

Efeitos do extrato de lúpulo num modelo animal de fibromialgia induzido por de reserpina

*Effects of hop extract in an animal model of fibromyalgia
induced by reserpine*

*Efectos del extracto de lúpulo en un modelo animal de
fibromialgia inducido por reserpina*

Maria Eduarda Rodrigues¹, Eduardo Peretti dos Santos²,
Cláudio Laurentino Guimarães³, Edison Sanfelice André⁴

1.Acadêmica do curso de Fisioterapia, Universidade Regional de Blumenau (FURB). Blumenau-SC, Brasil.

2.Acadêmico do curso de Ciências Biológicas, Universidade Regional de Blumenau (FURB). Bolsista Programa UNIEDU. Blumenau-SC, Brasil.

3.Farmacêutico/Bioquímico, Doutor em Farmacologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Regional de Blumenau (FURB). Blumenau-SC, Brasil.

4.Fisioterapeuta, Doutor em Neurociências, Departamento de Fisioterapia/Laboratório de Fisioterapia Neurológica Experimental, Universidade Regional de Blumenau (FURB). Blumenau-SC, Brasil.

Resumo

Introdução. O diagnóstico da fibromialgia vem sendo frequentemente atualizado incluindo sinais característicos do binômio depressão/ansiedade. **Objetivo.** Estabelecer as características de estados de depressão/ansiedade em um modelo animal de fibromialgia induzido por injeções repetidas de reserpina em ratos Wistar sob o efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de lúpulo. **Método.** Após injeções de salina, reserpina e extrato hidroalcoólico de lúpulo, ratos Wistar foram submetidas aos testes do campo aberto (TCA), labirinto em cruz elevado (LCE) e teste do nado forçado (TNF). **Resultados.** Após o tratamento com extrato de lúpulo não foi possível observar diferenças no TCA e no LCE se comparado à reserpina. Por outro lado, o extrato hidroalcoólico de lúpulo foi capaz de reverter as alterações comportamentais depressivas produzidas pela reserpina no TNF. **Conclusão.** Esses dados reforçam o efeito depressivo e ansiogênico característico do modelo de fibromialgia induzido por injeções repetidas de reserpina e sugerem, também, potencial efeito ansiolítico do extrato de lúpulo.

Unitermos. Fibromialgia; Reserpina; Ansiedade; Depressão; Lúpulo

Abstract

Introduction. The diagnosis of fibromyalgia has been regularly updated, with distinctive signs of binomial depression/anxiety. **Objective.** To establish the characteristics of behavioral states of depression/anxiety in an animal model of fibromyalgia induced by repeated injections of reserpine in Wistar rats under the effect of treatment with hydroalcoholic extract of hops. **Method.** After saline injections, reserpine and hydroalcoholic hop extract, Wistar rats were submitted to open field (TCA), elevated plus maze (LCE) and forced swim (TNF) tests. **Results.** After treatment with hop extract it was not possible to observe differences in TCA and LCE data compared to reserpine. On the other hand, the hydroalcoholic hop extract was able to reverse the depressive behavioral changes produced by reserpine in TNF. **Conclusion.** These data reinforce the depressive and anxiogenic effect characteristic of the model of fibromyalgia induced by repeated injections of reserpine and suggest potential anxiolytic effect of hop extract.

Keywords. Fibromyalgia; Reserpine; Anxiety; Depression; Hops

Resumen

Introducción. El diagnóstico de fibromialgia se ha actualizado periódicamente, con signos distintivos de depresión/ansiedad. **Objetivo.** Establecer las características de los estados comportamentales de depresión/ansiedad en un modelo animal de fibromialgia inducida por inyecciones repetidas de reserpina en ratas Wistar bajo el efecto del tratamiento con extracto hidroalcohólico de lúpulo. **Método.** Después de inyecciones de salina, reserpina y extracto de lúpulo hidroalcohólico, las ratas Wistar fueron sometidas a pruebas de campo abierto (TCA), laberinto en cruz elevado (LCE) y natación forzada (TNF). **Resultados.** Después del tratamiento con extracto de lúpulo no fue posible observar diferencias en los datos de ATC y LCE en comparación con la reserpina. Por otro lado, el extracto de lúpulo hidroalcohólico fue capaz de revertir los cambios de comportamiento depresivos producidos por la reserpina en el TNF. **Conclusión.** Estos datos refuerzan el efecto depresivo y ansiogénico característico del modelo de fibromialgia inducido por inyecciones repetidas de reserpina y sugieren un posible efecto ansiolítico del extracto de lúpulo.

Palabras clave. Fibromialgia; Reserpina; Ansiedad; Depresión; Lúpulo

Trabalho realizado na Universidade Regional de Blumenau (FURB). Blumenau-SC, Brasil.

Conflito de interesse: não

Recebido em: 28/03/2023

Aceito em: 13/09/2023

Endereço para correspondência: Edison Sanfelice André. E-mail: sanfelice@furb.br

INTRODUÇÃO

A fibromialgia ou síndrome da fibromialgia é uma das causas mais comuns de dor crônica generalizada, mas embora a dor seja sua característica principal e distintiva, a fibromialgia é caracterizada por uma sintomatologia complexa que também compreende fadiga, distúrbios do sono e sintomas funcionais (isto é, sintomas clínicos não explicados por causas estruturais ou patológicas definidas). A fibromialgia é uma condição bastante comum na população geral. No entanto, ainda não existem tratamentos consistentemente eficazes devido à falta de consenso em relação ao diagnóstico de fibromialgia, critérios de classificação e, especialmente, em relação à etiopatogenia da fibromialgia.

A prevalência relatada de fibromialgia varia dependendo dos critérios diagnósticos utilizados para definir

essa condição. Estudos utilizando os critérios do ACR de 1990 registraram taxas de prevalência que variam de 0,4% (Grécia) a 8,8% (Turquia), com uma prevalência global estimada média de 2,7%. A proporção média mundial de mulheres para homens para fibromialgia é de 3: 1. Um estudo de cinco países europeus (França, Portugal, Espanha, Alemanha e Itália) estimou uma prevalência geral da população de 4,7%¹. No entanto, essas taxas de prevalência podem variar até quatro vezes ao considerar conjuntos de critérios subsequentes¹. Ainda, esta síndrome pode estar relacionada a doenças específicas como patologias reumáticas, distúrbios psiquiátricos ou neurológicos, infecções e diabetes¹⁻³.

O sofrimento físico e mental vivenciado por pacientes que tem fibromialgia afeta fortemente a qualidade de vida, desempenho social e laboral, a ponto de a fibromialgia ter sido chamada de “invisible disability” e, em termos de dor e debilidade global, a fibromialgia tem sido experienciada como mais severa do que qualquer outra síndrome de dor crônica⁴, além de que, pacientes com fibromialgia são frequentemente diagnosticados com transtornos depressivos e de ansiedade^{5,6}.

Acredita-se que a depressão e a ansiedade são resultado, e não a causa da fibromialgia⁴. Observou-se que pacientes com fibromialgia possuem taxas elevadas quando se trata do transtorno depressivo maior, comparado com a população em geral, que variam de 20 a 60% em amostras dos Estados Unidos da América e Europa⁷⁻⁹; além de que,

autores afirmam que a fibromialgia e a depressão podem ser vinculados pois ocorrem concomitantemente⁸.

Sabendo-se que uma série robusta de evidências demonstra que sistemas reguladores da sensibilidade, dos estados de humor e do ciclo vigília-sono compartilham os mesmos distritos neurais⁸ não causa espanto a manifestação concomitante de sintomas álgicos, depressão e distúrbios do sono em portadores de fibromialgia.

Pacientes com fibromialgia possuem níveis elevados de substância-P no líquido cefalorraquidiano, a qual estudos demonstram que facilita a transmissão de mensagens nociceptivas “alertando” os neurônios da medula espinhal, ao invés de transportar a mensagem como um neurotransmissor putativo¹⁰, o que está relacionado à modulação da sensibilidade somática (amplificação central e redução da inibição central da dor)¹¹, ocorrendo redução nos níveis de serotonina e noradrenalina no líquido cefalorraquidiano em portadores de fibromialgia¹¹⁻¹³, o que desempenha papel funcional importante na regulação de diferentes estados comportamentais e na fisiopatologia da depressão¹⁴.

Não menos importante, reduções na concentração das aminas biogênicas em determinadas regiões do cérebro parece ter participação no desenvolvimento de quadros de depressão, sendo a teoria monoaminérgica da depressão a mais aceita atualmente¹⁵. O desenvolvimento da depressão por esses pacientes pode ser explicado, em parte, uma vez que alguns genes das vias dopaminérgica e serotoninérgica

que têm sido associados ao desenvolvimento da fibromialgia estão envolvidos, também, no desencadeamento da depressão¹⁶. Distúrbios no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e alterações no sistema de neurotransmissores são características em comum da depressão e fibromialgia, inclusive alguns pacientes com fibromialgia respondem bem ao tratamento de fármacos utilizados para depressão^{8,17}.

O modelo de fibromialgia induzido por injeções repetidas de reserpina¹⁸, que tem como mecanismo de ação a depleção de aminas biogênicas (noradrenalina, dopamina e serotonina) no SNC (sistema nervoso central) por se ligar irreversivelmente aos transportadores de monoaminas vesiculares (VMAT), impedindo a ligação de neurotransmissores intracelulares ao transportador, o que pode se revelar ainda mais valioso, dado ao fato que estas aminas biogênicas desempenham papel crucial na regulação de diferentes estados de humor e do ciclo vigília-sono, que também apresentam alterações nos casos de fibromialgia^{1,19-22}.

Durante a última década, vários estudos foram conduzidos em condições experimentais no intuito de agregar evidências de que os componentes contidos no lúpulo possuem efeito sobre o sistema nervoso central e, conseqüentemente, poderiam ser empregados para mitigar os sintomas da fibromialgia. Mais de 1000 substâncias químicas foram identificadas nas diferentes variedades de lúpulos incluindo produtos naturais e derivados isomerizados. Os óleos voláteis, flavonoides e ácidos

amargos compreendem a maioria destes componentes estudados²³. Apesar disso, tais estudos não são conclusivos e até mesmo contraditórios, pois os extratos de lúpulo foram empregados em associação com outras plantas com efeito medicinal carecendo, então, de aprofundamento²⁴.

Neste contexto, buscou-se avaliar possíveis efeitos de injeções de extrato hidroalcoólico de lúpulo sobre os comportamentos de ansiedade e de depressão em um modelo animal de fibromialgia sugerido por Nagakura (2009)¹⁸.

MÉTODO

O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais da Universidade Regional de Blumenau (020/2019). Ao chegarem ao laboratório os animais permaneceram durante sete dias em ambientação antes do início dos experimentos, sendo mantidos em gaiolas acondicionadas em uma estante isoladora ventilada para roedores (ALESCO®), instalada em ambiente com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 horas (07h00-19h00 claro sob luz artificial) e tiveram acesso livre à ração balanceada e à água filtrada durante todo o processo.

Foram utilizadas 36 ratas adultas da linhagem Wistar que foram aleatoriamente divididas em 3 grupos ($n=12/\text{grupo}$; TCA, LCE, TNF) submetidos ao teste do campo aberto (TCA), labirinto em cruz elevado (LCE) e ao teste do nado forçado (TNF), consecutivamente e nesta ordem. Os

animais foram previamente pesados e submetidos a testes de ambientação aos instrumentos de avaliação comportamental com duração de cinco minutos cada. Todos os dispositivos de avaliação comportamental (vide abaixo) foram completamente higienizados após cada uso individual.

Procedimento

Teste do Campo Aberto (TCA)

Foi utilizada uma arena de madeira de 60x60cm de largura e paredes com 33cm de altura. As marcações foram previamente feitas com fita adesiva, totalizando 12 quadrantes. A arena foi colocada no chão sempre na mesma posição, de forma que o observador conseguisse permanecer sentado com pequena distância do instrumento e ainda assim contemplar o comportamento do animal. Durante o período de observação comportamental (5 minutos) foram avaliados: locomoção (número de quadrantes percorridos pelo animal neste período, sendo correspondido ao animal invadir com as quatro patas um dos quadrantes), autolimpeza (período, medido através de um cronômetro, ao qual o animal apresenta movimentos de lambidas pelo corpo ou cauda, ou quando se limpa ou se coça com as próprias patas) e defecação (número de bolos fecais presentes na arena ao final do teste)²⁵.

Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Foi utilizado um labirinto de madeira elevado a 50cm do solo, com quatro braços de 52cm de comprimento, 13cm de

largura, os braços fechados com paredes de 39cm de altura e teto aberto, dispostos de forma que os braços abertos fossem opostos uns aos outros, assim como os braços fechados. Durante os testes, os animais foram colocados individualmente na ponta de um dos braços fechados, de frente para o centro, permitindo dez minutos de exploração livre. Neste período, o observador, com o auxílio de um cronômetro, mediu o tempo que o animal demorou para sair do braço fechado e entrar no braço aberto, o tempo total que permaneceu nos braços abertos, resultado da somatória do tempo passado no braço aberto durante cada saída, o número de entradas em braços abertos, e o número de bolos fecais ao término do experimento. Para se considerar entrada válida, o animal teve que invadir com as quatro patas um dos braços abertos^{26,27}.

Teste do Nado Forçado (TNF)

Os animais foram colocados individualmente em uma caixa de vidro (aquário: l=25cm x h=30cm x p=25cm) com um nível máximo de 26cm de água a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, coberto com uma tampa de vidro para impedir a fuga. O aquário foi posicionado, sempre na mesma posição, sobre uma bancada de forma que o observador conseguisse permanecer sentado a pequena distância do instrumento e ainda assim observar o comportamento do animal, que realizou o teste durante cinco minutos. Durante esse tempo foram contabilizados: o tempo que o animal demorou para ficar imóvel pela primeira vez, e o tempo em que o animal permaneceu imóvel, sendo

imóvel a somatória do tempo em que o animal estava flutuando e realizando apenas movimentos necessários para manter a cabeça acima da água²⁸.

Tratamento

Todos os animais foram submetidos a injeções intraperitoneais de salina (solução de 0,9%), num volume de 0,1ml/Kg, durante três dias consecutivos para comporem a amostra controle. Após, cada grupo foi submetido aos testes TCA, LCE e TNF por três dias consecutivos. Em seguida, todos os animais receberam injeções subcutâneas de reserpina (1mg/kg, Sygma-Aldrich) durante três dias consecutivos conforme protocolo¹⁸. Ato contínuo, foram submetidos aos mesmos testes por mais três dias consecutivos. Por fim, todos os animais receberam injeções intraperitoneais de 1,0mg/Kg de extrato de lúpulo por três dias consecutivos e, novamente, foram submetidos aos testes TCA, LCE e TNF, por mais três dias consecutivos.

Após a realização de todos os testes previstos, os animais foram eutanasiados com sobredosagem anestésica (associação de Cloridrato de Cetamina e Xilazina) e as carcaças foram congeladas para serem descartadas conforme procedimento padrão adotado pela Instituição.

Reserpina

Para a preparação dessa solução, a reserpina (Sigma-Aldrich) foi dissolvida em ácido acético glacial, diluída com água destilada para uma concentração final de ácido acético

de 0,5%. Foi injetado 1,0mg/Kg em um volume 1ml/kg, uma vez ao dia, por três dias consecutivos¹⁸.

Extrato de Lúpulo

Lúpulos comerciais (varietal Magnum) em forma de pellets T-90 foram adquiridos em lojas especializadas. Foi realizada a destilação em aparelho tipo *Clevenger* e posteriormente em evaporador rotatório para concentração do extrato. Após obtido, o extrato foi diluído em solução salina (0,9%) e soro albumina bovina (emulsificante, fração V em pó, 0,1%) para atingir 1,0mg/Kg de peso do animal. Por fim, a solução foi armazenada em frasco opaco envolto por papel alumínio, em geladeira, para evitar oxidação.

Análise estatística

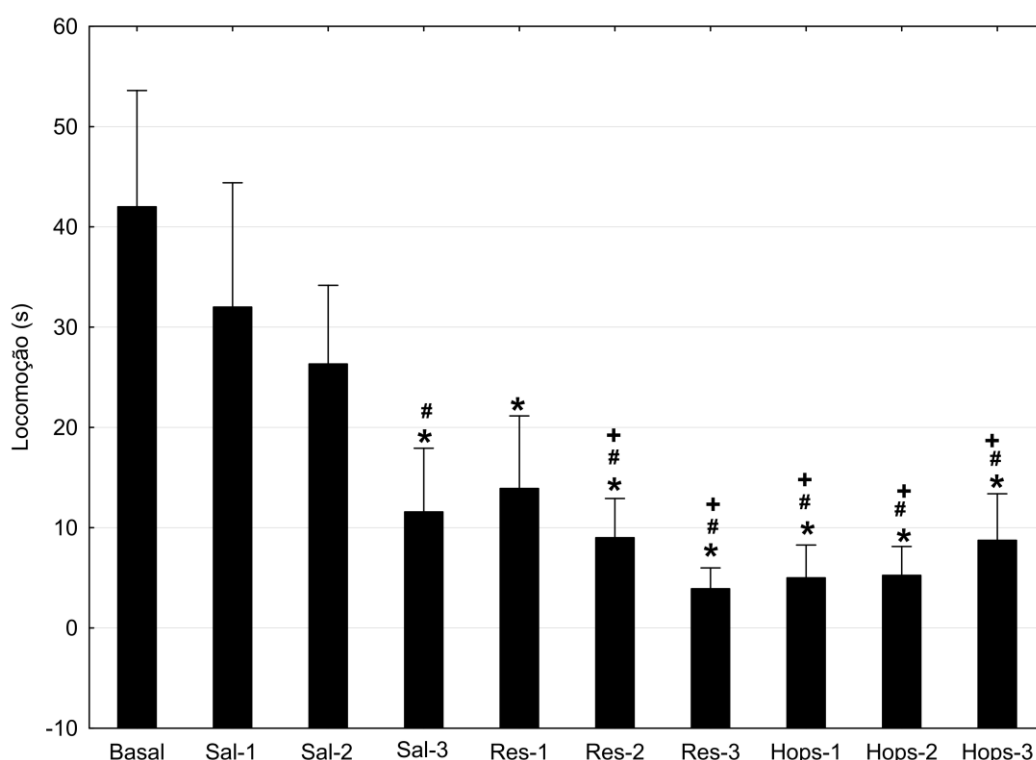
As medidas obtidas nos grupos TNF, TCA e LCE foram inseridas em uma planilha do programa Statistica® (ver. 12.0, Statsoft, Inc.) e posteriormente submetidas à ANOVA de uma via, teste de Levene para homogeneidade de variâncias e o teste post-hoc de Tukey caso houvesse significância estatística ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

O TCA revelou diminuição progressiva do comportamento de locomoção ($[F(9,110)=13,135; p=0,0001]$) a partir da terceira injeção de salina (SAL-3) (Figura 1). Inconstância no comportamento de autolimpeza

e aumento crescente, não significante, no número de bolos fecais no decorrer dos testes.

Figura 1. Locomoção média no teste do campo aberto (TCA). Basal: primeiro teste para habituação ao TCA. Sal-1: teste realizado após a primeira injeção de solução salina. Sal-2: teste aplicado após a segunda injeção de salina. Sal-3: teste aplicado após a terceira injeção de salina. Res-1: teste aplicado após a primeira injeção de reserpina. Res-2: teste aplicado após a segunda injeção de reserpina. Res-3: teste aplicado após a terceira injeção de reserpina. Hops-1: teste aplicado após a primeira injeção de extrato de lúpulo. Hops-2: teste aplicado após a segunda injeção de extrato de lúpulo. Hops-3: teste aplicado após a terceira injeção de extrato de lúpulo.



(*) diferenças significantes em relação ao basal; (#) diferenças significantes em relação à Sal-1; (+) diferenças significantes em relação à Sal-2; (Média±EPM, $p < 0,05$).

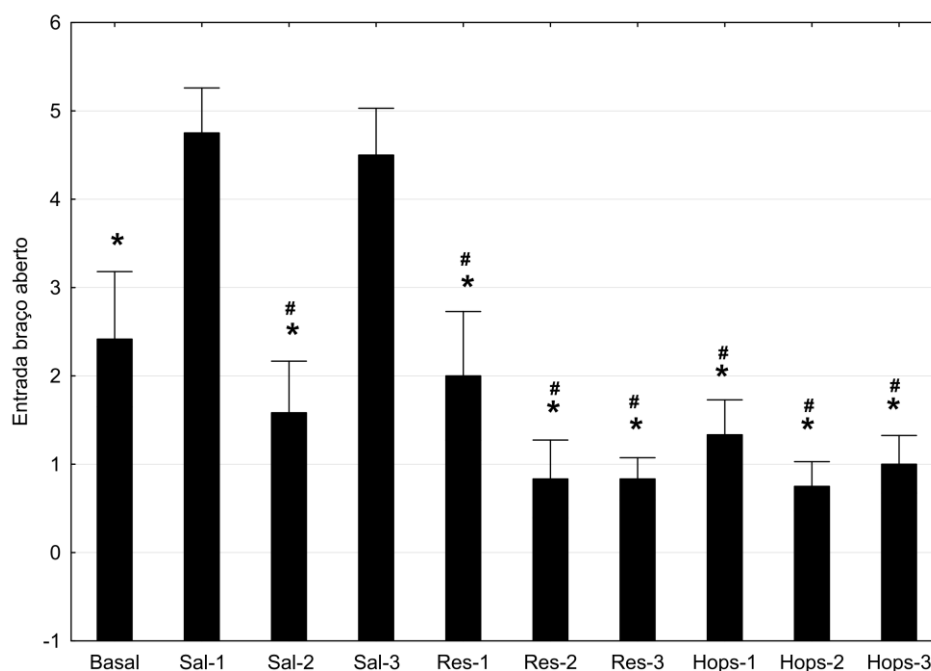
O grupo reserpina demonstrou redução progressiva e significativa na duração do comportamento de locomoção no TCA atingindo o menor valor após a terceira injeção, quando comparado à situação basal e controle (Sal-1, Sal-2 e sal-3) (Figura 1).

Em relação ao extrato de lúpulo, foi possível notar que as médias de locomoção estão entre as menores observadas desde o primeiro dia de injeção, indicando que os animais possuem tendência a explorar menos o ambiente (Figura 1). Não foram encontradas diferenças significantes quando o grupo que recebeu injeções de extrato de lúpulo foi comparado ao grupo que recebeu injeções de reserpina.

No teste do LCE, quando analisada a variável número de entradas no braço aberto, observou-se variabilidade de resultados dentro do grupo salina e uma tendência de redução nos grupos reserpina e extrato de lúpulo (Figura 2). Os animais levaram mais tempo para invadir o braço aberto em Res-3 e Hops-2, indicando que após a terceira injeção de reserpina e a segunda injeção de lúpulo os animais apresentaram tendência a explorar menos o ambiente (Fig.2). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação ao número de bolos fecais.

Em análise mais profunda, foi possível encontrar diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os grupos ($[F(9,110)=8,546; p=0,0001]$). Tanto o grupo reserpina quanto o grupo lúpulo apresentaram diminuição na frequência com que invadiram os braços abertos quando comparados tanto à condição basal quanto após injeções de solução salina. Por outro lado, não foi possível detectar diferenças entre o grupo reserpina e o grupo lúpulo (Figura 2).

Figura 2. Número médio de entradas no braço aberto durante o teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Basal: primeiro teste para habituação ao LCE. Sal-1: teste realizado após a primeira injeção de solução salina. Sal-2: teste aplicado após a segunda injeção de salina. Sal-3: teste aplicado após a terceira injeção de salina. Res-1: teste aplicado após a primeira injeção de reserpina. Res-2: teste aplicado após a segunda injeção de reserpina. Res-3: teste aplicado após a terceira injeção de reserpina. Hops-1: teste aplicado após a primeira injeção de extrato de lúpulo. Hops-2: teste aplicado após a segunda injeção de extrato de lúpulo. Hops-3: teste aplicado após a terceira injeção de extrato de lúpulo.



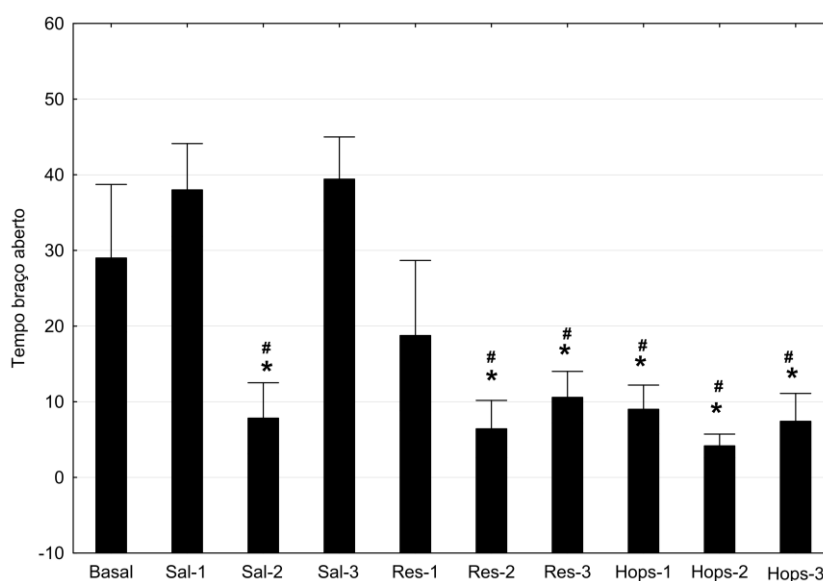
(*) diferenças significantes em relação à Sal-1; (#) diferenças significantes em relação à Sal-3; (Média±EPM, $p < 0,05$).

Seguindo na mesma direção, o tempo que os animais passaram no braço aberto foi estatisticamente menor quando comparados os grupos reserpina e lúpulo com a situação basal e após injeções de salina. Não foram encontradas diferenças entre o grupo lúpulo e reserpina (Figura 3).

No que se refere ao TNF, foi possível notar resultados significantes em ambas as variáveis analisadas (latência: $[F(9,110)=4,068, p=0,001]$; tempo inerte: $[F(9,110)=2,00, p=0,046]$). Observou-se que, após injeções de solução

salina, houve estabilidade temporal da latência, não havendo diferenças em relação à condição basal.

Figura 3. Tempo médio (em segundos) no braço aberto durante o teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Basal: primeiro teste para habituação ao LCE. Sal-1: teste realizado após a primeira injeção de solução salina. Sal-2: teste aplicado após a segunda injeção de salina. Sal-3: teste aplicado após a terceira injeção de salina. Res-1: teste aplicado após a primeira injeção de reserpina. Res-2: teste aplicado após a segunda injeção de reserpina. Res-3: teste aplicado após a terceira injeção de reserpina. Hops-1: teste aplicado após a primeira injeção de extrato de lúpulo. Hops-2: teste aplicado após a segunda injeção de extrato de lúpulo. Hops-3: teste aplicado após a terceira injeção de extrato de lúpulo.

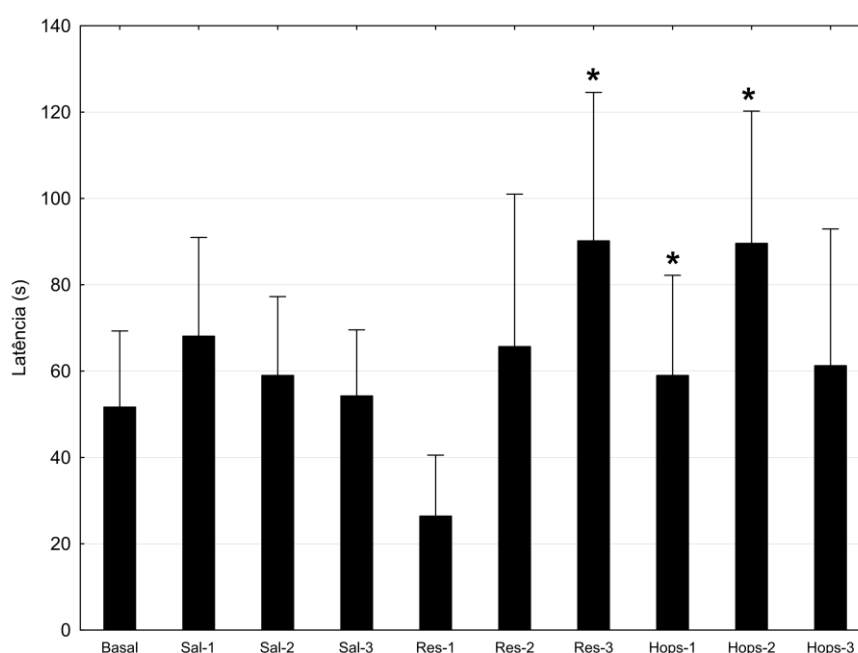


(*) diferenças significantes em relação ao basal; (#) diferenças significantes em relação à Sal-1 e Sal-3; (Média±EPM, $p < 0,05$).

As injeções de reserpina produziram aumento progressivo na duração da latência para iniciar o comportamento de inatividade atingindo o valor máximo após a terceira injeção. As injeções de extrato de lúpulo produziram respostas com tempos semelhantes aos encontrados na condição basal e após as injeções de salina,

e aumento na latência quando comparada aos valores encontrados após a primeira injeção de reserpina (Figura 4).

Figura 4. Tempo médio (em segundos) da latência no teste do nado forçado (TNF). Basal: primeiro teste para habituação ao TNF. Sal-1: teste realizado após a primeira injeção de solução salina. Sal-2: teste aplicado após a segunda injeção de salina. Sal-3: teste aplicado após a terceira injeção de salina. Res-1: teste aplicado após a primeira injeção de reserpina. Res-2: teste aplicado após a segunda injeção de reserpina. Res-3: teste aplicado após a terceira injeção de reserpina. Hops-1: teste aplicado após a primeira injeção de extrato de lúpulo. Hops-2: teste aplicado após a segunda injeção de extrato de lúpulo. Hops-3: teste aplicado após a terceira injeção de extrato de lúpulo.

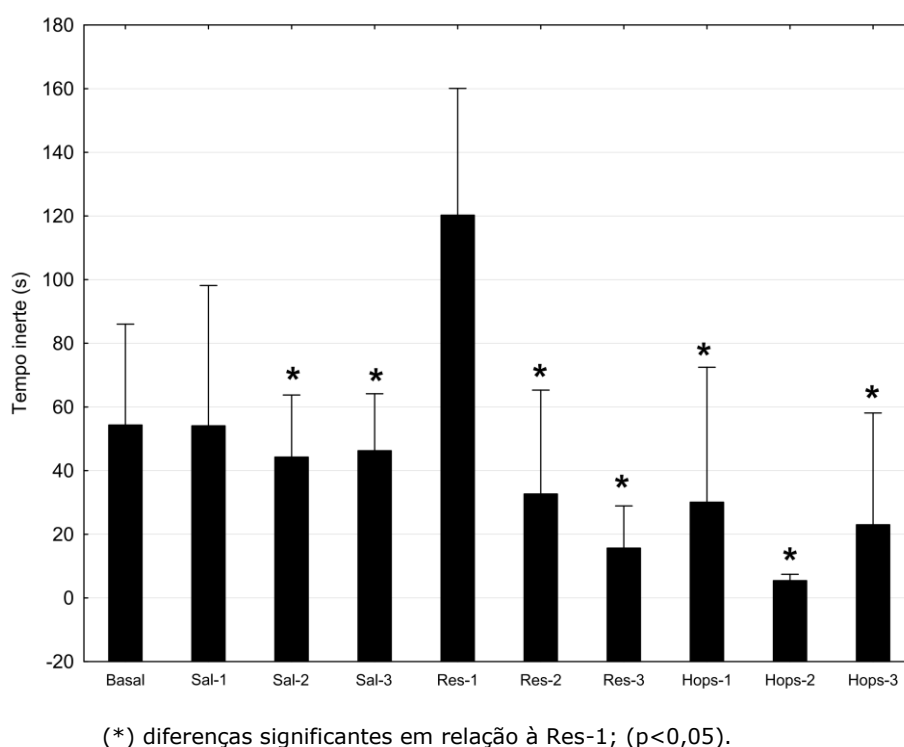


(*) diferenças significantes em relação à Res-1; (Média±EPM, $p < 0,05$).

Considerando o tempo médio gasto na manutenção do comportamento inerte, foi possível observar aumento destacado após a primeira injeção de reserpina ($[F(9,110)=2,00, p < 0,03]$). Após a segunda e a terceira injeção de reserpina observou-se redução significativa em relação à primeira, porém não diferente dos demais valores

encontrados nos outros grupos. As injeções de extrato de lúpulo produziram redução significativa quando comparadas aos valores obtidos após a primeira injeção de reserpina, mas sem diferenças detectáveis em relação às outras duas (Figura 5).

Figura 5. Tempo médio (em segundos) gasto na manutenção do comportamento inerte no teste do nado forçado (TNF). Basal: primeiro teste para habituação ao TNF. Sal-1: teste realizado após a primeira injeção de solução salina. Sal-2: teste aplicado após a segunda injeção de salina. Sal-3: teste aplicado após a terceira injeção de salina. Res-1: teste aplicado após a primeira injeção de reserpina. Res-2: teste aplicado após a segunda injeção de reserpina. Res-3: teste aplicado após a terceira injeção de reserpina. Hops-1: teste aplicado após a primeira injeção de extrato de lúpulo. Hops-2: teste aplicado após a segunda injeção de extrato de lúpulo. Hops-3: teste aplicado após a terceira injeção de extrato de lúpulo.



DISCUSSÃO

Em uma primeira e rápida avaliação do conjunto de dados dos três grupos, é possível notar que em cada um dos

testes executados houve uma tendência de redução nos tempos dos comportamentos da primeira para a segunda injeção, exceto no TNF. Essa aparente redução associada à ausência de respostas mais evidentes após as injeções tanto de reserpina quanto de extrato de lúpulo pode indicar o desenvolvimento de tolerância à situação de testagem, uma vez que foram submetidos a nove repetições de cada teste (salina, reserpina e extrato de lúpulo)²⁹.

Após injeções de reserpina os animais mantiveram suas diferenças comportamentais anteriormente descritas pelos pesquisadores que desenvolveram este modelo animal, os quais observaram que na primeira sessão de testes a reserpina não afetou a imobilidade porém, nos dias 3, 5, 7 e 14 a reserpina aumentou significativamente a imobilidade quando comparado com o grupo controle¹⁸, o que reforça nossos dados, que demonstraram que no primeiro dia de teste após reserpina os animais apresentaram decréscimo e, no terceiro dia, aumento significativo da imobilidade. A análise deste dado permite uma adequada compreensão deste modelo de fibromialgia, no qual foi possível observar que estes animais tiveram um tempo de imobilidade maior, característica de um quadro depressivo.

Os dados do TCA mostraram que após receberem reserpina os animais apresentaram redução da locomoção, em evidência no segundo e terceiro dia, quando comparado com o grupo Salina, o que corrobora com estudo que testou três doses distintas de reserpina e observou que a partir do

segundo dia após a indução com a dose de 1mg/Kg ocorreu diminuição da atividade locomotora³⁰.

Ainda, no LCE constatamos um perfil ansioso dos animais após aplicação de reserpina, indicando um potencial ansiogênico da droga, o que vai ao encontro com o estudo que afirma que os animais permanecem por mais tempo nos braços fechados após injeções de reserpina³¹.

Um outro objetivo desta investigação foi verificar se o extrato hidroalcoólico de lúpulo seria capaz de exercer efeito no perfil tipo ansioso induzido pela reserpina. Para tal intento, utilizou-se o LCE, no qual os animais apresentaram aumento gradativo no número de entradas nos braços abertos quando comparado com reserpina-3. Em uma de suas pesquisas, foi encontrado que extratos de lúpulo possuem melhores efeitos que o Diazepam quando analisados os efeitos de sedação, pré-anestésico e ansiolítico³². Neste estudo, os autores afirmam que as diferenças encontradas nos testes sugerem que o aumento das doses do extrato (400 mg/kg-1) aumentam os efeitos ansiolíticos da droga do composto, demonstrando aumento no tempo gasto nos braços abertos do LCE, assim como no número de entradas nestes.

Outra forma de avaliar os efeitos do extrato de lúpulo frente às características ansiosas após injeções de reserpina foi através do TCA. Neste, os animais não apresentaram diferença significativa da locomoção após injeções do extrato de lúpulo, ainda que tenham diminuído a incidência de locomoção, quando comparados aos dos demais grupos.

Resultado semelhante foi encontrado em estudo que investigou os efeitos do extrato de lúpulo por CO² e de uma de suas frações que contém α -ácidos sobre o SNC de ratos (2 ml/kg; via oral), e não encontrou diferenças significantes de locomoção dos animais em nenhuma das doses testadas (2.5, 5, 10 e 20 mg/kg)³³. Ainda, um grupo de pesquisa atribuiu os efeitos sedativos do lúpulo ao 2-metil-3-buten-2-ol que, quando injetado via i.p., reduz a motilidade sem induzir efeitos miorelaxantes nos animais³⁴.

Por outro lado, investigando os efeitos de extrato de lúpulo no SNC, foi confirmado que a aplicação de extratos de lúpulo provocou aumento da atividade locomotora (250mg/kg, i.p.), além dos potenciais efeitos antinociceptivos, sedativos e hipnóticos³⁵.

Essa divergência entre os resultados encontrada em relação a diferentes autores pode ser explicada pelo exposto no trabalho que analisou os efeitos de injeções intraperitoneais dos extratos aquoso, etéreo e alcoólico do lúpulo e observou que os três extratos apresentaram redução da locomoção dos animais, porém, o extrato etéreo foi o mais ativo, pois inibiu completamente a atividade motora dos camundongos 20 minutos após a injeção³⁶, indicando que o lúpulo possui potencial efeito sedativo, além de que efeitos do lúpulo dependem, além das diferentes dosagens, das vias de aplicação do extrato, e também do tipo de solvente utilizado no procedimento de extração do extrato.

Ainda, buscamos investigar se o extrato de lúpulo seria capaz de exercer efeito no perfil comportamental depressivo induzido pela reserpina. Para isso, os animais foram submetidos ao TNF, no qual observou-se que no primeiro dia após aplicação do extrato de lúpulo os animais apresentaram o menor tempo de latência e, no segundo dia, o maior tempo de imobilidade, revelando que a aplicação do extrato de lúpulo não foi capaz de reverter as alterações causadas pela reserpina. Num estudo sobre a ação do extrato de lúpulo no perfil comportamental tipo depressivo, observou-se que o lúpulo possui mecanismo de ação oposto ao encontrado em drogas antidepressivas que comumente interferem nos resultados do TNF, como a amitriplina, um antidepressivo tricíclico que tem como mecanismo de ação o bloqueio da recaptação de serotonina e noradrenalina²¹. Antidepressivos possuem diferentes mecanismos de ação que podem atuar através do aumento da disponibilidade de triptofano no cérebro, aumento da síntese de 5-HT, aumento da liberação de 5-HT de neurônios pré-sinápticos, bloqueio da recaptação de 5-HT nos terminais nervosos e, aumento da sensibilidade pós-sináptica de receptores 5-HT, que parece ser o mecanismo oposto ao do extrato de lúpulo³⁷.

Em estudo que objetivou encontrar evidências de que a fração de β -ácidos do lúpulo reduzem a neurotransmissão GABAérgica central, foi encontrada reduzida porcentagem de animais que adormecem após injeção de pentobarbital presumivelmente decorre de um efeito antagônico na neurotransmissão GABAérgica³⁸. Além disso, em

experimentos eletrofisiológicos as correntes evocadas por GABA foram reduzidas após a aplicação de β -ácidos do lúpulo³⁸.

CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os dados do presente trabalho revelaram que a reserpina foi capaz de induzir um quadro comportamental tipo ansiogênico. Este quadro comportamental demonstra que este modelo de estudo para fibromialgia mimetiza alterações comportamentais significativas que são encontradas em humanos portadores da síndrome fibromiálgica, tal e qual demonstrado pelos proponentes do modelo. Os dados obtidos durante o TNF, associados às pesquisas prévias³⁹ reforçam uma possível ação ansiolítica do extrato hidroalcolico de lúpulo no modelo de fibromialgia induzido por injeções de reserpina. Estudos subsequentes, buscando decifrar quais componentes do extrato de lúpulo possuem ação ansiolítica e/ou antidepressiva, merecem especial atenção.

REFERÊNCIAS

- 1.Sarzi-Puttini P, Giorgi V, Marotto D, Atzeni F. Fibromyalgia: an update on clinical characteristics, aetiopathogenesis and treatment. *Nat. Rev Rheumatol* 2020;16:645-60. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00506-w>
- 2.Pereira CN, Nunes BF, André, ES. Investigação das correlações existentes entre o ciclo vigília-sono e a dor num modelo experimental de fibromialgia. *Biotemas* 2020;33:99-108. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2020.e74455>
- 3.Siracusa R, Fusco R, Cuzzocrea S. Fibromyalgia: Pathogenesis, mechanisms, diagnosis, and treatment options update. *Inter J Mol Sci* 2021;22:3891. <https://doi.org/10.3390/ijms22083891>

4. Sturge-Jacobs M. The experience of living with fibromyalgia: confronting an invisible disability. *Res Nursing Pract* 2002;16:19-28. <https://doi.org/10.1891/rtnp.16.1.19.52994>
5. Aguglia A, Salvi V, Maina G, Rossetto I, Aguglia E. Fibromyalgia syndrome and depressive symptoms: Comorbidity and clinical correlates. *J Affect Dis* 2011;128:262-6. <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2010.07.004>
6. Bradley LA. Psychiatric comorbidity in fibromyalgia. *Curr Pain Headache Rep* 2005;9:79-86. <https://doi.org/10.1007/s11916-005-0042-3>
7. Fuller-Thomson E, Nimigon-Young J, Brennenstuhl S. Individuals with fibromyalgia and depression: findings from a nationally representative Canadian survey. *Rheumatol Int* 2012;32:853-62. <https://doi.org/10.1007/s00296-010-1713-x>
8. Gracely RH, Ceko M, Bushnell MC. Fibromyalgia and depression. *Pain Res Treat* 2012;2012:486590. <https://doi.org/10.1155/2012/486590>
9. Thieme K, Turk DC, Flor H. Comorbid depression and anxiety in fibromyalgia syndrome: relationship to somatic and psychosocial variables. *Psychosom Med* 2004;66:837-44. <https://doi.org/10.1097/01.psy.0000146329.63158.40>
10. Russell IJ. The promise of substance P inhibitors in fibromyalgia. *Rheu Dis Clin North Am* 2002;28:329-42. [https://doi.org/10.1016/S0889-857X\(01\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0889-857X(01)00006-0)
11. Sluka KA. Is it possible to develop an animal model of fibromyalgia? *Pain* 2009;146:3-4. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.07.032>
12. DeSantana JM, Cruz KM, Sluka KA. Animal models of fibromyalgia. *Arthritis Res Ther* 2013;15:222. <https://doi.org/10.1186/ar4402>
13. De la Luz-Cuellar YE, Rodríguez-Palma EJ, Franco-Enzástiga Ú, Déciga-Campos M, Mercado F, Granados-Soto V. Spinal dopaminergic D1 and D5 receptors contribute to reserpine-induced fibromyalgia-like pain in rats. *Brain Res* 2023;1799:148167. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.148167>
14. Adrien J. Neurobiological bases for the relation between sleep and depression. *Sleep Med Rev* 2002;6:341-51. <https://doi.org/10.1053/smr.2001.0200>
15. Jacobsen JP, Medvedev IO, Caron MG. The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012;367:2444-59. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0109>
16. Lacerda-Pinheiro SF, Pinheiro Junior RF, Lima MAP, Silva CGL, Santos MSV, Teixeira Júnior AG, *et al.* Are there depression and anxiety genetic markers and mutations? A systematic review. *J Affect Disord* 2014;168:387-98. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.07.016>
17. Borchers AT, Gershwin ME. Fibromyalgia: A Critical and Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2015;49:100-51. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8509-4>
18. Nagakura Y, Oe T, Aoki T, Matsuoka N. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by

- depression: A putative animal model of fibromyalgia. *Pain* 2009;146:26-33. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.05.024>
- 19.Schuldiner S, Shirvan A, Linial M. Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol Rev* 1995;75:369-92. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.2.369>
- 20.Stitzel RE, Craig C. *Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas*. 3a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2005; 832p.
- 21.Beppler LM. Efeito do extrato hidroalcoólico da planta *Polygala paniculata* no modelo de fibromialgia induzido pela reserpina em camundongos: avaliação sensorial e emocional (Dissertação). Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2019. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/198618>
- 22.Lobay D. Rauwolfia in the treatment of hypertension. *Integ Med* 2015;14:40-6. <https://europepmc.org/article/MED/26770146#free-full-text>
- 23.Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine* 2006;13:119-31. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.07.006>
- 24.Zanoli P, Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 2008;116:383-96. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>
- 25.Carlini EA, Mendes FR. *Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental: um Guia para a Pesquisa de Drogas com Ação sobre o SNC, com Ênfase em Plantas Medicinais*. São Paulo: FAP-UNIFESP; 2012.
- 26.Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149-67. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- 27.Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;44:463-9. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90492-c](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90492-c)
- 28.Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc* 2012;3:1009-14. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.044>
- 29.Holmes A. Targeted gene mutation approaches to the study of anxiety-like behavior in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:261-73. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00012-4](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00012-4)
- 30.Freitas CM, Busanello A, Schaffer LF, Peroza LR, Krum BN, Leal CQ, *et al.* Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2016;233:457-67. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4118-4>
- 31.Blasco-Serra A, Escrihuela-Vidal E, González-Soler EM, Martínez-Expósito E, Blasco-Ausina MC, Martínez-Bellver S, *et al.* Depressive-like symptoms in a reserpine-induced model of fibromyalgia in rats. *Phys Behav* 2015; 151:456-462. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.07.033>

32. Shishegar R, Rezaie A, Nazeri M. Study of sedation, pre-anesthetic and antianxiety effects of hop (*Humulus lupulus* L.) Extract compared with diazepam in rats. *J Anim Vet Adv* 2012;11:2570-5. <https://doi.org/10.3923/javaa.2012.2570.2575>
33. Zanolli P, Rivasi M, Zavatti M, Brusiani F, Baraldi M. New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 2005;102:102-6. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.040>
34. Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM (Eds.). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Edinburgh: Elsevier, Churchill Livingstone; 2012; p.243.
35. Lee KM, Jung JS, Song DK, Krauter M, Kim YH. Effects of humulus lupulus extract on the central nervous system in mice. *Planta Med* 199;359(Suppl.7):A691. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959980>
36. Bravo L, Cabo J, Fraile A, Jimenez J, Villar A. Estudio farmacodinámico del lupulo (*Humulus lupulus* L.) – acción tranquilizante. *Boll Chim Farmac* 1974;113:310-5. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.99.2012.2.6>
37. Charney DS, Heninger GR, Sternberg DE. Serotonin function and mechanism of action of antidepressant treatment. Effects of amitriptyline and desipramine. *Arch Gen Psychiatry* 1984;41:359-65. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1984.01790150049008>
38. Zanolli P, Zavatti M, Rivasi M, Brusiani F, Losi G, Puia G, *et al*. Evidence that the beta-acids fraction of hops reduces central GABAergic neurotransmission. *J Ethnopharmacol* 2007;109:87-92. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.008>
39. Kyrrou I, Christou A, Panagiotakos D, Stefanaki C, Skenderi K, Katsana K, *et al*. Effects of a hops (*Humulus lupulus* L.) dry extract supplement on self-reported depression, anxiety and stress levels in apparently healthy young adults: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover pilot study. *Hormones (Athens)* 2017;16:171-80. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1738>