



**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**NATHALIA NAHAS DONATELLO**

**ATIVAÇÃO DE RECEPTORES OPIOIDES PERIFÉRICOS E ESPINAIS PELA  
INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lavandula augustifolia* REDUZ  
HIPERALGESIA MECÂNICA EM MODELOS ANIMAIS DE NEUROPATIA E  
INFLAMAÇÃO CRÔNICA**

Palhoça  
2017

**NATHALIA NAHAS DONATELLO**

**ATIVAÇÃO DE RECEPTORES OPIOIDES PERIFÉRICOS E ESPINAIS PELA  
INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lavandula augustifolia* REDUZ  
HIPERALGESIA MECÂNICA EM MODELOS ANIMAIS DE NEUROPATIA E  
INFLAMAÇÃO CRÔNICA**

**LINHA DE PESQUISA: Neurociências**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde para obtenção do título de  
Mestra em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Palhoça

2017

D73 Donatello, Nathalia Nahas, 1990-

Ativação de receptores opioides periféricos e espinais pela inalação do óleo essencial de lavandula augustifolia reduz hiperalgesia mecânica em modelos animais de neuropatia e inflamação crônica / Nathalia Nahas Donatello. – 2017.

83 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernandes Martins

1. Dor - Tratamento. 2. Aromaterapia. 3. Analgesia. 4. Inflamação. I. Martins, Daniel Fernandes. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.0472

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária da Unisul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Ativação de receptores opioides periféricos e espinais pela inalação do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* reduz hiperalgesia mecânica em modelos animais de neuropatia e inflamação crônica

**NATHALIA NAHAS DONATELLO**  
AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 14 de julho de 2017.

Doutor Daniel Fernandes Martins (orientador)

Doutor Allisson Freire Bento (Avaliador externo- CIE.nP)

Doutora Anna Paula Piovezan (avaliador interno)

*Professor Doutor Jefferson Traebert*

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus queridos avós, Juarez e Valkíria.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer à família maravilhosa que eu tenho. Meus pais, meus avós, tia Karin e Arthur. Obrigada pela vida que tenho tido ao lado de vocês, por tudo que vocês sempre me proporcionaram, pelo apoio que sempre me deram, por sempre terem sido presentes e participativos na minha vida, e por nunca terem colocado limite em meus sonhos. Tudo que tenho, sou e posso ser é graças a vocês.

Alguém muito importante que também merece meus agradecimentos é o Willian. Obrigada por ser tão especial pra mim, um grande companheiro e amigo. Cheguei ao fim dessa etapa também graças à ti. Obrigada por nunca ter me deixado desistir, nem desanimar. Por sempre ter me ajudado de todas as formas possíveis, por encher minha vida de amor, atenção e carinho.

Gostaria de agradecer também ao Prof. Daniel F. Martins, por ter me apresentado o mundo da pesquisa e da Neurociência, lá na graduação em 2011. Por ter acreditado em mim, me dado essa grande oportunidade e me guiado mais uma vez. Obrigada por ter dividido comigo seu conhecimento, seu trabalho e por ter me orientado todo esse tempo. Nada disso teria sido possível sem o Sr.

Agradeço também aos professores do PPGCS e meus colegas de mestrado que contribuíram para minha formação, mas em especial agradeço a Profa. Anna Paula Piovezan que sempre deixou suas portas abertas e me ajudou sempre que pode. Obrigada por toda a sua paciência e atenção.

Esse trabalho não teria acontecido também sem os grandes colegas de laboratório que tenho. Pessoas especiais, dedicadas, que contribuíram para minha pesquisa, aprendizado, e que fizeram da minha rotina muito melhor. Em especial: Aline, Silvana, Daniela, Daiana, Júlia e Kamilla.

Obrigada aos animais que foram fundamentais para a realização deste trabalho e tantos outros. Obrigada também à FAPESC, pelo apoio financeiro. E obrigada à Marci, que desde o início do Mestrado sempre ajudou tanto.

A todos estes e outros que contribuíram para conclusão desta etapa. Muito obrigada, de todo o coração!

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.” – Marie Curie*

## RESUMO

**Introdução:** O óleo essencial de *Lavandula angustifolia* (OELa) tem sido utilizado amplamente na aromaterapia no tratamento de diversas condições clínicas, com evidências do potencial analgésico e antiinflamatório.

**Objetivo:** O presente estudo investigou o efeito da inalação do OELa sobre a hiperalgesia mecânica em dois modelos animais de dor crônica e o possível envolvimento do sistema opioide neste efeito.

**Métodos:** Os constituintes do OELa foram caracterizados pela análise fitoquímica por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Os experimentos comportamentais foram conduzidos após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL – CEUA/UNISUL. Utilizou-se camundongos *Swiss* fêmeas pesando de 25 a 35g. Para indução da síndrome da dor regional complexa do tipo 1 (SDRC-1), os animais foram submetidos à isquemia/reperfusão (IR) da pata posterior. A dor inflamatória crônica foi induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) do adjuvante completo de Freund (CFA). Em ambos modelos os animais receberam tratamento agudo e diário com o OELa. Os animais foram avaliados após os tratamentos quanto a hiperalgesia mecânica (pelo teste de von Frey) e atividade locomotora (teste do campo aberto). Para avaliar o envolvimento do sistema opioide, os animais receberam pré-tratamento com naloxona, administrada intraperitoneal (i.p.), intratecal (i.t.) ou i.pl.

**Resultados:** Identificou-se sessenta e cinco elementos no OELa. Dentre os compostos encontrados, os majoritários foram o linalol (30,61%) e o acetato de linalila (20,36%). Também foi observado que a inalação do OELa produziu: i) efeito anti-hiperalgésico na SDRC-I, ii) efeito anti-hiperalgésico na dor inflamatória induzida por CFA e, iii) ativação de receptores opioide periféricos e espinais.

**Conclusão:** A inalação do OELa mostrou eficácia (prova de conceito) em reduzir a hiperalgesia mecânica em condições de dor crônica do tipo inflamatória e neuropática. E este efeito parece ser mediado, pelo menos em parte, por receptores opioides periféricos e centrais.

**Palavras-chave:** Aromaterapia. Dor neuropática. Dor inflamatória. Sistema opioide.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Lavandula angustifolia*'s essential oil (LaEO) has been widely used by aromatherapy in the treatment of various clinical conditions, with evidence of its analgesic and anti-inflammatory potential.

**Objective:** The present study investigated the effect of LaEO inhalation on mechanical hyperalgesia in two animal models of chronic pain and the possible involvement of the opioid system in this effect.

**Methods:** The constituents of the LaEO were phytochemically characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-EM). Behavioral experiments were conducted after approval by the Ethics Committee on Animal Use of UNISUL – CEUA/UNISUL. Female *Swiss* mice weighing 25 to 35g were used. For induction of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-1), the animals were submitted to ischemia/reperfusion (IR) of the hind paw. Chronic inflammatory pain was induced by intraplantar injection (i.pl.) of Complete Freund's Adjuvant (CFA). In both models animals received acute and daily treatment with the LaEO. The animals were evaluated after the treatments for mechanical hyperalgesia (by the von Frey test) and locomotor activity (open field test). To evaluate the involvement of the opioid system, the animals received pre-treatment with naloxone, administered intraperitoneally (i.p.), intrathecally (i.t.) or i.pl.

**Results:** Sixty-five substances were identified in LaEO. Among the compounds found, the major ones were linalool (30.61%) and linalyl acetate (20.36%). It was also observed that LaEO inhalation produced: i) antihyperalgesic effect in CRPS-1, ii) antihyperalgesic effect on CFA-induced inflammatory pain, and iii) activation of peripheral and spinal opioid receptors.

**Conclusion:** LaEO inhalation showed efficacy (proof of concept) in reducing mechanical hyperalgesia in conditions of chronic inflammatory and neuropathic pain. Moreover, this effect seems to be mediated at least in part, by peripheral and central opioid receptors.

**Keywords:** Aromatherapy. Neuropathic pain. Inflammatory pain. Opioid system.

## LISTAS

### Lista de abreviaturas

AINES – Antiinflamatórios não-esteroidais

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

AR – Receptor adrenérgico

ASC – Área sob a curva

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA - Adjuvante completo de Freund (do inglês, Complete Freund's Adjuvant)

CG – Cromatografia gasosa

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetria de massa

CPME – Corno posterior da medula espinal

CRF – Fator liberador da corticotrofina

CRFR – Receptor do fator liberador da corticotrofina

DC – Diclofenaco

DN- Dor neuropática

DSR- Distrofia Simpático Reflexa

EO – Estresse oxidativo

E.P.M – Erro Padrão da Média

EVA – Escala Visual Analógica

GSNE – Gânglio sensorial do nervo espinal

i.g. – intragástrico

i.p.- intraperitoneal

i.pl. – intraplantar

i.t. – intratecal

IR – Isquemia/Reperusão

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, International Association for the Study of Pain)

IL- Interleucina

N – Naive

NA – Noradrenalina

NeuPSIG – Special Interest Group on Neuropathic Pain

NF-KB – Fator nuclear kappa B

NRO – Neurônios receptores olfatórios

OA – Osteoartrite  
OE – Óleo essencial  
OELa – Óleo Essencial de *Lavandula angustifolia*  
PGs- Prostaglandina  
PO – Peptídeo opioide  
RO – Receptor opioide  
ROD – Receptor opioide Delta  
ROK – Receptor opioide Kappa  
ROM – Recetor opioide Mu  
s.c. - subcutânea  
SDRC – Síndrome da Dor Regional Complexa  
SNC – Sistema nervoso central  
SNP – Sistema nervoso periférico  
sP – substância P  
SUS – Sistema Único de Saúde  
TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alpha  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina  
vF – von Frey

#### Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo..... 42

#### Lista de figuras

Figura 1 - Mecanismo periférico da analgesia opioide..... 29

Figura 2 - Fluxograma do delineamento do estudo..... 38

Figura 3 - Perfil fitoquímico do óleo essencial *Lavandula angustifolia*..... 47

Figura 4 - Efeito da inalação do OELa sobre a hiperalgesia mecânica induzida por IR..... 49

Figura 5 - Efeito da inalação do OELa sobre a hiperalgesia mecânica induzida por CFA..... 51

Figura 6 - Receptores opioides periféricos e centrais estão envolvidos no efeito antinociceptivo do OELa..... 53

Figura 7 - Efeito da inalação do OELa sobre a atividade locomotora..... 54

Lista de tabelas

Tabela 1 - Componentes identificados no óleo essencial de *Lavandula angustifolia*..... 44

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
<b>1.1.1 Dor.....</b>	<b>16</b>
1.1.1.1 Dor crônica.....	18
1.1.1.1.1 Dor neuropática e SDRC.....	19
1.1.1.1.2 Dor crônica de origem inflamatória.....	24
1.1.1.2 Sistema opioide.....	26
<b>1.1.2 Óleo essencial de <i>Lavandula angustifolia</i>.....</b>	<b>30</b>
1.1.2.1 Via inalatória.....	32
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	36
3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS.....	36
3.3 ANIMAIS.....	36
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	37
3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS.....	38
<b>3.5.1 Análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....</b>	<b>38</b>
<b>3.5.2 Indução da lesão por IR em camundongos.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.3 Indução da inflamação periférica.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.4 Tratamento inalatório com o OELa.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.5 Testes comportamentais.....</b>	<b>40</b>
<b>3.5.6 Avaliação do efeito da inalação do OELa na hiperalgesia mecânica.....</b>	<b>40</b>
<b>3.5.7 Envolvimento dos receptores opióides no efeito antihiperálgico da inalação do OELa .....</b>	<b>41</b>

<b>3.5.8 Avaliação do efeito da inalação do OELa na atividade locomotora.....</b>	<b>41</b>
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO.....	42
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	42
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	42
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
4.1 ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DO OELA.....	44
4.2 EFICÁCIA DA INALAÇÃO DO OELA NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR IR.....	48
4.3 EFICÁCIA DA INALAÇÃO DO OELA NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR CFA.....	50
4.4. RECEPTORES OPIOIDES PERIFÉRICOS E ESPINAIS MEDEIAM O EFEITO ANTIHIPERALGÉSICO DA INALAÇÃO DO OELA.....	52
4.5 EFEITO DA INALAÇÃO DO OELA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	53
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	62
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO A- Parecer Aprovação da Comissão de Ética.....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A dor crônica é um problema de saúde pública que acarreta em enormes gastos a nação, devido ao seu tratamento e por reduzir a capacidade de trabalho do indivíduo e sua interação com a sociedade. Além disso a dor crônica também pode comprometer a qualidade de vida do indivíduo e de seus familiares ou cuidadores<sup>1</sup>. Nos Estados Unidos em torno de US\$ 635 bilhões foram gastos no tratamento da dor crônica em 2010, sendo este um valor mais elevado do que os custos anuais do país com câncer, doenças cardíacas e diabetes<sup>2</sup>.

Dependendo de sua origem, a dor crônica pode ser classificada como neuropática ou inflamatória. A dor de origem neuropática é causada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso periférico ou central, enquanto a dor de origem inflamatória é geralmente iniciada por danos nos tecidos ou por inflamação<sup>3</sup>.

Ensaio clínicos randomizados controlados demonstraram que os opioides, os antiinflamatórios não esteroidais (AINES), os anticonvulsivantes e os antidepressivos constituem as farmacoterapias mais utilizadas no tratamento da dor crônica. No entanto, estes medicamentos produzem muitos efeitos colaterais e têm eficácia terapêutica limitada em alguns casos<sup>4-9</sup>.

As dores crônicas de origem neuropática ou inflamatória diferem de dores agudas na duração, limiar para estimulação e na plasticidade que ocorre no tecido periférico lesionado e no corno posterior da medula espinal (CPME)<sup>10,11,12</sup>. Essas diferenças substanciais poderiam explicar por que alguns analgésicos que são empregados no tratamento da dor aguda podem não ser eficazes no tratamento da dor crônica<sup>13</sup>.

Sabe-se que a sensação dolorosa pode ser controlada pelos sistemas endógenos moduladores da dor, predominantemente através de vias descendentes opioidérgicas, serotoninérgicas, noradrenérgicas, canabinoidérgicas e dopaminérgicas<sup>14,15</sup>.

Os opioides possuem um papel importante na transmissão da dor, por iniciarem o controle descendente da dor no tronco encefálico e por reduzirem diretamente a atividade das fibras do tipo C e do tipo A $\delta$  no CPME, via receptores opioides pré-sinápticos. Além disso, foi observado em estudos pré-clínicos que o tratamento repetido com morfina produz efeito antinociceptivo mediado por receptores opioides

no núcleo magno da rafe, agindo por meio do sistema de controle descendente de modulação de dor<sup>16</sup>. Receptores opioides não são expressos exclusivamente no sistema nervoso central (SNC). Sua presença tem sido observada também no sistema nervoso periférico (SNP), em neurônios nociceptivos primários (corpo celular) onde eles são transportados para os terminais centrais e periféricos. Nos terminais centrais, os opioides reduzem a liberação de neurotransmissor excitatórios das fibras aferentes primárias nociceptivas, bloqueando assim a transmissão sináptica, enquanto que, na periferia a ativação dos receptores opioides hiperpolariza diretamente os neurônios sensoriais e atenua a sensibilização neuronal ou a hiperexcitabilidade induzida por inflamação ou lesão<sup>17</sup>.

Numerosos estudos têm demonstrado os efeitos antinociceptivos de alguns agonistas seletivos e não seletivos para receptores opioides em diferentes modelos de dor neuropática e inflamatória<sup>18-21</sup>. No entanto, apesar do reconhecimento de seu potencial terapêutico no tratamento da dor, ainda assim, a utilização clínica de agonistas opioides é limitada devido os seus efeitos secundários, desenvolvimento de tolerância e dependência física<sup>22,23</sup>.

Perante este quadro, se faz necessária, seja por estudos clínicos ou não clínicos, a busca por novas terapêuticas adjuvantes que possam ativar esses receptores/sistema e talvez propiciar uma nova abordagem terapêutica, onde com a combinação com doses menores de medicamentos possam então aumentar o alívio da dor crônica e reduzir os efeitos colaterais<sup>15</sup>.

As práticas integrativas e complementares, como a aromaterapia, são utilizadas desde a antiguidade pelos mais diversos povos no tratamento da saúde, porém, são poucos os estudos que compreendem de forma aprofundada seus mecanismos biológicos<sup>24,25</sup>. Pelo fato dos óleos essenciais serem extraídos de plantas, a aromaterapia se torna uma ciência diretamente coligada com a fitoterapia<sup>26</sup>, fazendo com que ela seja um recurso da mesma, e utilizada também dentro do Sistema Único de Saúde (SUS), como tratamento adjuvante a medicina alopática no Brasil<sup>27</sup>.

É possível perceber que há um crescente interesse nas propriedades analgésicas de extratos de plantas aromáticas, particularmente nos OE. Sabe-se que a aromaterapia produz benefícios para os seres humanos melhorando, tanto aspectos físicos (funcionamento de músculos e vísceras) quanto mental (cognitivos e humor).

Essa prática tem se tornado cada vez mais popular e já é considerada uma terapia adjuvante em muitos países<sup>28,29</sup>.

O OELa é composto por misturas complexas de álcoois, mono e sesquiterpenóides, ésteres, óxidos e cetonas. O linalol e o acetato de linalila são os principais componentes do óleo. No estudo da atividade anti-nociceptiva de alguns constituintes do OELa, já tem sido demonstrado parcialmente o mecanismo de ação. Por exemplo, foi mostrado que os sistemas opioidérgico, colinérgico e dopaminérgico, estão envolvidos no efeito antinociceptivo do linalol. Apesar de vários estudos demonstrarem atividades antinociceptivas, imunomoduladoras e anti-inflamatórias de compostos encontrados no OELa<sup>30,31,32</sup> essas evidências são de estudos *in vitro* ou de estudos em modelos de dor (nocicepção) aguda. Neste sentido, evidências do efeito analgésico e anti-inflamatório da lavanda em modelos de dor (nocicepção) crônica necessitam ainda ser realizados.

Mesmo com um crescente número de estudos, ainda não há dados suficientes que confirmem a eficácia da inalação do OELa no tratamento da dor crônica. Além disso, o mecanismo de ação deste composto não é completamente compreendido. Assim, na presente pesquisa primeiramente se investigou os efeitos analgésicos (anti-hiperalgésico) e antiinflamatório do OELa em modelos de dor crônica de origem inflamatória e neuropática. E então, analisou-se o possível envolvimento dos receptores opioides neste efeito.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1. Dor

A dor é uma resposta normal a um evento geralmente desagradável associado a uma lesão tecidual real ou potencial. Por envolver diversos fatores, como componentes afetivos e emocionais, é tida como uma experiência subjetiva, complexa e de difícil definição, apesar de ser conhecida por todos. A experiência do indivíduo é diretamente relacionada à percepção da intensidade da dor. Trata-se de uma função protetora de extrema importância ao organismo, por servir como um alerta a lesões ou possíveis lesões que requerem tratamento ou fuga. Ela não é uma resposta direta a um evento sensorial, e sim, o resultado de uma variedade de sinais neuronais processados pelo encéfalo<sup>33</sup>.

A dor pode ser classificada temporalmente em: dor rápida (ou aguda) e dor lenta. A primeira é sentida dentro de 0,1 segundo após o estímulo doloroso por ser transmitida por fibras A $\delta$ , as quais são mielinizadas e transmitem informações de nociceptores térmicos ou mecânicos quando ativados. Entretanto a segunda, se inicia após 1 segundo ou mais, aumentando gradualmente, já que é transmitida por fibras do tipo C (não mielinizadas) que levam ao SNC sinais de nociceptores polimodais<sup>34</sup>.

Os nociceptores estão amplamente distribuídos na pele e em tecidos profundos. Existem 3 classes principais que são ativados por estímulos específicos, tais como: térmicos (extremos de temperatura), mecânicos (pressão intensa) e polimodais (estímulos de alta intensidade mecânico, químico ou térmico). Há ainda uma quarta classe, os nociceptores silentes que são encontrados nas vísceras e, ao contrário dos outros, sua ativação se dá por inflamação e agentes químicos que reduzem seu limiar de disparo<sup>33</sup>.

O sistema somatossensorial é responsável pela percepção do toque, pressão, dor, temperatura, posição, movimento e vibração. Os nervos somatossensoriais estão na pele, músculos, articulações e fáscia. Eles incluem termorreceptores, mecanorreceptores, quimiorreceptores, pruriceptores e os nociceptores, que enviam sinais para a medula espinal e dela ao encéfalo onde ocorre a percepção da dor<sup>35</sup>.

A dor aguda é iniciada pela ativação de nociceptores periféricos no local da lesão, o que provoca uma despolarização em direção a medula espinal. O centro metabólico de cada célula neuronal é localizado no gânglio sensorial do nervo espinal (GSNE). Dele saem prolongamentos axônicos que se dividem em dois troncos, um deles se dirige aos tecidos periféricos e outro para a medula espinal. As fibras nervosas aferentes primárias entram na medula espinal pela região posterior e fazem conexões com neurônios de segunda ordem nas lâminas I e II. Esta comunicação sináptica se dá por meio da liberação de neurotransmissores, como o glutamato e a substância P (sP). A ativação dos neurônios subseqüentes transmite a informação até o tronco encefálico e centros corticais superiores, momento em que a dor é percebida<sup>36-39</sup>.

De acordo com estudos funcionais e anatômicos em animais e seres humanos a via de modulação da dor eferente (descendente) originadas no bulbo rostroventral e outros núcleos do tronco encefálico, tais como: o núcleo do trato do solitário, o núcleo parabraquial, o núcleo reticular dorsal, além do envolvimento do hipotálamo e do córtex, interagem com fibras aferentes, interneurônios e neurônios de projeção no

CPME. As ações nestes locais, em função da influência de receptores individuais sobre a excitabilidade celular, suprimem ou facilitam a passagem da informação nociceptiva para a substância cinzenta periaquedutal, tálamo, hipotálamo, amígdala e outras estruturas cerebrais envolvidas no processamento secundário. Essas estruturas transferem informações nociceptivas para regiões corticolímbicas e interagem com outros centros para modular a atividade das vias descendentes. Essas vias modulam o fluxo simpático por ações em neurônios simpáticos pré-ganglionares na medula espinal. Assim levando através da medula espinal a informação excitatória ou inibitória do cérebro para a periferia, facilitando ou inibindo a percepção dolorosa<sup>36-39</sup>.

#### 1.1.1.1 Dor crônica

A dor crônica pode ser definida como a dor com duração além do tempo de cicatrização normal para uma determinada lesão, ou seja, dor que perdura por mais de 3 meses<sup>40</sup>. É uma condição complexa e heterogênea<sup>41</sup>.

Há pouco tempo, ainda se presumia que a dor crônica possuía o mesmo mecanismo da dor aguda e que era causada por um contínuo estímulo nociceptivo periférico. Porém, pesquisas mostram que o SNC tem um papel importante na modulação da nocicepção, o que é evidenciado pela falta de dados mostrando qualquer estado doloroso em que o grau de estímulo nociceptivo pode ser correlacionado com o grau de dor sentida. Acredita-se que essa alteração possa ser o resultado da sinalização nociceptiva periférica que persiste após a cicatrização do tecido, conduzindo a uma hipersensibilidade das fibras nervosas, ou seja, as fibras continuam respondendo a estímulos sensoriais baixos ou até mesmo ausentes<sup>42,43,44</sup>.

Para qualquer diagnóstico de dor é provável que haja, ao menos inicialmente, um mecanismo principal subjacente gerando a dor. Porém, à medida que a dor se torna crônica, desenvolve-se uma sobreposição de múltiplos mecanismos e a sensibilização central desempenha frequentemente um papel mais dominante do que a estimulação periférica<sup>42</sup>.

A Associação Internacional para o estudo da dor (IASP) define a sensibilização central como "maior responsividade dos neurônios nociceptivos no SNC à sua entrada aferente normal ou sub-limiar"<sup>45</sup>. Na sinapse dos neurônios de segunda ordem no CPME, essa responsividade exacerbada pode acarretar em mudanças na

permeabilidade de canais de cálcio e super-expressão de receptores<sup>46,47</sup>. Um dos contribuintes, para a promoção da dor crônica, são as células neurogliais, cuja hiperativação desencadeia a liberação de mediadores da dor, tais como: citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteases<sup>48</sup>. O desequilíbrio resultante entre facilitação descendente e inibição nas regiões supraespinais, e a má adaptação da plasticidade subcortical e cortical, também são outros fatores para perpetuação da dor<sup>49,50,51</sup>.

#### *1.1.1.1.1 Dor Neuropática e SDRC*

Há mais de 15 anos, a dor neuropática (DN) foi definida como “dor iniciada ou causada por uma lesão primária, disfunção ou perturbação transitória do sistema nervoso central ou periférico”, porém, recentemente, a IASP publicou uma nova definição que caracteriza a DN como “dor causada por uma lesão ou doença do sistema somatosensorial”<sup>52,53</sup>.

Essa mudança ocorreu, pois, DN não é uma única doença, e sim, uma síndrome causada por uma ampla variedade de doenças e lesões que podem se manifestar com diferentes sinais e sintomas. Há diversos mecanismos subjacentes a essas diversas condições, porém, nem todos são conhecidos<sup>54</sup>.

A etiologia desta síndrome tem um amplo espectro e suas alterações associadas foram distribuídas em quatro categorias: lesões focais e multifocais no sistema nervoso periférico; polineuropatias generalizadas do SNP; lesões do SNC; e disfunções neuropáticas complexas como a SDRC-I e SDRC-II<sup>55,56,57</sup>.

A DN é aflitiva. Os dados para sua estimativa de incidência e prevalência na população em geral tem sido de difícil obtenção devido à falta de critérios diagnósticos simples para grandes pesquisas epidemiológicas. Porém, uma revisão sistemática de estudos epidemiológicos concluiu que a prevalência de dor crônica com características neuropáticas na população geral é estimada em cerca de 6,9 a 10%<sup>58</sup>.

Os sintomas da DN tendem a persistir e a se tornarem crônicos, dessa forma os indivíduos costumam a responder menos aos medicamentos para a dor. Distúrbios do sono, ansiedade e depressão são comuns e graves em indivíduos com essa condição, assim, sua qualidade de vida é mais prejudicada do que naqueles com dor crônica não neuropática<sup>59</sup>. Também tem sido observado que a DN crônica ocorre com maior frequência em mulheres e em indivíduos com mais de 50 anos de idade, e

costuma afetar na maioria dos casos a parte inferior das costas, membros inferiores, pescoço e membros superiores<sup>60</sup>.

A compreensão dos mecanismos que envolvem a DN e, por consequência, seu diagnóstico tem melhorado ao longo dos anos, porém, tratar esta condição continua sendo um desafio para os clínicos<sup>61</sup>.

A falta de um padrão ouro ao avaliar a DN acarreta limitações e falta de padronização dos métodos diagnósticos, aumentando as chances de casos que não são detectados ou são classificados erroneamente<sup>62</sup>. Porém, o *Special Interest Group on Neuropathic Pain* (NeuPSIG) da IASP desenvolveu um sistema de classificação que envolve diversas etapas, as quais incluem obter uma história clínica da dor; avaliar a plausibilidade neuroanatômica da dor, utilizando técnicas sensoriais para confirmar o envolvimento do SNC; e utilizando testes diagnósticos para confirmar lesões ou doenças acometendo o sistema nervoso<sup>63,64</sup>.

Assim, não é apenas o diagnóstico da DN que é complexo, mas também o seu tratamento. Os efeitos colaterais causados pelos medicamentos prescritos são a limitação da terapêutica farmacológica atual. Como exemplo disto, pode-se mencionar estudos que demonstraram o desuso da pregabalina por 20% dos indivíduos. Apesar de ser um medicamento tradicional no tratamento de DN, o tratamento precisou ser descontinuado por causar grande sonolência nos usuários<sup>4</sup>. Os antidepressivos tricíclicos, também na primeira linha de tratamento, têm efeitos colaterais como diminuição da cognição e retenção urinária, o que pode ser um grande problema para os indivíduos, especialmente quando estes são idosos<sup>65</sup>.

A complexidade para um diagnóstico preciso, assim como a dificuldade de um tratamento satisfatório se tornam preocupantes, uma vez que a DN periférica provavelmente se tornará cada vez mais comum devido: ao envelhecimento da população global; maior incidência do diabetes mellitus; e as crescentes incidências de câncer seguidas pelas consequências da quimioterapia. Fatores, os quais, provocam alterações em todas as fibras sensoriais<sup>35</sup>.

A SDRC aparece na história desde o século XVI sob variados nomes. Apenas no ano de 1946, foi introduzido o termo distrofia simpático reflexa (DSR) e, em 1994, a IASP nomeou este quadro como sendo SDRC após uma reavaliação<sup>66</sup>. Autores afirmam que é necessário um melhor entendimento da fisiopatologia desta doença para definir com exatidão o que a constitui, como diagnosticá-la e tratá-la. Porém o termo SDRC foi determinado pelas seguintes razões: é uma doença complexa, pois

expressa características clínicas variadas como dor, edema, atividade vasomotora com a mudança de coloração do membro afetado, hiperidrose, distonia, hipotrofia muscular e osteopenia; ela também é regional, ou seja, na maioria das vezes a síndrome envolve apenas uma região do corpo, geralmente acometendo as extremidades. A dor é um sintoma essencial para o diagnóstico da síndrome e pode ser tanto espontânea ou evocada. Raramente o sintoma doloroso é mínimo ou ausente<sup>67,68</sup>.

A SDRC foi classificada em dois tipos. Ela pode ser do tipo I, quando se trata de uma neuropatia que pode ser desenvolvida em consequência de um trauma à uma extremidade, sem ocorrer lesão nervosa. Ou, ela pode ser do tipo II, quando apresentar uma lesão nervosa, mesmo que esta seja parcial<sup>66</sup>. A SDRC-I, é uma condição crônica que normalmente surge após uma lesão ao tecido profundo como uma fratura ou uma distensão, porém não se conhece a exata causa da dor<sup>69</sup>. Por ser uma síndrome, há diversos sintomas envolvidos, mas há uma tríade característica que apresenta distúrbios motores, sensoriais e autonômicos. Porém, não é incomum que estes sintomas se alterem ao longo do tempo<sup>70</sup>. A SDRC-I também pode ser subdividida em duas fases. A fase quente, que é o período inicial da doença, uma fase de característica inflamatória, tem o melhor prognóstico. Porém, a doença pode perdurar passando a fase seguinte, chamada de fase fria, por ter características neuropáticas, a qual recebe o pior prognóstico, pois persiste ao longo de vários meses, podendo resultar em casos graves de hipotrofia do tecido, associados à dor insuportável<sup>71</sup>.

O diagnóstico da SDRC-I é baseado nos sinais e sintomas apresentados pelo indivíduo. Todas as diretrizes diagnósticas foram desenvolvidas por neurologistas com algumas contribuições de fisioterapeutas. As primeiras foram elaboradas em 1995 pela IASP. Posteriormente, especialistas se reuniram em Budapeste e criaram “os critérios de Budapeste”, os quais são focados nos sinais e sintomas da fase fria da doença e pouca ênfase é dada aos exames de imagem<sup>68,72,73</sup>. A dificuldade encontrada pelos especialistas em obter uma evidência certa para a origem da dor relatada pelos indivíduos tem gerado constantes debates e frustrações entre os profissionais que lidam com esta síndrome. Isso tende a ser um problema, visto que um atraso no diagnóstico pode ter um impacto negativo no prognóstico e no sucesso terapêutico<sup>68,74</sup>.

Van der Laan e colaboradores (1998)<sup>75</sup> observaram, na autópsia realizada em membros inferiores amputados de indivíduos com a SDRC-I, uma degeneração de nervos periféricos e alterações musculares consistentes com indivíduos diagnosticados com diabetes<sup>75</sup>. Confirmando os achados anteriores, Albrecht e colegas (2006)<sup>76</sup> ao analisarem amostras da pele de membros amputados de dois indivíduos diagnosticados com a SDRC-I, também encontraram degeneração nervosa e inflamação vascular<sup>76</sup>. Ainda, Oaklander e colaboradores (2006)<sup>77</sup> demonstraram uma perda parcial de fibras nervosas intraepidérmicas a partir da biópsia de 18 indivíduos acometidos com a SDRC-I<sup>77</sup>. Mas, foi Eisenberg e colaboradores (2008)<sup>78</sup> que demonstraram, em 2008, um grande aumento na quantidade de malondialdeído, desidrogenase láctica e antioxidantes celulares no soro e, principalmente, na saliva de indivíduos com a síndrome<sup>78</sup>. É importante salientar que malondialdeído é um marcador de estresse oxidativo (EO), assim como a desidrogenase láctica, que tende a aumentar na presença do mesmo. A presença aumentada de antioxidantes endógenos representa uma compensação do organismo ao EO. Esses dados corroboram que há presença de EO em indivíduos com a SDRC-I, estando fortemente relacionado com doenças inflamatórias<sup>74</sup>.

Coderre e colaboradores<sup>79</sup> propuseram, em 2004, que pelo menos alguns dos indivíduos diagnosticados com SDRC-I apresentam uma inflamação crônica em tecidos profundos. Essa inflamação advém de uma patologia microvascular provocada por uma lesão de IR, que resulta na produção de EO. Essa teoria surgiu após terem submetidos ratos à IR da pata traseira, em um modelo desenvolvido e padronizado pelos mesmos autores. Os animais apresentaram hiperemia e extravasamento de plasma da pata acometida. Durante os testes, foram observados hiperalgesia mecânica e alodinia mecânica e ao frio. Quando dois redutores de radicais livres, N-acetil-L-cisteína (NAC) e 2 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil piperidina-1-oxil (Tempol), foram administrados, se mostraram capazes de reduzir a alodinia nos animais neste modelo<sup>79</sup>. Coderre e colaboradores (2008)<sup>74</sup> afirmam que se esta teoria está correta, talvez seja mais adequado pensar na SDRC-I como uma combinação de mecanismos inflamatórios e neuropáticos<sup>74</sup>.

Há mais indícios de que o EO e a inflamação estão interligados. Alguns estudos mostram que eles ativam vias semelhantes. Também apontam que a ativação excessiva e/ou prolongada de citocinas no SNC pode promover um conjunto de alterações interconectadas que são essenciais para a diminuição do suporte

neurotrófico, diminuição da neurogênese, aumento da ativação glutamatérgica e aumento do EO, entre ativação de outras vias<sup>80,81,82</sup>. Também é interessante notar que outros estudos publicados recentemente sugerem as espécies reativas de oxigênio como um sinal importante na ativação do inflamassoma que converte a interleucina-1 $\beta$  em sua forma ativa<sup>83,84</sup>.

Nas últimas décadas, diversas terapias foram propostas para o tratamento da SDRC-I e os fármacos indicados costumam ser os mesmos indicados para o tratamento da DN. Porém estes tratamentos têm sido insatisfatórios, pois são baseados em racionalidades fracas, já que os estudos normalmente não evoluem para ensaios clínicos randomizados controlados e costumam ser inconclusivos devido a falhas metodológicas<sup>68</sup>.

Tem sido observado que os glicocorticóides reduzem a inflamação pós-traumática e existem alguns dados que suportam a eficácia do seu uso no início da doença, mas não na fase crônica. Além disso, a dose e tempo de tratamento ideal não são bem definidos<sup>85,86,87</sup>. A cetamina tem boas evidências de tratamento como analgésico, porém este efeito aparenta ser perdido com o tempo e apresenta efeitos colaterais<sup>88,89,90</sup>. O sulfóxido de dimetilo (na forma de creme) e N-acetilcisteína (oral), “varredores de radicais livres”, parecem ter maior eficácia sobre a dor na fase inflamatória da doença<sup>91,92,93</sup>. Não há evidências suficientes de que anticonvulsivantes (tais como carbamazepina e pregabalina), antidepressivos e opioides são eficazes na redução da dor nos indivíduos, assim como os AINES e o uso de bloqueio simpático anestésico local<sup>86,90,94,95</sup>. Como prevenção, o tratamento com vitamina C pode ser utilizado após fraturas do pulso<sup>96</sup>. Os bisfosfonatos aparecem como uma nova opção por terem propriedades analgésicas que vão além do seu efeito sobre o metabolismo ósseo, já que apresentaram efeito antinociceptivo em modelos pré-clínicos de dor neuropática, porém mais pesquisas são necessárias<sup>68,97</sup>.

Frente aos dados, pode se perceber que a terapia farmacológica atual para o tratamento da SDRC-I é ineficaz. Normalmente, são necessárias combinações de diversos fármacos na busca pelo alívio dos sintomas e efeitos colaterais são comuns. Por isso, é necessário a busca e desenvolvimento de novos tratamentos. Quanto a abordagem terapêutica adequada para o tratamento desta doença, ela deve ser multidisciplinar, buscando educar os indivíduos sobre a condição, reduzindo a dor e preconizando a manutenção ou restauração da função do membro afetado<sup>94,98,99</sup>.

#### 1.1.1.1.2 Dor crônica de origem inflamatória

A resposta inflamatória é um importante mecanismo de defesa do organismo, ativada em decorrência de uma lesão ou infecção, com a função de eliminar o agente agressor, recuperar homeostase e reparar o tecido. Embora distintas, as respostas de defesa inata e imunológica adaptativa interagem entre si e podem se sobrepor durante uma resposta inflamatória<sup>100</sup>. A natureza do agente agressor é que determina a intensidade da resposta inflamatória<sup>101</sup>.

A dor de origem inflamatória é o resultado da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos, por meio da participação de mediadores inflamatórios. A dor inflamatória aguda é resultado de um estímulo mecânico, térmico ou químico ou de um mediador inflamatório que ativa os neurônios periféricos já sensibilizados. Entretanto, a hiperalgesia inflamatória é resultado de alterações funcionais dos neurônios aferentes primários nociceptivos. Alterações essas que ocorrem devido a uma ativação metabotrópica (mudança metabólica) em todo o neurônio sensorial<sup>102</sup>. Essas mudanças na excitabilidade neuronal são induzidas por mediadores inflamatórios liberados diretamente pelas células danificadas ou por células ativadas a partir do reconhecimento de um agente estranho ao organismo. O agente estranho ao organismo ou os debris resultantes da lesão são reconhecidos por células fagocíticas locais, as células imunológicas do organismo, como os mastócitos e os macrófagos. Estas células desencadeiam a resposta inflamatória por liberarem uma série de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas, as quimiocinas e as aminas vasoativas. O aumento da permeabilidade vascular e o acúmulo de leucócitos na região resultam na produção dos sinais e sintomas de calor, rubor, dor e edema, que são alguns dos principais sinais cardinais da inflamação<sup>37</sup>.

Durante a inflamação também ocorre uma ativação endotelial, na qual os neutrófilos se deslocam para o local da inflamação, sendo uma das características da resposta inflamatória aguda. Em seguida monócitos maturam em macrófagos, enquanto outros elementos do sistema imunológico inato liberam agentes antimicrobianos. As células dendríticas e os macrófagos constituem a segunda parte da defesa, pois fagocitam antígenos estranhos, os levam aos linfonodos e os apresentam ao sistema imunológico adaptativo. Quando os agentes deletérios ao organismo são eliminados, a reação inflamatória diminui gradualmente. No entanto,

se houver uma estimulação exacerbada pelo agente agressor e a inflamação aguda não for resolvida, esta evoluirá para uma inflamação crônica. A liberação de mediadores químicos por essas células leva ao aumento da sensibilidade neuronal a estímulos que normalmente são inócuos ou mínimos<sup>37,103,104,105</sup>.

Uma característica importante da resposta inflamatória é que existe uma hierarquia temporal de liberação e ação destes mediadores. Estes são divididos em dois grupos: mediadores hiperalgésicos intermediários e mediadores hiperalgésicos finais. Este primeiro grupo é liberado no início e durante a inflamação. Nele pode-se destacar as citocinas e as quimiocinas. Inicialmente, estes mediadores pareciam ser importantes apenas no recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório, porém eles também são de extrema importância para a geração da sensibilização nociceptiva. As principais citocinas na nocicepção são o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas 1 e 8 (IL-1, IL-8), as quais estimulam respectivamente a liberação de prostaglandinas (PGs) e aminas simpatomiméticas, que são classificadas como mediadores finais<sup>104,106,107,108</sup>. Os mediadores finais interagem em determinados receptores presentes na membrana dos neurônios nociceptivos e sua ativação estimula vias de sinalização intracelular, como a da adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e a das proteínas quinases, levando a sensibilização neuronal. Fato interessante é que, em alguns casos, os mediadores intermediários também podem comportar-se como mediadores finais<sup>37</sup>.

O processamento da dor (periférico e central) pode torna-se mais complexo em condições inflamatórias, pois como visto, estas vias neuronais amplificam suas respostas em função das alterações do funcionamento dos canais iônicos. Essas alterações são causadas pelos mediadores pró e anti-inflamatórios e pela ativação destas proteínas quinases, ambos liberados na fase aguda e crônica do processo inflamatório<sup>37,109</sup>. A inflamação crônica é considerada como principal causa de diversas patologias como: doenças neurodegenerativas, câncer, aterosclerose e doenças musculoesqueléticas (osteoartrite [OA] e artrite reumatoide)<sup>110</sup>. A OA por exemplo, representa uma das condições dolorosas mais frequentes. A dor como sendo o principal sintoma, envolvendo mecanismos neurológicos periféricos e centrais. O sinal nociceptivo envolve não apenas neuromediadores e fatores reguladores, tais como o fator de crescimento neuronal, mas também promove modificações centrais das vias da dor<sup>111</sup>.

O tratamento farmacológico de doenças crônicas inflamatórias e da dor persistente de diferentes origens ainda é um algo problemático. Os fármacos de primeira linha de tratamento atualmente prescritos são os AINEs, glicocorticoides e opioides, apesar de já terem sido introduzidos há muito tempo, os seus mecanismos principais permanecem os mesmos. A utilização prolongada dos AINES está associada a graves efeitos adversos, como lesões gástricas e intestinais. Os glicocorticoides, embora eficazes, apresentam muitos efeitos colaterais relacionados principalmente, com sua função hormonal endógena, a qual limita sua utilização de forma crônica. A utilização de opioides é limitada devido aos seus diversos efeitos colaterais, principalmente a dependência<sup>37,103</sup>.

Medicamentos biológicos, que tem como alvo diferentes moléculas chave do mecanismo imune, têm tido resultados satisfatórios no tratamento de algumas doenças autoimunes/inflamatórias. Porém, existem alguns pontos desfavoráveis: o alto custo de fabricação, a via de administração (intravenosa), efeitos colaterais a longo prazo e ainda não há garantia de uma analgesia eficaz<sup>37,103</sup>. Portanto, apesar de ser uma tarefa desafiadora, há uma necessidade imediata de novas opções terapêuticas de anti-inflamatórios e analgésicos que possam auxiliar na resolução do processo inflamatório<sup>112</sup>.

#### 1.1.1.2 Sistema opioide

Os receptores opioides são considerados importantes alvos no tratamento da dor. Os agonistas opioides são os analgésicos mais efetivos no manejo da dor. No último século, nas áreas de farmacologia e química medicinal, houve um grande avanço no desenvolvimento de opioides derivados de opiáceos naturais<sup>113</sup>. O sistema opioide é crítico na modulação endógena da dor e antinocicepção. Os peptídeos opioides (PO) e seus respectivos receptores estão presentes no circuito nociceptivo e em áreas importantes do SNC, como também em algumas estruturas relacionadas a emoções e recompensa, enquanto outros estão localizados no SNP e em diversos tecidos não neuronais<sup>114,115,116</sup>.

Este sistema é constituído por três receptores: receptor opioides delta ( $\delta$ -, ROD), kappa ( $\kappa$ -, ROK), mu ( $\mu$ -, ROM)<sup>115,117</sup>. Mais especificamente, o ROM é amplamente distribuído por todo o prosencéfalo, mesencéfalo e cérebro posterior, aparentemente sua maior expressão é no neocórtex, núcleos caudado e putâmen,

núcleo accumbens, tálamo, hipocampo, amígdala e núcleo do trato solitário<sup>118,119</sup>. O ROK é expresso moderadamente em diversas áreas cerebrais, porém com maior expressão nos núcleos caudado e putâmen, no núcleo accumbens, hipotálamo, amígdala e neurohipófise<sup>118,119</sup>. O ROD é particularmente expresso em abundância em áreas neurais relacionadas ao olfato, o neocórtex, núcleos caudado e putâmen, o núcleo accumbens e a amígdala; sua ligação é limitada no tálamo, hipotálamo e tronco encefálico<sup>118,119</sup>.

Todos os receptores opioides são receptores acoplados a proteínas G inibitórias<sup>120</sup>. Todos os três quando ativados por seus ligantes inibem a enzima adenilato ciclase, diminuindo assim os níveis celulares de AMPc e afetando as vias de fosforilação das proteínas e dessa forma a função celular. Por serem acoplados a proteína G, também exercem influência direta sobre os canais iônicos, ativando as correntes de K<sup>+</sup> e inibindo as correntes de Ca<sup>2+</sup>. Dessa forma, reduzindo a excitabilidade neuronal e a liberação de neurotransmissores excitatórios, tais como o glutamato, a sP e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina<sup>121</sup>. Esses receptores também agem na neurotransmissão GABAérgica e são ativados em condições naturais por opioides endógenos<sup>122</sup>. Seus ligantes endógenos são as dinorfinas, encefalinas e endorfinas, os quais também são amplamente distribuídos pelo SNC<sup>117</sup>.

Cada tipo de receptor desempenha respostas distintas, envolvidas na modulação da dor no SNC e periférico<sup>123,124,125</sup>. Os ROM são responsáveis por mediar a analgesia espinal e supraespinal, reduzir a motilidade do trato gastrointestinal, depressão respiratória, euforia e sedação. Os ROK e ROD também estão envolvidos na analgesia espinal e supraespinal. O ROK ainda media a analgesia periférica, sedação, depressão respiratória, dispneia e disforia. Ainda, tem-se pouco conhecimento sobre os ROD, porém sabe-se que eles estão localizados no cérebro e acredita-se que eles tenham uma participação sobre os efeitos psicomiméticos e disfóricos<sup>124</sup>.

Estudos mostram o papel dos agonistas opioides em modelos pré-clínicos de dor inflamatória. Por exemplo, em um estudo, a ativação de ROM por um agonista seletivo foi capaz de modular a inflamação de camundongos em um modelo de colite experimental aguda. Este efeito foi mediado pela redução das citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 RNAm), pela provável ativação do fator anti-apoptótico, Bcl-xL e supressão do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), o qual é um potencializador da inflamação<sup>126</sup>. Outra pesquisa mostrou que a administração intracerebroventricular de Deltorfina II e

SNC80 (agonistas do ROD), e de DAMGO e morfina (agonistas do ROM), reverteu significativamente a resposta hiperalgésica associada à inflamação periférica por CFA em ratos<sup>127</sup>. A enadolina (CI-977), agonista seletivo e potente do ROK, foi associada como um eficaz analgésico em modelos animais de estímulos nocivos mecânicos e químicos<sup>128</sup>.

Como todos os três receptores opioides estão presentes nos terminais nervosos sensoriais periféricos tanto em animais como em seres humanos<sup>129</sup>, diversos estudos também tem demonstrado o efeito do sistema opioide periférico na dor inflamatória<sup>130,131</sup>. Por exemplo em um outro estudo utilizando um modelo animal de dor inflamatória periférica induzida por CFA, o envolvimento de opioides periféricos foi investigado com pré-tratamento i.pl. de naloxona, que se mostrou capaz de reverter o efeito anihiperalgésico demonstrado pelo tratamento i.pl. de morfina<sup>132</sup>.

Sabe-se que em tecidos inflamados ou lesionados uma plethora de mediadores hiperalgésicos são produzidos, porém essa hiperalgesia é parcialmente mediada por um sistema analgésico local que envolve leucócitos contendo opioides (como pode ser observado na figura 1)<sup>129,133</sup>. Estes leucócitos extravasam-se após a ativação de moléculas de adesão. O fator liberador de corticotropina (CRF), quimiocinas ou noradrenalina (NA) podem induzir a liberação de opioides ativando seus respectivos receptores nos leucócitos. Os opioides exógenos ou peptídeos opioides endógenos, como as endorfinas, encefalinas e dinorfinas, ligam-se aos receptores opioides que são sintetizados nos GSNE e transportados ao longo dos microtúbulos intra-axonais até os terminais periféricos e centrais dos neurônios sensoriais (Figura 1). A subsequente inibição dos canais iônicos excitatórios e da liberação da sP resulta em efeito antinociceptivo<sup>129</sup>.

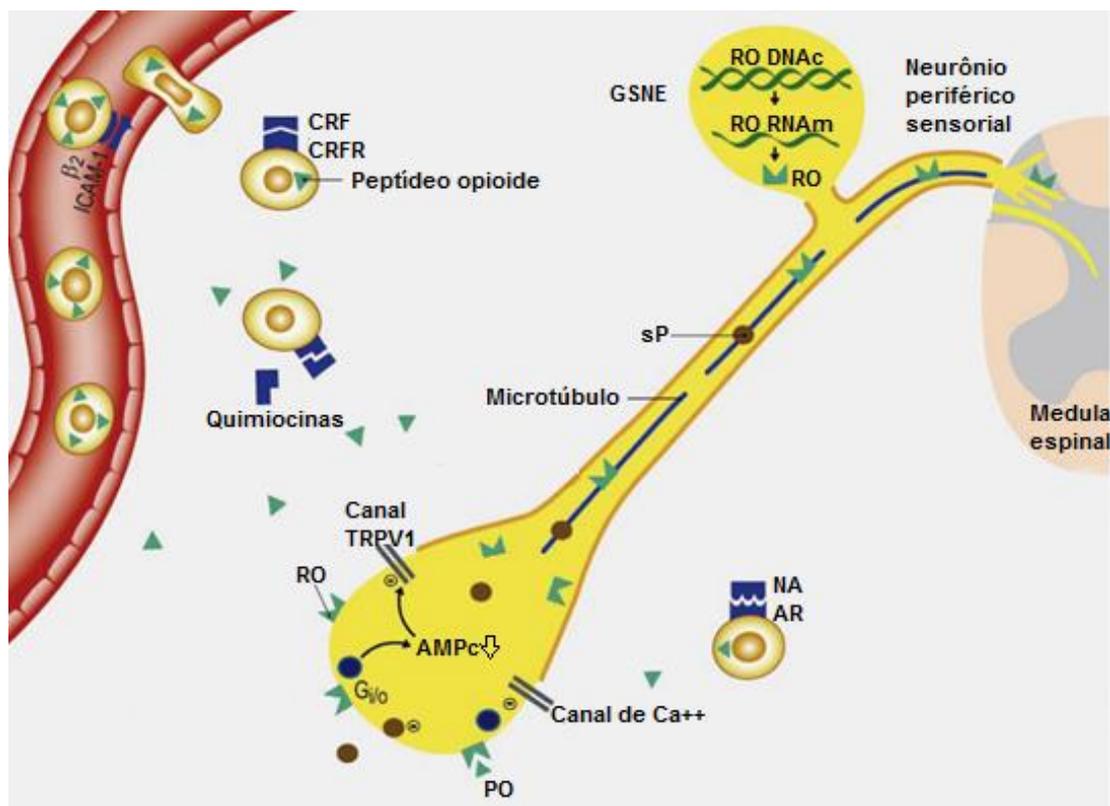


Figura 1: Mecanismo periférico da analgesia opióide.

Os leucócitos circulantes contendo PO extravasam-se após a ativação de moléculas de adesão (por exemplo ICAM-1; integrina beta2). O CRF, quimiocinas ou NA (liberada de neurônios simpáticos) pode induzir a liberação de opióides ativando seus respectivos receptores (receptores CRF, receptores AR) nos leucócitos. Os peptídeos opióides endógenos ligam-se aos RO que são sintetizados nos GSNE e transportados ao longo dos microtúbulos intraaxonais até os terminais periféricos (e centrais) dos neurônios sensoriais. A subsequente inibição dos canais iônicos excitatórios (por exemplo, TRPV1, Ca<sup>2+</sup>) e da liberação da sP resulta em efeitos antinociceptivos. GSNE: gânglio sensorial do nervo espinal; RO: receptor opioide; sP: substância P; NA: noradrenalina; AR: receptor adrenérgico; PO: peptídeo opioide; CRF: fator liberador de corticotrofina; CRFR: receptor do fator liberador de corticotrofina.

Fonte: Adaptada de Stein et al, 2009<sup>129</sup>.

No entanto, a administração sistêmica de medicamentos opióides produzem efeitos colaterais importantes, visto que o sistema opióides endógeno afeta vários sistemas fisiológicos, incluindo sistemas de recompensa, sistema imunológico, aprendizagem, funções de memória e resposta ao estresse, demonstrando quão complexos os efeitos do tratamento e seus efeitos colaterais podem ser. Principalmente, aqueles que agem sobre o sistema gastrointestinal e SNC, bem como a tolerância desenvolvida e o vício. Estes são responsáveis pela descontinuidade dos tratamentos de 1 a cada 5 indivíduos, o que acarreta em alívio inadequado da dor e pouca qualidade de vida. Por isso, se fazem necessárias novas estratégias terapêuticas com poucos ou nenhum efeito colateral.

### 1.1.2 Óleo essencial de *Lavandula angustifolia*

A Lavanda é uma planta florida que pertence à família *Lamiaceae*. Ela é proveniente da região Mediterrânea, mas amplamente cultivada no sul da Europa, principalmente nas regiões da França, Itália e Inglaterra. É uma planta arbustiva, de ciclo perene que pode chegar até 1 metro de altura. Suas flores são numerosas e se agrupam em inflorescências, com uma coloração que varia de tons rosas a azuis. O OE extraído dela através do processo de destilação a vapor é de coloração verde-clara com um toque amarelado<sup>134,135</sup>.

Ela possui mais de 30 espécies e dezenas de subespécies, sendo assim foi dividida em 4 categorias principais: *L. angustifolia*, popularmente conhecida como Lavanda Inglesa, era referida anteriormente como *L. vera* ou *L. officinalis*; *L. stoechas* é, algumas vezes, chamada de Lavanda Francesa; *L. latifolia* e *L. intermedia*. Esses diversos tipos de Lavanda possuem propriedades etnobotânicas similares e grandes quantidades de constituintes químicos<sup>136,137</sup>.

Na aromaterapia, é considerado um dos óleos mais úteis e versáteis. Na França, não é raro encontrar um frasco dessa essência nas residências; uma tintura composta de Lavanda foi reconhecida pela Farmacopéia Britânica por mais de dois séculos. Durante a Segunda Guerra Mundial, era aplicado nos machucados dos feridos como um antisséptico. Foi graças aos efeitos terapêuticos da Lavanda que René Maurice Gattefossé começou a investigar em maior profundidade os OE, após queimar-se em um acidente de laboratório e aplicar o óleo na ferida<sup>134,135</sup>.

Os principais constituintes do OELa são o linalol, acetato de linalila, 1,8-cineole *B*-ocimeno, terpinen-4-ol e cânfora<sup>137</sup>. Sabe-se que a proporção dos compostos químicos varia de acordo com a região de produção, do solo e das condições de cultivo das plantas, também há uma certa variação de ano para ano de acordo com as condições climáticas. Normalmente, as espécies de melhor qualidade crescem em altitudes de 700 a 1400 metros. A qualidade do OELa depende primeiramente de uma alta quantidade dos principais compostos desejáveis, tais como o linalol e acetato de linalila, que são terpenos, mas também depende do toque aromático dado por vários compostos secundários<sup>134,135,138</sup>.

Sua indicação na medicina popular é de sedativo suave, supressor da tosse, antisséptico, antibiótico, antidepressivo e cicatrizante. Acredita-se que atenua a reação do SNC à dor, por isso teria ação analgésica<sup>135</sup>. Os monoterpenos lipofílicos

contidos na Lavanda agem nas membranas celulares e promovem mudanças na atividade de canais iônicos, nos transportadores e nos receptores nervosos. Essa característica pode explicar os efeitos calmante e antibacteriano do OELa<sup>139</sup>.

Diversos estudos têm investigado as propriedades antinociceptivas, imunomodulatórias e anti-inflamatórias encontradas nos componentes do óleo. Quando avaliados em conjuntos, eles evidenciam que a composição química do OELa pode exercer uma atividade anti-inflamatória ou antinociceptiva direta ou indiretamente<sup>30,31</sup>.

Os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antinociceptivos do OELa foram mostrados em ratos e camundongos. A atividade anti-inflamatória foi observada através de um modelo de indução de pleurisia por carragenina (0,6 mg/kg, via oral) e edema de orelha induzido pela aplicação de óleo de cróton (0,6 mg/kg, via oral ou tópica 50 µL/orelha) em camundongos. A atividade antinociceptiva foi avaliada utilizando o modelo da formalina (0,6 mg/kg, via oral) em ratos. Neste estudo, também foi observado a eficácia do óleo sem nenhuma evidência de efeitos tóxicos significativo na dose de 0,6 mg/kg, via oral)<sup>140</sup>.

Diversos outros experimentos foram realizados para tentar esclarecer os mecanismos de ação da Lavanda em tecidos neuronais. Também foram observadas ação antioxidante e inibição colinérgica relativamente fraca causadas pela lavanda e linalol<sup>141-145</sup>. Tem sido demonstrado que a via colinérgica desempenha um papel importante na analgesia, ansiedade, depressão e convulsão, sugerindo efeitos potenciais da lavanda<sup>146,147,148</sup>.

Em um estudo com humanos, noventa indivíduos com OA no joelho foram aleatoriamente distribuídos em três grupos. O participantes do grupo intervenção, massagearam os joelhos durante 20 min com 5 ml de óleo essencial de lavanda diluído em óleo de amêndoa doce a uma concentração final de 3%. O procedimento foi realizado 9 vezes em um período de 3 semanas. A escala visual analógica (EVA) foi aplicada imediatamente após a intervenção, na primeira e 4ª semana após o fim da intervenção. O estudo concluiu que o grupo que recebeu a massagem com óleo essencial de lavanda teve um alívio significativo da dor, logo após e uma semana após a intervenção<sup>149</sup>.

Outro estudo avaliando a atividade do linalol no sistema glutamatérgico no córtex cerebral de ratos relatou um efeito inibitório do linalol sobre a ligação ao glutamato<sup>150</sup>. Em outra pesquisa recente, investigou-se os efeitos dos óleo essenciais

de *Coriandrum sativum* e *Lavandula angustifolia* obtidos por hidrodestilação e analisado por CG e CG-EM, e seu principal constituinte, o linalol, sobre a atividade elétrica espontânea de células neuronais de ratos. Os resultados demonstraram pela primeira vez que o linalol ou os dois óleos essenciais afetam, de maneira dose dependente, a atividade de disparo neural<sup>151</sup>.

Além disso, o mecanismo antinociceptivo do linalol tem sido parcialmente demonstrado nos modelos pré-clínicos de placa quente e formalina. Assim, Peana e colaboradores (2004)<sup>152</sup> mostrou que a antinocicepção produzida pelo linalol administrado subcutaneamente envolve a ativação dos sistemas opioidérgico, colinérgico (receptores M2-5), dopaminérgico (receptores D2) e canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP. Estes resultados estão de acordo com as propriedades farmacológicas observadas do linalol, principalmente sua atividade colinérgica, anestésica local e sua capacidade de bloquear receptores NMDA. Aparentemente, um mecanismo chave é desempenhado pelos canais K<sup>+</sup>, cuja abertura pode ser resultado de uma estimulação dos receptores muscarínicos M2, opioides ou dopamina D2<sup>152</sup>.

Mesmo com o grande número de pesquisas conduzidas na última década, ainda há falta de dados mais substanciais sobre os efeitos e mecanismo de ação do óleo essencial de Lavanda<sup>140</sup>.

#### 1.1.2.1 Via inalatória

O sistema olfatório é uma rede complexa, composta principalmente pelo epitélio olfatório, bulbo olfatório e córtex olfatório. Os elementos periféricos deste sistema consistem em aproximadamente 6 milhões de células<sup>153</sup>.

Pode-se pensar no olfato como uma série de transformações. As informações sobre a estrutura de uma molécula odorífera são transformadas em uma série de representações neurais até que se tornam uma percepção<sup>154</sup>.

As moléculas odoríferas, quando inaladas, entram em contato com o epitélio olfativo, são detectadas e interagem com os cílios. Estes são botões dendríticos que constituem as células receptoras olfatórias, inervando a parte superior da cavidade nasal e a região da lâmina cribiforme do osso etmoide<sup>155</sup>. Estas células são neurônios receptores olfatórios (NRO), neurônios de primeira ordem, cada um pode expressar um ou mais tipos de receptores<sup>154</sup>. Em conjunto, seus axônios formam o nervo olfatório I, que atravessam a lâmina cribiforme e projetam seus axônios diretamente para os

glomérulos do bulbo olfatório no SNC<sup>156</sup>. No glomérulo, composto pelos terminais axonais dos NROs, estes fazem sinapses com os dendritos dos neurônios eferentes do bulbo olfatório: células mitral e células tufo. Essas células, neurônios de segunda ordem, transportam a informação do bulbo olfatório para o córtex olfatório<sup>154,157,158</sup>.

O córtex olfatório é dividido em cinco áreas de maior importância: o núcleo olfatório anterior, tubérculo olfatório, córtex piriforme, núcleo amigdalóide, córtex periamigdalóide e córtex entorrinal<sup>159</sup>. Estas áreas recebem diversas informações que são transmitidas por meio de projeções diretas para as vias límbicas, mediando os aspectos afetivos da percepção olfativa. Nas regiões do tálamo, hipotálamo e do hipocampo, as informações do olfato são incorporadas a outras informações sensoriais, memórias de aprendizado, experiências prévias e comportamento<sup>154</sup>. Sabe-se também que as projeções dessas fibras nervosas passam pelo bulbo olfatório e chegam a regiões como a substância negra, núcleos da rafe e *Locus Coeruleus*, as quais fazem parte do processamento e modulação da dor<sup>160</sup>.

Porém, a inalação de moléculas químicas não promove efeitos no organismo somente pela estimulação dos NRO no SNC. Essas mudanças também ocorrem, pois, após inaladas, as moléculas chegam as membranas pulmonares através do epitélio olfatório. Os pulmões são compostos por duas partes funcionais: a região traqueobrônquica; e a região alveolar. O trato respiratório é altamente bifurcado e cerca de 95% da superfície total dos pulmões é composta pela área alveolar e um delgado epitélio vascular alveolar com uma abundante rede capilar<sup>161</sup>. O pulmão serve como via de administração e de eliminação. Sua grande área e o fluxo sanguíneo resultam em troca rápida de elementos, e permite ajustes rápidos na concentração plasmática<sup>162</sup>. Por meio dos capilares pulmonares, as moléculas químicas atingem a circulação sanguínea, podendo assim promover efeitos sistêmicos no organismo<sup>163</sup>. A via inalatória é umas das vias mais indicadas para administração de anestésicos e tem sido demonstrado que pode mais efetiva que a via intravenosa. Por exemplo, um estudo em cães que receberam morfina por via inalatória mostrou o sistema pulmonar como uma importante via de administração para opioides, visto que as moléculas podem ser absorvidas rapidamente pela elevada permeabilidade dos alvéolos. A pesquisa também identificou um perfil farmacocinético melhor de liberação lenta e toxicidade menor do que uma injeção intravenosa<sup>164</sup>.

Quando se tem como alvo o SNC, principalmente o tratamento de doenças neurológicas, a via inalatória é considerada uma importante via de administração

terapêutica, também, por em contraste com os medicamentos orais atuais, as moléculas odoríferas podem atravessar a barreira hematoencefálica, produzindo uma resposta com mais rapidez, eficiência e atingindo a circulação sistêmica<sup>165,166,167</sup>. Além disso, uma revisão sistemática e meta-análise - envolvendo 12 estudos com humanos em diversas condições dolorosas - concluiu que aromaterapia causa redução significativa da dor. Outras vantagens destacadas pelo estudo são o custo mais baixo e menos efeitos colaterais que os medicamentos tradicionais para o tratamento da dor<sup>168</sup>. A via inalatória também ganhou destaque como uma via de administração promissora para o tratamento de infecções pulmonares. Dados publicados indicaram que a terapia inalatória como sistema de administração de fármacos antibióticos é capaz de diminuir a dose de antibiótico administrada, reduzindo assim a toxicidade, assim como aumentando a adesão ao tratamento<sup>169</sup>.

A dor crônica é um problema de saúde pública. Novas opções de tratamento, acessíveis e práticas, para um alívio eficaz e adequado são necessários para melhora do prognóstico e qualidade de vida dos indivíduos afetados por ela. A lavanda é uma das plantas mais conhecidas no universo da aromaterapia e sua utilização tem sido disseminada na Europa através dos séculos. Seu OE é utilizado no tratamento das mais diversas condições na medicina popular e estudos científicos já demonstram seu potencial analgésico e antiinflamatório, principalmente devido a um de seus componentes majoritários, como o linalol. Dessa forma, esclarecer se a inalação do OELa exerce influência sobre a dor inflamatória e neuropática, e fornecer informações adicionais sobre o mecanismo envolvido é de profunda valia para o desenvolvimento de um tratamento eficaz, que pode ser facilmente aplicado na clínica em conjunto com os tratamentos convencionais, bem como para uma abordagem terapêutica mais adequada.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos da inalação do OELa em modelos animais de dor crônica de origem neuropática e inflamatória e o envolvimento do sistema opioide neste efeito.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o volume do OELa, através inalação, mais efetivo em reduzir a hiperalgesia mecânica nos modelos animais de dor neuropática e inflamatória;

Verificar a contribuição dos receptores opioides centrais (espinais) e periféricos no efeito da inalação do OELa em um modelo animal de dor inflamatória;

Verificar efeito da inalação do OELa na atividade locomotora em um modelo animal de dor inflamatória.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

Este é um estudo não clínico experimental, de natureza quantitativa.

#### 3.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Na execução deste estudo os seguintes equipamentos foram utilizados: cromatógrafo gasoso da Agilent 5975, Series MSD (Califórnia, EUA); monofilamento de von Frey (vF) de 0,6g da VFH (Chicago, EUA); e uma caixa de madeira retangular sem tampa (*open field*, confeccionado para o laboratório).

As seguintes substâncias foram utilizadas: óleo essencial de *Lavandula angustifolia* obtido da Penny Price Aromatherapy® (Hinckley, Inglaterra); CFA, diclofenaco (DC) e naloxona foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA); Tween 80 e hidrato de cloral adquiridos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil); gabapentina da EMS (São Paulo, Brasil); sulfato de morfina da Cristália (São Paulo, Brasil). Todos os fármacos foram dissolvidos, imediatamente antes do uso, a partir do sal ou de solução estoque. O CFA foi diluído em Tween 80 e salina e os demais foram dissolvidos somente em solução salina. As doses de todas as substâncias usadas foram selecionadas e adaptadas com base na literatura<sup>170,171</sup> e em experimentos prévios, conduzidos em nosso laboratório. A gabapentina e o DC foram administrados via intragástrica (i.g.). A morfina foi administrada por via subcutânea (s.c.) e a naloxona foi administrada por via i.p., em volume de 10ml/kg. A naloxona quando administrada por via i.pl. e/ou i.t., volumes constantes de 20µl e 5µl foram injetados, respectivamente.

#### 3.3 ANIMAIS

Para a realização do experimento foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (25 a 35g), obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), aclimatados a 22±2°C, no ciclo 12h-claro/12h-escuro (claro a partir das 6h:00 min), com acesso a ração e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos

homogeneamente entre os grupos e aclimatados no laboratório por pelo menos 1h antes dos testes e foram utilizados apenas uma vez em cada experimento.

A previsão do número de animais nessa pesquisa foi baseada em Daniel (2008)<sup>172</sup>, que coloca uma equação utilizada para a determinação do tamanho de uma amostra sem reposição, sendo que a utilização do desvio padrão obtido na fórmula aponta para  $n = 8$  animais por grupo, utilizando um intervalo de confiança de 95%.

### 3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

No primeiro *set* de experimentos, a fim de avaliar uma possível ação da inalação do OELa sob a hiperalgesia mecânica dos animais no modelo animal da SDRC-I (dor neuropática), os camundongos foram submetidos a IR da pata direita. No 3º dia após o procedimento, a hiperalgesia mecânica dos animais foi avaliada utilizando o teste do monofilamento de vF. Diferentes grupos de animais foram tratados com DC ou diferentes volumes de OELa (100, 200 e 300µl). Neste experimento o grupo controle recebeu salina. Do 7º ao 11º dia (fase fria e neuropática da SDRC-I) os animais foram tratados com gabapentina e OELa (volume mais efetivo observado no 3º dia) diariamente e avaliados 30 minutos após o tratamento (Figura 2-A).

No segundo *set* de experimentos, com o intuito de avaliar uma possível ação da inalação do OELa na dor inflamatória, animais foram submetidos a injeção i.pl. de CFA na pata traseira direita. Vinte e quatro horas após a injeção, a hiperalgesia mecânica também foi avaliada utilizando o teste de vF. Diferentes grupos de animais foram tratados com o OELa (100, 200 e 300µl). Os animais receberam tratamento diário com o volume de OELa mais efetivo (observado no 1º dia) por 5 dias consecutivos, sendo no último dia realizado novamente a avaliação do decurso temporal do efeito anti-hiperalgésico do OELa (Figura 2-B). Animais tratados diariamente por seis dias consecutivos com OELa (no volume mais efetivo) foram submetidos ao teste do campo aberto no sexto dia.

No terceiro *set* de experimentos, se analisou o envolvimento dos receptores opioides sobre o efeito anti-hiperalgésico do OELa, a fim de determinar a participação dos receptores sistêmicos, espinais ou periféricos. Para isso, vinte e quatro horas após a injeção de CFA, diferentes grupos de animais foram pré-tratados com naloxona por via i.p., i.t. ou i.pl., respectivamente. Quinze (i.t. e i.pl.) ou vinte (i.p.) minutos após as

administrações os animais inalaram o OELa (100 $\mu$ l). Trinta minutos após foi avaliada a hiperalgesia mecânica. Um grupo controle positivo recebeu uma injeção i.p. de naloxona e posteriormente foi tratado com morfina por via s.c.

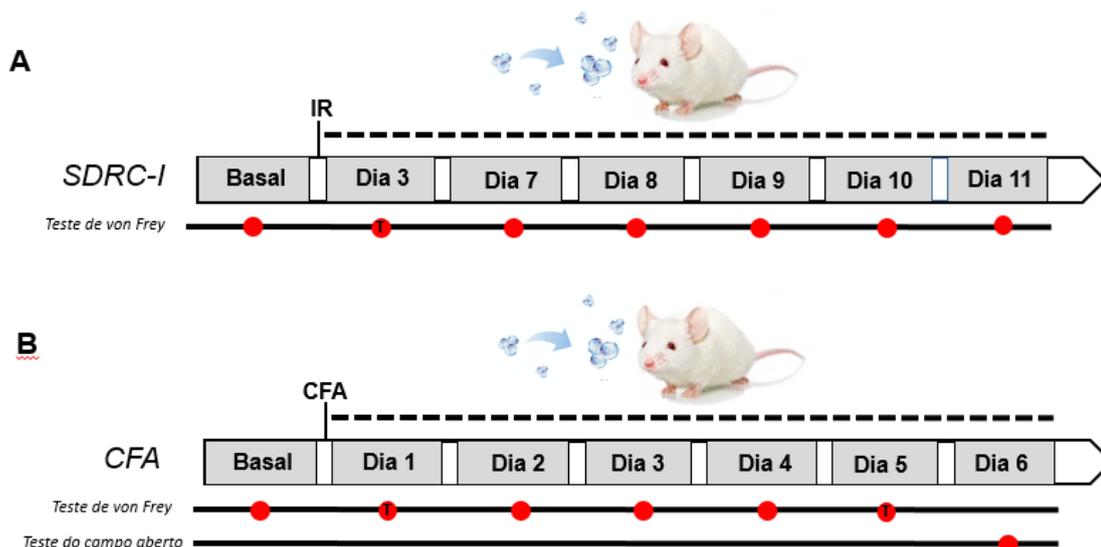


Figura 2 – Fluxograma do delineamento do estudo.

Esquema ilustrativo referente ao protocolo de indução dos modelos e avaliações comportamentais. Os círculos vermelhos são referentes ao dia em que as avaliações foram realizadas. A linha pontilhada é referente aos dias em que o tratamento inalatório com o OELa ou salina foi realizado. SDRC-I= Síndrome da dor regional complexa do tipo 1; CFA = Adjuvante completo de Freud; IR= isquemia/reperfusão; T: *time course*.

### 3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

#### 3.5.1 Análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A análise cromatográfica do OELa foi realizada por meio de um cromatógrafo gasoso da Agilent 5975, Series MSD (70 eV). Foi utilizada uma coluna HP-5MS (30m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m) com hélio como gás portador a um fluxo de 1 mL/min. As condições da temperatura da coluna do programa foram: 50-280°C (8°C/min) com isoterma a 280°C durante 20 min; a temperatura do injetor foi de 280°C e do detector de 280°C. O volume de amostra injetado foi de 1 $\mu$ L.

Os componentes no óleo foram identificados pela comparação dos índices de retenção calculados, dos espectros de massa obtidos por CG-EM e da literatura<sup>173</sup>. Os valores dos índices de retenção dos componentes foram obtidos por injeção de uma mistura de séries de n-alcenos (C5-C30) e utilizando a equação referida por Van

den Dool-Kratz (1963)<sup>174</sup>. A concentração foi calculada utilizando as áreas de pico individuais para cada substância.

### **3.5.2 Indução da lesão por IR em camundongos**

Para realização da isquemia, os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de hidrato de cloral (7%, 0,6 ml/kg)<sup>175</sup>. Após a verificação do estado de consciência do animal, foi colocado um anel elástico com 1,2 mm de diâmetro interno (Elástico Ligadura 000-1237 marca: Uniden) proximal a articulação do tornozelo direito de modo a fazer um torniquete. O animal foi mantido sob anestesia com reforços de 20% da dose inicial por três horas e então o anel foi cortado permitindo a reperfusão da pata. Após a isquemia, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada até retornarem a deambular pela caixa, onde foram encaminhados então para o biotério do laboratório. O procedimento de IR foi inicialmente descrito em ratos por Coderre e colaboradores em 2004<sup>79</sup> e posteriormente adaptado para camundongos por Millecamps e colaboradores (2010)<sup>176</sup>. Sabe-se devido a experimentos prévios que cerca de 30% dos animais não desenvolvem dor<sup>79</sup>, assim 11 animais por grupo foram submetidos a IR para obtenção de pelo menos 8 animais que apresentasse a SDRC-I.

### **3.5.3 Indução da inflamação periférica**

O modelo de inflamação periférica persistente foi induzido pelo CFA dissolvido em solução salina e Tween<sup>®</sup>, resultando em uma concentração de 80% de CFA<sup>177</sup>. Foram injetados 20µl desta solução na pata direita de cada animal. Esse modelo produz um estado de hiperalgesia mecânica persistente<sup>177</sup>.

### **3.5.4 Tratamento inalatório com OELa**

Para realizar o tratamento por meio da inalação do OE foi utilizado uma caixa moradia de polipropileno dos animais medindo 20 cm x 30 cm x 20 cm. No interior da caixa foi posicionada uma placa de petri (8cm de diâmetro) contendo diferentes quantidades do OELa. A caixa foi totalmente coberta por um plástico filme por um período de 30 minutos antes de receber os animais. Os animais foram colocados

dentro da caixa (8 por vez) e permaneceram inalando o ar do ambiente interno da caixa com os vapores do OELa ou de salina durante 30 minutos. Durante o período que os animais permaneceram na caixa inalando, uma pequena abertura de 2 cm foi feita para a manutenção da entrada de ar<sup>178</sup>.

### **3.5.5 Testes comportamentais**

Nos experimentos descritos nas próximas seções os animais foram homogeneamente distribuídos em grupos com 8 animais cada. O grupo Naive (N) foi composto por camundongos sem manipulação (CFA ou IR) e apenas avaliado; o grupo controle foi composto por camundongos que foram submetidos a IR da pata, ou injeção de CFA e que inalaram salina; o grupo controle positivo foi composto por camundongos que foram submetidos a IR da pata e tratados com gabapentina (30 mg/kg, i.g.) ou DC (10mg/kg, i.g.); e os grupos experimentais foram compostos por camundongos que foram submetidos a IR da pata injeção de CFA e tratados com inalação do OELa em diferentes volumes (100, 200 e 300 µl) por 30 minutos.

### **3.5.6 Avaliação do efeito da inalação do OELa na hiperalgesia mecânica**

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando monofilamentos de vF. A frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento de vF (0,6 g) foram os valores percentuais utilizados, como indicativo de resposta. O teste foi aplicado utilizando uma plataforma (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, os animais foram 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<sup>179</sup>.

O filamento foi aplicado na pata posterior direita (submetida a IR ou CFA), atendendo alguns critérios como: aplicação feita perpendicularmente à superfície plantar, com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total. Os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela. A resposta de retirada foi considerada quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio. No dia anterior à indução dos modelos os animais foram submetidos ao teste para caracterização da resposta basal. Apenas

os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta em torno de 20% foram selecionados<sup>179</sup>.

### **3.5.7 Envolvimento dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico da inalação do OELa**

A fim de verificar o envolvimento dos receptores opioides (sistêmicos, periféricos e espinais) sobre o efeito anti-hiperalgésico do OELa, diferentes grupos de animais foram submetidos a injeção i.pl. de CFA. Vinte quatro horas após, foi administrada naloxona por diferentes vias: i.p. (1mg/kg), i.pl. (5µg/pata) ou i.t. (5µg/sítio). Quinze (i.pl. e i.t.) e vinte (i.p.) minutos depois das injeções os animais foram tratados por inalação com o OELa no volume de 100µl por 30 minutos. Trinta minutos após a inalação foi avaliada a hiperalgisia mecânica.

Grupos de animais controles foram tratados com salina ou naloxona pelas mesmas vias quinze ou vinte minutos antes da inalação com salina. Para controle positivo, um grupo diferente de animais com CFA recebeu uma injeção i.p. de naloxona e 20 minutos depois recebeu morfina s.c. (2,5mg/kg). A hiperalgisia mecânica foi avaliada trinta minutos após à administração de morfina.

### **3.5.8 Avaliação do efeito da inalação do OELa na atividade locomotora**

A avaliação da atividade locomotora foi realizada utilizando o teste do campo aberto. O teste foi realizado em um aparato que consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50cm. O assoalho da caixa era dividido em 12 quadrados iguais sendo contabilizado cumulativamente o número de cruzamentos com todas as patas (*crossing*), durante 6 minutos. Foram realizadas inalações diárias (por seis dias consecutivos) do OELa (100µl) e a avaliação da atividade locomotora foi feita trinta minutos após a última inalação.

### 3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo

<b>Variáveis</b>	<b>Tipo</b>	<b>Natureza</b>	<b>Proposta de utilização</b>
Nociceção (dor) – número de retirada da pata frente ao estímulo mecânico (%)	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Média e erro-padrão da média
Atividade locomotora – número de cruzamentos	Dependente	Quantitativa contínua de razão	Média e erro-padrão da média
Tratamentos – OELa – tempo (min)	Independente	Dicotômica	Sim ou não
Tratamentos - Naloxona, Morfina, Diclofenaco, Gabapentina – massa (kg)	Independente	Dicotômica	Sim ou não

### 3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Inicialmente foi avaliada a distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro Wilk. Os dados paramétricos foram comparados usando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente. Em todas as análises, valores de  $p$  menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram analisados no programa Graph Pad Prism® (v. 5.0).

### 3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) sob os protocolos 16.006.2.07.IV e 16.042.2.07.IV. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados de animais de laboratório e guia ético para investigações experimentais da dor em animais conscientes<sup>180</sup>. O número de animais utilizados e a intensidade dos estímulos nocivos foram o mínimo necessário para demonstrar o consistente efeito ao tratamento recebido.

Para realizar o método de morte indolor assistida após os experimentos foram obedecidas as disposições da resolução número 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 11 de maio de 2012<sup>181</sup>, bem como da Instrução Normativa número 13 – Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal de 20 de setembro de 2013<sup>182</sup>. O procedimento foi realizado pelo Médico Veterinário responsável pelo Biotério Experimental do Laboratório de Neurociência Experimental, Geraldo Jorge Severgnini Bernardes, Matrícula na UNISUL-7068 e CRMV 0452-SC, por sobredose anestésica de (Pentobarbital, 80 mg/kg, i.p.).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DO OELa

A composição química do OELa e os índices de retenção são apresentados na Tabela 2 e na Figura 3. Sessenta e cinco componentes, representando 90,56% do óleo foram identificados. Os compostos principais foram linalol (30,61%) e acetato de linalila (20,36%). Outros compostos presentes em quantidades significativas foram acetato de geranil (3,97%), mirceno (3,64%), 1,8 cineol (3,59%), cânfora (3,24%), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (2,95%), borneol (2,56%), acetato de nerilo (2,43%), *E*-cariofileno (1,75%), acetato de lavandulilo (1,69%), terpinen-4-ol (1,67%) e  $\alpha$ -Terpineol (1,54%).

**Tabela 1.** Componentes identificados no óleo essencial de *Lavandula angustifolia*.  
(continua)

Componentes	TR* (min)	IR**	Concentração (%)
( <i>Z</i> )-3-hexanol (1)	4.313	875	0.06
Hexanol (2)	4.472	884	0.11
Triciclano (3)	5.373	933	0.03
$\alpha$ -Pino (4)	5.517	941	0.11
Camfeno (5)	5.820	958	0.12
Octen-3-ol (6)	6.249	981	0.16
$\beta$ -pino (7)	6.297	984	0.16
3-Octanona (8)	6.393	989	0.50
Mirceno (9)	6.490	995	3.64
$\delta$ -3-careno (10)	6.817	1012	0.28
<i>o</i> -cimeno (11)	7.010	1023	0.04
<i>p</i> -cimeno (12)	7.116	1029	0.17
Limoneno (13)	7.202	1034	0.46
$\beta$ -felandreno (14)	7.246	1036	0.43

(continuação)

<b>Componentes</b>	<b>TR* (min)</b>	<b>IR**</b>	<b>Concentração (%)</b>
1,8-cineol <b>(15)</b>	7.328	1041	3.59
(Z)- $\beta$ -ocimeno <b>(16)</b>	7.477	1049	0.70
(E)- $\beta$ -ocimeno <b>(17)</b>	7.501	1050	2.95
$\gamma$ -terpineno <b>(18)</b>	7.737	1063	0.06
Óxido de <i>cis</i> -linalol <b>(19)</b>	7.982	1076	0.74
Terpinoleno <b>(20)</b>	8.286	1093	0.52
Linalol <b>(21)</b>	8.710	1116	30.61
Acetato de octen-3-ilo <b>(22)</b>	8.893	1126	0.13
alo-ocimeno <b>(23)</b>	9.071	1136	0.81
neo-alo-ocimeno <b>(24)</b>	9.254	1146	0.30
Cânfora <b>(25)</b>	9.586	1164	3.24
Borneol <b>(26)</b>	9.995	1187	2.56
Terpinen-4-ol <b>(27)</b>	10.106	1193	1.67
Butirato de hexilo <b>(28)</b>	10.125	1194	0.26
$\alpha$ -Terpineol <b>(29)</b>	10.342	1206	1.54
Nerol <b>(30)</b>	10.751	1229	0.08
Neral <b>(31)</b>	10.876	1236	0.37
Geraniol <b>(32)</b>	11.079	1248	0.05
Acetato de linalila <b>(33)</b>	11.334	1262	20.36
Geranial <b>(34)</b>	11.551	1274	0.11
Óxido de trans-carvona <b>(35)</b>	11.613	1278	0.09
Acetato de isobornila <b>(36)</b>	11.676	1281	0.05
Acetato de lavandulila <b>(37)</b>	11.767	1287	1.69
Acetato de 3-tujil <b>(38)</b>	11.820	1290	0.08
Hexil tigolato <b>(39)</b>	12.509	1330	0.18
Acetato de $\alpha$ -Terpinila <b>(40)</b>	12.860	1351	0.07

(continuação)

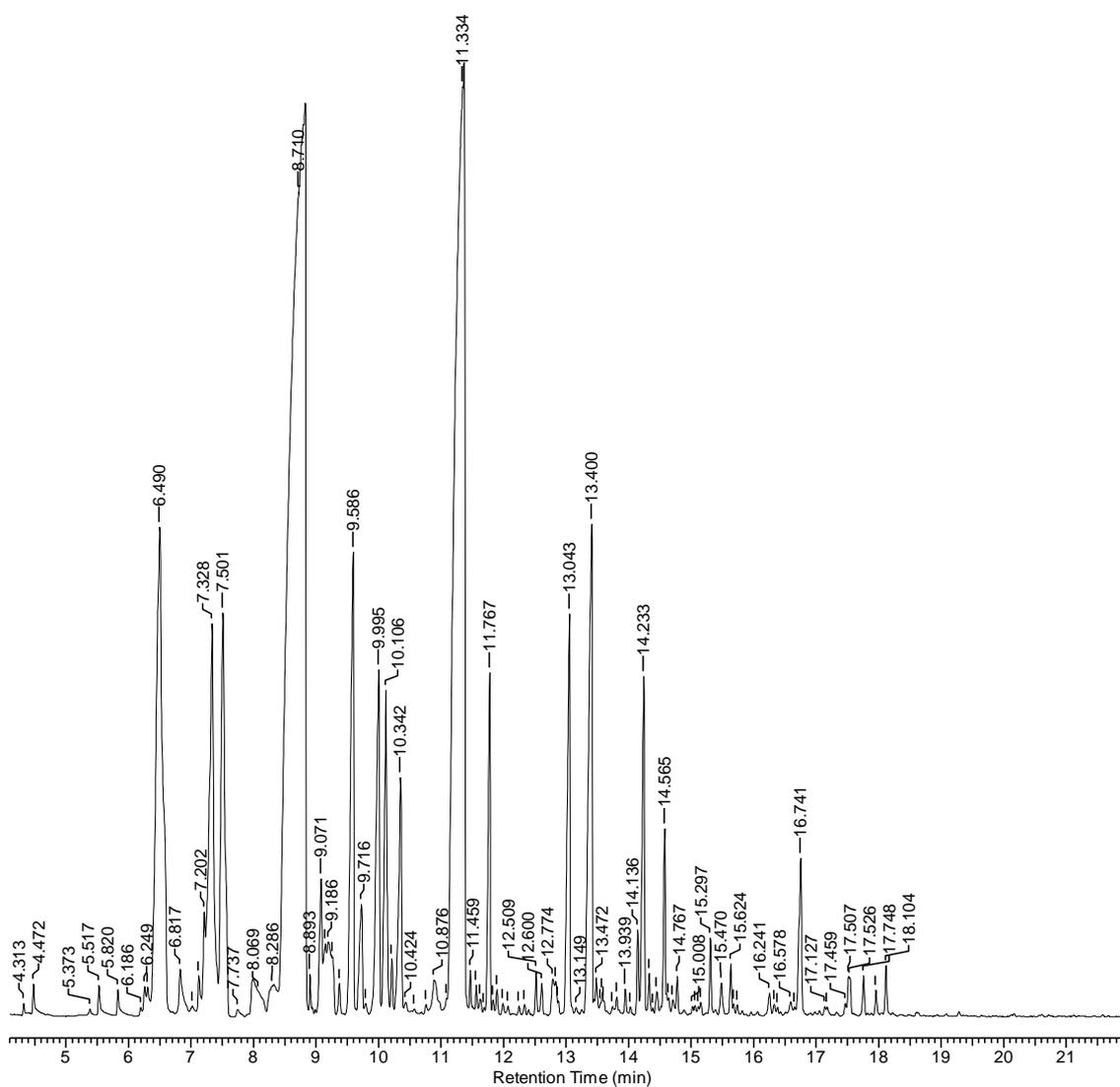
<b>Componentes</b>	<b>TR* (min)</b>	<b>IR**</b>	<b>Concentração (%)</b>
Acetato de Nerilo <b>(41)</b>	13.043	1362	2.43
Linalol isobutirato <b>(42)</b>	13.246	1374	0.04
Acetato de Geranil <b>(43)</b>	13.400	1383	3.97
Hexanoato de hexilo <b>(44)</b>	13.472	1387	0.20
$\beta$ -Bourboneno <b>(45)</b>	13.592	1395	0.06
$\beta$ -Cedreno <b>(46)</b>	13.799	1407	0.10
$\alpha$ - <i>cis</i> -bergamoteno <b>(47)</b>	14.016	1421	0.06
<i>E</i> -cariofileno <b>(48)</b>	14.233	1435	1.75
$\alpha$ - <i>trans</i> -bergamoteno <b>(49)</b>	14.319	1440	0.19
( <i>Z</i> )- $\beta$ -farneseno <b>(50)</b>	14.565	1455	0.75
( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseno <b>(51)</b>	14.628	1459	0.09
$\gamma$ -Curcumeno <b>(52)</b>	15.008	1483	0.05
$\alpha$ -curcumeno <b>(53)</b>	15.051	1486	0.05
Biciclogermacreno <b>(54)</b>	15.143	1492	0.07
Isovalerato de lavandulil <b>(55)</b>	15.297	1501	0.32
Lavandulil 2-metil butirato <b>(56)</b>	15.470	1513	0.20
$\delta$ -Cadineno <b>(57)</b>	15.624	1523	0.22
<i>trans</i> -calameneno <b>(58)</b>	15.725	1530	0.07
Longipinanol <b>(59)</b>	16.318	1569	0.09
Dendrolasin <b>(60)</b>	16.371	1572	0.05
Globulol <b>(61)</b>	16.578	1586	0.10
1-epi-cubenol <b>(62)</b>	17.165	1626	0.06
$\alpha$ -Muurolol <b>(63)</b>	17.526	1651	0.17
14-hidroxi-9-epi- ( <i>E</i> ) -caryofileno <b>(64)</b>	17.748	1667	0.19
epi- $\alpha$ -Bisabolol <b>(65)</b>	18.104	1692	0.22

(conclusão)

Componentes	TR* (min)	IR**	Concentração (%)
<b>Total</b>			90.56

\*TR, tempo de retenção

\*\* IR, índice de retenção

Figura 3 - Perfil fitoquímico do óleo essencial *Lavandula angustifolia*

## 4.2 EFICÁCIA DA INALAÇÃO DO OELA NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR IR

Os resultados apresentados na figura 4 (painel A) mostram que o procedimento de IR - um modelo animal da SDRC-I - induziu hiperalgesia mecânica de maneira significativa até o décimo primeiro dia de experimentação. A figura 4 (painel C) demonstra que no terceiro dia após o procedimento (fase inflamatória da síndrome) a inalação do OELa (100 $\mu$ l) reduziu de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) a hiperalgesia mecânica induzida pela IR da pata dos camundongos. No entanto, na análise da área sob a curva (ASC) também se observou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da hiperalgesia mecânica do grupo DC (figura 4D). O tratamento dos animais na fase neuropática (sete dias após a IR) da SDRC-I mostrou um efeito anti-hiperalgésico muito breve e transiente (somente no nono dia, figura 4E), apesar da análise da ASC demonstrar grande diferença estatística ( $p < 0,001$ , figura 4F).

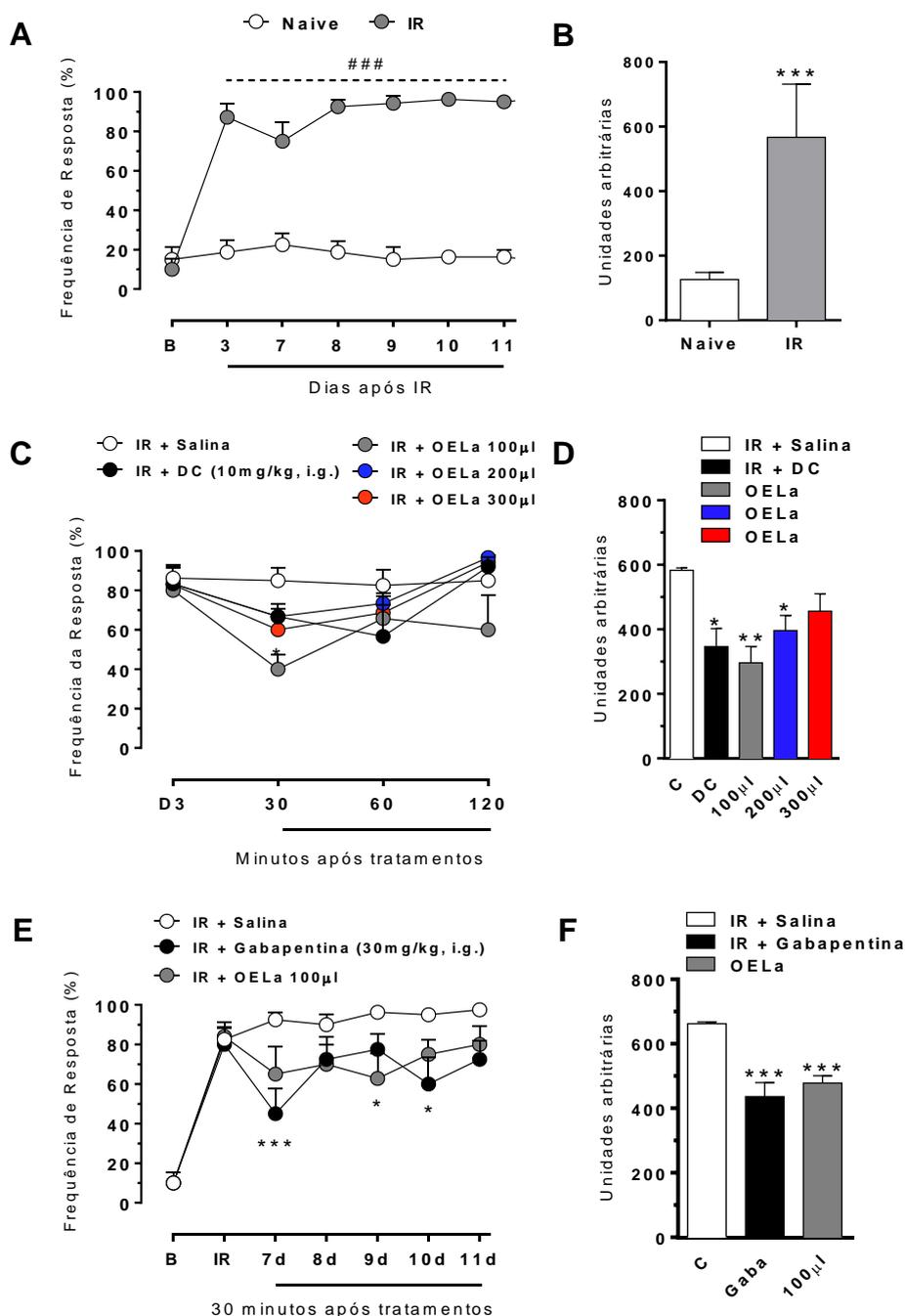


Figura 4 – Efeito da inalação do OELA sobre a hiperalgesia mecânica induzida por IR. Inalação do OELA no volume de 100µl diminui a hiperalgesia mecânica em um modelo animal de SDRC-I em camundongos no terceiro e nono dia após IR. Assim como a gabapentina no sétimo e décimo dia. Cada ponto representa a média dos valores obtidos em 8 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os símbolos determinam uma diferença significativa de  $*p = 0,05$  quando comparado ao grupo controle (IR+Salina). Foi utilizado ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. Na ASC, painel D, os volumes de 100 e 200 µl, assim como o grupo que recebeu DC diminuíram a hiperalgesia mecânica. No painel F, os grupos gabapentina e OELA 100 µl apresentaram diminuição da hiperalgesia mecânica. Cada coluna representa a média dos valores obtidos em 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M.  $*p = 0,05$  quando comparado com o grupo controle (IR + Salina). Os dados da ASC foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. OELA = óleo essencial de Lavandula angustifolia; SDRC-I = Síndrome

da dor regional complexa tipo 1; IR = isquemia/reperfusão; E.P.M = erro padrão da média; ASC = área sob a curva; DC = diclofenaco; Gaba = Gabapentina; D = dia; C = controle; B = basal.

#### 4.3 EFICÁCIA DA INALAÇÃO DO OELA NA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA POR CFA

Os resultados apresentados na figura 5 (painéis A, C e E) mostram que o procedimento de injeção i.pl. de CFA - um modelo animal de dor inflamatória crônica - induziu hiperalgesia mecânica de maneira significativa, que se estende até o quinto dia após a indução do modelo. Também é possível observar que a inalação do OELa (100 µl) durante 30 minutos reduziu de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA até 2h após o tratamento com OELa (figura 5A). Conforme ilustrado na figura 5C e 5D se observa que houve uma redução significativa da hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA no primeiro ( $p < 0,05$ ), segundo ( $p < 0,05$ ), terceiro ( $p < 0,05$ ) e quinto ( $p < 0,05$ ) dia de tratamento. No 5º dia após a injeção i.pl de CFA a inalação do OELa (100 µl) reduziu de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA até 2h após o tratamento com OELa, não apresentando efeito cumulativo (figuras 5E).

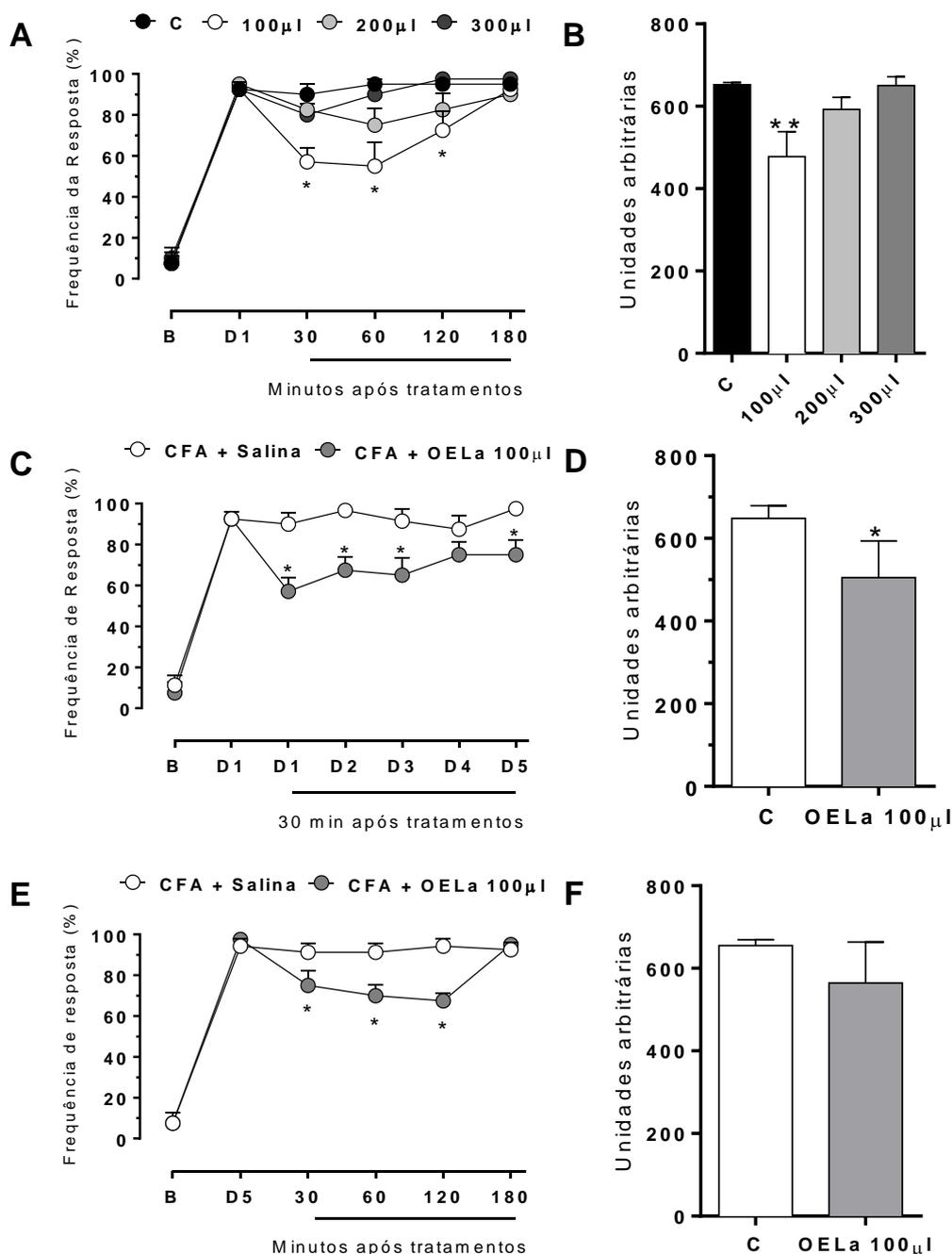


Figura 5 – Efeito da inalação do OELa sobre a hiperalgesia mecânica induzida por CFA.

Inalação do OELa no volume de 100 $\mu$ l diminui a hiperalgesia mecânica em um modelo animal de inflamação periférica crônica em camundongos induzida por CFA. Cada ponto representa a média dos valores obtidos em 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. Os símbolos determinam uma diferença significativa de  $*p = 0,05$  quando comparado ao grupo controle (CFA+Salina). Foi utilizado ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. O mesmo é observado na análise da ASC, painel B e D. Cada coluna representa a média dos valores obtidos em 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M.  $*p = 0,05$  quando comparado com o grupo controle (CFA + Salina). Os dados da ASC foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. OELa= óleo essencial de Lavandula angustifolia; CFA = adjuvante completo de Freund; D = dia; E.P.M= erro padrão da média; ASC = área sob a curva; C = controle; B = basal.

#### 4.4 RECEPTORES OPIOIDES PERIFÉRICOS E ESPINAIS MEDEIAM O EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA INALAÇÃO DO OELA

Como pode-se observar na figura 6A, a administração i.p. de salina ou naloxona, bem como a inalação de salina não influenciaram na hiperalgesia mecânica (frequência de resposta de retirada da pata). No entanto, a figura mostra que o pré-tratamento i.p. dos animais com naloxona (1mg/kg, i.p.), foi capaz de prevenir de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a redução da hiperalgesia mecânica causada pela morfina (2,5 mg/kg, s.c.- painel A) ou pela inalação do OELa (volume de 100  $\mu$ l) (painel B).

Como pode-se observar na figura 6 (painéis C e D), a administração i.t. e i.pl. de salina ou naloxona, bem como a inalação de salina não influenciaram na hiperalgesia mecânica (frequência de resposta). Porém, é possível observar que o pré-tratamento i.t. e i.pl. dos animais com naloxona, foi capaz de prevenir de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a redução da hiperalgesia mecânica causada pela inalação do OELa (volume de 100 $\mu$ l).

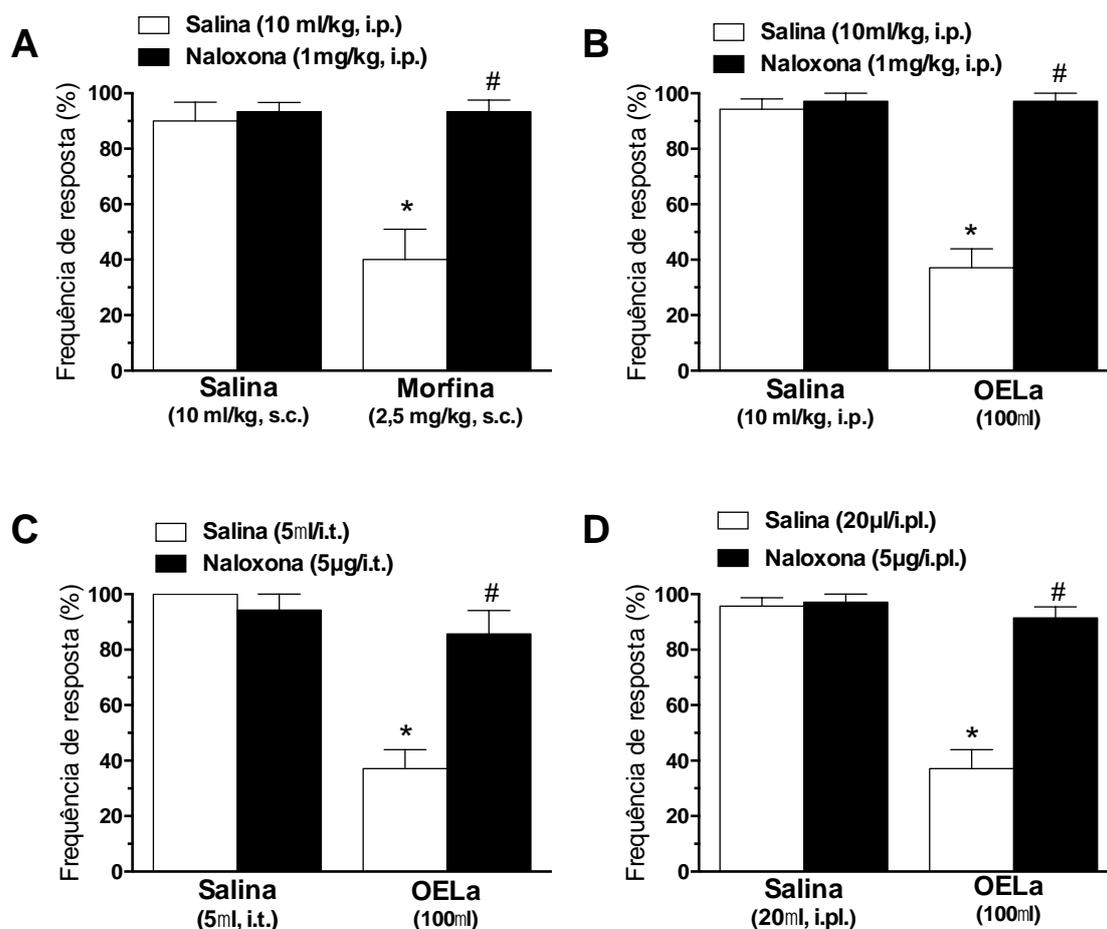


Figura 6 - Receptores opioides periféricos e centrais estão envolvidos no efeito anti-hiperalgésico produzido pelo OELa no modelo de inflamação periférica crônica induzida pelo CFA.

O pré-tratamento com naloxona i.p., i.t. e i.pl. foi capaz de prevenir o efeito anti-hiperalgésico proporcionado pelo tratamento com OELa. Cada coluna representa a média dos valores obtidos em 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. \* $p = 0,05$  quando comparado com o grupo controle (Veículo + Inalação Salina). # $p = 0,05$  quando comparado com o grupo que inalou o OE (Veículo + OELa 30 minutos). A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Naloxona = antagonista de receptores opioides; OELa = óleo essencial de *Lavandula angustifolia*.

#### 4.5 EFEITO DA INALAÇÃO DO OELA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA.

No teste do campo aberto, realizado no 6º dia após a injeção i.pl. de CFA (figura 7), não houve diferença significativa da atividade locomotora entre os grupos.

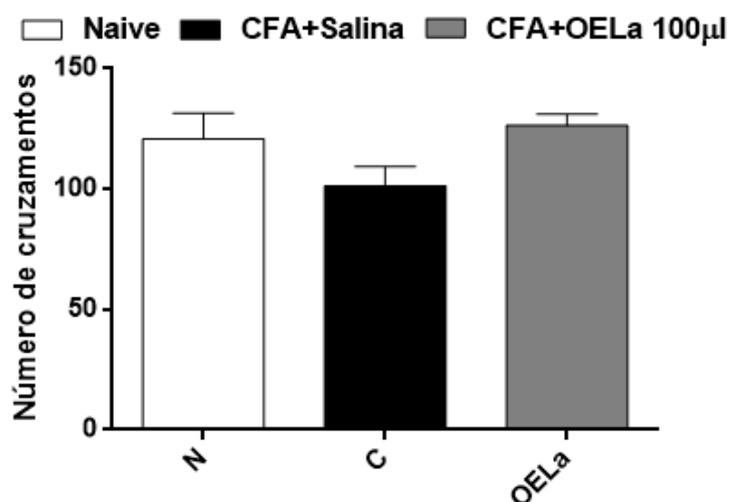


Figura 7 – Efeito da inalação do OELa sobre a atividade locomotora em um modelo de inflamação periférica crônica.

A inalação do OELa no volume de 100µl não exerceu nenhum efeito sobre a atividade locomotora dos animais, avaliada através do número de cruzamentos no teste do campo aberto. Cada coluna representa a média dos valores obtidos em 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. N = naive; OELa = óleo essencial de *Lavandula angustifolia*; CFA = adjuvante completo de Freund; C = controle (CFA+Salina); E.P.M = erro padrão da média; N = naive.

## 5. DISCUSSÃO

Vários estudos clínicos e não clínicos têm demonstrado efeito analgésico/antinociceptivo produzido pelo OELa e por seus compostos majoritários (linalol e acetato de linalila) administrado por diferentes vias, como: uso tópico em massagens (estudo clínico), banhos de assento (estudo clínico), por via oral ou mesmo injetado i.p.<sup>183,184,140,30</sup>. No entanto, o efeito analgésico causado pela inalação do OELa tem sido pouco investigado. Assim, o presente estudo analisou o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OELa em modelos animais de dor crônica (neuropática e inflamatória) e demonstrou fortes evidências para o envolvimento de receptores opioides neste efeito. Neste sentido, foi demonstrado pela primeira vez na literatura que a inalação do OELa produziu: i) efeito anti-hiperalgésico na fase quente (inflamatória) e fria (neuropática) da SDRC-I, ii) efeito anti-hiperalgésico na dor inflamatória induzida por CFA e, iii) ativação de receptores opioide periféricos e espinais.

A primeira e importante análise do presente estudo foi a caracterização do perfil fitoquímico do OELa realizada por meio de análise cromatográfica. Com os dados obtidos a partir da análise CG-EM, 65 compostos químicos foram encontrados, sendo os principais: o linalol (30,61%) e acetato de linalila (20,36%). Outros compostos também presentes em quantidades significativas foram: acetato de geranil (3,97%), mirceno (3,64%), 1,8 cineol (3,59%), cânfora (3,24%), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (2,95%), borneol (2,56%), acetato de nerilo (2,43%), *E*-cariofileno (1,75%), acetato de lavandulilo (1,69%), terpinen-4-ol (1,67%) e  $\alpha$ -Terpineol (1,54%). Estes resultados foram consistentes com dados previamente relatados por Verma e colaboradores (2010)<sup>185</sup> que identificaram o acetato de linalila, linalol, acetato de lavandulil,  $\alpha$ -terpineol, acetato de geranilo, óxido de cariofileno e 1,8 cineol como compostos majoritários da lavanda angustifolia<sup>185</sup>. Singh e co-autores (2015)<sup>186</sup> estudaram OELa, e os resultados mostraram que o óleo era rico em linalol, acetato de linalila,  $\alpha$ -terpineol, trans-cariofileno, óxido de trans-cariofileno, acetato de geranil e acetato de nerilo. Os autores também descreveram a presença de outros compostos como hidrato de trans-sabineno, limoneno, acetato de 1-octeno-3-yil e lavandulol<sup>186</sup>.

Está bem estabelecido na literatura que a IR da pata de roedores por três horas mimetiza grande parte dos sinais e sintomas evidenciados em seres humanos com a

SDRC-I<sup>187</sup>. A exposição prolongada a IR da pata produz hiperemia e extravasamento plasmático na pata isquêmica, agudamente, e sintomas do tipo dor neuropática, incluindo hiperalgesia a estimulação mecânica e alodinia ao frio, cronicamente<sup>69</sup>. Um importante argumento a se discutir em favor da utilização desse modelo em detrimento de outros descritos na literatura, tais como: a estimulação tetânica (10min) do nervo isquiático de ratos<sup>188,189</sup>, ou a infusão intra-arterial contínua de um doador de radical livre<sup>190,191,192</sup> é que os sintomas do tipo-SDRC-I são induzidos por uma lesão física, semelhante à aquelas observadas na clínica<sup>187</sup>. A SDRC-I comumente é seguida de: fraturas, torções, contusões, esmagamentos entre outros<sup>193,194</sup>.

Millecamps e Coderre (2008)<sup>195</sup> sugerem que três condições dolorosas distintas podem ser geradas após uma lesão de IR de 3h. Inicialmente, ocorre uma inflamação aguda (2-3 dias após o procedimento, sensível à morfina, dexametasona e pregabalina) quando os tecidos apresentam lesão oxidativa<sup>196</sup> e uma produção local de mediadores inflamatórios<sup>197</sup>. Após isso, ocorre uma condição isquêmica persistente, em consequência direta do insulto à IR nos vasos sanguíneos, sendo evidenciada pela redução fluxo sanguíneo<sup>198</sup>; e finalmente, uma lesão neuropática secundária devida à degeneração das fibras nervosas como consequência do fraco fluxo sanguíneo nos nervos<sup>196</sup>. A fase mais tardia da dor pós-isquemia crônica (7 dias pós IR) é provavelmente uma combinação dessas três condições dolorosas. O único fármaco efetivo nessas 3 condições dolorosas, foi a pregabalina (análoga da gabapentina)<sup>195</sup>.

Em relação a fase inflamatória, apesar de Millecamps e Coderre (2008)<sup>195</sup> não observarem efeito da administração sistêmica de fármacos anti-inflamatórios na hiperalgesia mecânica em nenhum momento (2 ou 7 dias após IR), exceto com a dexametasona, na dose mais alta e durante a fase quente (isto é, 10 mg/kg aos 2 dias pós IR). Estudos prévios demonstraram consistentemente que o tratamento sistêmico com AINEs (indometacina, diclofenaco, ibuprofeno, dipirona e acetaminofeno) atenuou a hiperalgesia durante a primeira hora após IR em ratos<sup>199</sup>.

Estudos clínicos em diferentes condições dolorosas apontam para um efetivo efeito analgésico da inalação do OELa. A exemplo, Olapour e colegas (2013)<sup>200</sup> demonstraram que a inalação do OELa foi efetiva em reduzir a dor pós-operatória em mulheres submetidas a cesariana. Os autores observaram que os indivíduos do grupo que inalou o OELa tiveram menos dor em quatro, oito e doze horas após a primeira medicação hospitalar e ainda apresentaram menor frequência cardíaca e maior nível

de satisfação com a analgesia. Além disso, o uso de DC para complementar a analgesia foi significativamente maior no grupo placebo<sup>200</sup>.

Outro estudo publicado mostrou que apenas a inalação do aroma de lavanda foi efetivo em aliviar os sintomas primários de dismenorreia em universitárias. O tratamento foi realizado por 5 min a cada 6 horas pelos 3 primeiros dias da menstruação<sup>201</sup>. Soltani e colegas (2013)<sup>202</sup> concluiu que a inalação de OELa foi capaz de reduzir a frequência diária do uso de acetaminofeno por pacientes pediátricos nos três primeiros dias após a cirurgia para retirada das amígdalas. Porém estes pacientes não apresentaram redução da intensidade da dor e não houve mudança na frequências de vezes que os pacientes acordaram durante a noite<sup>202</sup>.

Nossos primeiros resultados demonstraram que a inalação do OELa exerceu uma redução significativa da hiperalgesia mecânica dos animais três dias após IR da pata - fase inflamatória da SDRC-I. Em paralelo a esses resultados, também se observou o efeito positivo da administração oral de DC sobre a hiperalgesia mecânica, resultado que corrobora os dados da literatura. O efeito analgésico e anti-inflamatório do OELa e de seus compostos tem sido mostrado. Silva e colaboradores (2015)<sup>140</sup> demonstraram que o tratamento por via i.g. com o OELa foi capaz de reduzir a resposta inflamatória (edema e migração celular) na pleurisia induzida pela carragenina, e edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Ainda no mesmo estudo foi demonstrado que o OELa foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pela formalina de maneira muito semelhante ao tramadol (agonista opioide).

Peana e co-autores (2002)<sup>30</sup> analisaram o efeito da administração i.p. de linalol e de acetato de linalila no modelo de edema de orelha induzido pela carragenina. Os resultados mostraram que tanto o linalol quanto o acetato de linalila foram efetivos em reduzir o edema, sugerindo assim potencial anti-inflamatório desses compostos. Não foram encontrados estudos não clínicos na literatura que avaliaram o efeito da inalação do OELa na dor ou inflamação crônica. Assim, os resultados do presente estudo fortalecem a literatura, por novamente demonstrar o efeito analgésico do OELa, e ao mesmo tempo estendem os dados da literatura por utilizar um modelo animal e via de administração que ainda não tinham sido estudados.

Outro interessante achado do presente estudo, foi a demonstração que no sétimo dia após IR da pata já na fase fria (neuropática) da SDRC-I também se observou uma redução da hiperalgesia mecânica, porém transiente. Também em paralelo a esses resultados, observou-se efeito positivo da administração oral de

gabapentina na hiperalgesia mecânica, resultado que também corrobora os dados da literatura<sup>203</sup>.

Embora não se encontra na literatura estudos não clínicos com a inalação do OELa em modelos de dor neuropática, tem sido evidenciado que o linalol reduz a dor neuropática após sua administração s.c.<sup>204</sup> ou i.p.<sup>205</sup> em camundongos.

Berliocchi e colaboradores (2009)<sup>204</sup> mostraram que foi necessária a administração s.c. de linalol 1h antes do procedimento cirúrgico de ligadura do nervo espinal, ou o tratamento diário por sete dias consecutivos para reduzir a alodinia mecânica em camundongos. O tratamento por 14 dias mostrou resultado similar e não houve efeito cumulativo. Os autores sugerem e concluem que o linalol pode reduzir a hipersensibilidade mecânica apenas na fase inicial da sensibilização central<sup>204</sup>. Batista e colegas (2010)<sup>205</sup> observaram em camundongos que a administração i.p. de linalol (50 ou 200mg/kg) a cada 12h por cinco dias consecutivos, foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica em um modelo animal de dor neuropática induzida pela ligadura parcial do nervo isquiático. Os pesquisadores também mostraram que este efeito anti-hiperalgésico do linalol pode ser mediado, pelo menos em parte, pela capacidade do linalol em reduzir a ação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  na medula espinal<sup>205</sup>.

Acredita-se que no presente estudo os efeitos foram mais transiente em função da via administração (inalatória) usada, uma vez que pelas administrações i.p. e s.c. as concentrações de linalol na corrente sanguínea podem ser maiores.

Após a realização do primeiro set de experimentos utilizando o modelo da SDRC-I ficou evidente que o potencial analgésico da inalação do OELa é na hiperalgesia inflamatória, neste sentido, o passo seguinte foi testar os efeitos da inalação do OELa sobre a hiperalgesia mecânica de origem inflamatória induzida pelo CFA, que é um modelo animal de hiperalgesia inflamatória crônica bem estabelecido na literatura.

Conforme observado na figura 5, a inalação do OELa produziu efetivo efeito sobre a hiperalgesia mecânica inflamatória por até duas horas após os tratamentos. Também se observou que o tratamento diário não causou efeito cumulativo sobre a analgesia. Corroborando com esses achados, Batista e co-autores (2010)<sup>205</sup> também mostraram que o tratamento diário com linalol reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica e alodinia ao frio em camundongos injetados com CFA. Peana e colaboradores (2003)<sup>206</sup> mostraram que a administração s.c. de linalol diminuiu as contorções abdominais induzida por ácido acético em camundongos. Por fim, OE de

bergamota (óleo com grande quantidade de linalol e acetato de linalila) ou linalol administrado na pata ipsilateral reduziu a resposta nociceptiva induzida pela formalina em camundongos<sup>207</sup>. Juntos, estes estudos fortalecem a hipótese de que o efeito anti-hiperalgésico observado no presente estudo possa ser em função da presença do linalol na constituição do OELa. No entanto, para esclarecer se o efeito observado é apenas do linalol ou se é um efeito sinérgico de todos constituintes do OELa, futuros estudos com a inalação apenas do linalol e com outros constituintes também majoritários do OELa poderão ser realizados afim de responder estas questões.

Tem sido demonstrado que a analgesia endógena opioide é mediada pela modulação das vias ascendente e descendente da dor<sup>118,208,209</sup>. Além disso, a expressão de ROM, ROD e ROK foram confirmadas nos GSNE, na medula espinal e no núcleo trigeminal da via ascendente da dor, bem como nos núcleos da substância cinzenta periaquedutal, com predominância da expressão de ROM e ROK nos núcleos da rafe<sup>118</sup>. Além dos sítios espinais e supra-espinais que produzem a analgesia opioide, receptores opioides expressos em neurônios periféricos também podem contribuir para a antinocicepção periférica opioide.

No presente trabalho, o envolvimento dos receptores opioides no efeito anti-hiperalgésico da inalação do OELa foi investigado pelo fato de que na literatura encontrou-se que o pré-tratamento s.c. com naloxona preveniu o efeito antinociceptivo do linalol administrado pela mesma via s.c.<sup>152</sup>. Além disso, o pré-tratamento i.pl. com naloxona metiodida, a qual se liga preferencialmente a ROM também preveniu o efeito antinociceptivo do linalol injetado na pata de camundongos<sup>207</sup>. Aqui, foi demonstrado que os receptores opioides periféricos e espinais estão envolvidos no efeito anti-hiperalgésico da inalação do OELa. Esta conclusão deriva do fato que o pré-tratamento dos animais com a naloxona administrado em diferentes sítios (i.p., i.t. ou i.pl.), em uma dose na qual não produziu nenhum efeito *per se* no modelo de inflamação periférica induzida por CFA, mas que preveniu significativamente a anti-hiperalgesia causada pela morfina, também preveniu significativamente a atividade anti-hiperalgésica da inalação do OELa. Pode-se concluir parcialmente que, assim como o efeito anti-hiperalgésico do linalol administrado por via i.p., o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OELa também é mediado por receptores opioides centrais e periféricos.

Estudos prévios mostraram que a inalação do OELa ou de linalol produz efeito sedativo em camundongos<sup>210,211</sup>. Neste sentido, no presente estudo foi realizado o

teste do campo aberto, afim de descartar o possível efeito sedativo do volume de OELa mais efetivo utilizado. Por não apresentar diferença entre o volume que melhor produziu efeito anti-hiperalgésico (OELa 100µl) e os grupos de animais *naïve* e controle, se descartou a possibilidade de um possível efeito sedativo da inalação do OELa que poderia causar uma má interpretação na avaliação da hiperalgesia mecânica.

Woronuk e colaboradores (2011)<sup>212</sup> descreveram que a absorção dos óleos essenciais através do sistema respiratório pode ocorrer de duas maneiras: (i) absorção pelos pulmões e mucosa nasal na corrente sanguínea, levando os compostos ativos ao SNC e atuando diretamente na neurotransmissão e (ii) olfatório, em que a administração intranasal ultrapassa a barreira hemato-encefálica, e as substâncias atingem o SNC através de vias neuronais olfatórias<sup>156,213,214</sup>. Alternativamente, o óleo essencial de lavanda pode ativar células olfatórias, provocando sinalização no SNC através do sistema olfatório e causando alterações comportamentais<sup>213-217</sup>. O sistema olfatório está anatomicamente próximo de regiões cerebrais associadas ao processamento da informação afetiva, como o tálamo, o hipotálamo, a amígdala, o hipocampo, o córtex orbitofrontal e o córtex insular, que também são estruturas envolvidas na emoção e no processamento de odores<sup>218</sup> e que também fazem parte do circuito modulatório da dor. Porém, um interessante estudo realizado por Chioca e colaboradores (2013)<sup>219</sup>, demonstrou que a estimulação do sistema olfatório não é necessária para o efeito ansiolítico produzido pela inalação do OELa, pois este efeito ainda foi observado (preservado) em camundongos com anosmia<sup>219</sup>. Como ainda não foram realizados estudos para testar se isso também ocorre no tratamento da dor, futuros estudos são necessários afim de determinar a principal via de absorção (pulmonar ou olfatória) que medeia o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OELa.

O presente trabalho serve como mais uma evidência de que os óleos essenciais e a aromaterapia podem vir a ser utilizados no futuro como um recurso importante no manejo da dor. Espera-se que novas pesquisas sejam realizadas, buscando desenvolver e aprofundar este conhecimento, para que esta prática seja utilizada amplamente e com todo seu potencial. Com a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, diversas terapias complementares foram institucionalizadas no SUS, e a aromaterapia é um dos recursos utilizados dentro da fitoterapia. Estas novas políticas são criadas com a perspectiva de prevenir agravos,

promover e recuperar a saúde. Tendo como foco a Atenção Básica, por este nível estar voltado para o cuidado continuado, humanizado e integral em saúde. Além disso, também têm o propósito de ampliar o acesso da população a mais opções de tratamento. Perante isso, testar estas terapias como opção de tratamento em pesquisas científicas se tornam de profunda valia para sustentação e ampliação destas novas políticas.

## 6. CONCLUSÃO

Em suma, o presente estudo conclui que:

- Dos sessenta e cinco compostos químicos identificados no OELa utilizado nesta pesquisa, os principais foram o linalol (30,61%) e acetato de linalila (20,36%).
- Dos três volumes testados, a inalação do OELa no volume de 100µl por 30 min foi a mais efetiva em reduzir a hiperalgesia mecânica dos animais no modelo de SDRC-1 e de inflamação crônica periférica;
- O efeito anti-hiperalgésico da inalação do OELa parece ser mediado por receptores opioides periféricos e centrais;
- O volume do OELa, bem como o tempo de inalação que foi mais efetivo em reduzir a hiperalgesia mecânica não alterou a locomoção dos animais.

### 6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

O OELa já é indicado dentro das práticas integrativas e complementares. Com base nestes achados ele pode vir a ser utilizado como um tratamento complementar para promover analgesia em casos de dor crônica, sendo uma opção de baixo custo e viável para auxiliar nos tratamentos convencionais, como consequência espera-se a melhora da qualidade de vida dos indivíduos acometidos por essas condições. Através de testes adicionais, no futuro, pode-se considerar uma interação com medicações opioides, podendo quem sabe levar a uma redução na necessidade desses medicamentos e por consequência seus efeitos colaterais.

Dando sequência a este trabalho próximos estudos poderiam investigar o efeito da inalação do OELa sobre o EO e mediadores inflamatórios. Também pode ser investigada a participação de outros sistemas no efeito anti-hiperalgésico do OELa. Seria interessante e relevante a quantificação do quanto de OE está sendo inalado e absorvido pelos animais, bem como um estudo induzindo anosmia, para determinar a principal via de absorção que medeia o efeito anti-hiperalgésico da inalação do OELa.

## REFERÊNCIAS

1. Willman A, Petzäll K, Östberg AL, Hall-Lord ML. The psychosocial dimension of pain and health-related quality of life in the oldest old. *Scand J Caring Sci.* 2013; 27(3):534-40.
2. Gaskin DJ, Richard P. The Economic Costs of Pain in the United States. In: Institute of Medicine (US) Committee on Advancing Pain Research, Care, and Education. *Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research.* Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. Appendix C. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92521/>.
3. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic Pain - A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. *Annu Rev Neurosci.* 2009; 32:1–32.
4. Seventer R, Bach FW, Toth CC, Serpell M, Temple J, Murphy TK, et al. Pregabalin in the treatment of post-traumatic peripheral neuropathic pain: a randomized double-blind trial. *Eur J Neurol.* 2010; 17(8):1082-9.
5. Kissin I. Long-term opioid treatment of chronic nonmalignant pain: unproven efficacy and neglected safety? *J Pain Res.* 2013; 6:513–529.
6. Kissin I. The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. *Methods Mol Biol.* 2010; 617:475–82.
7. Chou R, Fanciullo GJ, Fine PG, Adler JA, Ballantyne JC, Davies P, et al. Clinical Guidelines for the Use of Chronic Opioid Therapy in Chronic Noncancer Pain. *J Pain.* 2009; 10(2):113–130.
8. Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, et al. European Federation of Neurological Societies. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol.* 2010; 13:1113–e88.
9. Guindon J, Hohmann AG. Recent advances in the pharmacological management of pain. *Drugs.* 2007; 67:2121–33.
10. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2001; 429:23–37
11. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet.* 1999; 353:1959–64.
12. Ji RR, Strichartz G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. *Science* 2004; 252:1–19.
13. da Silva KA, Paszcuk AF, Passos GF, Silva ES, Bento AF, Meotti FC, et al. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene  $\alpha,\beta$ -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *Pain.* 2011; 152(8):1872-87.

14. Yoshimura M, Furue H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J Pharmacol Sci.* 2006; 101(2):107-17.
15. Dogrul A, Seyrek M, Yalcin B, Ulugol A. Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012; 38:97–105.
16. Ma J, Zhang Y, Kalyuzhny AE, Pan ZZ. Emergence of functional  $\delta$ - opioid receptors induced by long-term treatment with morphine. *Mol.Pharm.* 2006; 69:1137–1145.
17. Hurley RW, Hammond DL. The analgesic effects of supraspinal mu and delta opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. *The Journal of Neuroscience.* 2000; 20(3):1249-1259.
18. Salaga M, Mokrowiecka A, Jacenik D, Cygankiewicz AI, Malecka-Panas E, Kordek R, et al. Systemic administration of sialorphin attenuates experimental colitis in mice via interaction with mu and kappa opioid receptors. *J Crohns Colitis.* 2017. No prelo.
19. Sambasevam Y, Omar Farouk AA, Tengku Mohamad TA, Sulaiman MR, Bharatham BH, Perimal EK. Cardamonin attenuates hyperalgesia and allodynia in a mouse model of chronic constriction injury-induced neuropathic pain: Possible involvement of the opioid system. *Eur J Pharmacol.* 2017; 796:32-38.
20. Grenald SA, Young MA, Wang Y, Ossipov MH, Ibrahim MM, Largent-Milnes TM, et al. Synergistic attenuation of chronic pain using mu opioid and cannabinoid receptor 2 agonists. *Neuropharmacology.* 2017; 116:59-70.
21. Raffa RB, Burdge G, Gambrah J, Kinecki HE, Lin F, Lu B, et al. Cebranopadol: novel dual opioid/NOP receptor agonist analgesic. *J Clin Pharm Ther.* 2017; 42(1):8-17.
22. Seltzman HH, Shiner C, Hirt EE, Gilliam AF, Thomas BF, Maitra R, et al. Peripherally Selective Cannabinoid 1 Receptor (CB1R) Agonists for the Treatment of Neuropathic Pain. *J Med Chem.* 2016; 59(16):7525-43.
23. Günther T, Dasgupta P, Mann A, Miess E, Kliewer A, Fritzwanker S, et al. Targeting multiple opioid receptors - improved analgesics with reduced side effects? *Br J Pharmacol.* 2017. No prelo.
24. Horrigan C. Aromatherapy in the management and treatment of rheumatoid and musculoskeletal autoimmune disorders: Part III. Elsevier. 2004;15:15-23
25. PRICE, Shirley; PRICE, Len (Ed). *Aromatherapy for health professionals.* 4. ed. Nova York: Elsevier, 2012.
26. LOMAZZI, Giuliana. *Aromaterapia : os antigos segredos dos óleos essenciais para reencontrar a saúde do corpo e da mente.* Blumenau: Eko, 2006.

27. Tepe B, Daferera D, Sökmen M, Polissiou M, Sökmen A. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et P.H. Davis. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(5):1132-7.
28. Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, de la Mano-Espinosa, T. Complementary and alternative medical therapies in patients with burning mouth syndrome. *J Altern Complement Med*. 2011; 17:289–90.
29. Buckle J. *Clinical aromatherapy*. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone; 2003.
30. Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, Serra G, Pippia P, Moretti MD. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*. 2002; 9(8):721-6.
31. Kim HM, Cho SH. Lavender oil inhibits immediate- type allergic reaction in mice and rats. *J Pharm Pharmacol*. 1999; 51(2):221-6.
32. Woronuk G, Demissie Z, Rheault M, Mahmoud S. Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents. *Planta Med*. 2011; 77(1):7-15.
33. Basbaum AI, Jessell TM. Dor. In: Kandell ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum AS, Hudspeth AJ. *Princípios de Neurociências*. 5ªed. Porto Alegre: AMGH; 2014. 462-481.
34. Hall JE. Sensações Somáticas: II. Dor, Cefaleia e Sensações Térmicas. In: Hall JE. *Guyton & Hall Tratado de Fisiologia Médica*. 12ªed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. 617-628.
35. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 16(3):17002.
36. Aronoff GM. What do we know about the pathophysiology of chronic pain? Implications for treatment considerations. *Med Clin North Am*. 2016; 100:31-42.
37. Ferreira SH, Ferrari LF, Cunha TM, Nascimento PG, Verri-Junior W, Cunha F. Dor inflamatória. In: Neto AO, Costa CM, Siqueira J, Teixeira M. *Dor: Princípios e Prática*. Porto Alegre: Artmed; 2009. 265-278.
38. Bingel U, Tracey I. Imaging CNS modulation of pain in humans. *Physiology*. 2008. 23:371-80.
39. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 2002; 66(6):355-474.
40. International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. *Pain*. 1986; S1–226.

41. Institute of Medicine (US) Committee on Advancing Pain Research, Care, and Education. *Relieving pain in America: a blue - print for transforming prevention, care, education, and research*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
42. Schneiderhan J, Orizondo C. Chronic pain: How to approach these 3 common conditions. *J Fam Pract*. 2017; 66(3):145-157.
43. Clauw DJ. Diagnosing and treating chronic musculoskeletal pain based on the underlying mechanism(s). *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2015; 29:6-19 .
44. Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care*. 2014; 8:143–151.
45. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008; 137(3):473–7.
46. Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*. 1992; 355(6355):75–8.
47. Fields HL, Rowbotham M, Baron R. Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation. *Neurobiol Dis*. 1998; 5(4):209–27.
48. Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*. 2013; 154(1):S10–28.
49. Sugimoto T, Bennett GJ, Kajander KC. Transsynaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: effects of a chronic constriction injury, transection, and strychnine. *Pain*. 1990; 42(2):205–13.
50. Flor H, Elbert T, Knecht S, Wienbruch C, Pantev C, Birbaumer N, et al. Phantom-limb pain as a perceptual correlate of cortical reorganization following arm amputation. *Nature*. 1995; 375(6531):482–4.
51. Apkarian AV, Sosa Y, Sonty S, Levy RM, Harden RN, Parrish TB, et al. Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *J Neurosci*. 2004; 24(46):10410–5.
52. Merskey H, Nikolai B. *Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms*. Seattle: IASP, 1994. 212-14.
53. Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 2008; 70(18):1630-5.
54. Jansen TS, Baron R, Haanpaa M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, et al. A new definition of neuropathic pain. *Pain*. 2011; 152: 2204–05.
55. Hamdan A, Luna JD, Del Pozo E, Galvez R. Diagnostic accuracy of two questionnaires for the detection of neuropathic pain in the Spanish population. *Eur J Pain*. 2014; 18(1):101-9.

56. Madani SP, Fateh HR, Forogh B, Fereshtehnejad SM, Ahadi T, Ghaboussi P, et al. Validity and reliability of the persian (Farsi) version of the DN4 (Douleur Neuropathique 4 Questions) questionnaire for differential diagnosis of neuropathic from non-neuropathic pains. *Pain Pract.* 2014; 14(5):427-36.
57. Erdemoglu AK, Koc R. Brief Pain Inventory score identifying and discriminating neuropathic and nociceptive pain. *Acta Neurol Scand.* 2013; 128(5):351-8.
58. van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain.* 2014; 155:654–662.
59. Attal N, Lanteri-Minet M, Laurent B, Fermanian J, Bouhassira D. The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey. *Pain.* 2011; 152:2836–2843.
60. Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain.* 2008; 136:380–387.
61. Schestatsky P, Vidor L, Winckler PB, Araújo TG, Caumo W. Promising treatments for neuropathic pain. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2014; 72(11):881-88.
62. Sommer C, Richter H, Rogausch JP, Frettlow J, Lungenhausen M, Maier C. A modified score to identify and discriminate neuropathic pain: a study on the German version of the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI). *BMC Neurol.* 2011; 11:104.
63. Alkan H, Ardic F, Erdogan C, Sahin F, Sarsan A, Findikoglu G. Turkish version of the pain DETECT questionnaire in the assessment of neuropathic pain: a validity and reliability study. *Pain Med.* 2013; 14(12):1933-43.
64. Kitisomprayoonkul W. Validation study of the Thai ID Pain Scale. *J Med Assoc Thai.* 2011; 94(5):610-5.
65. Watson CP, Vernich L, Chipman M, Reed K. Nortriptyline versus amitriptyline in postherpetic neuralgia: a randomized trial. *Neurology.* 1998; 51(4):1166-71.
66. Feliu MH, Edwards CL. Psychologic factors in the development of complex regional pain syndrome: history, myth, and evidence. *Clin J Pain.* 2010; 26(3):258–63.
67. Stanton-hicks M, Baron R, Boas R, Gordh T, Harden N, Hendler N, et al. Complex regional pain syndromes: guidelines for therapy. *Clin J Pain.* 1998; 14(2):155-66.
68. Gatti D, Rossini M, Adami S. Management\_of\_patients\_with\_complex regional pain syndrome type I. *Osteoporos Int.* 2016; 27(8):2423-31.

69. Coderre TJ, Bennett GJ. A hypothesis for the cause of complex regional pain syndrome-type I (reflex sympathetic dystrophy): pain due to deep-tissue microvascular pathology. *Pain Med.* 2010; 11(8):1224-38.
70. Maihöfner C, Seifert F, Markovic K. Complex regional pain syndromes: new pathophysiological concepts and therapies. *Eur J Neurol.* 2010, 17(3):1-19.
71. Bruehl S, Harden RN, Galer BS, Saltz S, Backonja M, Stanton-Hicks M. Complex regional pain syndrome: are there distinct subtypes and sequential stages of the syndrome? *Pain.* 2002; 95:119–124.
72. Stanton-Hicks M, Jänig W, Hassenbusch S, Haddox JD, Boas R, Wilson P. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. *Pain.* 1995; 63:127–133.
73. Harden RN, Bruehl S, Perez RSGM, Birklein F, Marinus J, Maihofner C, et al. Validation of proposed diagnostic criteria (the BBudapest Criteria) for Complex Regional Pain Syndrome. *Pain.* 2010; 150:268–274.
74. Coderre TJ, Bennett GJ. Editorial: Objectifying CRPS-I. *Pain.* 2008; 138:3-4.
75. van der Laan L, Ter Laak HJ, Gabreels-Festen A, Gabreels F, Goris RJA. Complex regional pain syndrome type I (RSD): pathology of skeletal muscle and peripheral nerve. *Neurology.* 1998b; 51:20-5.
76. Albrecht PJ, Hines S, Eisenberg E, Pud D, Finlay DR, Connolly MK, et al. Pathologic alterations of cutaneous innervation and vasculature in affected limbs from patients with complex regional pain syndrome. *Pain.* 2006; 120:244-66.
77. Oaklander AL, Rissmiller JG, Gelman LB, Zheng L, Chang Y, Gott R. Evidence of focal small-fiber axonal degeneration in complex regional pain syndrome-I (reflex sympathetic dystrophy). *Pain.* 2006; 120:235–43.
78. Eisenberg E, Shtahl S, Geller R, Reznick AZ, Sharf O, Ravbinovich M, et al. Serum and salivary oxidative analysis in complex regional pain syndrome. *Pain.* 2008; 138:226–32.
79. Coderre TJ, Xanthos DN, Francis L, Bennett GJ. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain.* 2004; 112:94-105.
80. de Melo LGP, Nunes SOV, Anderson G, Vargas HO, Barbosa DS, Galecki P, et al. Shared metabolic and immune-inflammatory, oxidative and nitrosative stress pathways in the metabolic syndrome and mood disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017; 78:34-50.
81. Maes M. Inflammatory and oxidative and nitrosative stress pathways underpinning chronic fatigue, somatization and psychosomatic symptoms. *Current opinion in psychiatry.* 2009; 22(1):75-83.

82. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological psychiatry*. 2009; 65(9):732-741.
83. Huet O, Pickering RJ, Tikellis C, Latouche C, Long F, Kingwell B, et al. Protective Effect of Inflammasome Activation by Hydrogen Peroxide in a Mouse Model of Septic Shock. *Crit Care Med*. 2017; 45:e184-e194.
84. Liu X, Zhang X, Ding Y, Zhou W, Tao L, Lu P, et al. Nuclear Factor E2-Related Factor-2 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activity by Inhibiting Reactive Oxygen Species-Induced NLRP3 Priming. *Antioxid Redox Signal*. 2017; 26:28-43.
85. Munts AG, van der Plas AA, Ferrari MD, Teepe-Twiss IM, Marinus J, van Hilten JJ. Efficacy and safety of a single intrathecal methylprednisolone bolus in chronic complex regional pain syndrome. *Eur J Pain Lond Engl*. 2010; 14:523–528.
86. Kalita J, Vajpayee A, Misra UK. Comparison of prednisolone with piroxicam in complex regional pain syndrome following stroke: a randomized controlled trial. *QJM J Assoc Physicians*. 2006; 99:89–95.
87. Christensen K, Jensen EM, Noer I. The reflex dystrophy syndrome response to treatment with systemic corticosteroids. *Acta Chir Scand*. 1982; 148:653–655.
88. Sigtermans MJ, van Hilten JJ, Bauer MCR, Arbous MS, Marinus J, Sarton EY, et al. Ketamine produces effective and long-term pain relief in patients with Complex Regional Pain Syndrome Type 1. *Pain*. 2009; 145:304–311.
89. Schwartzman RJ, Alexander GM, Grothusen JR, Paylor T, Reichenberger E, Perreault M. Outpatient intravenous ketamine for the treatment of complex regional pain syndrome: a double-blind placebo controlled study. *Pain*. 2009; 147:107–115.
90. Birklein F, O'Neill D, Schlereth T. Complex regional pain syndrome: an optimistic perspective. *Neurology*. 2015; 84:89–96.
91. Zuurmond WW, Langendijk PN, Bezemer PD, Brink HE, de Lange JJ, van Loenen AC. Treatment of acute reflex sympathetic dystrophy with DMSO 50% in a fatty cream. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1996; 40:364–367.
92. Gaspar M, Bovaira M, Carrera-Hueso FJ, Querol M, Jiménez A, Moreno L. Efficacy of a topical treatment protocol with dimethyl sulfoxide 50% in type 1 complex regional pain syndrome. *Farm Hosp*. 2012; 36:385–391.
93. Perez RSGM, Zuurmond WWA, Bezemer PD, Kuik DJ, van Loenen AC, de Lange JJ, et al. The treatment of complex regional pain syndrome type I with free radical scavengers: a randomized controlled study. *Pain*. 2003; 102: 297–307.
94. Bussa M, Guttilla D, Lucia M, Mascaro A, Rinaldi S. Complex regional pain syndrome type I: a comprehensive review. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2015; 59:685–697.

95. Stanton TR, Wand BM, Carr DB, Birklein F, Wasner GL, O'Connell NE. Local anaesthetic sympathetic blockade for complex regional pain syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; 8:CD004598.
96. Zollinger PE, Tuinebreijer WE, Kreis RW, Breederveld RS. Effect of vitamin C on frequency of reflex sympathetic dystrophy in wrist fractures: a randomised trial. *Lancet Lond Engl*. 1999; 354:2025–2028.
97. Yanow J, Pappagallo M, Pillai L. Complex regional pain syndrome (CRPS/RSD) and neuropathic pain: role of intravenous bisphosphonates as analgesics. *Scientific World Journal*. 2008; 8:229–36.
98. Cacchio A, De Blasis E, Necozone S, di Orio F, Santilli V. Mirror therapy for chronic complex regional pain syndrome type 1 and stroke. *N Engl J Med*. 2009; 361:634–636.
99. Borchers AT, Gershwin ME. Complex regional pain syndrome: a comprehensive and critical review. *Autoimmun Rev*. 2014; 13: 242–265.
100. Coutinho AE, Chapman KE. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*. 2011; 335(1):2-13.
101. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010; 140:771–6.
102. Hardy J, Wolff H, Goodell H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin Invest*. 1950; 29(1):115–140.
103. Botz B, Bölcskei K, Helyes Z. Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2017; 9(3). No prelo.
104. Ferreira SH, Lorenzetti BB, Poole S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*. 1993; 110(3):1227-31.
105. Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol*. 2000; 387(1):111-8.
106. Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*. 1992; 107(3):660-4.
107. Watkins LR, Goehler LE, Relton J, Brewer MT, Maier SF. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. *Brain Res*. 1995; 692(1-2):244-50.

108. Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*. 1988; 334(6184):698-700.
109. Splettstoesser WD, Schuff-Werner P. Oxidative stress in phagocytes—the enemy within. *Microsc Res Tech*. 2002; 57(6):441-55.
110. Das SK, Farooqi A. Osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol*. 2008; 22(4):657-75.
111. Perrot S. Osteoarthritis pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2015; 29(1):90-7.
112. Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Vezza T, Garrido-Mesa J, Garrido-Mesa N, Utrilla MP, et al. Anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Lavandula dentata* L. and *Lavandula stoechas* L. *J Ethnopharmacol*. 2016; 190:142-58.
113. Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology*. 2011; 115(6):1363-81.
114. Iwaszkiewicz KS, Schneider JJ, Hua S. Targeting peripheral opioid receptors to promote analgesic and antiinflammatory actions. *Front. Pharm*. 2013; 24:132.
115. Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, et al. International Union of Pharmacology. XII: Classification of receptors. *Pharmacol. Rev*. 1996; 48:567–592.
116. Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Investig*. 2010; 120(11):3779–87.
117. Tudurí E, Nogueiras R. Mu opioid receptor: from pain to glucose metabolism. *Oncotarget*. 2017; 8(4):5643-5644.
118. Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci*. 1988; 11:308–14.
119. Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci*. 1995; 18:22–9.
120. Ahlbeck K. Opioids: A two-faced Janus. *Curr Med Res Opin*. 2011; 27:439–448.
121. Zhang M, Wang X, Zhang D, Xu G, Dong H, Yu Y, Han J. Orphanin FQ antagonizes the inhibition of Ca(2?) currents induced by mu-opioid receptors. *J Mol Neurosci*. 2005; 25(1):21–7.
122. Law PY, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; 40:389-430.

123. Gutstein H, Akil H. Opioid analgesics. In: Brunton L, Lazo J, Parker K (eds). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11<sup>a</sup> ed. Nova Iorque: McGraw-Hill; 2006. 547-90.
124. Lomberk G, Cruciani R, Urrutia R. Primers on molecular pathways – pain and opioid receptors. I. Pancreatology. 2008; 8:544-5.
125. Sweetman S. Martindale. The Complete Drug Reference. 36<sup>a</sup> ed. Londres: Pharmaceutical Press. 2009.
126. Anselmi L, Huynh J, Duraffourd C, Jaramillo I, Vegezzi G, Sacconi F, et al. Activation of  $\mu$  opioid receptors modulates inflammation in acute experimental colitis. Neurogastroenterol Motil. 2015; 27(4):509-23.
127. Fraser GL, Gaudreau GA, Clarke PB, Ménard DP, Perkins MN. Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. Br J Pharmacol. 2000; 129:1668–1672.
128. Hunter JC, Leighton GE, Meecham KG, Boyle SJ, Horwell DC, Rees DC, et al. CI-977, a novel and selective agonist for the kappa-opioid receptor. Br J Pharmacol. 1990; 101:183–189.
129. Stein C, Lang LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. Curr Opin Pharmacol. 2009; 9(1):3-8.
130. Cidral-Filho FJ, Mazzardo-Martins L, Martins DF, Santos AR. Light-emitting diode therapy induces analgesia in a mouse model of postoperative pain through activation of peripheral opioid receptors and the L-arginine/nitric oxide pathway. Lasers Med Sci. 2014; 29(2):695-702.
131. Martins DF, Bobinski F, Mazzardo-Martins L, Cidral-Filho FJ, Nascimento FP, Gadotti VM, et al. Ankle joint mobilization decreases hypersensitivity by activation of peripheral opioid receptors in a mouse model of postoperative pain. Pain Med. 2012; 13(8):1049-58.
132. Martins DF, Brito RN, Stramosk J, Batisti AP, Madeira F, Turnes BL, et al. Peripheral neurobiologic mechanisms of antiallodynic effect of warm water immersion therapy on persistent inflammatory pain. J Neurosci Res. 2015c; 93(1):157-66.
133. Brack A, Rittner HL, Machelska H, Leder K, Mousa SA, Schafer M, et al. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. Pain. 2004; 112(3):229–238.
134. Corazza S. Aromacologia: uma ciência de muitos cheiros. São Paulo: Senac, 2002.
135. Davis P. Aromaterapia. São Paulo: Martins Fontes, 1996.
136. Cavanagh HMA, Wilkinson JM. Biological activities of lavender essential oil. Phytother Res. 2002; 16(4):301–08.

137. Koulivand PH, Ghadiri MK, Gorji A. Lavender and the Nervous System. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; (2013):681304.
138. Despinasse Y, Fiorucci S, Antonczak S, Moja S, Bony A, Nicolè F, et al. Bornyl-diphosphate synthase from *Lavandula angustifolia*: A major monoterpene synthase involved in essential oil quality. *Phytochemistry.* 2017; 137:24-33.
139. van Wyk BE. A broad review of commercially important southern African medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2008; 119(3):342-55.
140. Silva GL, Luft C, Lunardelli A, Amaral RH., Melo DA, Donadio MV, et al. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. *An Acad Bras Cienc.* 2015; 87:1397-1408.
141. Wang D, Yuan X, Liu T, Liu L, Hu Y, Wang Z, et al. Neuroprotective activity of lavender oil on transient focal cerebral ischemia in mice. *Molecules.* 2012; 17(8):9803-17.
142. Salah SM, Jäger AK. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol.* 2005; 97(1):145-9.
143. Perry NS, Houghton PJ, Theobald A, Jenner P, Perry EK. In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J Pharm Pharmacol.* 2000; 52(7):895-902.
144. Perry NS, Bollen C, Perry EK, Ballard C. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003; 75(3):651-9.
145. Savelev S, Okello E, Perry NS, Wilkins RM, Perry EK. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003; 75(3):661-8.
146. Hritcu L, Cioanca O, Hancianu M. Effects of lavender oil inhalation on improving scopolamine-induced spatial memory impairment in laboratory rats. *Phytomedicine.* 2012; 19(6):529-34.
147. Barocelli E, Calcina F, Chiavarini M, Impicciatore M, Bruni R, Bianchi A, et al. Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil. *Life Sci.* 2004; 76(2):213-23.
148. Yamada K, Mimaki Y, Sashida Y. Anticonvulsive effects of inhaling lavender oil vapour. *Biol Pharm Bull.* 1994; 17(2):359-60.
149. Nasiri A, Mahmodi MA, Nobakht Z. Effect of aromatherapy massage with lavender essential oil on pain in patients with osteoarthritis of the knee: A randomized controlled clinical trial. *Complement Ther Clin Pract.* 2016; 25:75-80.

150. Elisabetsky E, Marschner J, Souza DO. Effects of Linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochem Res.* 1995; 20(4):461-5.
151. Caputo L, Souza LF, Alloisio S, Cornara L, De Feo V. *Coriandrum sativum* and *Lavandula angustifolia* Essential Oils: Chemical Composition and Activity on Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2016; 30;17(12).
152. Peana AT, De Montis MG, Nieddu E, Spano MT, D'Aquila PS, Pippia P. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. *Eur J Pharmacol.* 2004; 485(1-3):165-74.
153. Moran DT, Rowley JC, Jafek BW, Lovell MA. The fine structure of the olfactory mucosa in man. *J Neurocytol.* 1982; 11 721-746.
154. Su CY, Menuz K, Carlson JR. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell.* 2009; 139(1):45-59.
155. Doty CR, Kennedy DW, Yousem DM. Evaluation of Olfactory Deficits by Structural Medical Imaging. In: Doty RL *Handbook of Olfaction and Gustation.* 2 ed. Nova Iorque: Marcel Dekker. 2003. 593-613.
156. Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci.* 2008; 9(3):1-4.
157. Kratskin IL, Belluzzi O. Anatomy and neurochemistry of the olfactory bulb. In: Doty RL, editor. *Handbook of olfaction and gustation.* Nova Iorque: Marcel Dekker; 2003. 235-76.
158. Díaz D, Gómez C, Muñoz-Castañeda R, Baltanás F, Alonso JR, Weruaga E. The olfactory system as a puzzle: playing with its pieces. *Anat Rec (Hoboken).* 2013; 296(9):1383-400.
159. Brunjes PC, Illig KR, Meyer EA. A field guide to the anterior olfactory nucleus (cortex). *Brain Res Brain Res Rev.* 2005; 50(2):305-335.
160. Doty RL. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol.* 2008; 63(1):7-15.
161. Hinds WC. *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles.* 2ª ed. Nova Jérsei: John Wiley & Sons, 1999.
162. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Absorção e distribuição de fármacos. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Farmacologia.* 7ªed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. 99-114.
163. Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD. Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev.* 2005; 85(1):281-317.

164. Xu X, Wang X, Ge W, Pan L, Zheng M. The pharmacokinetics of inhaled morphine delivered by an ultrasonic nebulizer in ventilated dogs. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2012; 25(1):41-6.
165. Lv XN, Liu ZJ, Zhang HJ, Tzeng CM. Aromatherapy and the central nerve system (CNS): therapeutic mechanism and its associated genes. *Curr Drug Targets.* 2013; 14(8):872-9.
166. Ross TM, Zuckermann RN, Reinhard C, Frey WH. Intranasal administration delivers peptoids to the rat central nervous system. *Neurosci Lett.* 2008; 439(1):30-3.
167. Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64(7):614-28.
168. Lakhan SE, Sheafer H, Tepper D. The Effectiveness of Aromatherapy in Reducing Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pain Res Treat.* 2016; 2016:8158693.
169. Moreno-Sastre M, Pastor M, Salomon CJ, Esquisabel A, Pedraz JL. Pulmonary drug delivery: a review on nanocarriers for antibacterial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70(11):2945-55.
170. Rousseaux C, Thuru X, Gelot A, Barnich N, Neut C, Dubuquoy L, et al. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat Med.* 2007; 13:35-7.
171. Cobos EJ, Ghasemlou N, Araldi D, Segal D, Duong K, Woolf CJ. Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: a nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. *Pain.* 2012; 153(4):876-84.
172. Daniel WW. *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences.* New York: John Wiley & Sons; 2008.
173. Adams RP. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy.* 1st. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 1995. 469.
174. Vandendool H; Kratz PD. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J Chromatogr.* 1963; 11:463-71.
175. Martins DF, Mazzardo-Martins L, Soldi F, Stramosk J, Piovezan AP, Santos AR. High-intensity swimming exercise reduces neuropathic pain in an animal model of complex regional pain syndrome type I: evidence for a role of the adenosinergic system. *Neuroscience.* 2013; 234:69-76.
176. Millecamps M, Laferrière A, Ragavendran JV, Stone LS, Coderre TJ. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). *Pain.* 2010; 151:174–183.

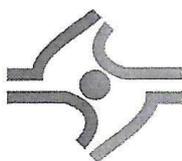
177. Martins DF, Brito RN, Stramosk J, Batisti AP, Madeira F, Turnes BL, et al. Peripheral neurobiologic mechanisms of antiallodynic effect of warm water immersion therapy on persistent inflammatory pain. *J Neurosci Res.* 2015b; 93(1):157-66.
178. Martins DF, Emer AA, Batisti AP, Donatello N, Carlesso MG, Mazzardo-Martins L, et al. Inhalation of *Cedrus atlantica* essential oil alleviates pain behavior through activation of descending pain modulation pathways in a mouse model of postoperative pain. *J Ethnopharmacol.* 2015a; 175.
179. Nucci-Martins C, Martins DF, Nascimento LF, Venzke D, Oliveira AS, Frederico MJ, et al. Ameliorative potential of standardized fruit extract of *Pterodon pubescens* Benth on neuropathic pain in mice: Evidence for the mechanisms of action. *J Ethnopharmacol.* 2015; 175:273-86.
180. Zimmernann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983; 16(2):109-10.
181. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução nº 1000 de 11 de maio 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. *Manual de Legislação do Sistema CFMV/CRMVs.* 2012: 1-9.
182. Ministério da ciência, tecnologia e inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Instrução Normativa número 13 de 20 de setembro de 2013. Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. 2013; 187(1):5.
183. Sheikhan F, Jahdi F, Khoei EM, Shamsalizadeh N, Sheikhan M, Haghani H. Episiotomy pain relief: Use of Lavender oil essence in primiparous Iranian women. *Complement Ther Clin Pract.* 2012; 18(1):66-70.
184. Ghods AA, Abforosh NH, Ghorbani R, Asgari MR. The effect of topical application of lavender essential oil on the intensity of pain caused by the insertion of dialysis needles in hemodialysis patients: A randomized clinical trial. *Complement Ther Med.* 2015; 23(3):325-30.
185. Verma RS, Rahman LU, Chanotiya CS, Verma RK, Chauhan A, Yadav A, Singh A, Yadav AK. Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *J. Serb. Chem. Soc.* 2010; 75(3):343–348.
186. Singh P, Andola H, Rawat MSM, Nee Pant GJ, Jangwan JS. GC-MS analysis of essential oil from *Lavanda angustifolia* cultivated in Garhwal Himalaya. *The Natural Products Journal.* 2015; 5:268-272.
187. Laferrière A, Millecamps M, Xanthos DN, Xiao W-H, Bennett GJ,Coderre TJ. Chronic postischemia pain: A novel animal model suggests that ischemia-reperfusion (I-R) injury, no-reflow and chronic tissue ischemia contribute to CRPS-I. *Eur J Pain.* 2007; 11:S61–2.

188. Vatine JJ, Argov R, Seltzer Z. Brief electrical stimulation of c-fibers in rats produces thermal hyperalgesia lasting weeks. *Neurosci Lett* 1998; 246:125–8.
189. Vatine JJ, Tsenter J, Raber P, Seltzer Z. A model of CRPS-I produced by tetanic electrical stimulation of an intact sciatic nerve in the rat: genetic and dietary effects. In: Harden RN, Baron R, Janig W, editors. *Complex regional pain syndrome. Progress in pain research and management*, vol. 22. Seattle, WA: IASP Press; 2001. p. 53–74.
190. van der Laan L, Kapitein PJ, Oyen WJ, Verhofstad AA, Hendriks T, Goris RJA. A novel animal model to evaluate oxygen derived free radical damage in soft tissue. *Free Radic Res.* 1997a; 26:363–72.
191. van der Laan L, Oyen WJ, Verhofstad AA, Tan EC, ter Laak HJ, Gabreels-Festen A, et al. Soft tissue repair capacity after oxygen-derived free radical-induced damage in one hindlimb of the rat. *J Surg Res.* 1997b; 72:60–9.
192. van der Laan L, Kapitein P, Verhofstad A, Hendriks T, Goris RJA. Clinical signs and symptoms of acute reflex sympathetic dystrophy in one hindlimb of the rat, induced by infusion of a free-radical donor. *Acta Orthop Belg.* 1998a; 64:210–7.
193. Allen G, Galer BS, Schwartz L. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients. *Pain.* 1999; 80: 539–44.
194. Galer BS, Henderson J, Perander J, Jensen MP. Course of symptoms and quality of life measurement in complex regional pain syndrome: a pilot survey. *J Pain Symptom Manage.* 2000; 20:286–92.
195. Millecamps M, Coderre TJ. Rats with chronic post-ischemia pain exhibit an analgesic sensitivity profile similar to human patients with complex regional pain syndrome--type I. *Eur J Pharmacol.* 2008; 583(1):97-102.
196. Nagamatsu M, Schmelzer JD, Zollman PJ, Smithson IL, Nickander KK, Low PA. Ischemic reperfusion causes lipid peroxidation and fiber degeneration. *Muscle Nerve.* 1996; 19:37–47.
197. Nukada H, McMorran PD, Shimizu J. Acute inflammatory demyelination in reperfusion nerve injury. *Ann. Neurol.* 2000; 47:71–79.
198. Fitzal F, DeLano FA, Young C, Schmid-Schonbein GW. Early capillary no-reflow during low-flow reperfusion after hind limb ischemia in the rat. *Ann. Plast. Surg.* 2002; 49: 170–180.
199. Gelgor L, Butkow N, Mitchell D. Effects of systemic non-steroidal anti-inflammatory drugs on nociception during tail ischaemia and on reperfusion hyperalgesia in rats. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 105:412–416.
200. Olapour A, Behaen K, Akhondzadeh R, Soltani F, Al Sadat Razavi F, Bekhradi R. The Effect of Inhalation of Aromatherapy Blend containing Lavender Essential Oil on Cesarean Postoperative Pain. *Anesth Pain Med.* 2013; 3(1):203-7.

201. Raisi Dehkordi Z, Hosseini Baharanchi FS, Bekhradi R. Effect of lavender inhalation on the symptoms of primary dysmenorrhea and the amount of menstrual bleeding: A randomized clinical trial. *Complement Ther Med*. 2014; 22(2):212-9.
202. Soltani R, Soheilipour S, Hajhashemi V, Asghari G, Bagheri M, Molavi M. Evaluation of the effect of aromatherapy with lavender essential oil on post-tonsillectomy pain in pediatric patients: a randomized controlled trial. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2013; 77(9):1579-81.
203. Martins DF, Prado MR, Daruge-Neto E, Batisti AP, Emer AA, Mazzardo-Martins L, et al. Caffeine prevents antihyperalgesic effect of gabapentin in an animal model of CRPS-I: evidence for the involvement of spinal adenosine A1 receptor. *J Peripher Nerv Syst*. 2015; 20(4):403-9.
204. Berliocchi L, Russo R, Levato A, Fratto V, Bagetta G, Sakurada S, et al. (-) - Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in c57/bl6mice. *Int Rev Neurobiol*. 2009; 85:221-35.
205. Batista PA, Werner MF, Oliveira EC, Burgos L, Pereira P, Brum LF, et al. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. *J Pain*. 2010; 11(11):1222-9.
206. Peana AT, D'Aquila PS, Chessa ML, Moretti MD, Serra G, Pippia P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *Eur J Pharmacol*. 2003; 460(1):37-41.
207. Katsuyama S, Otowa A, Kamio S, Sato K, Yagi T, Kishikawa Y, et al. Effect of plantar subcutaneous administration of bergamot essential oil and linalool on formalin-induced nociceptive behavior in mice. *Biomed Res*. 2015; 36(1):47-54.
208. Vaughan CW, Ingram SL, Connor MA, Christie MJ. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature*. 1997; 390:611–4.
209. Pan Y, Li D, Chen S, Pan HL. Activation of mu-opioid receptors excites a population of locus coeruleus-spinal neurons through presynaptic disinhibition. *Brain Res*. 2004; 997(1):67–78.
210. Buchbauer G, Jirovetz L, Jäger W, Dietrich H, Plank C. Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z Naturforsch C*. 1991; 46(11-12):1067-72.
211. Linck VM, da Silva AL, Figueiró M, Piato AL, Herrmann AP, Dupont Birck F, et al. Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine*. 2009; 16(4):303-7.
212. Woronuk G, Demissie Z, Rheault M, Mahmoud S. Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents. *Planta Med*. 2011; 77:7-15.
213. Faturi CB, Leite JR, Alves PB, Canton AC, Teixeira-Silva F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010; 34:605–9.

214. Kagawa D, Jokura H, Ochiai R, Tokimitsu I, Tsubone H. The sedative effects and mechanism of action of cedrol inhalation with behavioral pharmacological evaluation. *Planta Med.* 2003; 69:637–41.
215. Almeida RN, Motta SC, de Brito Faturi C, Catallani B, Leite JR. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004; 77:361–4.
216. Herz RS. Aromatherapy facts and fictions: a scientific analysis of olfactory effects on mood, physiology and behavior. *Int J Neurosci.* 2009; 119:263–90.
217. Souto-Maior FN, de Carvalho FL, de Moraes LC, Netto SM, de Sousa DP, de Almeida RN. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011; 100:259–63.
218. Soudry Y, Lemogne C, Malinvaud D, Consoli SM, Bonfils P. Olfactory system and emotion: common substrates. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2011; 128:18–23.
219. Chioca LR, Antunes VD, Ferro MM, Losso EM, Andreatini R. Anosmia does not impair the anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice. *Life Sci.* 2013; 92(20-21):971-5.

## ANEXO A- Parecer Aprovação da Comissão de Ética



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 29 de novembro de 2016  
Registro na CEUA (código):16.042.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do efeito dos sistemas opioide e canabioide pela inalação do óleo essencial de lavandula angustifolia em um modelo animal de inflamação crônica periférica", registrada com o nº16.042.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 13/12/2016.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

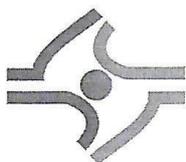
Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,



---

Prof. Sandro Melim Sgrott  
Coordenador da Comissão



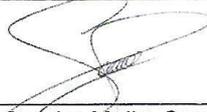
UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

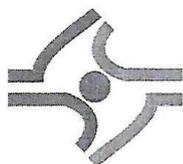
Palhoça, 29 de novembro de 2016

## CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Avaliação do efeito dos sistemas opioide e canabioide pela inalação do óleo essencial de lavandula angustifolia em um modelo animal de inflamação crônica periférica”, registrada com o no 16.042.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 13/12/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/12/2016 a 10/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongos Swiss <i>mus musculus</i>
No de animais	336
Peso/Idade	25-35g / 45-60 dias
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Sandro Melim Sgrott  
Coordenador da Comissão



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 12 de maio de 2016  
Registro na CEUA (código): 16.006.2.07.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Daniel Fernandes Martins

Prezado(a),

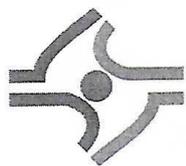
Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Avaliação dos efeitos da inalação do Óleo essencial de *Lavandula angustifolia* em um modelo pré-clínico de Síndrome da dor regional complexa do tipo I”, registrada com o nº 16.006.2.07.IV, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 12/05/2016.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Sandro Melim Sgrott  
Coordenador da Comissão



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 12 de maio de 2016

### CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Avaliação dos efeitos da inalação do Óleo essencial de *Lavandula angustifolia* em um modelo pré-clínico de Síndrome da dor regional complexa do tipo I”, registrada com o nº **16.006.2.07.IV**, sob a responsabilidade de Daniel Fernandes Martins - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 12/05/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março de 2016 a março de 2018
Espécie/linhagem/raça	Swiss fêmea, Mus musculus
No de animais	272
Peso/Idade	45-60 dias
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina.

  
Prof. Sandro Melim Sgrott  
Coordenador da Comissão

Campus Florianópolis - Unidade Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - CEP 88137-270 - Palhoça - SC - Fone 55-48-3279-1036 - ceua@unisul.br