

**Avaliação da atividade anti-hiperalgésica do extrato bruto de
Casearia sylvestris Sw. em modelo animal de endometriose**

**Evaluation of the anti-hyperalgesic activity of the *Casearia sylvestris*
Sw. crude extract in an animal model of endometriosis**

DOI:10.34117/bjdv7n5-324

Recebimento dos originais: 07/04/2021

Aceitação para publicação: 14/05/2021

Lia Karina Volpato

Mestrado - Programa de pós-graduação em ciências da saúde – Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL)/Brasil - Campus Grande Florianópolis

Endereço: Avenida Pedra Branca, 25, Palhoça, SC, Brasil CEP 88137-270

*Autor correspondente

E-mail:Liakarina@hotmail.com

Deborah Martins Costa

Aacadêmica - Graduação em Medicina – UNISUL/Brasil - Campus Grande Florianópolis

Endereço: Avenida Pedra Branca, 25, Palhoça, SC, Brasil CEP 88137-270

E-mail:deborahmartinscosta@gmail.com

Thais Walber

Acadêmica - Graduação em Medicina – UNISUL/Brasil - Campus Grande Florianópolis

Endereço: Avenida Pedra Branca, 25, Palhoça, SC, Brasil CEP 88137-270

E-mail:thaiswalber@gmail.com

Ana Caroline Heymann

Mestrado - Programa de pós-graduação em ciências da saúde – Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL)/Brasil - Campus Grande Florianópolis

Endereço: Avenida Pedra Branca, 25, Palhoça, SC, Brasil CEP 88137-270

E-mail:nutriheymanns@gmail.com

Leidiane Mazzardo-Martins

Doutorado - Programa de pós-graduação em neurociências, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)/ Brasil.

Campus Universitário, s/n, Sala 208, Bloco E, Prédio Administrativo, Córrego Grande, Florianópolis, SC, Brasil CEP 88040-900

E-mail: leidiane2001@yahoo.com.br

Rachel Faverzani Magnago

Doutorado - Programa de pós-graduação em ciências ambientais - UNISUL/Brasil - Campus Grande Florianópolis

Endereço: Avenida Pedra Branca, 25, Palhoça, SC, Brasil CEP 88137-270

E-mail: rachel.magnago@unisul.br

Anna Paula Piovezan

Doutorado - Laboratório de Neurociência Experimental (LANEX) –
UNISUL/Brazil - Campus Grande Florianópolis
Endereço: Avenida Pedra Branca, 25, Palhoça, SC, Brasil CEP 88137-270
E-mail:anna.piovezan@unisul.br

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance *Casearia sylvestris* Sw. is widely used in popular medicine to treat inflammatory disorders based on the folk use and some literature about efficacy. **Aim of the study** This study evaluates the anti-hyperalgesic activity of the hydroalcoholic crude extract of *Casearia sylvestris* (HCE-CS) in an endometriosis animal model. **Methods and results** Sixteen female Swiss mice of endometriosis (ENDO) group were randomized into two groups after the implantation and establishment of heterologous endometrium onto the peritoneum abdominal wall and treated with HCE-CS 30 mg/kg or vehicle via gastric tube. The sham group consisted of eight female Swiss mice. The Von Frey test's behavioral evaluation to evaluate the levels of response to the mechanical nociceptive stimulus was performed before the surgery, before the treatment, and 30 min, 1h, 2h, and 3h after the administration of the extracts. A significant reduction of hyperalgesia was observed in the group treated with HCE-CS compared with the ENDO group without treatment, between 30 min and 3h after the **administration of the extract**. The highest response was observed in the 1h period after the administration of the medication. The anti-hyperalgesic effect was reproduced on the second day of treatment. **Conclusion** The results of this study demonstrate the anti-hyperalgesic potential of HCE-CS, justifying interest in conducting other studies that evaluate the direct effect of this plant on endometriosis lesions and the mechanisms involved in the relief of pain.

Key words: *Casearia sylvestris* Sw., Salicaceae, Endometriosis, Anti-hyperalgesic.

RESUMO

Relevância etnofarmacológica: A *Casearia sylvestris* Sw. é amplamente utilizada na medicina popular para tratar doenças inflamatórias, com base no conhecimento popular e em alguma literatura sobre eficácia. **Objetivo do estudo:** Este estudo avalia a atividade anti-hiperalgésica do extrato bruto hidroalcolólico de *Casearia sylvestris* Sw. (HCE-CS) em um modelo animal de endometriose. **Métodos e resultados:** Dezesesseis camundongos suíços fêmeas do grupo de endometriose (ENDO) foram randomizados em dois grupos após a implantação e estabelecimento de endométrio heterólogo na parede peritoneal e tratados com HCE-CS 30 mg/kg ou veículo via sonda gástrica. A avaliação comportamental pelo teste de Von Frey para avaliar os níveis de resposta ao estímulo nociceptivo mecânico foi realizada antes da cirurgia, antes do tratamento e 30 min, 1h, 2h e 3h após a administração dos extratos. Foi observada redução significativa da hiperalgesia no grupo tratado com HCE-CS em comparação ao grupo ENDO sem tratamento, entre 30 min e 3h após a administração do extrato. A maior resposta foi observada no período de 1h após a administração do medicamento. O efeito anti-hiperalgésico foi reproduzido no segundo dia de tratamento. **Conclusão:** Os resultados deste estudo demonstram o potencial anti-hiperalgésico do HCE-CS, justificando o interesse em realizar outros estudos que avaliem o efeito direto dessa planta nas lesões de endometriose e nos mecanismos envolvidos no alívio da dor.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris* Sw., Salicácea, Endometriose, Anti-hiperalgesia.

1 INTRODUÇÃO

A endometriose é definida pela identificação de implantes extrauterinos do epitélio glandular e/ou estroma endometrial (Vercellini et al., 2007). Pode acometer diversos sítios, entre eles peritônio, ligamentos uterossacos, septo retovaginal, ovários, intestino, bexiga e ureteres (Podgaec et al., 2008, Fuentes et al., 2014). É uma doença benigna, porém progressiva, e afeta 0,3-5% da população feminina em geral (Fuentes et al., 2014), atingindo até 74% das mulheres submetidas a laparoscopia por dor pélvica crônica (Peterson et al., 2013, Deus et al., 2014) e 47% das mulheres com infertilidade (Peterson et al., 2013). A dor pélvica crônica é um dos sintomas mais comuns da endometriose, que também se manifesta pela presença de dismenorreia, dispareunia de profundidade e infertilidade (Klein et al., 2014, de Oliveira et al., 2015). Quanto à etiologia, na atualidade acredita-se que fatores imunológicos e hormonais influenciam o ambiente peritoneal, impedindo a eliminação dessas células, complementando a teoria de Sampson (Burney, 2014, Ahrens et al., 2015). No entanto, a doença também tem sido arrolada como uma condição inflamatória, com neoangiogênese e atenuação da ação da progesterona no endométrio, bem como aumento da densidade de macrófagos no líquido peritoneal e alteração na produção de citocinas no fluido peritoneal de mulheres acometidas (Burney, 2014, Mehedintu et al., 2014, Volpato et al., 2018).

Seu tratamento baseia-se na supressão da função ovariana pelo uso de contraceptivos hormonais combinados, progestágenos e agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas e na remoção cirúrgica de lesões endometrióticas, além do controle da dor pelo uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e analgésicos (Stephens et al., 2013, Ruhland et al., 2011, ASRM, 2014). No entanto, a terapia hormonal só pode ser utilizada por um curto período de tempo devido a efeitos adversos graves, como pseudomenopausa, hemorragia maciça e perda de densidade mineral óssea (Dunselman et al., 2014). A recidiva da doença ocorre dentro de 3 a 5 anos em 30 a 50% das mulheres após a remoção cirúrgica das lesões de endometriose (Guo and Olive, 2007).

A elucidação dos mecanismos moleculares associados ao processo do desenvolvimento da endometriose proporciona novas perspectivas na etiopatologia da doença e o aperfeiçoamento das formas de diagnóstico e tratamento. Modelos pré-clínicos de endometriose vêm sendo empregados para avaliar a dor e a inflamação decorrentes desta patologia (Sun et al., 2016). Neste sentido, fármacos e produtos que possuam ação antinociceptiva (analgésica) e/ou anti-inflamatória têm potencial para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, e existe um interesse crescente pelo uso de

fitoterápicos para o tratamento de sintomas semelhantes à endometriose (Stephens et al., 2013, Zou et al., 2013, Bina et al., 2019), sendo que as plantas medicinais constituem possibilidades promissoras neste cenário.

Estudos preliminares já relataram importantes efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório para diferentes plantas em modelos animais de dor e inflamação, entre estas a *Casearia sylvestris* Sw. (de Mattos et al., 2007, Albano et al., 2013). A *Casearia sylvestris* Sw., popularmente conhecida como erva-de-bugre ou guaçatonga, contém em sua composição química diferentes classes de substâncias de interesse medicinal, tais como compostos diterpênicos (caseariaclerodano, caseariavestrinas A-C e casearinas A-T), ácido hexanóico, ácido capróico e triterpenos presentes em seu óleo essencial, além de conter saponinas, ácidos graxos, taninos, alcaloides, antocianinas, resinas, polissacarídeos e flavonoides (Alonso, 2004). Quanto às propriedades biológicas, já foi registrado o seu uso em humanos e animais para o tratamento de feridas e úlceras, para induzir anestesia local, bem como agente antitérmico, antisséptico, fungicida e tônico-estimulante (Alonso, 2004). Farmacologicamente, foi demonstrado em diferentes extratos da planta as propriedades citotóxicas contra células tumorais (Silva et al., 2008) ou bactérias e fungos (Tavares et al., 2008), sobre enzimas inflamatórias (Borges et al., 2001), além dos registros de ação sobre a dor (de Mattos et al., 2007) e o edema de origem inflamatória (Albano et al., 2013).

Diante do exposto observa-se que a pesquisa sobre a influência do tratamento com produtos naturais como os extratos de plantas medicinais na endometriose merece ser investigada. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação anti-hiperalgésica do extrato bruto hidroalcolólico de *Casearia sylvestris* Sw. (EBHA-CS) em um modelo animal desta patologia.

2 MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram empregados 30 camundongos Swiss fêmeas (8 doadores e 22 receptores), com 18-20 g de peso e 8 semanas de vida, adquiridos por doação do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mantidos sob condições controladas de luz e temperatura e com livre acesso a água e comida. Os camundongos foram aclimatados ao Laboratório de Neurociência Experimental (Lanex), na UNISUL/Brasil-SC por pelo menos 1 h antes dos testes, que foram realizados entre 08:00 e 12:00 a.m. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de ética para uso

animal (CEUA-UNISUL) sob o número 16.010.4.01.IV e estão de acordo com as diretrizes do National Institutes of Health Animal Care Guidelines (NIH publications N° 80-23).

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO

Antes da cirurgia foi realizado o teste de Von Frey para avaliação dos níveis basais de resposta ao estímulo nociceptivo mecânico. Depois disso, os animais foram randomizados em blocos, para formar o grupo Sham (8 animais) e o grupo ENDO, com os animais que seriam submetidos aos procedimentos de cirurgia para indução de endometriose (16 animais). Vinte e um dias após a cirurgia, os camundongos do grupo ENDO, foram divididos randomicamente para receberem EBHA-CS 30 mg/kg ou apenas veículo (grupo ENDO + EBHA-CS ou grupo ENDO sem tratamento). Cada grupo foi composto por 8 animais.

Para medir a variação na resposta dos animais como resultado da endometriose induzida, em relação aos valores basais encontrados no teste de Von Frey, foi realizada a segunda rodada de testes, com todos os animais, duas semanas após a cirurgia e antes do tratamento. Após o início do tratamento, a terceira rodada de testes foi conduzida por duas semanas e posteriormente os animais foram submetidos a procedimento de Morte Indolor Assistida (MIA). (Fig. 1).

2.3 INDUÇÃO CIRÚRGICA DE ENDOMETRIOSE E TRATAMENTO IN VIVO

Para a padronização do modelo em nosso laboratório, foi utilizado o modelo empregado por (Lu et al., 2010). O tecido uterino de cada camundongo doador foi implantado em 2 receptores. Os animais foram anestesiados com solução de Xilazina e Ketamina (cloridrato, 10 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular (IM) profunda). Nos animais doadores, foi realizada laparotomia para remoção dos dois cornos uterinos. Os cornos foram excisados e imersos em uma solução de lactato estéril e abertos longitudinalmente. Cada corno uterino foi fragmentado em 4 porções de tamanhos semelhantes (cerca de 2,5 mm de diâmetro). Em cada receptora foram implantados 4 fragmentos, na face interna do peritônio parietal pélvico com uma sutura de seda 7/0. Em seguida, a incisão na linha média foi fechada com uma sutura de seda trançada 3/0 e depois da cirurgia, todos os animais foram acompanhados e receberam 40.000 U de penicilina IM profilática. Além disso, receberam solução oral de 0,2 mg/kg de 17 β -estradiol, todos os dias, por 21 dias para estimular e manter o crescimento dos implantes

endometriais. Para os animais do grupo Sham, foi realizada laparotomia e quatro fragmentos de gordura pré-peritoneal das doadoras foram implantados de forma semelhante, porém não receberam a administração oral de 17β -estradiol.

Duas semanas após a indução dos implantes iniciais, os animais do grupo ENDO + EBHA-CS receberam 30 mg/kg de EBHA-CS e os animais dos grupos ENDO sem tratamento receberam apenas veículo. Os extratos foram administrados por via intragástrica, no volume de 0,1 ml/10g de peso.

O EBHA-CS utilizado neste estudo contém as Casearinas A, B, D, J – L, N, O, Q, S, T e X, além da Caseargrewiina F e Casearvestrina B, conforme caracterizado em estudo anterior (Piovezan et al., 2017) e foram preparados de como descrito previamente (Albano et al., 2013).

2.4 TESTE DE VON FREY

Para a avaliação da alodinia mecânica induzida pela indução da endometriose, foram utilizados monofilamentos de nylon denominados von Frey (VFH, Stoelting, Chicago, USA). Como indicativo de resposta, foram utilizados os valores percentuais para a frequência de retirada da pata dos animais para 10 aplicações do monofilamento com a força de 0,6 g. Esta pressão foi selecionada para a avaliação de alodinia mecânica, a partir de estudo anterior que observou que esta pressão não causa retirada da pata (nocicepção) em animais do grupo controle (Martins et al., 2011). O teste foi aplicado utilizando-se uma plataforma de 70 x 40 cm, que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm, para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior, sendo os animais colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma (Pitcher and Henry, 2004). O avaliador da resposta comportamental não tinha conhecimento prévio do grupo a ser estudado e todos os testes foram realizados pelo mesmo avaliador. Quando avaliada a influência do tratamento com o extrato da planta, as análises foram feitas de 30 min a 3h após a sua administração.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentaram distribuição normal e por isso foram submetidos à análise por ANOVA de duas vias seguidos respectivamente pelo teste de Bonferroni, para múltiplas comparações. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 VALIDAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOMETRIOSE

Os camundongos fêmeas Swiss, com 8 semanas de vida, que foram submetidas a cirurgia para indução de endometriose, receberam administração oral de 17- β estradiol por 21 dias ou laparotomia com implante de tecido gorduroso (Grupo Sham) e foram testadas para hiperalgesia pelo teste de von Frey no 7^o, 10^o, 14^o, 15^o, 21^o, 22^o, 28^o e 29^o dias pós-operatórios. A indução da endometriose foi confirmada uma vez que até o 14^o dia a resposta hiperalgésica foi elevada em todos os animais, independente do implante utilizado; no entanto, a partir do 15^o dia, houve redução significativa da frequência de resposta no grupo Sham, enquanto o grupo que recebeu implantes dos cornos uterinos e estradiol manteve a hiperalgesia mecânica, que permaneceu elevada até pelo menos o 29^o dia após o procedimento cirúrgico (Fig. 2). Após a realização da MIA, procedeu-se análise histológica do tecido peritoneal, com a confirmação da presença de focos de endometriose no grupo ENDO.

3.2 AÇÃO DA CASEARIA SYLVESTRIS SW. NA FREQUÊNCIA DE RESPOSTA HIPERALGÉSICA

No 21^o dia pós-operatório do grupo ENDO, administrou-se veículo ou HCE-CS 30 mg/kg nos animais selecionados, conforme randomização prévia. Para verificar em que período ocorreria o maior efeito dos produtos, realizou-se testes de Von Frey em diferentes intervalos de tempo após o início do tratamento (30 min, 1h, 2h e 3h).

Observou-se redução significativa da hiperalgesia nos grupos tratados com EBHA-CS 30 mg/kg, quando comparados com o grupo ENDO sem tratamento, entre 30 min e 3h após a administração dos extratos. A maior resposta foi observada no período de 1h após a administração da medicação com redução da frequência de resposta em 75% (Fig.3). O efeito anti-hiperalgésico foi reproduzido no segundo dia de tratamento (22^o dia pós-operatório). (Fig.3)

4 DISCUSSÃO

Com frequência, a endometriose causa sérios efeitos na qualidade de vida de suas portadoras, uma vez que frequentemente está associada a sintomas dolorosos como dor pélvica crônica, dispareunia e dismenorreia (de Oliveira et al., 2015). Além disso, os tratamentos farmacológicos disponíveis baseiam-se na manutenção de um estado hormonal hipoestrogênico e no alívio da dor, contudo, seus efeitos colaterais limitam seu

uso a longo prazo (ASRM, 2014). Recentemente, terapias naturais têm sido estudadas no tratamento de várias doenças inflamatórias, e estas terapias podem ser efetivas no tratamento da endometriose (Kong et al., 2014, Bina et al., 2019).

Até onde se sabe, este é o primeiro estudo que avalia o efeito anti-hiperalgésico do EBHA-CS em um modelo experimental de endometriose e foi observada importante redução da frequência de resposta ao estímulo algíco nos animais submetidos a tratamento com EBHA-CS em comparação com os animais que não receberam tratamento.

O efeito anti-hiperalgésico da *Casearia sylvestris* Sw. foi demonstrado em diferentes modelos de dor inflamatória, sugerindo que a resposta antinociceptiva observada seja provavelmente mediada tanto pela inibição na produção de mediadores inflamatórios quanto pela ativação de um mecanismo da via dos opioides e por sua ação antioxidante (de Mattos et al., 2007, Albano et al., 2013, Piovezan et al., 2017).

A endometriose é uma doença inflamatória associada ao aumento na concentração de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) e de prostaglandinas, além de maior migração leucocitária e concentração de macrófagos ativados em comparação com mulheres sem a doença. (Ricchio et al., 2018, Symons et al., 2018). Esses dados podem explicar, em parte, a ação da *Casearia sylvestris* Sw. observada neste estudo, uma vez que sua capacidade de inibir a migração leucocitária e a produção de TNF já foi demonstrada em estudos anteriores. (Albano et al., 2013, Pierri et al., 2017, Gusman et al., 2015).

Além do envolvimento da resposta inflamatória na fisiopatologia da endometriose, o estresse oxidativo tem sido proposto como um potencial fator envolvido na gênese da doença. (Donnez et al., 2016). Em 2013, Albano et al., em um estudo de pleurisia induzida em ratos, observaram que o HCE-CS foi capaz de alterar muitos parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo, como a redução da peroxidação lipídica e aumento da quantidade de proteínas com grupos tiol no tecido pulmonar, sugerindo que o efeito antioxidativo desta planta possa estar envolvido na resposta encontrada neste estudo.

Desta forma, os resultados aqui apresentados demonstram o potencial anti-hiperalgésico do EBHA-CS, justificando o interesse na realização de outros estudos que avaliem o efeito direto desta planta sobre as lesões de endometriose e os mecanismos envolvidos no alívio da dor, bem como pode servir de subsídio para futuros estudos clínicos sobre o efeito das plantas nesta condição.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, para Lia Karina Volpato. Deborah Martins Costa recebeu bolsa do programa UNISUL de iniciação científica (PUIC). Thais Walber recebeu bolsa PIBIC - CNPq/UNISUL.

REFERÊNCIAS

- Abad, M.J., Bermejo, P., Gonzales, E., Iglesias, I., Irurzun, A., Carrasco, L., 1999. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *Gen. Pharmacol.* 32, 499–503. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(98\)00214-6](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(98)00214-6)
- Ahrens, T., Silveira, C.G.T., Banz-Jansen, C., Rody, A., Hornung, D., 2015. Evaluation of YB-1 levels in patients with endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 191, 68–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.05.008>
- Albano, M.N., Da Silveira, M.R., Danielski, L.G., Florentino, D., Petronilho, F., Piovezan, A.P., 2013. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). *J. Ethnopharmacol.* 147, 612–617. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.049>
- Alonso, J., 2004. *Tratado de fitofármacos y nutracéuticos*. Corpus Libros, Rosário, Argentina.
- ASRM, 2014. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 101, 927–935. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.02.012>
- Atta, A.H., El-Sooud, K.A., 2004. The antinociceptive effect of some Egyptian medicinal plant extracts. *J. Ethnopharmacol.* 95, 235–238. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.07.006>
- Bina, F., Soleymani, S., Toliat, T., Hajimahmoodi, M., Tabarrai, M., Abdollahi, M., Rahimi, R., 2019. Plant-derived medicines for treatment of endometriosis: A comprehensive review of molecular mechanisms. *Pharmacol. Res.* 139, 76–90. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.008>
- Borges, M., Soares, A., Rodrigues, V., Oliveira, F., Fransheschi, A., Rucavado, A., Giglio, J., Homsí-Brandeburgo, M., 2001. Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). *Toxicon* 39, 1863–1869. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00169-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00169-6)
- Burney, R.O., 2014. Biomarker development in endometriosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 244, 75–81; discussion 80. <https://doi.org/10.3109/00365513.2014.936692>
- de Mattos, E.S., Frederico, M.J.S., Colle, T.D., de Pieri, D. V., Peters, R.R., Piovezan, A.P., 2007. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. *J. Ethnopharmacol.* 112, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.034>
- de Moura Sperotto, N.D., Steffens, L., Veríssimo, R.M., Henn, J.G., Péres, V.F., Vianna, P., Chies, J.A.B., Roehe, A., Saffi, J., Moura, D.J., 2018. Wound healing and anti-inflammatory activities induced by a *Plantago australis* hydroethanolic extract standardized in verbascoside. *J. Ethnopharmacol.* 225, 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.012>
- de Oliveira, R., Musich, D. dos S., Ferreira, M.P.S.F., Vilarino, F.L., Barbosa, C.P., 2015. Perfil epidemiológico das pacientes inférteis com endometriose. *Reprodução Clim.* 30, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.recli.2015.03.005>

Deus, J.M. de, Santos, A.F.R. dos, Bosquetti, R. de B., Pofhal, L., Alves Neto, O., 2014. Analysis of 230 women with chronic pelvic pain assisted at a public hospital. *Rev. Dor* 15, 191–197. <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20140042>

Di Stasi, L.C., Oliveira, G.P., Carvalhaes, M.A., Queiroz-Junior, M., Tien, O.S., Kakinami, S.H., Reis, M.S., 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73, 69–91. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(01\)00362-8](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(01)00362-8)

Donnez, J., Binda, M.M., Donnez, O., Dolmans, M.-M., 2016. Oxidative stress in the pelvic cavity and its role in the pathogenesis of endometriosis. *Fertil. Steril.* 106, 1011–1017. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1075>

Dunselman, G.A.J., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D’Hooghe, T., De Bie, B., Heikinheimo, O., Horne, A.W., Kiesel, L., Nap, A., Prentice, A., Saridogan, E., Soriano, D., Nelen, W., 2014. ESHRE guideline: Management of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 29, 400–412. <https://doi.org/10.1093/humrep/det457>

Fuentes, A., Escalona, J., Céspedes, P., Espinoza, A., Johnson, M.C., 2014. Prevalencia de la endometriosis en mujeres sometidas a esterilización quirúrgica laparoscópica en un hospital de Santiago de Chile. *Rev. Med. Chil.* 142, 16–19. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872014000100003>

Gonzales, E., Iglesias, I., Carretero, E., Villar, A., 2000. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 70, 329–333. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00183-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00183-X)

Guo, S.W., Olive, D.L., 2007. Two unsuccessful clinical trials on endometriosis and a few lessons learned. *Gynecol. Obstet. Invest.* 64, 24–35. <https://doi.org/10.1159/000098413>

Gusman, G.S., Campana, P.R. V, Castro, L.C., Castilho, R.O., Teixeira, M.M., Braga, F.C., 2015. Evaluation of the Effects of Some Brazilian Medicinal Plants on the Production of TNF- α and CCL2 by THP-1 Cells. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/497123>

Klein, S., D’Hooghe, T., Meuleman, C., Dirksen, C., Dunselman, G., Simoens, S., 2014. What is the societal burden of endometriosis-associated symptoms? A prospective Belgian study. *Reprod. Biomed. Online* 28, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.09.020>

Kong, S., Zhang, Y.H., Liu, C.F., Tsui, I., Guo, Y., Ai, B.B., Han, F.J., 2014. The complementary and alternative medicine for endometriosis: A review of utilization and mechanism. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/146383>

Kujawska, M., Hilgert, N.I., 2014. Phytotherapy of polish migrants in Misiones, Argentina: Legacy and acquired plant species. *J. Ethnopharmacol.* 153, 810–830. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.044>

Lu, Y., Nie, J., Liu, X., Zheng, Y., Guo, S.-W., 2010. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, reduces lesion growth and hyperalgesia in experimentally induced endometriosis in mice. *Hum. Reprod.* 25, 1014–1025. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep472>

Martins, D.F., Mazzardo-Martins, L., Gadotti, V.M., Nascimento, F.P., Lima, D.A.N., Speckhann, B., Favretto, G.A., Bobinski, F., Cargnin-Ferreira, E., Bressan, E., Dutra, R.C., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., 2011. Ankle joint mobilization reduces axonotmesis-induced neuropathic pain and glial activation in the spinal cord and enhances nerve regeneration in rats. *Pain* 152, 2653–2661. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.08.014>

Mehedintu, C., Plotogea, M.N., Ionescu, S., Antonovici, M., 2014. Endometriosis still a challenge. *J. Med. Life* 7, 349–57.

Peterson, C.M., Johnstone, E.B., Hammoud, A.O., Stanford, J.B., Varner, M.W., Kennedy, A., Chen, Z., Sun, L., Fujimoto, V.Y., Hediger, M.L., Buck Louis, G.M., 2013. Risk factors associated with endometriosis: Importance of study population for characterizing disease in the ENDO Study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 208, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.02.040>

Pierri, E.G., Castro, R.C., Vizioli, E.O., Ferreira, C.M.R., Cavalheiro, A.J., Tininis, A.G., Chin, C.M., Santos, A.G., 2017. Anti-inflammatory action of ethanolic extract and clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. *Brazilian J. Pharmacogn.* 27, 495–501. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.12.008>

Piovezan, A.P., Batisti, A.P., Benevides, M.L.A.C.S., Turnes, B.L., Martins, D.F., Kanis, L., Duarte, E.C.W., Cavalheiro, A.J., Bueno, P.C.P., Seed, M.P., Norling, L. V., Cooper, D., Headland, S., Souza, P.R.P.S., Perretti, M., 2017. Hydroalcoholic crude extract of *Casearia sylvestris* Sw. reduces chronic post-ischemic pain by activation of pro-resolving pathways. *J. Ethnopharmacol.* 204, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.059>

Pitcher, G.M., Henry, J.L., 2004. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. *Exp. Neurol.* 186, 173–197. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.10.019>

Podgaec, S., Gonçalves, M.O., Klajner, S., Abrão, M.S., 2008. Epigastric pain relating to menses can be a symptom of bowel endometriosis. *Sao Paulo Med. J.* 126, 242–244. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802008000400012>

Riccio, L. da G.C., Santulli, P., Marcellin, L., Abrão, M.S., Batteux, F., Chapron, C., 2018. Immunology of endometriosis. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 50, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.01.010>

Ruhland, B., Agic, A., Krampe, J., Diedrich, K., Hornung, D., 2011. Innovations in conservative endometriosis treatment: An updated review. *Minerva Ginecol.* 63, 247–249. <https://doi.org/R09113279>

Silva, S.L. da, Chaar, J. da S., Figueiredo, P. de M.S., Yano, T., 2008. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and

erythrocytes. *Acta Amaz.* 38, 107–112. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000100012>

Stephens, L., Whitehouse, J., Polley, M., 2013. Western Herbal Medicine, Epigenetics, and Endometriosis. *J. Altern. Complement. Med.* 19, 853–859. <https://doi.org/10.1089/acm.2012.0623>

Sun, Q., Ding, D., Liu, X., Guo, S., 2016. Tranylecypromine, a lysine-specific demethylase 1 (LSD1) inhibitor, suppresses lesion growth and improves generalized hyperalgesia in mouse with induced endometriosis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 14, 17. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0154-0>

Symons, L.K., Miller, J.E., Kay, V.R., Marks, R.M., Liblik, K., Koti, M., Tayade, C., 2018. The Immunopathophysiology of Endometriosis. *Trends Mol. Med.* 24, 748–762. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.07.004>

Tavares, W.L., Apolonio, A.C., Gomes, R., Teixeira, K.I., Brandao, M.G., Santos, V., 2008. Assessment of the antimicrobial activity of *Casearia sylvestris* extract against oral pathogenic microorganisms. *Rev. ciencias Farm. basica e Apl.* 29, 257–260.

Vercellini, P., Fedele, L., Aimi, G., Pietropaolo, G., Consonni, D., Crosignani, P.G., 2007. Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. *Hum. Reprod.* 22, 266–71. <https://doi.org/10.1093/humrep/del339>

Volpato, L.K., Horewicz, V.V., Bobinski, F., Martins, D.F., Piovezan, A.P., 2018. Annexin A1, FPR2/ALX, and inflammatory cytokine expression in peritoneal endometriosis. *J. Reprod. Immunol.* 129, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.08.002>

Zou, J., Guan, Z., Zhang, W.Y., Xiao, W., Li, Y.L., 2013. Beneficial effects of the Chinese herbal medicine Sanjie Zhentong Capsule on experimental endometriosis in rats. *Chin. J. Nat. Med.* 11, 666–672. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60077-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60077-1)

Fig. 1: Ilustração esquemática do delineamento experimental deste estudo, para os 40 animais que seguiram para avaliação comportamental.

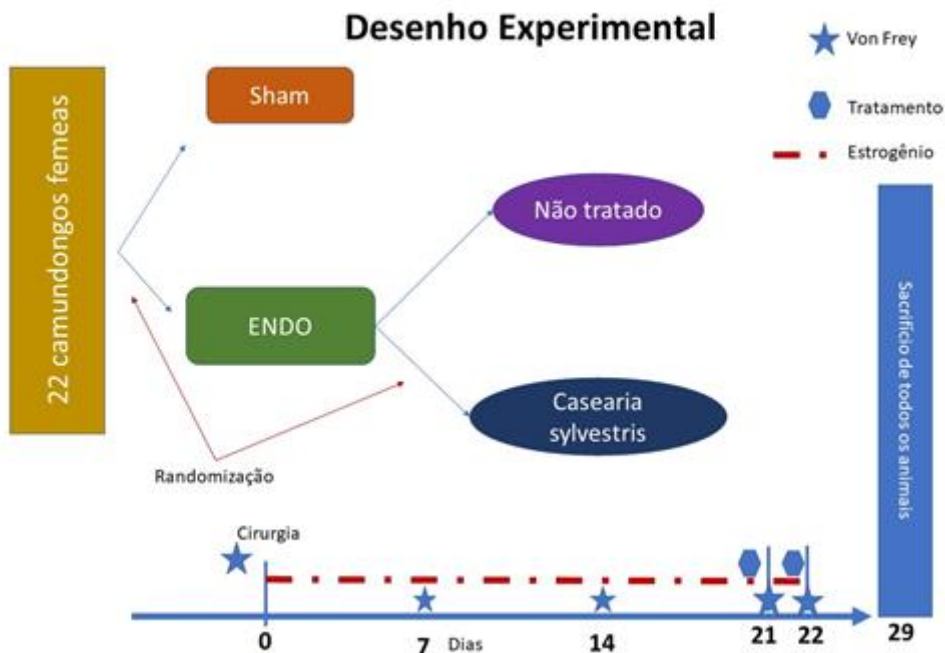


Fig. 2: Validação do modelo experimental de endometriose – Observa-se a frequência de resposta hiperalgésica pré-operatória e no 7º, 10º, 14º, 15º, 21º, 22º, 28º e 29º dias pós-operatórios, nos grupos Sham (implante de gordura, sem administração de estrogênio) e no grupo ENDO (implante dos cornos uterinos e administração de 17 β -estradiol até o 21º dia pós-operatório)

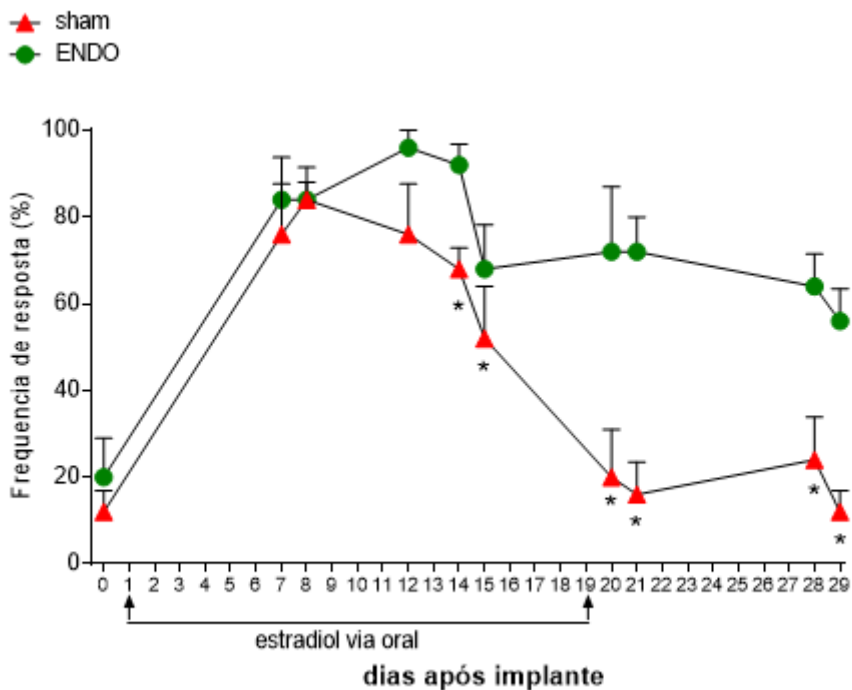


Fig. 3: Time-course demonstrando a ação do EBHA-CS 30 mg/kg na frequência de resposta hiperalgésica em modelo experimental de endometriose.
ENDO – modelo experimental de endometriose; EBHA-CS – extrato bruto hidroalcolólico de *Casearia sylvestris* SW.; B – Frequência de resposta pré-tratamento

