

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO GALATO DE ETILA NO MODELO
EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA**

TAINARA RIBEIRO GONÇALVES

ARARANGUÁ

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**EFEITO ANTINOCICPETIVO DO GALATO DE ETILA NO MODELO
EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA**

TAINARA RIBEIRO GONÇALVES

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à disciplina TCC II do Curso de Fisioterapia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra

ARARANGUÁ

2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e oportunidade de através da ciência desvendar os mistérios de sua criação.

Aos meus pais, Sandro e Silvane, por compreenderem as minhas ausências, me incentivar e sonhar comigo a realização dessa graduação. Estendo esse obrigado aos meus irmãos Tiago e Taiane por me apoiar.

Ao meu noivo, Gesbrian, por todo companheirismo, pelas noites em claros ao qual você ficou me encorajando á estudar, por sempre se fazer presente nos momentos de dificuldades, essa conquista também é sua.

As minhas amigas, Bruna Pereira, Elizete e Mônica, que sempre foram meu porto seguro ao longo desses anos de graduação. Quero agradecer também por vocês juntamente com a Danielle, Eduarda e Graziela formaram o grupo de estágio mais companheiro da história da UFSC. (deixaram saudades)

Ao Grupo de Oração Universitário Colo de Deus, que não teve participação direta nesse trabalho mais sempre me acolheu e foi meu amparo nos momentos de desespero, ansiedades e estresses.

Ao meu orientador, Rafael Cypriano Dutra, por todo conhecimento, paciência e dedicação durante minha trajetória acadêmica e científica, para que me tornasse uma profissional de sucesso.

A todos os alunos do LAIF, pela amizade, companheirismo e dedicação durante a realização desse trabalho.

A todos os professores e servidores técnico-administrativos da UFSC que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos camundongos empregados neste estudo, pois sem os quais não seria possível a realização do presente trabalho.

A CAPES e UFSC pelo auxílio financeiro empregado.

*Na vida, ore como se tudo dependesse
de Deus e estude como se tudo
dependesse de você*

(Cardeal Shellman)

RESUMO

A Fibromialgia (FM) é uma doença generalizada não inflamatória com dor de caráter crônico, cursando com ansiedade, distúrbios do sono, síndrome do intestino irritável, alterações do humor, rigidez muscular, fadiga, e alterações cognitivas. O Galato de Etila (GE) é um flavonóide derivado do ácido gálico encontrado em compostos como a uva, o vinho tinto e castanhas between, vários estudos tem demonstram que o GE apresenta forte ação antioxidante, antiinflamatória, antitumoral e antimutagênica. As terapias farmacológicas para o tratamento da FM apresentam eficácia clínica limitada, além de estarem associadas a diversos efeitos adversos ao organismo e possuírem elevado custo. Por esta razão, a busca por novas terapias anti-inflamatórias e antioxidantes torna-se de fundamental importância para o controle de patologias multifatoriais. Assim, a principal motivação desse estudo será investigar os efeitos antinociceptivos do GE, no modelo experimental da FM induzido por salina ácida (pH=4,0), através da avaliação da hipersensibilidade mecânica, térmica (ao frio e ao calor) e a dor espontânea após a indução da FM experimental em camundongos. A administração sistêmica de GE foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica nos dias 7,9,11,13 e 15 bem como a dor na escala expressão facial de dor no dia 15. Por outro lado é notável que não foi capaz de produzir a dor térmica ao frio e térmica ao calor de forma significativa. Os resultados apresentados apontam que o GE possui efeito antinociceptivo sobre o modelo experimental de fibromialgia.

Palavras chaves: fibromialgia; dor crônica generalizada não inflamatória; galato de etila.

ABSTRACT

Fibromyalgia (FM) is a generalized non-inflammatory disease with chronic disease, attending anxiety, sleep disorders, irritable bowel syndrome, mood changes, muscle stiffness, fatigue and cognitive changes. The Ethyl Gallate (GE) is a flavonoid derived from gallic acid, found in compound such as grape, red wine and chestnut among, several studies that demonstrate what GE presents, anti-oxidant, anti-inflammatory, antitumor and antimutagenic action . As pharmacological therapies for the treatment of FM, limited exercise, in addition to being effective, is adverse to its growth. For this reason, a search for new anti-inflammatory and antioxidant therapies becomes essential for the control of multifactorial pathologies. Thus, a pilot trial will be investigated on the antinociceptive effects of GE in the experimental model of MS by acidic saline (pH = 4.0), through the evaluation of mechanical, thermal and heat hypersensitivity after induction of experimental FM in mice . The systemic administration of GE was able to reduce function on days 7, 9, 11, 13 and 15 as a pain in the facial expression scale of day 15. On the other hand, it was not able to produce thermal under cold and thermal under heat significantly. The results presented that have GE have an antinociceptive effect on the experimental model of fibromyalgia.

Key words: fibromyalgia; generalized noncritical chronic pain; ethyl gallate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Pontos anatômicos sensíveis a pressão.....	11
Figura 2 Potenciais processos fisiologicos da FM.	14
Figura 3. Sintomas da Fibromialgia	15
Figura 4. Estrutura molecular do GE	18
Figura 5. Ilustração do protocolo de indução da CWP.....	20
Figura 6. Ilustração do protocolo experimental	21
Figura 7. Ilustração do teste de Von Frey	22
Figura 8. Ilustração do Cold Test.....	23
Figura 9. Ilustração do Escore da Grimace Scale.....	24
Figura 10. Ilustração do Teste de Campo Aberto	25
Figura 11. Efeito da administração sistêmica do GE na hipersalgesia mecânica induzida pela CWP	27
Figura 12. Efeito da administração sistêmica do GE na hipersalgesia térmica ao frio induzida pela CWP	28
Figura 13. Efeito da administração sistêmica do GE na hipersalgesia térmica ao calor induzida pela CWP	29
Figura 14. Efeito da administração sistêmica do GE na expressão facial	30
Figura 15. Efeito da administração sistêmica de GE sobre a atividade locomotora	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ACTH	hormônios adrenocorticotróficos
ATP	Adenosina trifosfato
CWP	Dor crônica generalizada não inflamatória
FM	Fibromialgia
FSH	hormônios folículos estimulantes
GM	Gastrocnêmico
GE	Galato de Etila
Gi	Proteína G inibitória
GH	Hormônio de crescimento
IGF-1	Fator de crescimento insulínico
i.p	Intraperitoneal
i.m	Intramuscular
ISRSs	Inibidores seletivos de recaptção de 5-HT
ISRSNs	Inibidores seletivos de recaptção de 5-HT e NA
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
pH	Potencial hidrogeniônico
NA	Noradrenalina
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
5-HT	Serotonina
SA	Salina ácida
SP	Substancia P
SNC	Sistema nervoso central
TP	<i>Tender Points</i>
v.o	Via oral
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 EPIDEMIOLOGIA	2
1.2 ETIOLOGIA	13
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	14
1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE FM	4
1.5 TERAPIAS FARMACOLÓGICAS NO TRATAMENTO DA FM:.....	16
1.6 GALATO DE ETILA	18
2 JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. ANIMAIS E INDUÇÃO DA FM	20
4.2. PROTOCOLO DE TRATAMENTO	9
4.3. AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA	22
4.3.1. HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA	22
4.3.2. HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO	230
4.3.3. HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO CALOR	23
4.3.4 ESCALA DE GRIMACE	23
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	24
4.4.1. TESTE DE CAMPO ABERTO	25

5. MÉTODO DE EUTANÁSIA	26
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
7. RESULTADOS	26
7.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO GE NA HIPERSENSIBILIDADE MÊCANICA NO MODELO EXPERIMENTAL DE FM	26
7.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO GE NA HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO NO MODELO EXPERIMENTAL DE FM.....	26
7.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO GE NA HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO CALOR NO MODELO EXPERIMENTAL DE FM.....	26
7.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO GE NA ESCALA DE EXPRESSÃO FACIAL NO MODELO EXPERIMENTAL DE FM	26
7.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO GE NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO MODELO EXPERIMENTAL DE FM.....	26
8. DISCUSSÃO	27
9. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	16

1. INTRODUÇÃO

A Fibromialgia (FM) é uma síndrome clínica caracterizada por dor muscular crônica difusa, sem evidência de processo inflamatório e hiperalgesia à palpação da musculatura (TALOTTA, 2017). Entre várias propostas para explicar a fisiopatologia da FM, a mais aceita é o aumento da excitabilidade dos neurotransmissores facilitadores da dor, os quais induzem uma sensibilização do sistema nervoso central (SNC), fenômeno complexo, o qual também ocorre em diversas síndromes dolorosas crônicas (CLAUW, 2007, LITTLEJOHN, 2015).

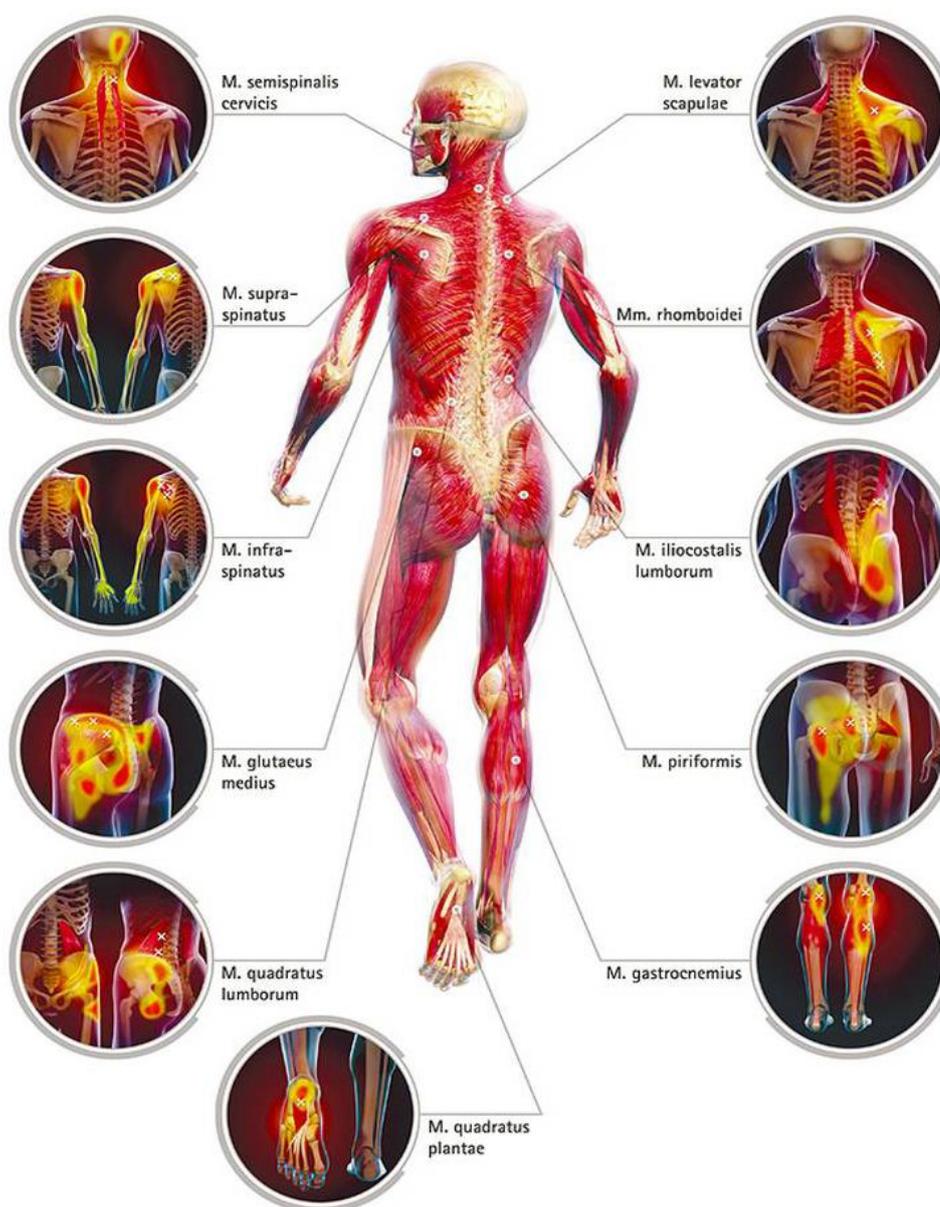


Figura 1. Pontos anatômicos sensíveis à pressão (fonte: CFS, Australia, 2010).

Essas características foram descritas previamente na literatura, no entanto, segundo a classificação do *American College of Rheumatology* (ACR), a FM deve ser diagnosticada através de três métodos diferentes: 1) *Medical Scientific Societies in Germany – AWMF* (dor crônica difusa definida como dor axial e dor nas quatro extremidades e/ou informação de distúrbios do sono e fadiga, e/ou sensação de edema ou rigidez nas mãos ou pés ou face nos últimos três meses, com um escore de Z1/10 em uma escala numérica coletada através de questionário); 2) *Survey* (Regional Pain Score – RPS Z8/19 e Fatigue Escore Z6/10 em uma escala visual analógica, na última semana); e 3) *American College of Rheumatology (ACR 1990)* – dor crônica difusa ou sensibilidade a pressão em 11 das 18 áreas pré-determinadas no corpo (Figura 1) (HEYMANN et al, 2017).

Entretanto, um dos maiores problemas enfrentado pelos médicos para diagnosticar a FM consiste no fato dos pacientes não apresentarem alterações em exames laboratoriais ou radiológicos que confirmem ou excluam a doença, sendo assim seu diagnóstico essencialmente clínico, gerando assim muitas discussões na literatura (CLAUW, 2018).

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Os dados epidemiológicos para a determinação da prevalência de FM são conflitantes e escassos, isso se deve às diferenças regionais, as sintomatologias e aos critérios diagnósticos (WOLFE, et al 2013). A FM é uma síndrome comum, que ocorre em todas as populações do mundo, com frequência mundial de 2 a 5%. Acomete, preferencialmente, mulheres em uma proporção de 7:1 (WOLFE, et al 2011 ; JONES, et al 2015).

A incidência de casos de FM foi de 6,88 casos por 1.000 pessoas para homens e 11,28 casos por 1.000 pessoas para mulheres. A prevalência de pessoas diagnosticadas com FM é de 2-4% relatada em estudos de epidemiologia populacionais (QUEIROZ, 2013).

No Brasil, o estudo populacional indicou prevalência de 2,5% de indivíduos diagnosticados com FM, com grande proporção de mulheres nesta população (12: 1) (SENNA, et al 2004), sendo destes, a maioria de meia idade

(40-60 anos). Comumente, a prevalência de indivíduos acometidos com FM aumenta proporcionalmente com o envelhecimento (HAUSER, 2015).

1.2 ETIOLOGIA

Atualmente são muitas as lacunas existentes acerca da etiologia, patogênese e fatores progressivos relacionados à FM. Parte desta questão relaciona-se aos critérios diagnósticos que são essencialmente clínicos e por se tratar de uma síndrome multifatorial (CLAUW, 2009; BRADLEY, 2009).

Ao longo da década de 80 e meados da década de 90, diferentes grupos de pesquisadores buscavam teorias que pudessem explicar as possíveis origens da FM, associado ao fato de que se acreditava que seu início fosse gerado por danos ao tecido muscular. Neste contexto Simms (1998) realizou estudo com biopsias musculares, análise histológica e investigação metabólica e concluiu que não há alterações e correlação entre indivíduos controles e pacientes fibromiálgicos, descartando assim a hipótese de que a dor poderia ser proveniente das alterações musculares.

Ainda, Russell e seus colaboradores (1994) realizaram análise dos níveis de substância P (SP) – neurotransmissor excitatório – no fluido cerebrospinal de pacientes com FM e demonstrou aumento dos níveis de SP quando comparado ao grupo controle, estando relacionado ao surgimento da sintomatologia dolorosa.

Assim, a proposta mais aceita para explicar a fisiopatologia da FM é a sensibilização do SNC aos estímulos nociceptivos, que pode ser dividida em três etapas: i) aumento dos impulsos nociceptivos periféricos aferentes ao SNC, ii) modulação alterada da dor no encéfalo e iii) diminuição da ação dos sistemas antinociceptivos descendentes (SCHNEIDER; BRADY 2001).

Mease e seus colaboradores (2005) realizaram revisão da literatura, a qual demonstrou redução de aminas biogênicas tais como serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA), aumento de neurotransmissores excitatório (substância P) e desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em pacientes com FM. A 5-HT exerce papel na regulação do sono e sua alteração sistêmica está associada à depressão e ansiedade, sintomas frequentes nesses pacientes.

A desregulação do eixo HPA, é evidenciada por níveis basais elevados de hormônios adrenocorticotróficos (ACTH) e hormônios folículos estimulantes (FSH) associado à diminuição de fator de crescimento insulínico (IGF-1), de hormônio de crescimento (GH), estrógeno, cortisol urinário, dentre outros (MEASE, 2005). Todas estas alterações endócrinas podem, por sua vez, estar relacionadas à diminuição de 5-HT que sabidamente influencia a secreção hormonal, e não à alteração primária da hipófise ou glândulas endócrinas periféricas (NEECK; CROFFORD 2000; MEASE, 2005).

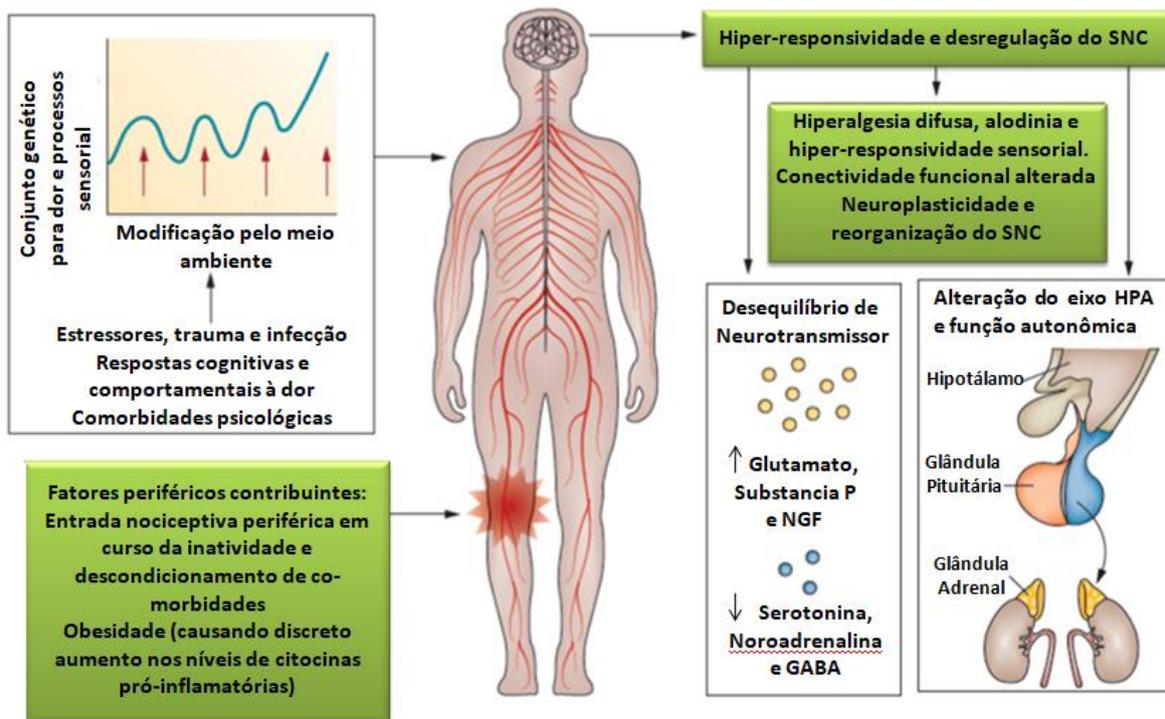


Figura 2: Potenciais processos fisiopatológicos da FM. (Fonte: Adaptado pela autora a partir de Hauser, 2015).

Hauser e seus colaboradores (2015) em uma revisão da literatura mostraram que a sensibilização do sistema nervoso central (SNC) tem sido sugerida como uma das principais alterações fisiopatológicas subjacentes à fibromialgia. O conjunto genético para regulação sensorial (incluindo a dor) pode ser modificada por fatores psicológicos, tais como ansiedade, depressão e catastrofização e estresse biopsicossocial (por exemplo, trauma, adversidades na infância, grandes eventos de vida ou infecções). Fatores periféricos, como a entrada nociceptiva contínua produzida por co-morbidades, também podem afetar a patogênese. No SNC, várias alterações podem ser observadas, incluindo desequilíbrios de neurotransmissores, conectividade

funcional alterada e alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que influenciam o sistema autonômico. Setas vermelhas representam estressores. GABA, ácido γ -aminobutírico; NGF, fator de crescimento nervoso (Figura 2).

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A FM cursa com diferentes manifestações sistêmicas (Figura 3), sendo a principal delas a dor muscular generalizada em pontos anatomicamente pré-determinados, os chamados *tender points* (TP). Os TP são parte essencial para o diagnóstico clínico dos pacientes com FM (KESKINDAG; KARAAZIZ, 2017; CLAUW, 2015).

Sabe-se que 80% dos pacientes com essa condição apresentam fadiga e distúrbios do sono. A fadiga é mais intensa pela manhã, costuma ser exacerbada por mínimo esforço físico e pode-se tornar incapacitante. Ainda é descrito na literatura uma possível relação das alterações neuronais com os eixos endócrinos no desenvolvimento da fadiga (JAY; BARKIN, 2015). Os distúrbios do sono caracterizam-se pela dificuldade de atingir o sono REM, considerado o sono restaurador (CHOY, 2015).

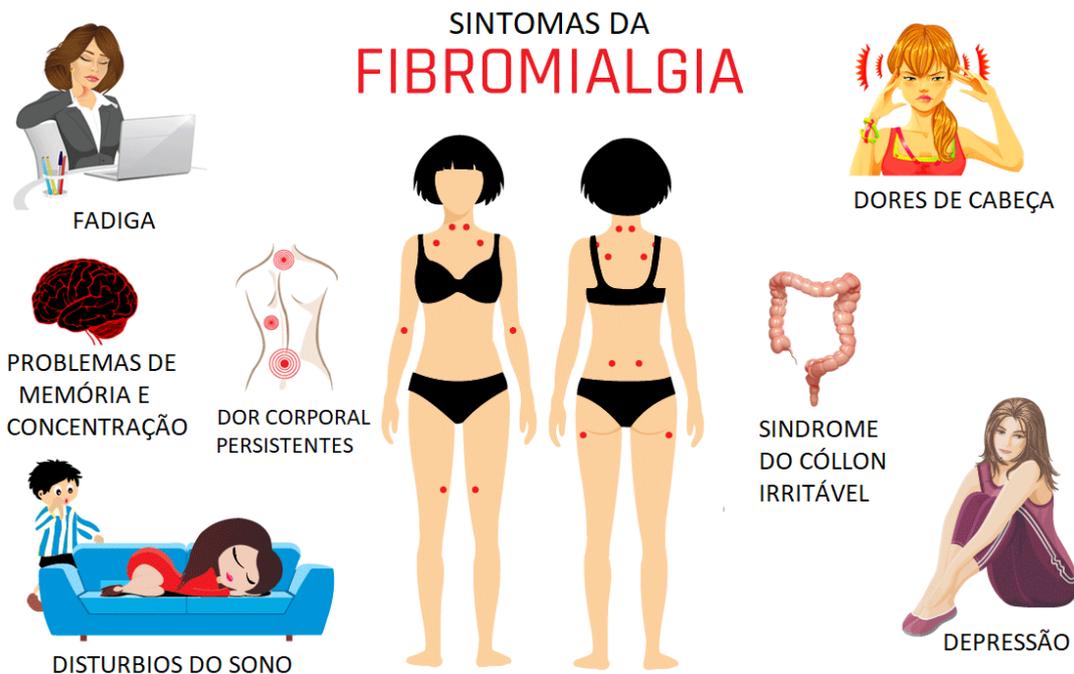


Figura 3 – Sintomas da Fibromialgia (Ilustração adaptada pela autora a partir de Top 10 Home Remedies, 2017).

Outros sintomas presentes no pacientes com FM são a rigidez muscular e articular; sensação de edema nas mãos; fenômeno de Raynaud; xerostomia (deficiência de salivação); síndrome do cólon irritável; tonturas; síndrome das pernas inquietas; precordialgia atípica e taquicardia, as quais acometem de 20% a 70% dos pacientes fibromiálgicos (CLAUW, 2015; HEYMANN et al, 2017). A disfunção têmporo-mandibular atinge uma proporção de 75% dos pacientes, enquanto a cefaléia uma proporção de 76% dos pacientes. Alterações do humor são observadas em até 70% dos indivíduos e a depressão ocorre em 30% do casos (HEYMANN et al, 2017).

1.4 MODELOS EXPERIMENTAL DE FM

Os modelos animais foram desenvolvidos para proporcionar uma melhor compreensão da neurobiologia da dor crônica generalizada, relacionado a FM. A fim de mimetizar esses sinais e sintomas é descrito na literatura modelos de lesão nervosa, carga de estresse como nado forçado e injeções como carregenina, reserpina ou salina ácida. Entretanto, o modelo mais comumente aceito na literatura é caracterizado por danos repetidos o músculo (TAGUCHI et al., 2015; QUINTAS-JUNIOR, 2015).

Sluka e seus colaboradores (2001) desenvolveram o modelo experimental de FM, através da administração de duas injeções intramusculares (i.m) de solução salina ácida (Figura 4), o qual produz aumento na excitabilidade do SNC e na liberação de glutamato na medula espinhal e no tronco cerebral. Conseqüentemente, esses aumentos induzem a hiperalgesia mecânica difusa duradoura sem distúrbios motores ou danos significativos nos tecidos. A hiperalgesia produzida neste modelo depende do pH e do tempo (dias) entre a administração da solução ácida. Comumente, a resposta álgica persiste por quatro semanas nos roedores (DE SANTANA et al, 2013; Oliveira et al 2012).

1.5. TERAPIAS FARMACOLÓGICAS NO TRATAMENTO DA FM:

O tratamento farmacológico da FM objetiva o alívio dos sintomas associados à doença, muito embora não apresente capacidade de tratar a

fisiopatologia da FM (SAWADDIRUK et al., 2017; CLAUW,2009). Ainda, por se tratar de uma síndrome multifatorial e com manifestações sistêmicas algumas classes de medicamentos utilizadas para controlar os sintomas incluem:

a) Antidepressivos tricíclicos:

Os antidepressivos tricíclicos foram os primeiros fármacos utilizados no controle da FM, especialmente o cloridrato de amitriptilina, através do bloqueio da recaptação de 5-HT e NA, aumentando a disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica, gerando assim, redução da sinalização dolorosa (JAY; BARKIN, 2015; CLAUW, 2014).

b) Inibidores seletivos de recaptação de 5-HT (ISRSs):

Os agentes seletivos para recaptação de 5-HT, apesar de não reduzirem as respostas álgicas nos pacientes com FM, auxiliam no controle dos sintomas emocionais e distúrbios do sono. Comumente, os ISRSs exercem suas ações inibindo de forma relativamente seletiva a captação de 5-HTe promovendo inibição no transportador dependente de Na⁺ e K⁺ adenosina trifosfatase (ATPase) na fenda pré-sináptica e conseqüentemente,aumentando a disponibilidade do neurotransmissor na região somatodendrítica (ABLIN; HAUSER, 2016; NAGAKURA, 2015).

c) Inibidores de recaptação 5-HT e NA (ISRSNs)

Na busca por maior eficácia clínica e redução dos efeitos colaterais, outros estudos têm focado no uso dos inibidores seletivos da recaptação de 5-HT e NA, como alternativa terapêutica no tratamento da FM (JAY; BARKIN, 2015; SMITH; BARKIN, 2010).

d) Outras classes de fármacos:

Fármacos opióides, como tramadol demonstrou eficácia clínica em paciente da FM, sendo indicado especialmente no início do tratamento, antes da inserção dos fármacos antidepressivos – os quais apresentam eficácia clínica percebida tardia. Ainda os relaxantes musculares, anticonvulsivantes, sedativos e indutores do sono são usados para promover controle dos sintomas e melhorar a qualidade de vida de pacientes com FM (SAWADDIRUK et al., 2017; JAY; BARKIN, 2015).

1.6 GALATO DE ETILA

O galato de etila (GE) é um composto fenólico derivado do ácido gálico encontrado naturalmente em grande número de espécies, entre as quais se destacam: *Phyllanthus urinaria*, *Pistacia integerrima*, *Alchornea trewioide* e *Hamamelis virginiana*. Além disso, o GE (Figura 4) pode ser encontrado em concentrações em produtos naturais como a uva vermelha, o vinho tinto e castanha between (CLIFFORD et al., 1996; COELHO, 2014).

Murase e seus colaboradores (1999) demonstraram que alguns ésteres do ácido gálico, em especial o GE foram capazes de suprimir a expressão de moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1, e selectina E) induzidas pela IL-1a e pelo TNF-a em culturas de células endoteliais obtidas de cordão umbilical humano. Além disso, os autores demonstraram que o GE foi capaz de inibir a translocação do fator nuclear kappa B induzido pelas citocinas, levando assim à diminuição da expressão de moléculas de adesão e, conseqüentemente, à redução da adesão leucócitaria. (SANTOS, 2000; MURASE et al, 1999).

Corroborando com os estudos anteriores (CECHINEL FILHO, et al,1996; COELHO, 2014, SANTOS, et al, 1999), demonstram que o GE inibiu a hiperalgesia induzida pela injeção de bradicinina e substância P em ratos, corroborando assim com os estudos anteriores, os quais demonstraram o efeito analgésico do GE no modelo de dor após a administração de ácido acético em camundongos

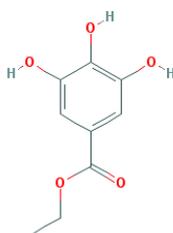


Figura 4. Estrutura molecular do galato de etila (Fonte: Pubchem, 2018).

Nesses mesmos estudos, os autores propõem que os efeitos antinociceptivos do GE envolvem a ativação de canais de potássio operados por baixa e alta condutância de cálcio, canais de potássio sensíveis ao ATP e ativação da proteína Gi (SANTOS et al., 1999). Assim, os dados descritos até o

momento na literatura indicam que o GE possui importante efeito farmacológico e a sua eficácia está associada a modulação dos canais de potássio, a qual poderia explicar em parte, o seu mecanismo analgésico nos modelos experimentais de hiperalgesia (CECHINEL FILHO et al., 1996; SANTOS et al., 1999).

2. JUSTIFICATIVA

A FM é uma doença altamente incapacitante que afeta a qualidade de vida dos indivíduos induzindo prejuízos pessoais, sociais e econômicos. Dessa forma faz-se necessário a busca por novas terapias, já que os fármacos atualmente disponíveis não são eficazes para inibir a progressão da doença, além de induzirem importantes efeitos adversos ao organismo e possuírem elevado custo aos sistemas de saúde. Ainda, até o presente momento, não existem dados na literatura que demonstraram o efeito antinociceptivo do GE em modelos animais de dor crônica, tal como a FM. Assim, o objetivo principal desse estudo será caracterizar o efeito antinociceptivo do GE no modelo experimental de FM após a administração repetida de salina ácida (pH=4) no músculo gastrocnêmio dos camundongos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antinociceptivo do galato de etila no modelo experimental de FM em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar o efeito do GE durante o desenvolvimento da FM;
- 2) Avaliar o efeito nociceptivo do GE no controle da dor gerada pelo modelo experimental de FM.
- 3) Avaliar a participação de diferentes vias de sinalização celular periféricas e centrais – opióides, adenosinérgicas, cininérgicas e quinases – no efeito induzido pelo GE durante o modelo experimental de FM.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS E INDUÇÃO DA FM

Os protocolos experimentais (Figura 5) foram realizados em camundongos fêmeas da linhagem Swiss (25-30g), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Centro de Ciências, Tecnologias e Saúde – Campus Araranguá – UFSC. Os camundongos serão mantidos no biotério setorial em gaiolas sobre temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade (50-70%), ciclo de 12 horas claro-escuro, com livre acesso a água e ração. Para o referido protocolo será utilizado 24 animais subdividido em quatro grupos, sendo eles: naive, controle positivo, tratamento preventivo e tratamento terapêutico. Os procedimentos utilizados neste estudo encontram-se aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFSC (CEUA nº 2572210218).

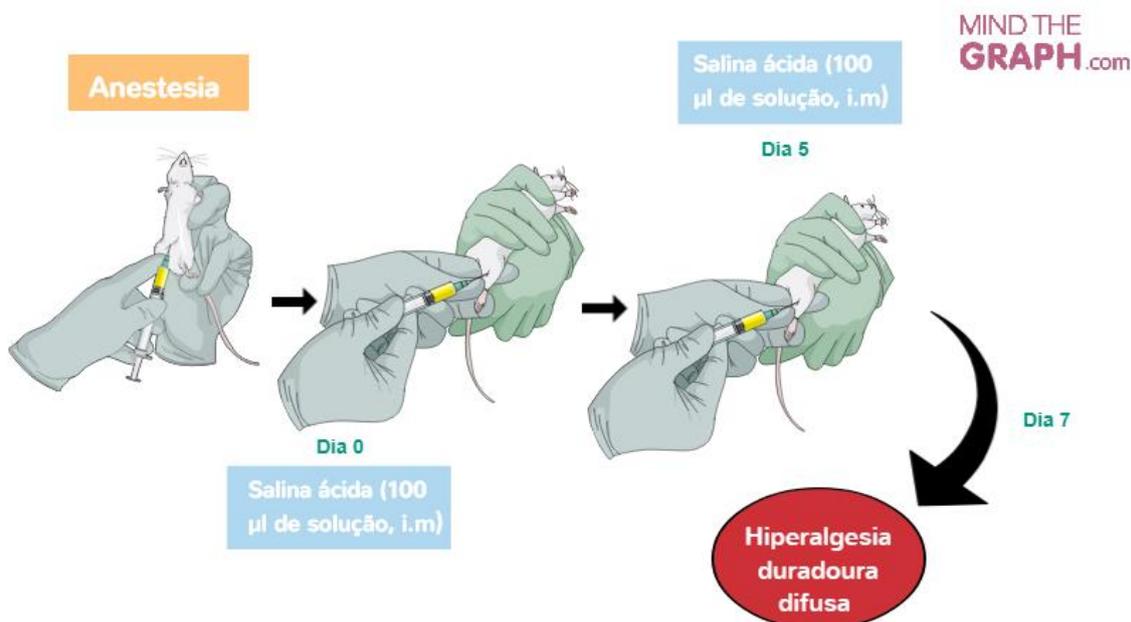


Figura 5 – Protocolo de indução da CWP. (Fonte: Elaborada pela autora a partir de Sluka, 2001)

A FM foi induzida através do modelo de dor crônica generalizada não inflamatória (CWP), através da administração de salina ácida no músculo gastrocnêmio. O protocolo consiste na aplicação de duas injeções de solução salina ácida (pH = 4,0 em 100 µl de solução, i.m.), aplicadas no dia zero e no

dia cinco, respectivamente, no músculo gastrocnêmio. Para execução do referido protocolo, os animais serão anestesiados com barbitúrico + anestésico local (pentobarbital 50 mg/kg + lidocaína 10 mg/ml, i.p.) e posteriormente será realizada a tricotomia na região do músculo gastrocnêmio direito para a injeção da solução salina ácida, conforme previamente demonstrado por Sluka e seus colaboradores, 2001.

4.2. PROTOCOLO DE TRATAMENTO

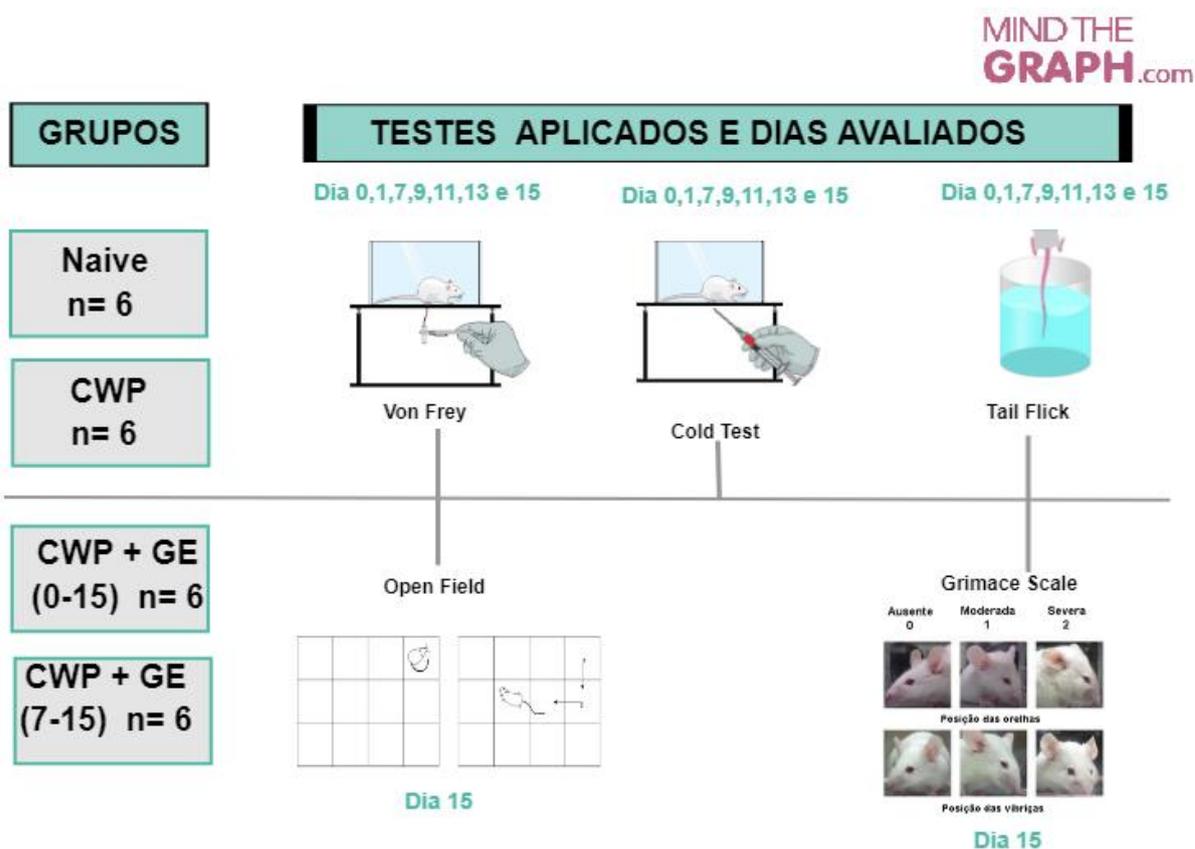


Figura 6. Protocolo experimental. (Fonte: Autora, 2018)

A fim de avaliar o efeito do GE no modelo experimental de FM, os animais foram divididos em quatro grupos, sendo eles: naive, controle positivo, tratamento terapêutico e tratamento preventivo. Os dias atribuídos à indução, tratamento e avaliação da hiperalgesia, bem como da atividade locomotora encontram-se descritos na Figura 6. A escolha das doses para cada droga foi baseada em experimentos pilotos ou em trabalhos prévios (Coelho, 2014). Os camundongos receberão duas injeções de salina ácida intramuscular – e o tratamento será realizado com GE (100 mg/kg, v.o – gavage). Os animais serão tratados uma vez ao dia, durante os 15 dias após a indução (tratamento

preventivo) e após o surgimento dos sintomas (dia 5 – 15; tratamento terapêutico) e serão avaliados nos dias 7, 9, 11, 13 e 15 pós-salina ácida.

4.3. AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA

4.3.1. HIPERSENSIBILIDADE MECÂNICA

A hiperalgesia mecânica foi avaliada conforme descrito anteriormente (BORTALANZA et al., 2002). Os animais foram aclimatados em caixas acrílicas individuais (9x9x8 cm) em plataforma elevada de assoalho aramado (Figura 4A), permitindo acesso à superfície ventral das patas. A resposta ao estímulo mecânico será efetuada da seguinte maneira: filamento de Von Frey com carga de 0,6 g será aplicado perpendicularmente na superfície ventral da pata posterior direita dos animais (região proximal aos dedos, conforme ilustra a Figura 7), sendo mantido por 3 segundos e a aplicação será repetida 10 vezes, com intervalo de 1 minuto entre elas. A pressão aplicada deverá ser suficiente para promover a curvatura do filamento utilizado. A resposta será considerada positiva quando, após o estímulo com o filamento, o animal retirar completamente a pata da grade metálica. O resultado será expresso como a porcentagem de retirada da pata frente ao estímulo mecânico. As avaliações ocorreram no dia 0, 7, 9, 11, 13 e 15.

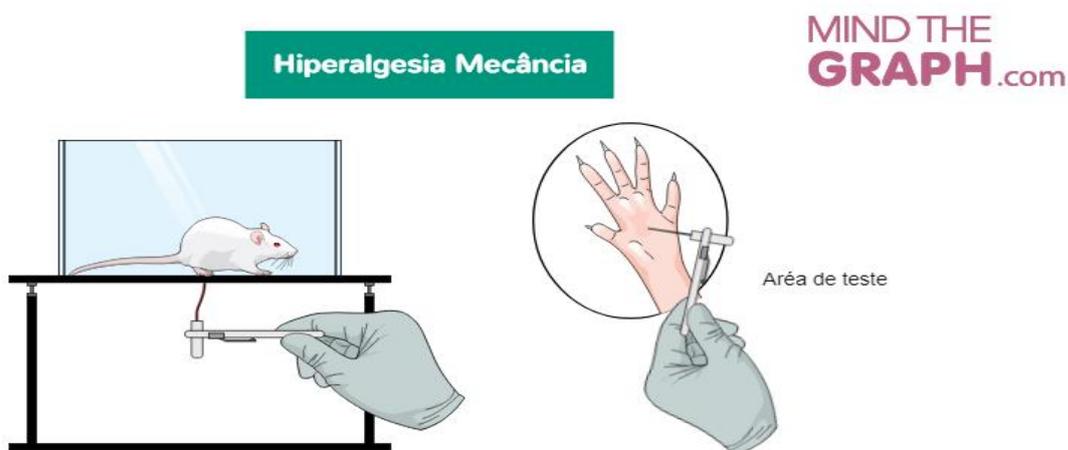


Figura 7. Teste de hiperalgesia mecânica (Von Frey). Fonte: Elaborada pela autora a partir de Bortalanza et al, 2002.

4.3.2. HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO FRIO

A hiperalgesia ao frio é avaliada conforme o método descrito previamente (FLATTERS; BENNETT, 2004), com pequenas modificações. Os animais foram aclimatados em caixas acrílicas individuais (9x9x8 cm) em plataforma elevada de assoalho aramado (Figura 8), permitindo acesso à superfície ventral das patas, e 20 μ L de acetona será sutilmente instilado na superfície ventral da pata posterior direita. A resposta comportamental será avaliada durante 30 s e registrada em escores: 0 – nenhuma resposta; 1 – rápida retirada ou movimento brusco da pata; 2 – retirada prolongada ou agitação repetida da pata; 3 – agitação repetida seguida de lambida da pata. A aplicação de acetona será repetida três vezes, em intervalos de cinco minutos, e a soma dos escores serão utilizadas para as análises estatísticas. As avaliações ocorreram no dia 0, 7, 9, 11, 13 e 15.

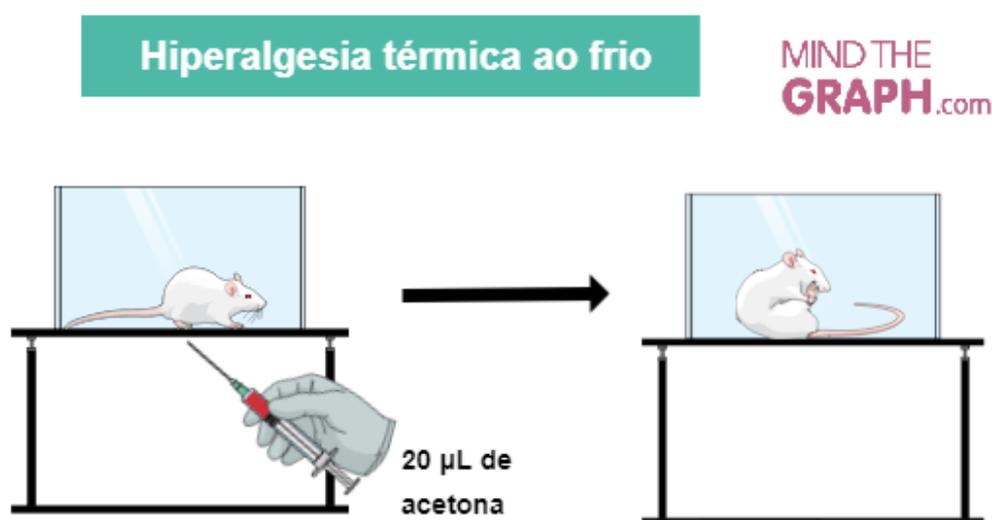


Figura 8. Teste de hiperalgesia térmica ao frio (Cold Test). Fonte: Elaborada pela autora a partir de Flatters; Bennett, 2004.

4.3.3 HIPERSENSIBILIDADE TÉRMICA AO CALOR

A avaliação da hiperalgesia térmica ao calor foi realizada pelo teste de *tail-flick* ou retirada da cauda descrito por Hardy (1953), com algumas adaptações. Os animais tem as pontas das caudas imersas em água aquecida a 50 °C e será cronometrado o tempo de latência do animal para retirar a cauda após a aplicação do estímulo térmico. O tempo de 10 s será determinado como *cut-off*, a fim de evitar possíveis lesões nas caudas dos

animais. Serão realizadas três medidas do tempo de resposta, as quais foram registradas em intervalos de 5 minutos. As avaliações ocorreram no dia 7, 9, 11, 13 e 15.

4.3.4. ESCALA DE GRIMACE

A avaliação de dor espontânea foi realizada através do *Grimace scale*, conforme descrito por Langford e colaboradores 2010, com algumas adaptações. A escala avalia subjetivamente a intensidade da dor, através das expressões faciais dos animais. Resumidamente, os camundongos serão mantidos dentro de recipiente acrílico (9 x 5 x 5 cm) e permanecerão por 45 minutos até que estejam ambientados. Em seguida será registrada uma foto de perfil e de frente, com posterior avaliação dos seguintes parâmetros (Figura 9): estreitamento dos olhos, arqueamento do nariz, arqueamento das bochechas, posição das orelhas e posição das vibrissas. Os parâmetros acima citados serão avaliados a partir do escore: 0 (ausente), 1 (dor moderada) e 2 (dor severa), e o resultado final se dará através da soma de todos os parâmetros. As avaliações ocorreram no dia 15





Figura 9 – Escala de avaliação da dor espontânea (Grimace Scale). Fonte: LANFORD, 2010.

4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

4.4.1 TESTE DE CAMPO ABERTO

Esse teste permite avaliar os efeitos da substância teste na atividade exploratória dos roedores e avaliação do comportamento motor dos animais. A locomoção dos animais foi avaliada conforme descrito previamente (RODRIGUES et al., 1996). O teste é realizado em caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm, na qual a base é dividida em 12 quadrados iguais. Assim, o número de quadrados cruzados com as quatro patas será contado em uma sessão que terá a duração de 6 minutos, assim como o número de elevações verticais (Figura 10). As avaliações ocorreram no dia 15.

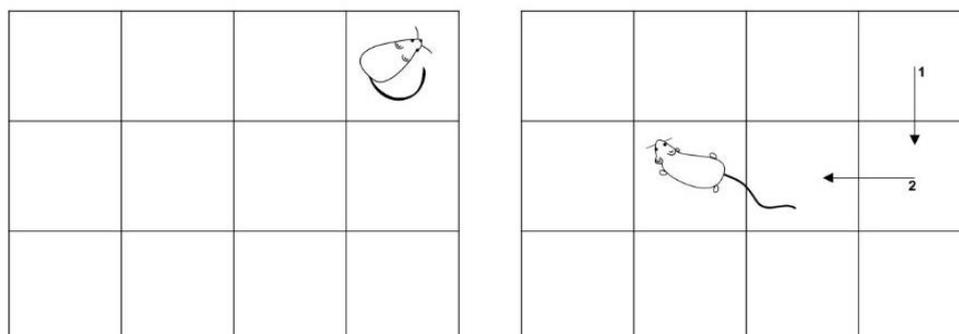


Figura 10 – Teste do campo aberto demonstrando o número de cruzamentos realizados pelos animais. Fonte: Adaptada pela autora a partir de COLLA, 2015.

5. MÉTODO DE EUTANÁSIA

Após as análises macroscópicas, o desfecho será a eutanásia com superdosagem de barbitúrico + anestésico local (pentobarbital 250 mg/kg + lidocaína 10 mg/ml, i.p.), conforme Resolução Normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013 - Diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal – CONCEA, 2013. Posteriormente, foram coletadas amostras de tecido do músculo gastrocnêmio (ambos aproximadamente 1 cm² de tecido) e medula espinhal (todas as porções – cervical a sacral), posteriormente serão armazenada em freezer -20°C até a análise bioquímicas ou homogeneizadas em tampão adequado, de acordo com as metodologias abaixo.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média +/- erro padrão da média (EPM). A avaliação estatística dos resultados será realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, adequadas ao protocolo experimental. Posteriormente, os grupos serão comparados entre si empregando-se o teste *post hoc* de *Student* ou *Newman-Keuls*. Valores de P menores a 0,05 ($p < 0,05$) serão considerados estatisticamente significantes. As análises estatísticas serão realizadas usando o software *Graphpad Prism 6* (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA)

7. RESULTADOS

O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito antinociceptivo do GE aplicados por via oral antes e após o 7º dia pós indução da fibromialgia (CWP). O referido estudo foi realizado com 28 camundongos da linhagem Swiss, machos, com idade de aproximadamente 90 dias e massa corporal de 43 gramas em média, as quais foram divididos de forma randomizada conforme segue: I) Naive (n=6); CWP: (n=6); CWP + GE (100mg/kg. v.o 0-15 dias) n=6 ; CWP + GE (100mg/kg. v.o 7-15 dias) n=6. Os animais foram submetidos a testes antinociceptivos sendo eles: Von Frey, Cold Test, Tail Flick e Grimace Scale. Também foram submetidos a teste de avaliação da atividade locomotora: Open Field.

7.1 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO GALATO DE ETILA NA HIPERSALGESIA MECÂNICA APÓS INDUÇÃO DO MODELO DE EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA

A fim de avaliar o efeito antinociceptivo do GE no modelo da CWP, foi utilizado dois protocolos diferentes: 1) a fase de indução da doença (tratamento preventivo) e 2) durante a fase crônica da CWP (tratamento terapêutico, no qual foi avaliado o efeito do GE, após o surgimento dos sintomas típicos da CWP). Interessantemente, o resultado apresentado na Figura 11 mostra que no momento da indução (basal) e um dia após a indução os animais não apresentam aumento na frequência de resposta uma vez que os sinais característicos do modelo ainda não teriam se manifestados, já no dia 7 pode-se observar que houve um aumento na frequência de resposta ($p < 0,01$) dos animais do grupo fibromialgia quando comparado ao controle. Nos dias 7^o, 9^o, 11^o, 13^o e 15^o observam-se que tanto o tratamento preventivo quando o terapêutico com GE (100 mg/kg, v.o) foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,001$) a frequência de resposta a hiperalgesia mecânica induzida pela FM entre a 1^a-4^a hora após administração. (Figura 11).

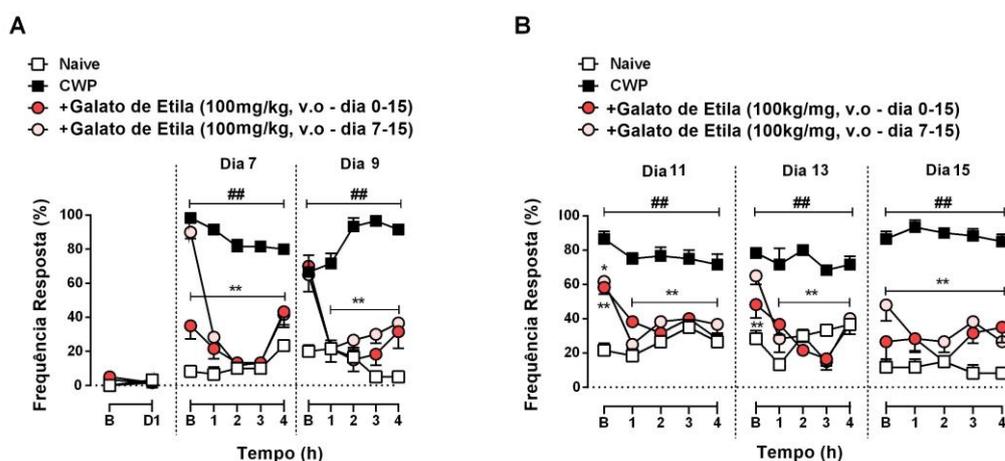
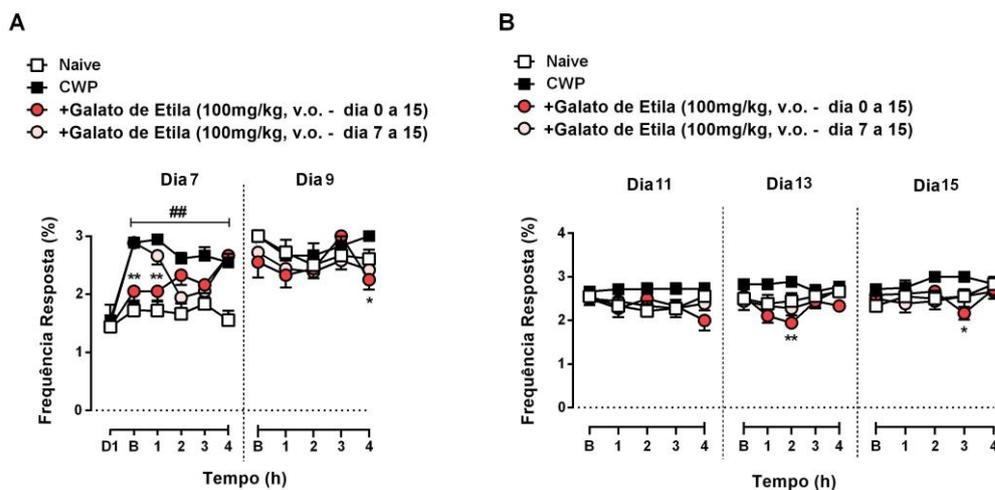


Figura 11: Efeitos antinociceptivos da aplicação sistêmica do galato de etila (GE) sobre a hiperalgesia mecânica no modelo experimental de fibromialgia. A hipersensibilidade mecânica foi avaliada antes (basal, B) e no 1^o (D1), 7, 9, 11, 13 e 15 (de 1 a 4 horas) dia após o início da dor generalizada crônica (solução salina ácida, pH = 4,0, 20 µl no músculo gastrocnêmio direito). Os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: (1) Naive, (2) Dor difusa não inflamatória crônica (CWP), (3) CWP + GE (100 mg / kg, v.o, do dia 0 ao dia 15) e (4) CWP + GE (100 mg / kg, v.o, do dia 7 ao 15). Os dados são apresentados como média ± EPM de seis camundongos / grupo, onde ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo naive. ** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo CWP (one-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

7.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO GALATO DE ETILA NA HIPERSALGESIA TÉRMICA AO FRIO APÓS INDUÇÃO DO MODELO DE EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA

No teste de hiperalgesia térmica ao frio, pode se observar uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre o grupo controle e o grupo fibromialgia. Quando comparado o grupo fibromialgia aos grupos tratados observa-se uma diferença significativa ($p < 0,001$) no dia 7, essa diferença foi observada na medida basal e uma hora após a administração da droga. No dia 9 houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo fibromialgia e grupo tratado com GE apenas na quarta hora após administração. No dia 11 não foi observado diferença estatísticas. No dia 13 pode-se analisar essa diferença significativa ($p < 0,001$) na segunda hora após a administração. E no dia 15 por sua vez a diferença estatística ($p < 0,05$) foi observada na terceira hora. (Figura 12)



Figur

a 12: Efeitos antinociceptivos da aplicação sistêmica do galato de etila (GE) sobre a hiperalgesia térmica ao frio no modelo experimental de fibromialgia. A hipersensibilidade térmica ao frio foi avaliada antes (basal, B) e no 1º (D1), 7, 9, 11, 13 e 15 (de 1 a 4 horas) dia após o início da dor crônica generalizada (solução salina ácida, pH = 4,0, 20 µl no músculo gastrocnêmio direito). Os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: (1) Naive, (2) Dor difusa não inflamatória crônica (CWP), (3) CWP + GE (100 mg / kg, v.o, do dia 0 ao dia 15) e (4) CWP + GE (100 mg / kg, v.o, do dia 7 ao 15). Os dados são apresentados como média ± EPM de seis camundongos / grupo, onde ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo ingênuo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo CWP (one-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

7.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO GALATO DE ETILA NA HIPERSALGESIA TÉRMICA AO CALOR APÓS INDUÇÃO DO MODELO DE EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA

A figura 13 apresenta os resultados do teste de hiperalgesia térmica ao calor (Tail Flick) é notável tanto o tratamento preventivo como o terapêutico apresenta uma tendência de aumentar o tempo de permanência do animal com a calda imersa em água aquecida, porém esse aumento não foi estatisticamente significativa. Apenas no dia 15 houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado o grupo fibromialgia com ambos os tratamentos.

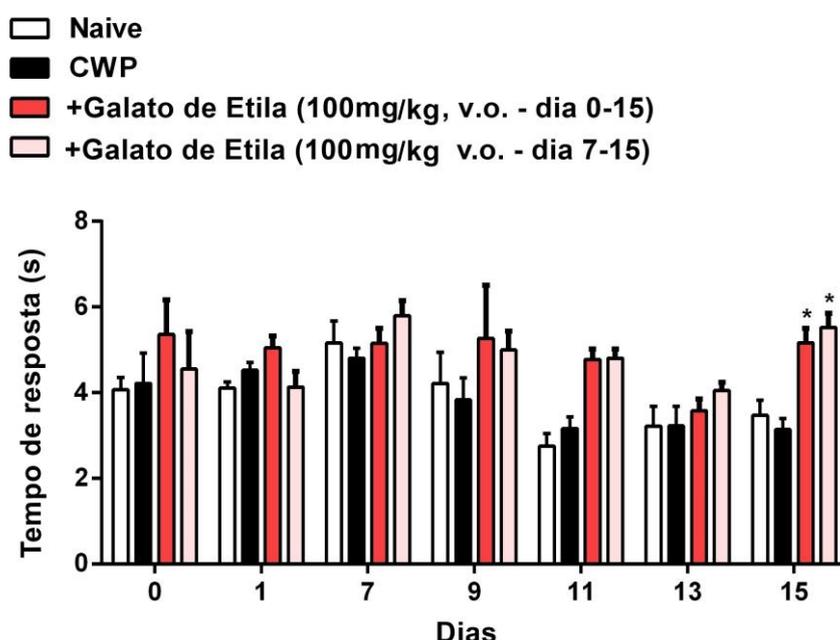


Figura 13: Efeitos antinociceptivos da aplicação sistêmica do galato de etila (GE) sobre a hiperalgesia térmica ao calor no modelo experimental de fibromialgia. A hipersensibilidade térmica ao calor foi avaliada antes (baseline, 0) e no 1º (D1), 7, 9, 11, 13 e 15 (de 1 a 4 horas) dia após o início da dor crônica generalizada (solução salina ácida, pH = 4,0, 20 µl no músculo gastrocnêmio direito). Os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: (1) Naive, (2) Dor difusa não inflamatória crônica (CWP), (3) CWP + GE (100 mg / kg, v.o, do dia 0 ao dia 15) e (4) CWP + GE (100 mg / kg, v.o, do dia 7 ao 15). Os dados são apresentados como média ± EPM de seis camundongos / grupo, onde ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo naive. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo CWP (one-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

7.4 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO GALATO DE ETILA NA ESCALA DE EXPRESSÃO FACIAL APÓS INDUÇÃO DO MODELO DE EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA

Na figura 14 pode-se observar que no dia 15 os animais que apresentavam fibromialgia se comparado os controles possuíam uma diferença estatística ($p > 0,01$) na escala de expressão facial de dor. Nota-se ainda que o GE foi capaz de reduzir de forma significativa ($p > 0,001$) a dor induzida pelo modelo de FM.

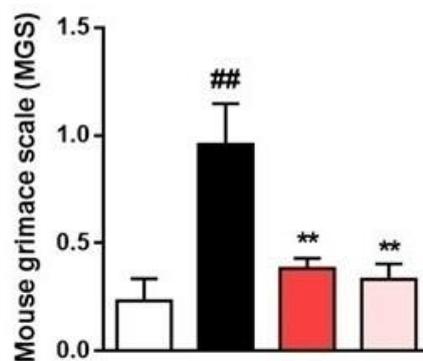
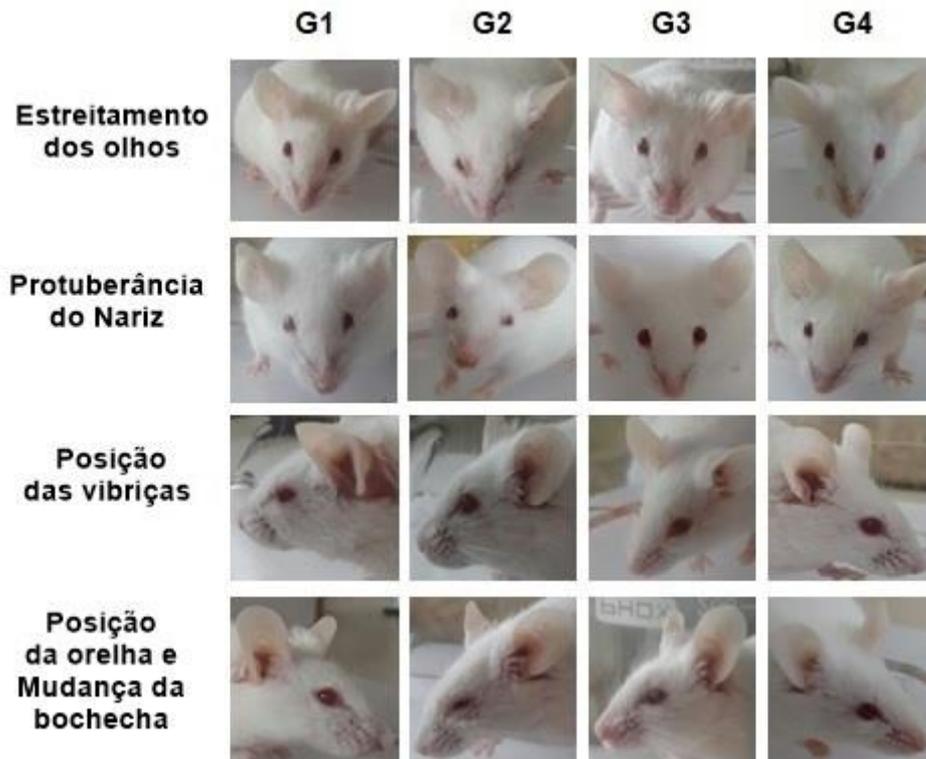


Figura 14: Efeitos antinociceptivos da aplicação sistêmica do galato de etila (GE) sobre a escala de expressão facial no modelo experimental de fibromialgia. As imagens

representativas de unidades de ação analisadas como parte da escala de expressão facial de camundongos (MGS) - 0 a 2 (aperto orbital, protuberância no nariz, mudança de bigode, posição da orelha e protuberância da bochecha). Média dos escores de diferença de MGS calculada a partir de: (1) Naïve, (2) Dor generalizada não inflamatória crônica (CWP), (3) CWP + GE (100 mg / kg, po, do dia 0 ao dia 15) e (4) CWP + GE (100 mg / kg, po, do dia 7 ao 15). Aumentos significativos nos escores de MGS foram observados nos dias 15 após o modelo de fibromialgia do mouse. Os dados são apresentados como média \pm EPM de seis camundongos / grupo, onde ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo ingênuo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo CWP (one-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

7.5 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DO GALATO DE ETILA NA ATIVIDADE LOCOMOTORA APÓS INDUÇÃO DO MODELO DE EXPERIMENTAL DE FIBROMIALGIA

O GE administrado por via oral, não interferiu no desempenho locomotor dos animais, no que diz relação ao número de quadrantes explorados pelos animais (Figura 15A) e nem na quantidade de vezes que o animal explorou as laterais da caixa (Figura 15B).

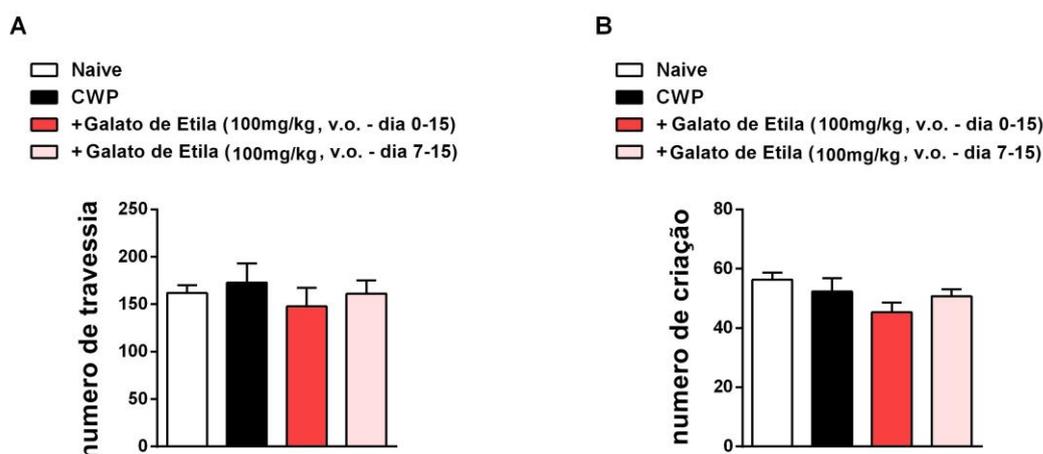


Figura 15: Efeitos da aplicação sistêmica do galato de etila (GE) sobre a atividade locomotora no modelo experimental de fibromialgia. Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: (1) Naïve, (2) Dor difusa não inflamatória crônica (CWP), (3) CWP + GE (100 mg / kg, v.o, do dia 0 ao dia 15) e (4) CWP + GE (100 mg / kg, v.o, do dia 7 ao 15). Quinze dias após os testes comportamentais do modelo CWP foram realizados: atividade locomotora no teste de campo aberto - (A) número de travessia e (B) número de elevações. Os dados são apresentados como média + SEM de seis camundongos / grupo.

8. DISCUSSÃO

A natureza generalizada da dor é uma característica clínica fundamental em indivíduos com FM e uma série de outros sintomas está associado a essa patologia. Fibromialgicos apresentam hiperalgesia difusa (aumento da dor a estímulos normalmente não dolorosos). Estas descobertas de dor aumentada e

processamento sensorial são corroborados pela presença desses mesmos fenômenos em estudos de neuroimagem funcional, e os desequilíbrios nos níveis de neurotransmissores que afetam a dor e transmissão sensorial estão presentes em indivíduos com FM (SCHMIDT-WILCKE e CLAUW, 2011; SLULA e CLAUW, 2016).

Até o presente momento muito se discute na literatura que a fibromialgia é uma doença multifatorial, sem evidencia de processo inflamatório e com dor de caráter crônico. Por outro lado, a partir dos estudos mencionados nesse trabalho, surge algumas idéias e hipóteses de que possa haver componentes inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da FM.

Estudos descritos na literatura indicam que vários mediadores químicos, como a substância P e o glutamato estão envolvidos na primeira fase (dor neurogênica), enquanto que a histamina, a serotonina, as prostaglandinas e a bradicinina participam da segunda fase (também chamada dor inflamatória) da dor induzida pela formalina (CORRÊA & CALIXTO, 1993; TJOlsen & HOLE, 1997; SANTOS, 2000).

Sabe-se que a IL-1 β também induz a liberação de substância-P e glutamato a partir dos terminais nervosos contribuindo para a transmissão da dor. Na dor aguda o glutamato liberado na fenda sináptica gera correntes excitatórias pós-sinápticas, isto ocorrendo a ativação de receptor glutamatérgico (BASBAUM et al., 2009; COELHO, 2014).

O TNF- α é a citocina inflamatória cuja principal função é regulação das células imunes, é capaz de induzir morte celular apoptótica, conseqüentemente induzir inflamação. Vários estudos mostram que o nível de TNF- α está aumentado em pacientes com síndrome da fadiga crônica. (MOSS et al, 1999 ; SACHDEVA, KUHAD, CHOPRA 2011).

A ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) são as enzimas chave envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico (AA), resultando na formação de importantes bio-mediadores, incluindo as prostaglandinas (PGs), prostaciclina e tromboxanos (MARNETT, 2000; KURUMBAIL, KIEFER, MARNETT 2001; MITCHELI, KISKBY, 2018). Uma vez que estes bio-mediadores afetam muitos processos patológicos e fisiológicos, a modulação

farmacológica da atividade catalítica das enzimas COX tornou-se uma estratégia eficaz no tratamento de certas condições médicas (FITZPATRICK, 2004; DUGGAN et al, 2010; MARNETT, 2004; BLOBAUM, MARNETT, 2007).

Os tratamentos farmacológicos para redução do quadro algico de pacientes com FM visam aumentar neurotransmissores antinociceptivo no sistema nervoso central, ou proporcionar níveis mais baixos de neurotransmissores excitatórios tais como o glutamato (HARRIS E CLAUW, 2012; SLULA e CLAUW, 2016).

No que diz respeito ao modelo experimental e os testes escolhidos para avaliar a dor nos animais pode-se observar que os nossos dados vão ao encontro de trabalhos prévios utilizando o mesmo modelo (Santos et al, 2016 ; Siqueira-lima et al. 2017; Oliveira et al. 2016) uma vez que o protocolo de indução da FM (induzido pela administração i.m de SA) foi capaz de causar hiperalgesia mecânica e térmica ao frio.

Murase e seus colaboradores (1999) conseguiram mostrar a partir de um estudo “in vitro” que ésteres do ácido gálico, como o GE, podem ter importantes efeitos antinociceptivo pelo bloqueio da ativação do NF-kB. Esse composto proveniente de varias espécies de planta, em especial da uva, poderia estar desempenhando um papel importante na prevenção da resposta inflamatória “in vivo”. Santos (2000) exemplifica outra particularidade interessante do GE, ele parece interagir com a proteína Gi sensível à toxina pertussis e com os canais de potássio ativados, tanto por cálcio, como por ATP. Contudo, estudos eletrofisiológicos adicionais e de biologia molecular são ainda necessários para a confirmação do preciso mecanismo de ação desse composto.

Assim como o GE a epigallocatequina galato (EGCG) é flavanóide derivado do ácido gálico ao qual possui inumeros estudos descritos na literatura demonstrando seu potencial terapeutico. Um estudo realizado na China mostrou que a EGCG (50 e 100 mg / kg) foi capaz de reduzir a hiperalgesia gerada por um modelo de fadiga crônica induzida por estresse. Nesse estudo os autores demonstraram que a EGCG foi capaz de diminuir significativamente o nível de TNF alfa quando comparação ao grupo controle

(MOSS et al, 1999; SACHDEVA, KUHAD, CHOPRA 2011). Nossos estudos também mostraram que o GE foi capaz de reduzir a hiperalgesia induzida pela salina ácida podendo assim supor que um possível mecanismo de ação do GE seria a redução de citocinas pró-inflamatórias tal como a TNF alfa.

Os nossos resultados mostraram que o GE conseguiu inibir de forma significativa a hiperalgesia mecânica induzida por salina ácida. Corroborando com COELHO, 2014 demonstrou que o GE induziu uma redução da frequência de resposta á hiperalgesia mecânica e térmica ao frio em um modelo de dor neuropática. Nesse mesmo estudo o autor evidencia uma redução nas citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6, IL-1 β e TNF- α , sendo plausível sugerir que o GE possa estar interferindo sobre a redução de citocinas pró-inflamatórias e em algum ponto da sinalização glutamatérgica. O que leva a crer e acreditar que nossos resultados possivelmente estejam corroborando para a idéia de que a FM pode ter envolvido em sua fisiopatologia alguns componentes inflamatórios.

Alguns trabalhos publicados previamente sugerem que o GE pode modular a nocicepção induzida pela ativação de receptores TRPV1 também em níveis centrais. Neste sentido, foi demonstrado o elevar a expressão do receptor TRPV1 no modelo de neuropatia diabética induzida por estreptozotocina e também sua co-expressão centralmente em neurônios positivos para substancia P. Neste sentido podemos relacionar um possível efeito do GE pela inibição ou modulação direta do receptor TRPV1 prevenindo a liberação de glutamato e substância-P. (COELHO, 2014; HONG; WILEY, 2005; HWANG; BURETTE; VALTSCHANOFF, 2003).

Wang e seus colaboradores (2018) demonstraram que o GE pode ativar a produção de prostaglandina E₂ (uma prostaglandina representante testada nesse estudo) e inativar a atividade das enzimas COX 1 e 2. Uma análise computacional foi realizada para indica que GE pode inativar os sítios de COX-1 e COX-2, servindo como um co-substrato de redução. Observou-se que o efeito de galato de etilo é anulada por galangina, que é conhecida por se ligar aos mesmos locais dos sítios ativos de COX-1 e COX-2, tornando-se um inibidor competitivo, consequentemente inibindo a ativação de outros

mediadores inflamatórios tais como a prostaglandina e tromboxano. Os resultados deste estudo apresentaram uma nova hipótese pró-inflamatória e efeitos benéficos para a saúde a partir das repercussões terapêuticos do GE (WANG et al, 2018).

Em resumo, nossos achados demonstraram que o GE reduziu a hiperalgesia clínica gerada pelo modelo de CWP. Contudo, baseada nos trabalhos previamente publicados é possível sugerir que o GE atua sobre células pró-inflamatórias e que por sua vez as mesmas estariam envolvidas no processamento ou desenvolvimento da FM, porém ainda são necessários estudos para elucidar os mecanismos moleculares relacionados aos efeitos terapêuticos induzido pelo GE.

8. CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos do presente estudo reforçam a idéia de que o GE possui potencial terapêutico para o controle da dor tanto de caráter aguda quanto crônica. Perante os diversos trabalhos aqui mencionados podemos sugerir que o GE tenha um efeito terapêutico através da modulação da transmissão sináptica (ex. reduzindo liberação de glutamato), inibindo a produção de citocinas e possivelmente controlando a excitabilidade neuronal por meio da abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP. Mais estudos são necessários para confirmar os mecanismos moleculares envolvido no efeito antinociceptivo do GE no modelo experimental de fibromialgia.

REFERÊNCIAS

ABLIN, Jacob N; HAUSER, Winfried. Fibromyalgia syndrome: novel therapeutic targets. **Journal Pain Management**. Alemanha, p. 1758-1869, 2016.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of Pain. **Cell** v. 139, n. 2, p. 267-84, out 2009.

BRADLEY, L.A. Pathophysiology of fibromyalgia. **American Journal of Medicine**, Alabama, p.1-13, 2009.

BLOBAUM, A.L.; MARNETT, L.J. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. **Journal of Medicine Chemistry**. p. 1425–1441, 2007.

BORTALANZA, L. B. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal of Pharmacology**, p. 203-8, 2002.

CECHINEL FILHO, V. et al. Chemical and pharmacological studies of *Phyllanthus caroliniensis* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. p. 1231-6, 1996.

CHOY, E. H. S.. The role of sleep in pain and fibromyalgia. **Nature Reviews Rheumatology**, Estados Unidos, p.513-520, 2015.

CLAUW, Daniel J. Fibromyalgia: update on mechanisms and management. **Journal of Clinical Rheumatology** Estados Unidos, p.102-109, 2007.

CLAUW, Daniel J et al. Normalizing fibromyalgia as a chronic illness. **Post Graduate Medical Journal**, Canada, p.01-10, 2018.

CLAUW, Daniel J, Fibromygia and Related Conditions. **Journal Mayo Clinic Proceedings**. Estados Unidos, p. 680-692, 2015.

CLAUW, Daniel J. Fibromyalgia A Clinical Review. **Clinical Review e Education**, Estados Unidos, p.1547-1555, 2014.

CLAUW, Daniel J. Fibromyalgia: An Overview. **The American Journal Of Medicine**, Estados Unidos, p.01-13, 2009.

CLIFFORD, A. J. et al. Delayed tumor onset in **transgenic mice fed an amino acid** based diet supplemented with red wine solids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, França, p. 748-756, 1996.

COELHO, Igor dos Santos. **Efeito terapêutico do galato de etila na nocicepção neuropática e induzida por alógenos em camundongos**. Tese (Mestrado) – Curso de Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

COLLA, André Roberto da Silva. **Efeito tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico do ácido ursólico em camundongos em diferentes modelos animais**. 2015. 168 f. Tese (Doutorado) - Curso de Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CORREA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **110: 193-198, 1993**.

DESANTANA, Josimari M; CRUZ, Kamilla MI da; A SLUKA, Kathleen. **Animal models of fibromyalgia**. **Arthritis Research & Therapy**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.222-235, 2013.

DUGGAN, K.C. et al, Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. **The Journal of Biological Chemistry** 2010,

FERRIER, Jeremy et al. Assessment of Mechanical Allodynia in Rats Using the Electronic Von Frey Test. **Bio Protocol**, França, p.01-06, 2016.

FLATTERS, S. J.; BENNETT, G. J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, p. 150-161, 2004.

FITZPATRICK, F.A. Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. **Current Pharmaceut Design**, p. 577–588. 2004,

HARDY, J.D. Threshold of pain and reflex contraction as related to noxious stimuli. **Journal of Applied Physiology** p.725-739, 1953.

HARRIS R.E, CLAUW D.J. Imaging central neurochemical alterations in chronic pain with proton magnetic resonance spectroscopy. **Neuroscience Letters**. 2012; 520:192–196.

HAUSER, Winfried et al. Fibromyalgia. **Nature Reviews**, Alemanha, p.01-16, 2015.

HEYMANN, Roberto E. et al. New guidelines for the diagnosis of fibromyalgia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, p.467-476, 2017.

HONG, S.; WILEY, J. W. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 1, p. 618-27, 2005.

HWANG, S. J.; BURETTE, A.; VALTSCHANOFF, J. G. VR1-positive primary afferents contact NK1-positive spinoparabrachial neurons. **Journal of Comparative Neurology**. v. 460, n. 2, p. 255-65, 2003.

JAY, Gary W; BARKIN, Robert J. Fibromyalgia. **Disease A Month**, p.66-111, 2015.

JONES, G. T. et al. The prevalence of fibromyalgia in the general population: a comparison of the American College of Rheumatology 1990, 2010, and modified 2010 classification criteria. **Arthritis e Rheumatology** p. 568–575, 2015.

KESKINDAG, Buse; KARAAZIZ, Meryem. The association between pain and sleep in fibromyalgia. **Saudi Medical Journal**, Turquia, p.465-475, 2017.

KURUMBAIL, R.G.; KIEFER, J.R.; MARNETT, L.J. Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. **Current Opinion in Structural Biology** p. 752–760, 2001,

LANGFORD, Dale J et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, Canada, p.447-452, 2010.

LITTLEJOHN, Geoffrey. Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome. **Nature Reviews Rheumatology**, Australia, p.639-648, 2015

MARNETT, L.J. Cyclooxygenase mechanisms. **Current Opinion in Structural Biology**. p. 545–552, 2000.

MARNETT, L.J.; et al. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. **The Journal of Biological Chemistry**, p.274-284, 1999.

MITCHELL, J.A.; KIRKBY, N.S. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**. 2018.

MEASE P. Fibromyalgia Syndrome: review of clinical presentation, pathogenesis, outcome measures, and treatment. **The Journal of Rheumatology**, p.06-21, 2005.

MEASE, Philip J.. Further Strategies for Treating Fibromyalgia: The Role of Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors. **The American Journal Of Medicine**, p.44-55, 2009.

MOSS, R.B. et al, TNF- and chronic fatigue syndrome, **Journal of Clinical Immunology**, p. 314–316, 1999.

MURASE, T., et al. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NFkappaB and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vase biology** p. 1412-1420, 1999.

NAGAKURA, Yukinori. Challenges in drug discovery for overcoming 'dysfunctional pain': an emerging category of chronic pain. **Journals Taylor e Francis**, Japão, p.1043-1045, 2015.

NEECK, Gunther; CROFFORD, Leslie J. Neuroendocrine perturbations in fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. **Neuroendocrine Mechanisms In Rheumatic Disease**, Estados Unidos, p.989-1002, 2000.

PUTTINI, Piercarlo Sarzi et al. Are the ACR 2010 diagnostic criteria for fibromyalgia better than the 1990 criteria? **Autoimmunity Reviews**, Italia, p.33-35, 2018.

PUBCHEM, Gallate Ethyl, 2018. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13250#section=Top>>. Acesso em: 10 mai. 2018.

QUEIROZ, L. P. Worldwide epidemiology of fibromyalgia. **Current Pain and Headache Reports** p. 356-365, 2013.

QUINTAS-JUNIOR, L. J. et al. Cyclodextrin-Complexed Ocimum basilicum Leaves Essential Oil Increases Fos Protein Expression in the Central Nervous System and Produce an Antihyperalgesic Effect in Animal Models for Fibromyalgia. **International Journal Of Molecular Sciences**, Sergipe, p.547-563, 2015.

OLIVEIRA, L.R. de et al. Induction of chronic non-inflammatory widespread pain increases cardiac sympathetic modulation in rats. **Department Of Health e Human Services**, São Paulo, p.45-49, 2012.

OLIVEIRA, M. G. B et al. Alfa-terpineol, a monoterpene alcohol, complexed with beta-cyclodextrin exerts an anti-hyperalgesic effect in an animal model for fibromyalgia aided with docking study. **Chemico-biological Interactions**, Sergipe, p.54-62, 2016.

RODRIGUES, A. L. et al. . Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacologic Toxicologic**, p. 150-156, 1996.

RUSSEL I.J et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. **Arthritis e Rheumatology**, California, p.1593-1561, 1994.

SANTOS, A. R. et al. The involvement of K⁺ channels and Gi/o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. **European Journal of Pharmacology** p. 7-17, 1999.

SANTOS, Priscila L. et al. Docking, characterization and investigation of β -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of Cymbopogon species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. **Phytomedicine**, Sergipe, p.948-957, 2016.

SAWADDIRUK, P. et al. Alterations of brain activity in fibromyalgia patients. **Journal Of Clinical Neuroscience**, Tailândia, p.13-22, 2017.

SACHDEVA, Anand Kamal; KUHAD, Anurag; CHOPRA, Kanwaljit. Epigallocatechin gallate ameliorates behavioral and biochemical deficits in rat model of load-induced chronic fatigue syndrome. **Brain Research Bulletin**, India, v. 86, n. 3-4, p.165-172, out. 2011.

SCHNEIDER M.J, BRADY M.D, Fibromyalgia Syndrome: A New Paradigm for Differential Diagnosis and Treatment. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**. Estados Unidos, p.529-541, 2001.

SCHMIDT-Wilcke T, CLAUW DJ. Fibromyalgia: from pathophysiology to therapy. **Nature reviews Rheumatology**. 2011

SENNA, Erika Rodrigues et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The Journal Of Rheumatology**, Minas Gerais, p.594-597, 2004.

SIMMS, R W. Fibromyalgia Is Not a Muscle Disorder. **American Journal Of The Medical Sciences**, Boston, p.346-350, 1998.

SIQUEIRA-LIMA, Pollyana S. et al. Anti-hyperalgesic effect of *Clippia grata* leaf essential oil complexed with beta-cyclodextrin in chronic musculoskeletal pain animal model: complemented with a molecular docking and antioxidant screening. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, Bahia, p.739-747, 2017.

SLUKA KA, et al. Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. **Muscle Nerve**. Iowa, p.37-46, 2001.

SLUKA, Kathleen A.; CLAUW, Daniel J.. Neurobiology of fibromyalgia and chronic widespread pain. **Neuroscience**, Michigan, v. 338, p.114-129, dez. 2016.

SMITH, Howard S; BARKIN, Robert L. Fibromyalgia Syndrome: A Discussion of the Syndrome and Pharmacotherapy. **American Journal Of Therapeutics**, Chicago, p.419-439, 2010.

TAGUCHI, Toru et al. Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine induced pain model. **Pain**, Japão, p.315-326, 2015.

TALOTTA, R et al. One year in review 2017: fibromyalgia. **Clinical And Experimental Rheumatology**, Italia, p.01-10, 2017

TJOLSEN, A., HOLE, K. Animal models of analgesia. The pharmacology of pain (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), p. 1-20, **Springer**, Berlin, 1997.

WANG, Hui et al. Stimulation of the Production of Prostaglandin E2 by Ethyl Gallate, a Natural Phenolic Compound Richly Contained in Longan. **Biomolecules**, China, v. 8, n. 3, p.91-104, 6 set. 2018.

WOLFE, F et al. Fibromyalgia criteria and severity for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia. **The Journal Rheumatology**, p.1113-1122, 2011.

WOLFE, F. e WALITT, N. Culture, science and fibromyalgia. **Nature Reviews Rheumatology**, p.751-755, 2013

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