZ, P. Evaluation of the antidepressant- and anxiolytic-like activity of -spinasterol, a plant derivative with TRPV1 antagonistic effects in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 303, s.n., p. 19–25. 2016.

STANTON-HICKS M. et al. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. **Pain**. v. 63, s.n., p. 127–33. 1995.

STANTON-HICKS, M. Complex regional pain syndrome (type I, RSD; type II, causalgia): controversies. **Clinical Journal of Pain**. v. 16 (2 Suppl), p. 33–40. 2000.

STANTON-HICKS, M. D. CRPS: what's in a name? Taxonomy, epidemiology, neurologic, immune and autoimmune considerations. **Regional Anesthesia & Pain Medicine**, v. 44, n. 3, p. 376-387. 2019.

STEEDS, C.E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery Oxford**. v. 34, s.n., p. 49-53. 2016.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**. v. 85, n. 3, p. 367-730. 1985.

SUDECK, P. Uber die akute entzündliche Knochenatrophie. **Arch Klin Chir**. v. 62, s.n., p. 147–156. 1900.

TAJERIAN, M. et al. Brain neuroplastic changes accompany anxiety and memory deficits in a model of complex regional pain syndrome. **Anesthesiology**, v. 121, n. 4, p. 852–865. 2014.

TODD, K.H. A Review of Current and Emerging Approaches to Pain Management in the Emergency Department. **Pain and Therapy**, v. 6, n. 2, p. 193-202. 2017.

TORTOSA, R. D.; NOVARA, L. J. Flora del Valle de Lema. **Aportes botânicos de Salta-Ser. Flora**, v.1, p, 1-21. 1992.

TSCHESCHE, R. et al. Alkaloide aus Rhamnaceae XV. Mucronin- D, ein weiteres cyclisches Peptid- Alkaloid aus *Zizyphus mucronata* Willd. **Tetrahedron Letters**, v.46, p. 4405-4408. 1971.

WALKER, A. K. et al. Neuroinflammation and Comorbidity of Pain and Depression. **Pharmacol Rev** 66:80–101, 2014.

WEINER, D. K. et al. The relationship between pain, neuropsychological performance, and physical function in community-dwelling older adults with chronic low back pain. **Pain Medicine**, v. 7, n. 1, p. 60–70. 2006.

WILLNER P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 83, n. 1, p. 1-16. 1984

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v.52, s.n., p.90–110. 2005.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9. 2000.

WOOLF, C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**. v. 152, s.n., p. S2–S15. 2011.

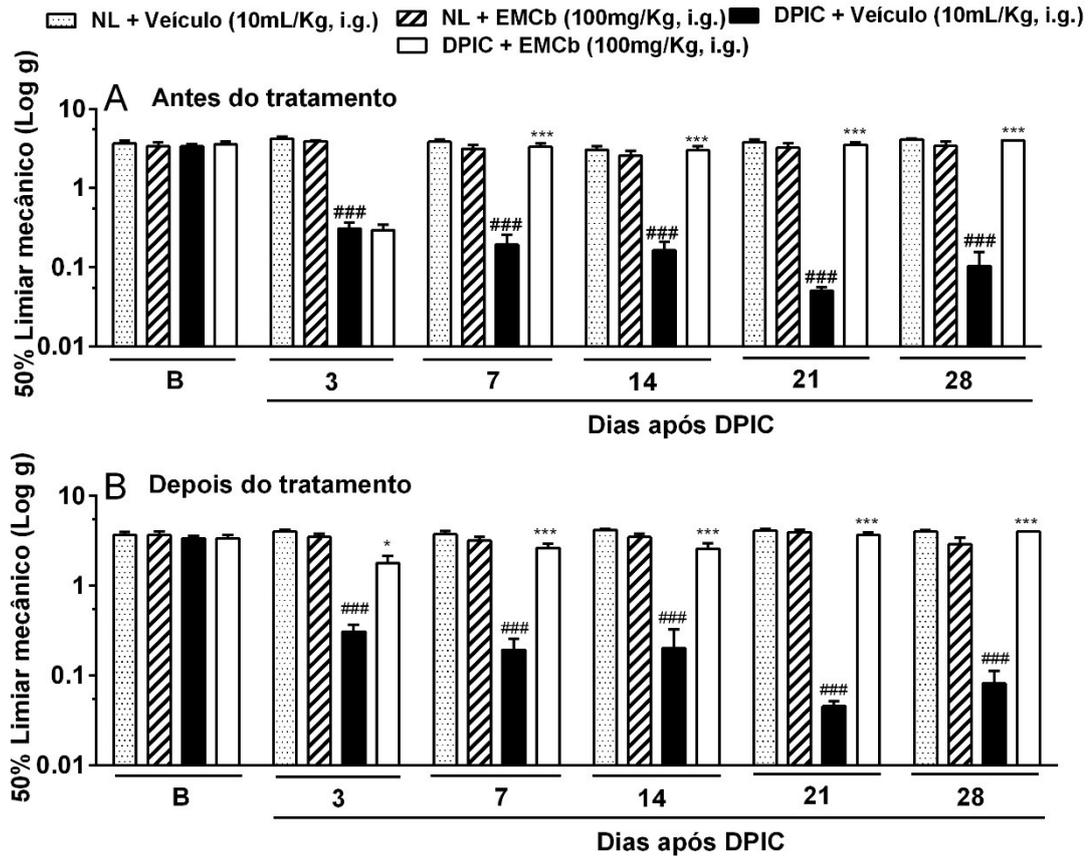
YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 101, s.n., p. 107-117. 2006.

ZIMMERMANN, M. Ethical Guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110. 1983.

ZYGLADO, J. A. et al. Distribution of alkalanes and fatty acids in the *Condalia montana* (Rhamnaceae) species complex. **Plant Systematics and evolution**, v. 179, n. 1-2, p. 89-93. 1992.

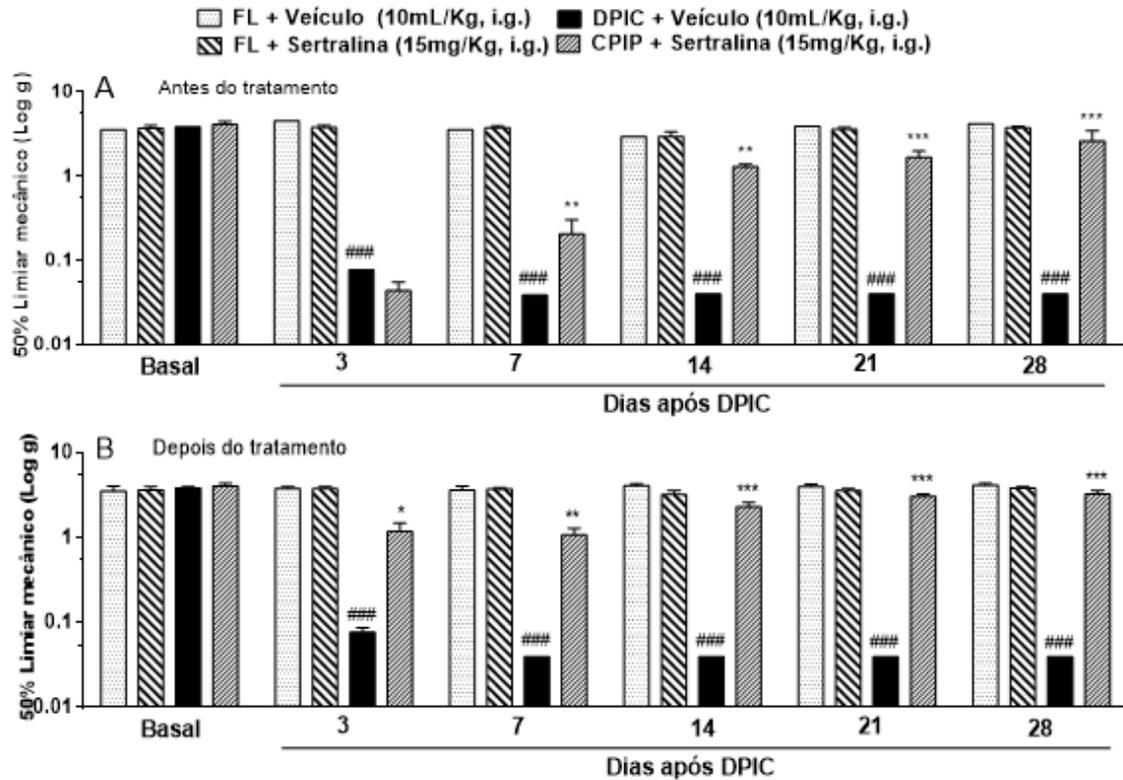
9 ANEXOS

ANEXO A - Desenho experimental 2: Efeito do EMCb no alodinia mecânica induzida pelo modelo de DPIC



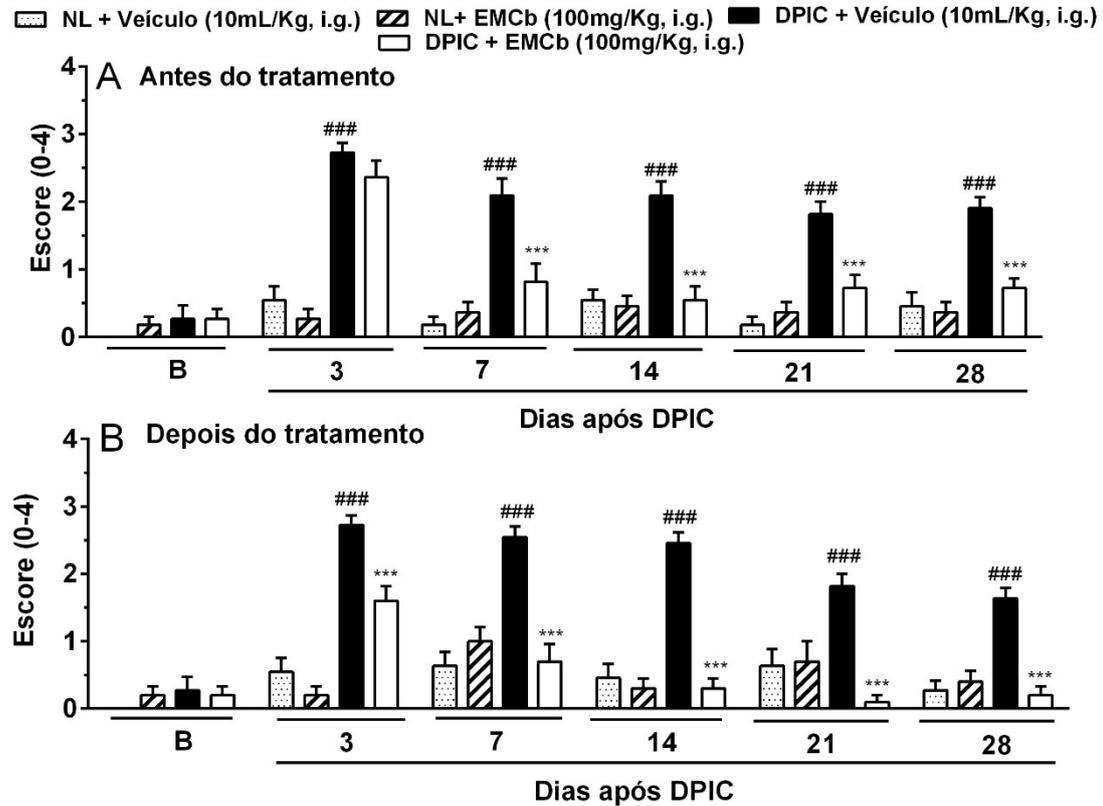
Legenda: O painel A representa as avaliações antes do tratamento, enquanto o painel B demonstra as avaliações após 2h do tratamento. Cada coluna representa a média de 11-12 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) de medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni. Os sustenidos (###) denotam a significância entre os grupos NL + Veículo e DPIC + Veículo. ###p<0,0001. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos DPIC + Veículo e DPIC + EMCb. **p<0,01; ***p<00001. DPIC: Dor pós-isquêmica crônica; NL: não lesionado.

ANEXO B - Desenho experimental 2: - Efeito da sertralina na alodinia mecânica induzida pelo modelo de DPIC.



Legenda: O painel A representa as avaliações antes do tratamento, enquanto o painel B demonstra as avaliações após 2h do tratamento. Cada coluna representa a média de 11-12 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) de medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni. Os sustenidos (###) denotam a significância entre os grupos NL + Veículo e DPIC + Veículo. ###p<0,0001. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos DPIC + Veículo e DPIC + EMCb. **p<0,01; ***p<00001. DPIC: Dor pós-ischêmica crônica; NL: não lesionado.

ANEXO C - Desenho experimental 2: Efeito do EMCb na hiperalgesia térmica ao frio decorrente do modelo de DPIC



Legenda: O painel A representa as avaliações diárias antes do tratamento, enquanto o painel B demonstra as avaliações após 2h do tratamento. Cada coluna representa a média de 7 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M). O teste estatístico se deu por análise de variância de duas vias (ANOVA) com medidas repetidas, seguida do pós-teste de Bonferroni. Os sustentados (###) denotam a significância entre os grupos NL + Veículo e DPIC + Veículo. ###<0,01; ###p<0,0001. Os asteriscos (*) denotam a significância entre os grupos DPIC + Veículo e DPIC + EMCb. *p<0,05; **p <0,01; ***p<00001. DPIC: Dor pós-isquêmica crônica; EMCb: Extrato metanólico de *C. buxifolia*; NL: não lesionado.