



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA - UNISUL

ALINE ARMILIATO EMER

**O ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NO EFEITO
ANTIHIPERALGÉSICO DA INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL *Cedrus atlantica*
EM UM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA**

Palhoça

2014

ALINE ARMILIATO EMER

**O ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NO EFEITO
ANTIHIPERALGÉSICO DA INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL *Cedrus atlantica*
EM UM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade do Sul de Santa Catarina, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Daniel Fernandes Martins, Dr.

Palhoça
2014

ALINE ARMILIATO EMER

**O ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NO EFEITO
ANTIHIPERALGÉSICO DA INALAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL *Cedrus atlantica*
EM UM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA**

Esta Dissertação foi julgada adequada à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde e aprovada em sua forma final pelo Curso Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Palhoça, 14 de novembro de 2014.

Prof. e Orientador Daniel Fernandes Martins, Dr.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof^ª. Leidiane Mazzardo Martins, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Clarissa Martineli Comin, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a espiritualidade por iluminar sempre o meu caminho, me inspirar e conectar com a fé.

Em especial aos meus pais, Fiorindo e Terezinha, pelo amor e exemplo de família em que fui criada, por acreditarem em mim, nos meus sonhos, pelo apoio e oportunidade.

Ao meu companheiro Ari, pela ajuda neste trabalho, pela compreensão e apoio em todos os momentos. Pelos ensinamentos diários e exemplo de ser humano. Te admiro muito!

Ao professor e orientador Dr. Daniel Fernandes Martins pela oportunidade, por todos os ensinamentos e por toda ajuda prestada nesses anos de laboratório.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório, obrigada pelo apoio, horas de conversa, incentivo e parcerias.

Aos camundongos, por serem instrumentos deste meu trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar o envolvimento do sistema endocanabinóide no efeito antihiperálgico da inalação do óleo essencial *Cedrus atlantica* (OECa) em um modelo pré-clínico de dor pós-operatória. Inicialmente foram caracterizados os constituintes do OECa pela análise fitoquímica por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Os experimentos comportamentais foram conduzidos após a aprovação pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL – CEUA/UNISUL (13.012.4.08.IV). Nestes experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* machos pesando de 25 a 35 g. Para indução da dor pós-operatória os animais foram submetidos a uma cirurgia de incisão plantar (CIP) na pata traseira direita. Vinte e quatro horas após, os animais inalaram o OECa por diferentes períodos de tempos (1, 5, 30 e 60 minutos). A hiperálgia mecânica foi avaliada utilizando o monofilamento de von Frey (0,4g) até o fim do efeito antihiperálgico do OECa. Também foi verificado o efeito da inalação diária, durante 6 dias e o efeito *per se* do OECa. Para avaliar o envolvimento do sistema endocanabinóide foram utilizadas 2 abordagens diferentes: uma por meio de antagonistas para os receptores CB₁ e CB₂, administrados em diferentes sítios (intraperitoneal [i.p.], intraplantar [i.pl.] e intratecal [i.t.]). E outra por meio da avaliação do efeito sinérgico de inibidores da degradação de endocanabinóides. Nos resultados da análise fitoquímica identificou-se vinte e um elementos constituintes. Dentre os compostos encontrados, os hidrocarbonetos sesquiterpenos α -himachaleno (16,6%), γ -himachaleno (10,4%) e β -himachaleno (46,4%) foram os compostos majoritários. Nos testes comportamentais notou-se que a inalação do OECa por 30 e 60 minutos induziu efeito antihiperálgico por até 2 horas. Em contraste, a inalação do OECa por apenas 1 minuto não induziu mudanças no limiar sensorial dos animais. A inalação diária do OECa diminuiu significativamente a hiperálgia mecânica, até o quinto dia. Na avaliação do efeito *per se*, não houve alterações do limiar sensorial. Em relação a análise do envolvimento do sistema endocanabinóide verificou-se que as administrações sistêmica e central (i.t.) dos antagonistas AM281 e AM630, para os receptores canabinóides CB₁ e CB₂, respectivamente, preveniram o efeito antihiperálgico do OECa; a administração de uma dose sub-efetiva dos inibidores da degradação de endocanabinóides (Amido hidrolase de ácidos graxos [FAAH] que degrada anandamida e da lipase mono acil glicerol [MAGL] que degrada o 2-araquidionil glicerol) com a subsequente inalação do OECa por 1 minuto, prolongou o efeito antihiperálgico do OECa por até 7 horas. Assim, pôde-se concluir que o mecanismo pelo qual o OECa exerce seu efeito pode ser por modular a atividade destas

enzimas e assim influenciar na sinalização endocanabinoidérgica. Estes resultados demonstram pela primeira vez na literatura, o envolvimento do sistema endocanabinóide no efeito antihiperálgico do OECA, em um modelo pré-clínico de dor pós-operatória.

Palavras-chave: Aromaterapia. *Cedrus atlantica*. Dor pós-operatória. Sistema endocanabinóide.

ABSTRACT

The present study investigated the involvement of the endocannabinoid system in the antihyperalgesic effect induced by the inhalation of the essential oil *Cedrus atlantica* (OECa) in a preclinical model of postoperative pain. Initially, the constituents of the OECa were phytochemically characterized by Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The behavioral experiments were conducted after approval by the Ethics Committee on Animal Use – CEUA/UNISUL (13.012.4.08.IV). In these experiments Swiss male mice weighing 25 to 35 g were used. For induction of post-operative pain the animals underwent a surgical plantar incision (CIP) in the right hind paw. Twenty-four hours later, the animals inhaled OECa for different periods of time (1, 5, 30 and 60 minutes). Mechanical hyperalgesia was assessed using a von Frey monofilament (0.4g) until the antihyperalgesic effect of OECa was over. The effect of daily inhalation (for 6 days) and the effect of OECa per se were also observed. To assess the involvement of the endocannabinoid system 2 different approaches were used: (1) by administering antagonists for the CB1 and CB2 receptors in different sites (intraperitoneal [i.p.], intraplantar [i.pl.] and intrathecal [i.t.]) and (2) by assessing the synergistic effect of the inhibitors of the degradation of endocannabinoids. The results of the phytochemical analysis identified twenty-one constituents, among which the hydrocarbons α -himachalene (16,6%), γ -himachalene (10,4%) e β -himachalene (46,4%) were the main components. The behavioral tests demonstrated that the inhalation of OECa for 30 and 60 minutes induced an antihyperalgesic effect that lasted for up to 2 hours. In contrast, inhalation of OECa for only 1 minute did not induce changes in the sensory threshold of the animals. Daily inhalation of OECa significantly reduced mechanical hyperalgesia until the fifth day. The administration of OECa per se did not induce any changes to the animal's sensory threshold. Regarding the involvement of the endocannabinoid system, the results demonstrated that systemic and central (i.t.) administration of the antagonists AM281 and AM630 for the cannabinoid receptors CB1 and CB2, respectively, prevented the antihyperalgesic effect of OECa; the administration of a sub-effective dose of the inhibitors of the degradation of endocannabinoids (Fatty acid amide hydrolase [FAAH] which degrades anandamide and Monoacylglycerol lipase [MAGL] which degrades 2-arachidonoyl glycerol) with subsequent inhalation of OECa for 1 minute, prolonged the antihyperalgesic effect of OECa for up to 7 hours. Thus, it was concluded that the mechanism by which OECa exerts its effect might be by modulating the activity of these enzymes and thus influencing

endocannabinoid signaling. These results demonstrate for the first time the involvement of the endocannabinoid system in the antihyperalgesic effect of OECa in a preclinical model of postoperative pain.

Keywords: Aromatherapy. *Cedrus atlantica*. Postoperative pain. Endocannabinoid system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diferentes tipos de fibras responsáveis pela condução do sinal sensorial da periferia ao SNC	17
Figura 2 – Vias da dor.....	19
Figura 3 – Transmissão sináptica das vias serotoninérgica e noradrenérgica no corno posterior da medula espinal	21
Figura 4 - Endocanabinóides	23
Figura 5 – Sinalização endocanabinóide	25
Figura 6 – Incisão Plantar.....	28
Figura 7 – Projeções da via olfativa no sistema nervoso central.....	33
Figura 8 – Possíveis vias de passagem após a administração intranasal	34
Figura 9 – Desenho experimental – tempo de inalação.....	40
Figura 10 – Desenho experimental – inalação diária e efeito <i>per se</i>	41
Figura 11 – Desenho experimental – envolvimento dos receptores canabinóides sistêmicos .	42
Figura 12 – Desenho experimental – envolvimento dos receptores canabinóides periféricos.	44
Figura 13 – Desenho experimental – envolvimento dos receptores canabinóides espinais	46
Figura 14 – Desenho experimental – efeito sinérgico	47
Figura 15 – Perfil fitoquímico do óleo essencial <i>Cedrus atlantica</i>	49
Figura 16 – Efeito antihiperálgico do OECa.....	52
Figura 17 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides sistêmicos	53
Figura 18 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides periféricos.....	54
Figura 19 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides espinais	55
Figura 20 – Sinergismo do efeito da inalação do OECa com inibidores da degradação de endocanabinóides.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial <i>Cedrus atlantica</i>	50
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – ácido araquidônico

AEA – Anandamida

AINEs – Antiinflamatórios não-esteróides

AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate

AMPc – AMP cíclico

AMPT – inibidor da síntese de noradrenalina

AM281 – Antagonista seletivo para receptores canabinóides CB1

AM630 – Antagonista seletivo para receptores canabinóides CB2

ANOVA – análise de variância

BVMR – Bulbo ventromedial rostral

C5 – 5 Carbonos

Ca²⁺ – Íon cálcio

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária

CIP – cirurgia de incisão plantar

CG-EM – Cromatógrafo gasoso com detector por espectrometria de massas;

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CCA – córtex cingulado anterior

DAGL – lipase diacil glicerol

DMAPP – Dimetilalil difosfato

E.P.M. – Erro padrão da média;

EO – Epitélio olfativo

FAAH – amido hidrolase de ácidos graxos

GABA – Ácido gama-aminobutírico

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor

IPP – Isopentenil difosfato

i.p. - Intraperitoneal

i.pl. - Intraplantar

i.t. - Intratecal

IR - Índices de retenção

LC – Locus coeruleus

M – Células mitrais

MAGL – lipase mono acil glicerol

MIA – Morte Indolor Assisstida/Eutanásia

MS – Ministério da Saúde

NA – Noradrenalina

NADA – V N-araquidonil dopamina

NAPE-PDL – N-araquidonil fosfatidil etanolamina

NCRCI – National Center for Research on Complementary and Integrative Health

NRO – Neurônios receptores olfativos

NR – núcleos da rafe

OE – Óleo essencial

OECa – Óleo essencial Cedrus atlantica

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCPA – inibidor da síntese de serotonina

PG – Células periglomerulares

PIC – Práticas Integrativas e Complementares

PKA – Proteína quinase

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

SCP – Substância cinzenta periaquedutal

SNC – Sistema nervoso central

SN – substância nigra

SUS – Sistema Único de Saúde

T – Células em tufo

TNL – Terminações nervosas livres

TME – transportador de membrana para endocanabinóides

TTO – tratamento

2-AG – 2 araquidonil glicerol

5- HT – Serotonina

Δ 9-THC – Δ 9-tetrahidrocanabinol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 DOR E HIPERALGESIA	15
2.1.1 Controle descendente inibitório da dor	17
2.2 SISTEMA CANABINÓIDE	21
2.2.1 Endocanabinóides	22
2.2.2 Receptores canabinóides	25
2.3 DOR PÓS-OPERATÓRIA	27
2.4 TERAPIAS INTEGRATIVAS	29
2.4.1 Aromaterapia	30
2.4.2 Óleo essencial <i>Cedrus atlantica</i>	31
2.5 SISTEMA OLFATIVO – VIA INALATÓRIA	32
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 TIPO DE PESQUISA	37
4.2 EXPERIMENTO 1: ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA	37
4.3 EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS	37
4.3.1 Animais	37
4.3.2 Drogas e reagentes	38
4.3.3 Cirurgia de incisão plantar	38
4.3.4 Tratamento inalatório com óleo essencial	38
4.3.5 Avaliação da hiperalgesia mecânica	39
4.3.6 Avaliação do efeito antihiperálgico da inalação do OE_{Ca}	39
4.3.6.1 Experimento 2: determinação do tempo de inalação	39
4.3.6.2 Experimento 3: Análise do efeito da inalação diária do OE _{Ca}	40
4.3.7 Análise do mecanismo endógeno do efeito antihiperálgico do OE_{Ca}	41
4.3.7.1 Procedimento para realização da injeção intraperitoneal	41
4.3.7.1.1 Experimento 4: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB ₁ sistêmicos na antihiperálgia induzida pelo OE _{Ca}	41

4.3.7.1.2 Experimento 5: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB ₂ sistêmicos na antihiperlgesia induzida pelo OECA	42
4.3.7.2 Procedimento para realização da injeção intraplantar	43
4.3.7.2.1 Experimento 6: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB ₁ periféricos na antihiperlgesia induzida pelo OECA	43
4.3.7.2.2 Experimento 7: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB ₂ periféricos na antihiperlgesia induzida pelo OECA	44
4.3.7.3 Procedimento para realização da injeção intratecal	44
4.3.7.3.1 Experimento 8: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB ₁ espinais na antihiperlgesia induzida pelo OECA	45
4.3.7.3.2 Experimento 9: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB ₂ espinais na antihiperlgesia induzida pelo OECA	45
4.3.7.4 Experimento 10: avaliação do efeito sinérgico do OECA com o inibidor da amido hidrolase de ácidos graxos	46
4.3.7.5 Experimento 12: avaliação do efeito sinérgico do OECA com o inibidor da lipase mono acil glicerol	48
4.3.8 Morte indolor assistida dos animais.....	48
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS	49
5.1 EXPERIMENTO 1 – ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL <i>Cedrus atlantica</i>	49
5.2 EFEITO ANTIHIPERALGÉSICO DA INALAÇÃO DO OECA	51
5.2.1 Experimento 2 e 3: determinação do tempo de inalação e efeito da inalação diária	51
5.3 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA CANABINÓIDE NO EFEITO ANTIHIPERALGÉSICO DO OECA	53
5.3.1 Experimento 4 e 5 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂ sistêmicos.....	53
5.3.2 Experimento 6 e 7 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂ periféricos	54
5.3.3 Experimento 8 e 9 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂ centrais (espinais).....	54
5.4 SINERGISMO DO EFEITO DA INALAÇÃO DO OECA COM INIBIDORES DA DEGRADAÇÃO DE ENDOCANABINÓIDES	55

5.4.1 Experimento 10 – Avaliação do efeito sinérgico do OECa com o inibidor da FAAH.....	55
5.4.2 Experimento 11 – Avaliação do efeito sinérgico do OECa com o inibidor da MAGL.....	56
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas realizadas pela Organização Mundial da Saúde apontam que por ano, são realizados mais de 234,2 milhões de procedimentos cirúrgicos em todo o mundo. Esses procedimentos apresentam como consequências altas taxas de mortalidade e morbidade, assim como altos custos no tratamento da dor crônica, gerada a partir da dor aguda. Sendo assim, a prevenção e o alívio eficaz na dor aguda podem melhorar desfechos clínicos, evitar complicações, economizar recursos de saúde e melhorar a qualidade de vida.

Como tratamento convencional são utilizados medicamentos analgésicos e antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), no entanto, a utilização desses fármacos muitas vezes é limitada devido os efeitos colaterais que causam. Sendo assim, se faz necessário o uso de abordagens analgésicas integrativas para melhor controle da dor pós-operatória, objetivando a prevenção e alívio eficaz, evitando maiores complicações com desfechos clínicos, reduzindo encargos econômicos de saúde e melhora da qualidade de vida do paciente.

Com isso, cresce um interesse nas Práticas Integrativas e Complementares, dentre elas a Aromaterapia. Essas práticas são utilizadas desde a antiguidade em tratamentos de saúde, no entanto, possuem poucos estudos que compreendem seus mecanismos de biológicos. O estudo do potencial terapêutico dos óleos essenciais derivados de plantas medicinais se faz de grande importância, considerando que apresentam efeitos analgésicos e antiinflamatórios com toxicidade e efeitos adversos reduzidos quando comparados com os efeitos dos analgésicos e antiinflamatórios sintéticos.

Desde a descoberta dos receptores canabinóides e seus ligantes endógenos, o sistema endocanabinóide é apontado como alvo terapêutico para muitas doenças, tais como: doenças neurodegenerativas, neuropáticas, inflamatórias, obesidade e tratamento da dor. Porém, o uso clínico de agonistas deste sistema ainda é limitado devido os efeitos adversos e ação psicotrópica. Com isso, estima-se que a utilização do efeito sinérgico de substâncias que possam ativar esse sistema, possa ser um novo alvo para o tratamento dessas doenças, principalmente para quadros de dor.

Neste contexto, tem sido demonstrado por meio de relatos clínicos que o OECa reduz processos dolorosos e inflamatórios. Na literatura encontra-se somente estudos fitoquímicos com o OECa. Nosso grupo, recentemente tem demonstrado que o OECa induz pronunciado efeito antihiperálgico no modelo animal de dor pós-operatória que é mediado pela ativação de vias serotoninérgicas, noradrenérgicas e opioidérgicas. Neste sentido, o

presente estudo visa estender os mecanismos sobre o efeito antihiperálgico do OECA, investigando a participação do sistema endocanabinóide.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOR E HIPERALGESIA

A dor atua como um mecanismo de alerta do corpo, “informando” que algo está ameaçando nosso bem-estar e retém nossa atenção até que a sua causa tenha sido identificada e afastada, tornando-se assim um dos sistemas responsáveis pelo controle da homeostase.^{1,2} Neste sentido, a dor é um sintoma clinicamente importante para a detecção e avaliação de muitas doenças. A associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), definiu dor como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”.³ Entretanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também de processos emocionais e cognitivos no encéfalo.^{4,5}

A nomenclatura introduzida em 1982 e redefinida pela IASP em 2008, estabelece que a sensibilização dos nociceptores estão dispostas em duas categorias: alodinia – descrita como uma resposta dolorosa a um estímulo que antes não era doloroso; e hiperalgesia – uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo previamente doloroso. Essas definições foram elaboradas para serem usadas em humanos, pois a alodinia possui uma característica fundamental que é induzir também uma mudança qualitativa na percepção da sensação esperada com base nas características do estímulo aplicado, ou seja, ocorre uma perda da especificidade da modalidade sensorial.⁶

É importante perceber que a alodinia é uma característica das neuropatias, nas quais ocorrem lesões neuronais, fazendo com que estímulos de pouca intensidade e pequena duração passem a causar dores ou sensações de queimação contínua ou mesmo dores espontâneas intensas sem estimulação. Essas características de alteração patológica das vias de sensação dolorosa não podem ser avaliadas nos modelos experimentais usuais de nocicepção animal, embora o uso impróprio desse termo tenha-se generalizado nas descrições do modo de ação e nas pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias. Assim, a IASP usa “hiperalgesia” como um termo psicofísico que foi proposto como um termo guarda-chuva para todas condições de sensibilidade a dor aumentada. Nesse sentido, a frequência de resposta de retirada aumentada dos animais que ocorre durante a inflamação provocada pela incisão da pele será referida, neste texto, como hiperalgesia.^{3,6}

Quando se trata do estudo da dor, no que se refere a suas vias e mecanismos, a dor é influenciada por fatores tanto fisiológicos quanto psicológicos, e o componente

fisiológico da dor, a codificação de processos neurais e processamento dos estímulos nocivos, é denominado de nocicepção.³

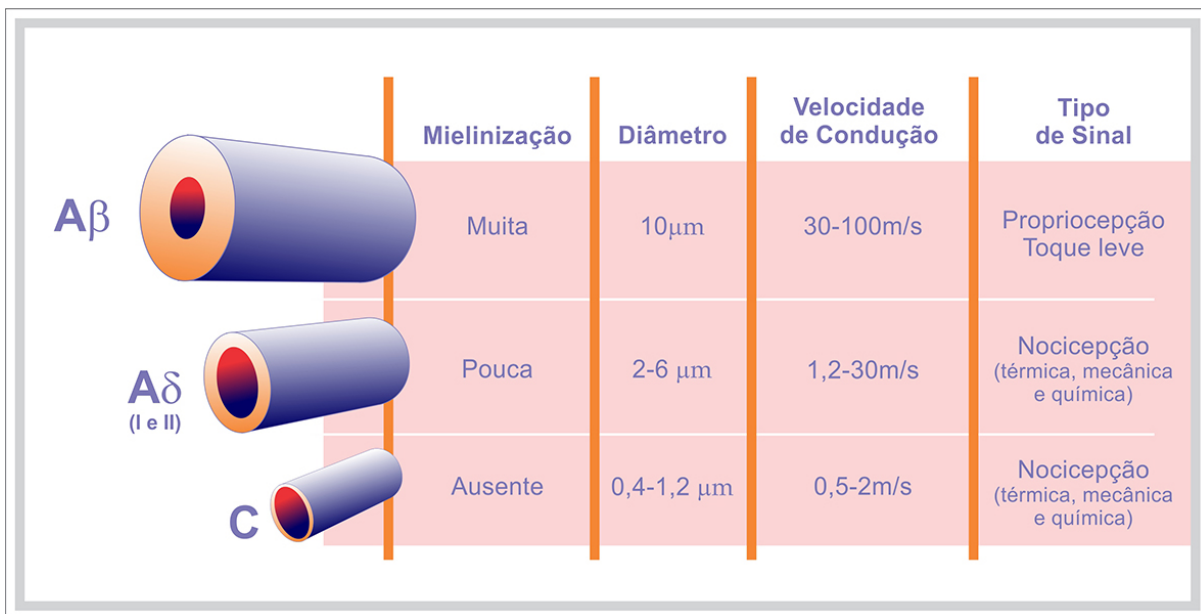
Existem diferentes tipos de dor, sendo que as principais podem ser descritas como: dor nociceptiva, que se origina devido à estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos. Dor neuropática, que reflete o dano de tecido neuronal na periferia ou no sistema nervoso central (SNC), e ocorre devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos. Dor psicogênica, que não é oriunda de uma fonte somática identificável e que pode refletir fatores psicológicos.⁷ Dor disfuncional, que refere-se a amplificação da sinalização nociceptiva na ausência de qualquer inflamação ou lesões neurais; e dor inflamatória, que ocorre em resposta a uma lesão tecidual, envolve uma resposta inflamatória subsequente e liberação de mediadores inflamatórios (bradicinina, prostaglandina, histamina e outros). A dor inflamatória atua como mecanismo de proteção do organismo contra um estímulo nocivo potencialmente prejudicial e resulta em sensibilização do sistema nociceptivo.⁸

Quando a sua duração, a dor pode ser classificada em dor aguda ou crônica. A dor aguda tem função de proteção, ocorre em resposta a uma lesão tecidual e a ativação de nociceptores. A dor crônica pode estar associada a dor aguda e se difere principalmente no tempo de duração, persistindo por dias ou semanas.⁷

A recepção do estímulo nociceptivo se dá em nível periférico por estruturas específicas situadas nas terminações nervosas livres (TNL), denominadas nociceptores. Os nociceptores estão localizados na porção distal dos neurônios aferentes sensoriais que estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. A velocidade de condução dos estímulos nocivos, dependem do diâmetro das fibras nervosas e são classificados de acordo com critérios funcionais e anatômicos, entre eles velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização (Figura 1).⁴

As fibras do tipo A β , são neurônios mielinizados, de maior diâmetro e que apresentam a maior velocidade de condução. Essas fibras respondem ao toque ou movimento, inervam a pele e de forma geral não contribuem para a dor. As fibras do tipo A δ e do tipo C, originam a maioria dos nociceptores, são fibras de médio e pequeno diâmetro, com velocidade de condução menor que as fibras do tipo A β , possuem pouco ou não possuem mielina, respectivamente, e são responsáveis pela transmissão do estímulo nocivo da periferia à medula espinal (Figura 1).⁴

Figura 1 – Diferentes tipos de fibras responsáveis pela condução do sinal sensorial da periferia ao SNC



	Mielinização	Diâmetro	Velocidade de Condução	Tipo de Sinal
Aβ	Muita	10 μ m	30-100m/s	Propriocepção Toque leve
Aδ (I e II)	Pouca	2-6 μ m	1,2-30m/s	Nocicepção (térmica, mecânica e química)
C	Ausente	0,4-1,2 μ m	0,5-2m/s	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

Fonte: Adaptado a partir de Julius e Basbaum (2001).⁴

Legenda: Representação dos diferentes tipos de fibras sensoriais responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC. As fibras A β , são mielinizadas e de maior diâmetro e rápida velocidade de condução, responsáveis pela propriocepção e toque leve. As fibras A δ e C, possuem menor diâmetro e são pouco ou não mielinizadas, respectivamente e possuem resposta de condução lenta.

A ativação dos nociceptores ocorre principalmente a partir da lesão no tecido. Os neurônios aferentes primários geram potenciais de ação ao longo do axônio transmitindo a informação até o corno posterior da medula espinal, onde ocorre a liberação de neurotransmissores, como glutamato e substância P. O sinal é “transduzido” e a informação é enviada pelo neurônio de segunda ordem a centro encefálicos superiores, como o tálamo, amígdala, córtex e outras regiões que envolvem o sistema límbico. Os tratos neoespinotalâmico e paleoespinotalâmico (Figura 2) são as principais vias responsáveis por levar a informação do corno posterior da medula espinal ao córtex somatossensorial, região a qual ocorre a percepção da dor.^{6,9}

2.1.1 Controle descendente inibitório da dor

Entende-se que a sensação dolorosa é uma experiência altamente complexa e subjetiva, não esta apenas relacionada com a estimulação dos nociceptores, mas envolve também, fatores psicológicos, emocionais e características da personalidade.⁵ Existem importantes mecanismos responsáveis por mediar a resposta nociceptiva, esses mecanismos

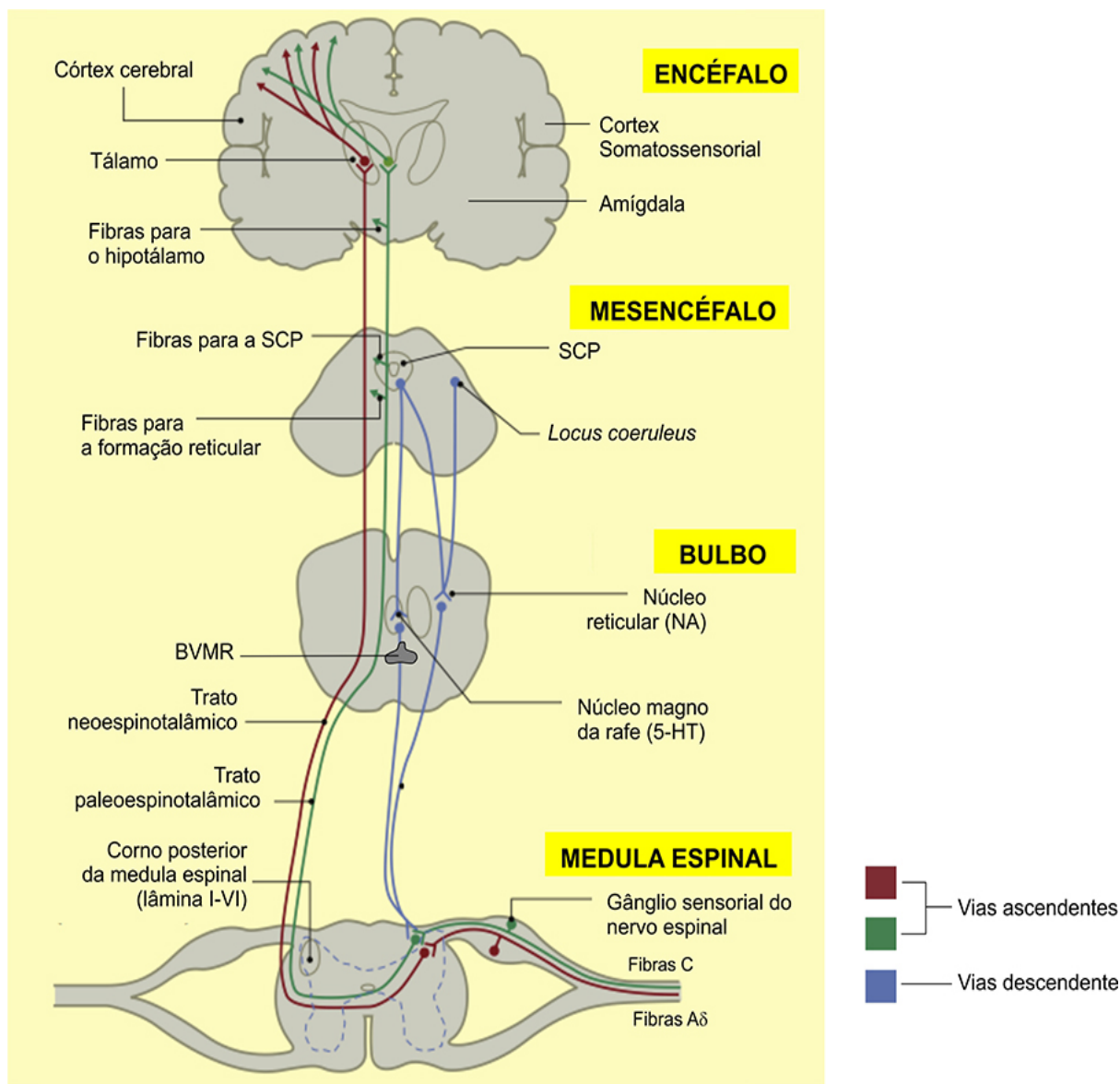
são os sistemas endógenos de modulação que podem atuar tanto como mecanismos de inibição, quanto de facilitação, dessa forma a dor pode ser modulada em nível periférico, espinal e supra-espinal, até a sua transmissão para o córtex somatossensorial.¹⁰

A ativação das vias descendentes juntamente com a interação no corno posterior da medula espinal e estruturas supra-espinais, foram descritas em 1965 por Melzack e Wall como a teoria da comporta da dor, indicando que a transmissão do sinal nociceptivo para a medula espinal é modulada por influências tanto excitatórias quanto inibitórias. A ativação dessas vias fornece um mecanismo de proteção biológica durante situações de emergência, um exemplo é no campo de batalha onde a maioria dos soldados não sente dor, mesmo após sofrerem ferimentos graves, somente após retirada para um local seguro e sob cuidados, a dor passa a ser percebida.^{11,12}

A nocicepção é um processo bidirecional de vias neuronais ascendentes e descendentes. Da periferia os sinais dolorosos são enviados ao corno posterior da medula espinal e posteriormente a centros encefálicos.¹³ Existem várias áreas do cérebro e vias neuronais que estão envolvidos no sistema de modulação da dor, destacando: os córtices cingulado anterior, frontal e parietal, córtices somatossensorial primário e secundário, córtex insular, hipotálamo, tálamo, amígdala, cerebelo,¹¹ substância cinzenta periaquedutal (SCP), núcleo parabraquial, núcleo do trato solitário, bulbo ventromedial rostral (BVMR, incluindo os núcleos da rafe) e núcleos noradrenérgicos (NA) A5, A6 (*locus coeruleus* [LC]), A7 (subcoeruleous) (Figura 2),¹³ o corno posterior da medula espinal desempenha um importante papel, recebe o sinal nociceptivo dos aferentes primários e das vias supra-espinais.¹⁴

Estudos sugerem que a SCP desempenha um papel central na modulação descendente da dor, faz ligações recíprocas com córtex frontal, amígdala, hipotálamo, núcleo parabraquial, LC, núcleo magno da rafe e BVMR. Já o BVMR é considerado a estação final de passagem para a maioria das regiões supra-espinais, recebe maior aporte de SCP e é identificado como a principal estação de retransmissão entre a SCP e a medula espinal no controle descendente da dor.^{15,16,10,5} O eixo SCP-BVMR-corno posterior da medula espinal, são estruturas fundamentais na modulação descendente da dor (Figura 2).¹⁷

Figura 2 – Vias da dor



Fonte: Adaptado de Steeds (2009).⁶

Legenda: As principais vias da dor, vias ascendentes representadas em vermelho e verde; via descendente representada em azul. Transmitem a informação nociceptiva da medula espinal até centros superiores.

Sabe-se que a sensação dolorosa pode ser modificada pelos sistemas endógenos inibidores da dor. Embora existam uma variedades de vias envolvidas, as vias serotoninérgicas, noradrenérgicas, opioidérgicas, dopaminérgicas, adenosinérgicas e canabinoidérgicas,¹⁴ constituem os principais componentes dos sistemas de modulação descendentes da dor, a maior parte dos terminais nervosos estão distribuídos nas laminae I e II do corno posterior da medula espinal e realizam sinapse com neurônios de projeção, interneurônios e neurônios aferentes primários.¹³

A ativação desses sistemas evoca a liberação de uma variedade de

neurotransmissores ou neuromoduladores na medula espinal que bloqueiam os estímulos nociceptivos por hiperpolarização dos neurônios de projeção (inibição pós-sináptica direta) ou em terminais centrais de fibras aferentes primárias (inibição pré-sináptica). Em consequência, a liberação de glutamato dos aferentes primários é reduzida e a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina de interneurônios é aumentada. Além disso, a informação nociceptiva transmitida para os centros superiores por meio dos neurônios de projeção também é reduzida. Como resposta, a percepção da dor é reduzida.^{14,13}

Estudos relatam que a transmissão sináptica das vias serotoninérgica e noradrenérgica produzem antinocicepção no corno posterior da medula espinal. A serotonina (5-HT) no neurônio pós-sináptico hiperpolariza pela interação dos receptores 5-HT_{1A} em cerca de 50% dos neurônios substância gelatinosa, e despolariza por meio de receptores 5-HT₃. A serotonina aumenta pré-sinápticamente devido a inibição de interneurônios, em consequência, deprime a liberação de glutamato para os aferentes primários. Já, a via noradrenérgica hiperpolariza pós-sinápticamente ou despolariza através da ativação receptores α_1 e α_2 , respectivamente. A noradrenalina quando aumentada no neurônio pré-sináptico ativa interneurônios inibitórios via receptores α_1 e deprime a liberação de glutamato para os aferentes primários (fibras do tipo A δ e do tipo C), por meio de receptores α_2 -adrenérgicos (Figura 3).^{13,18}

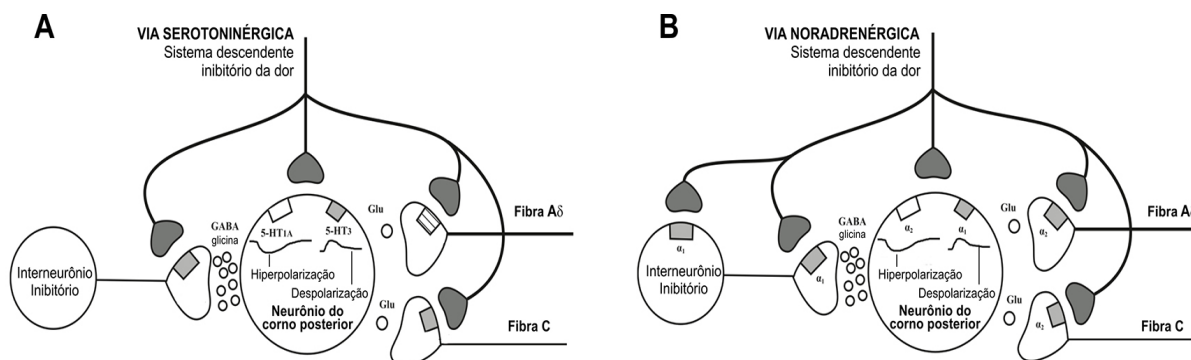
Porém, dependendo do subtipo de receptor ativado, do sítio de ação no corno posterior da medula espinal (fibras aferentes primárias ou neurônios de projeção) e da interação entre fibras descendentes na medula espinal, podem ser observados também efeitos pronociceptivos, ou seja, favorecem o processamento do ativam os estímulos nociceptivos, fazendo com que haja dor.¹⁴

Outros sistemas inibitórios descendentes que inibem a atividade dos neurônios nociceptivos do corno posterior da medula espinal originam-se em neurônios noradrenérgicos do LC e em outros núcleos do tronco encefálico. Estas projeções descendentes bloqueiam os neurônios aferentes que entram na medula espinal pelas lâminas I e V por meio de ações inibitórias diretas e indiretas e pela interação com interneurônios que contêm peptídeo opióides.¹³

Estudos apontam que os canabinóides ativam as vias descendentes monoaminérgicas e quando administrados sistemicamente produzem antinocicepção por meio da ativação de receptores CB₁, mediado pela ativação das vias descendentes serotoninérgicas e noradrenérgicas na medula espinal.¹⁹ Assim, posteriormente será retomado com mais detalhes a interação dos receptores canabinóides, juntamente com as vias

descendentes serotoninérgicas e noradrenérgicas e seu envolvimento no efeito antinociceptivo.

Figura 3 – Transmissão sináptica das vias serotoninérgica e noradrenérgica no corno posterior da medula espinal



Fonte: Adaptado de Yoshimura e Furue (2006).¹³

Legenda: Inervação serotoninérgica (painel A) e noradrenérgica (painel B) na transmissão sináptica no corno posterior da medula. Hiperpolarização pós-sináptica e/ou despolarização dos neurônios por meio da ativação de receptores. Os interneurônios inibitórios inibem a liberação de glutamato das fibras Aδ e do tipo C.

2.2 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

Registros históricos sugerem que a *Cannabis sativa* foi utilizada ao longo dos séculos com fins recreativos, artesanais, medicinais e religiosos.²⁰ Teve sua origem na Ásia Central e se espalhou pelo mundo com os movimentos migratórios e atividades comerciais.²¹ A maconha, como é popularmente conhecida, secreta através de suas flores e folhas uma resina que contém compostos chamados de canabinóides.²²

Conhecida desde a antiguidade, seu uso foi expandido com base nas medicinas tradicionais Indiana e Chinesa, foram encontrados os primeiros registros dos efeitos psicofarmacológicos na farmacopeia chinesa e na Índia, onde seu uso medicinal era bastante difundido,²³ era considerada umas das plantas sagradas e conhecida pelas mais diversas propriedades, como: tranquilizante, digestivo, hipnótico, antibiótico, afrodisíaco e analgésico.²⁴ No Brasil, existem registros do início de seu uso no século XVI, trazida pelos escravos africanos.²⁵

Considerada a droga ilegal mais popularmente conhecida, a restrição ao uso da *Cannabis* foi imposta na Convenção Internacional de Substâncias Psicotrópicas, mas devido seu potencial terapêutico para aliviar diversos sintomas, como estimulante de apetite, no

tratamento da dor e outros, em alguns países seu uso é socialmente aceito, o que gera grandes discussões sobre a legalização, devido ao desenvolvimento de tolerância, abuso e efeitos psicotrópicos.²⁶

Apesar de séculos de utilização pela humanidade, o conhecimento farmacológico desta planta e o sistema de sinalização endocanabinóide é recente.²⁷ Foram identificados, isolados e sintetizados os principais constituintes da *Cannabis*, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) como componente majoritário²⁸ e outros, incluindo canabidiol, canabinol, canabigerol e canabicromeno e mais de 60 outros canabinóides.²⁹ Com a elucidação dessas estruturas químicas, pesquisas científicas sobre os canabinóides foram impulsionadas, cientistas realizaram testes verificando a síntese, atividade biológica, metabolismo e os efeitos fisiológicos dessas moléculas, até a identificação e clonagem dos receptores canabinóides específicos.²⁷

No entanto, apesar do reconhecimento do potencial terapêutico no tratamento da dor, ainda assim, a sua utilização clínica é limitada devido os seus efeitos secundários, desenvolvimento de tolerância e dependência física, sendo assim, faz-se necessário estudos clínicos, utilizando novas abordagens terapêuticas com combinações de novos medicamentos que atuem sobre a ação endocanabinóides (síntese, recaptação e degradação), com objetivo de aumentar o alívio da dor sem os efeitos indesejáveis.¹⁹

2.2.1 Endocanabinóides

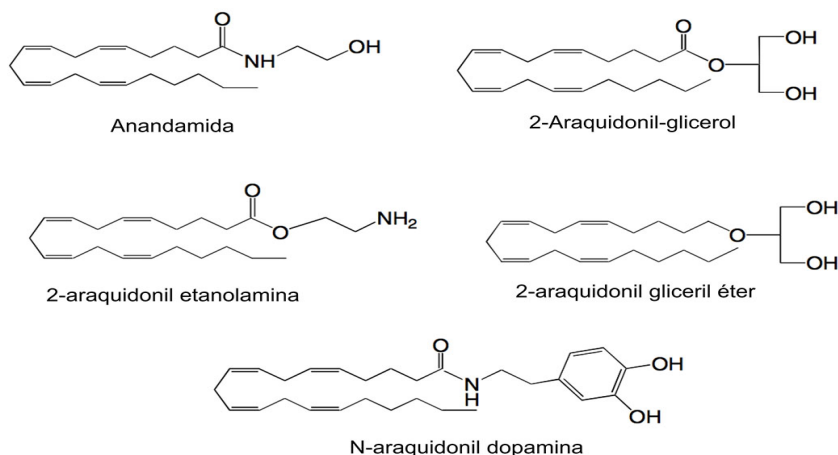
O sistema endocanabinóide é um sistema de sinalização endógena com participação em várias funções do SNC e periférico,³⁰ é constituído pelos receptores canabinóides (mais estudados o CB₁ e CB₂), seus principais ligantes endógenos (anandamida e 2-araquidôn timerol) e enzimas de síntese e degradação.²⁷

Os endocanabinóides são moléculas de sinalização de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, gerados a partir da membrana celular e de precursores de fosfolípeidos, possuem propriedades de se ligar e ativar um ou mais subtipos de receptores de canabinóides.³¹

A etanolamida do ácido araquidônico, anandamida (AEA) e o 2-araquidôn timerol (2-AG), são os principais agonistas endógenos dos receptores canabinóides, são de natureza lipídica, derivados de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, principalmente do ácido araquidônico e se ligam nos receptores canabinóide CB₁ e CB₂. Devido o seu maior envolvimento em várias vias metabólicas os níveis celulares e teciduais do 2-AG são mais

elevados que os da AEA.^{32,33,34} Após a identificação do primeiros endocanabinóides, mais tarde foram descobertas outras moléculas agonistas dos receptores canabinóides o 2-araquidonil etanolamina (virodamina),³⁵ o 2-araquidonil gliceril éter (noladina)³⁶ e a N-araquidonil dopamina (NADA) (Figura 4).³⁷

Figura 4 – Endocanabinóides



Fonte: Adaptado de De Petrocellis (2004).³⁸

Legenda: Ilustração esquemática da estrutura molecular de alguns principais endocanabinóides

A sinalização endocanabinóide (Figura 5) é regulada pela síntese, liberação, recaptação e degradação. Com o aumento dos níveis de cálcio intracelular e a despolarização da membrana, o receptor é estimulado e ativa processos enzimáticos que conduzem a síntese dos endocanabinóides. A síntese da AEA acontece a partir de uma fosfolipase D específica para a N-araquidonil fosfatidil etanolamina,³⁹ em seguida, é transportada para dentro da célula por um transportador de membrana para endocanabinóides (TME). Por meio do processo de recaptação a AEA é inativada e passa pelo mecanismo de degradação, que acontece pela enzima amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH) produzindo etanolamina e ácido araquidônico (AA).⁴⁰ Estudos mapearam a distribuição da FAAH no SNC e encontra-se maior expressão nos tratos espinotalâmicos,⁴¹ em neurônios do corno posterior da medula espinal, nos gânglios sensoriais do nervo espinal e neurônios pós-sinápticos.²⁷

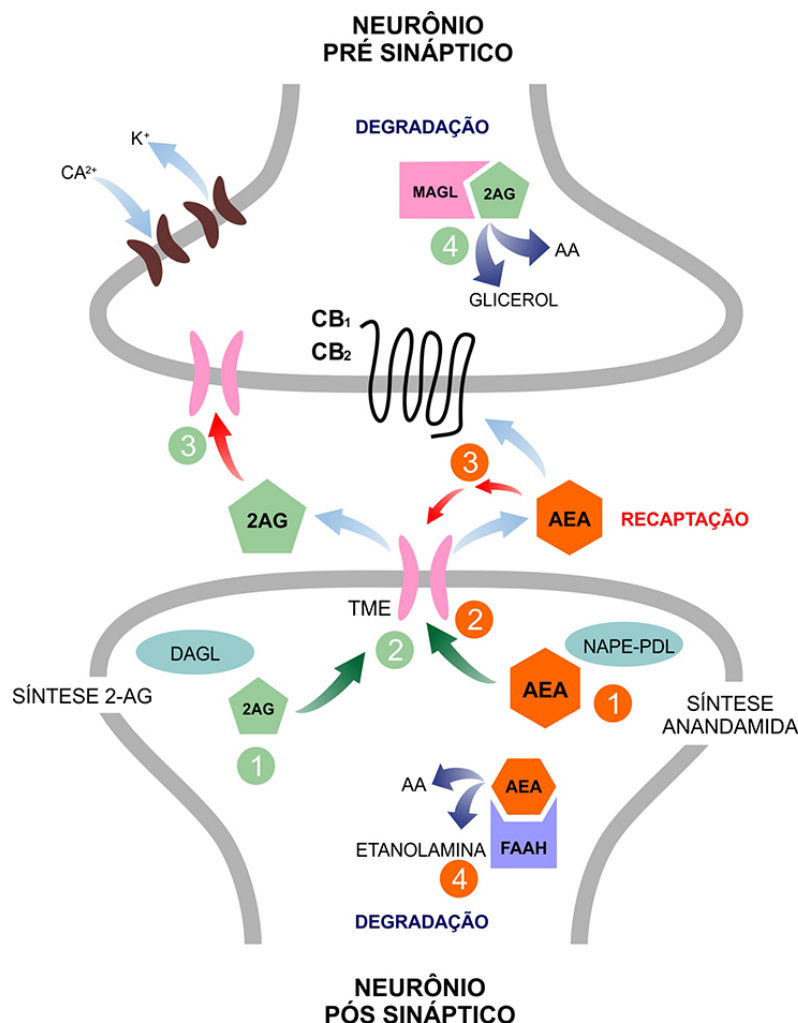
O 2-AG é formado a partir da clivagem enzimática de precursores de fosfolípidos de membrana a fosfolipase C e pela lipase diacil glicerol (DAGL), é transportado pelo TME para o espaço intracelular, passa pela recaptação e é degradado pela lipase mono acil glicerol (MAGL) produzindo o AA e glicerol. MAGL está localizada principalmente em terminais

pré-sinápticos e em regiões onde estão expressos os receptores CB1, principalmente no tálamo, hipocampo, córtex e cerebelo.²⁷

Na neurotransmissão endocanabinoidérgica, os endocanabinóides são mensageiros atípicos, a transferência de informações é feita do terminal pós para o pré-sináptico. Acontecendo assim, de forma retrógrada, o estímulo inicia-se no neurônio pós-sináptico, a excitação neuronal causa a despolarização e o influxo de íons de Ca^{2+} , estimulando assim, fosfolipases. Consequentemente os endocanabinóides são liberados na fenda sináptica por meio de difusão livre ou assistida para a estimulação dos receptores pré-sinápticos.³³ É importante destacar que os endocanabinóides não são sintetizados e armazenados em vesículas, como normalmente acontece com os neurotransmissores. São sintetizados e liberados quando estimulados pela célula, tendo assim sua disponibilidade regulada pela síntese de captação e degradação.³⁹ Os efeitos dos endocanabinóides podem ser limitados por internalização onde ocorre passivamente ou por meio de transportadores específicos e por catabolismo quando sofrem hidrólise enzimática, a AEA pela FAAH e do 2-AG pela MAGL, isso faz com que essas duas enzimas sejam alvos com importante potencial terapêutico.⁴²

Estudos sugerem que após a administração exógena dos principais endocanabinóides a AEA e 2-AG, inibidores da recaptação ou degradação (enzimas FAAH e MAGL) produzem efeito antinociceptivo.⁴³

Figura 5 – Sinalização endocanabinóide



Fonte: Adaptado de Di Marzo e Matias (2005).⁴⁴

Legenda: Na representação esquemática a sinalização endocanabinóide é regulada pela síntese, liberação, recaptção e degradação. (1) – a anandamida (AEA) é sintetizada pela enzima específica N-araquidionil fosfatidil etanolamina (NAPE-PDL). O 2-araquidionil glicerol (2-AG) é sintetizado por meio da lipase diacil glicerol (DAGL). (2) – após serem sintetizados, a AEA e o 2-AG ligam-se ao transportador de membrana para endocanabinóides (TME). (3) – os endocanabinóides passam pela recaptção. (4) – a AEA é degradada pela amido hidrolase de ácidos graxos (FAAH) produzindo etanolamina e ácido araquidônico (AA). O 2-AG é degradado pela lipase mono acil glicerol (MAGL) produzindo glicerol e AA.

2.2.2 Receptores canabinóides

Os receptores canabinóides são os receptores ligados a proteína G mais abundantes expressos no cérebro de mamíferos,⁴⁵ o sistema de transdução posterior a ativação desses receptores envolve a inibição da adenilato ciclase, levando a redução do AMP cíclico (AMPc) e modulação da atividade dos canais iônicos de cálcio e potássio que leva a estimulação da proteína quinase (PKA), como consequência inibem a liberação de

neurotransmissores e excitabilidade neuronal.^{30,46} Dessa forma, constituem uma base importante para o controle de vários processos de sinalização celular dentro do SNC.⁴⁷

A partir destas ações, o sistema canabinóide regula diversas funções neurobiológicas relacionadas ao SNC e periférico, funções motoras e cognitivas, influencia no comportamento alimentar, sono, antinocicepção, modula respostas imunes e inflamatórias, influencia no metabolismo celular, na atividade cardiovascular (alteração da frequência cardíaca e vasodilatação), respiratória (hiper ou hipoventilação e broncodilatação), funções reprodutivas (inibição da secreção de testosterona e relaxamento uterino) e ocular (diminui a pressão intraocular).^{47,48} Devido a ampla distribuição tecidual desses receptores é possível explicar boa parte dos efeitos psicotrópicos encontrados.³⁰

O marco inicial para os estudos do sistema canabinóide foi após a descoberta de seus principais receptores, apenas depois de muitos estudos, foi possível a clonagem e identificação dos receptores canabinóides. O primeiro receptor canabinóide a ter a sua estrutura molecular definida foi o receptor CB₁, em 1990 por Matsuda e colaboradores e em seguida em 1993, o receptor CB₂ por Munro e colaboradores.^{49,50} Recentemente outros receptores foram adicionados a família como o receptor acoplado a proteína G (GPCR) e receptor acoplado a proteína G_{α11-13} (GPR55).⁵¹

O receptor CB₁ é considerado o receptor mais abundante encontrado no SNC e em menor quantidade em tecidos periféricos.⁵² Os receptores CB₁ são encontrados nos núcleos da base, cerebelo, amígdala, hipocampo, hipotálamo, tálamo e tronco encefálico,⁴⁵ em áreas relacionadas ao processamento nociceptivo, córtex cerebral, córtex cingulado anterior (CCA), núcleos da rafe, LC, corno posterior da medula espinal, SCP, BVRM, medula espinal e fibras aferentes primárias.^{41,46}

Os receptores CB₂ são expressos principalmente em tecidos periféricos, células do sistema imunológico, baço, amígdalas.^{53,52,50} e expressos em menor quantidade em regiões SNC,⁵⁴ em células microgliais do cérebro em condições inflamatórias,⁵⁵ exerce efeito antinociceptivo em alguns modelos de dor aguda e crônica,⁵⁶ são encontrados também em regiões que modulam o processamento nociceptivo como tronco encefálico,⁵⁴ SCP,⁵⁷ e medula espinal.⁵⁸

Em geral, a estimulação dos receptores canabinóides (CB₁ e CB₂) resulta numa inibição das vias de sinalização nociceptivas.⁴³ Está bem definido que os canabinóides produzem efeitos analgésicos por meio da ativação de receptores CB₁, em sítios periféricos, espinais e supra-espinais.^{59,46,43} Existem estudos apontando a interação dos sistemas canabinóide, serotoninérgico e noradrenérgico por meio da ativação de receptores CB₁ e a

sinalização é mediada principalmente nas regiões da SCP e BVMR com maior liberação de anandamida e 2-AG.¹⁹

Os endocanabinóides (receptores CB1 e CB2, incluindo a anandamida, 2-AG e as enzimas responsáveis pela síntese e degradação), apresentam ampla distribuição no eixo da transmissão e modulação da dor, principalmente em regiões da amígdala, SCP, BVMR, LC e medula espinal.⁴³ Sabe-se que os receptores canabinóides podem desempenhar funções como neurotransmissores ou neuromoduladores no SNC, com isso, evidências afirmam seu papel na modulação da nocicepção⁶⁰ e que este processo acontece pela inibição pré-sináptica de neurônios GABAérgicos na SCP e BVMR levando à ativação das vias descendentes inibitórias.⁶¹

2.3 DOR PÓS-OPERATÓRIA

A dor pós-operatória induzida pela incisão cirúrgica, é entendida como uma forma de dor aguda, suas características fisiológicas têm sido estudadas com bases em achados experimentais em modelos animais. Assim, um modelo animal de dor pós-operatória, o modelo de incisão plantar, foi desenvolvido por Brennan, Vandermeulen e Gebhart (1996).⁶² Os mecanismos de dor pós-operatória são diferentes de outros modelos de dor induzidos por lesão tecidual convencionalmente utilizado.^{63,64}

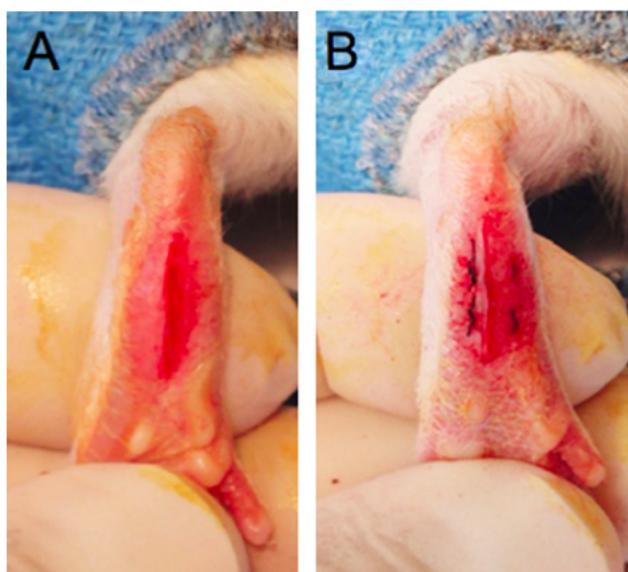
Embora no Brasil não existam dados epidemiológicos conclusivos sobre a prevalência da dor pós-operatória, nos Estados Unidos foram realizados estudos pelo Centro Nacional para Estatística de Saúde, apontando que até 75% dos pacientes sentem dor após o procedimento cirúrgico. A dor aguda não tratada adequadamente, evolui para um quadro de dor crônica, com isso, é gerado altos custos para o departamento de saúde.⁶⁵

Um quadro de evolução da dor pós-operatória, atinge cerca de 10 a 50% dos pacientes e apesar do tratamento com analgésicos, ainda assim 2 a 10% dos pacientes desenvolvem um quadro de dor crônica. O tratamento clínico é limitado em sua eficácia e produz efeitos secundários indesejáveis. É necessário maior compreensão dos mecanismos pelos quais a dor aguda evolui para dor crônica para que sejam desenvolvidas novas formas de tratamento mais seguras e mais eficazes.⁶⁶

Assim, a dor induzida pela incisão cirúrgica tem como resultado lesões da pele, fáscia, músculos e pequenas inervações desses tecidos, tem como mecanismos comuns: lesão direta, inflamação e liberação de mediadores inflamatórios que sensibilizam terminais nociceptivos periféricos que detectam estímulos térmicos e mecânicos.⁶⁷ Neste sentido,

Pogatzki, Gebhart e Brennan (2002)⁶⁸ mostraram que fibras do tipo A δ e fibras do tipo C são sensibilizadas pela incisão e que a ativação de nociceptores mecânicos tem um papel na manutenção da hiperalgesia após a incisão. Os receptores ionotrópicos para aminoácido excitatório α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) e cainato apresentam um importante papel na dor, hiperalgesia e sensibilização central induzidas pela incisão.⁶⁴

Figura 6 – Incisão Plantar.



Fonte: Adaptado de Brennan (2011).⁶⁹

Legenda: Os diferentes estágios do procedimento cirúrgico de incisão plantar. Em A: incisão longitudinal de 5 mm feita através da pele e fâscia iniciando a 0,5 cm da extremidade proximal do calcanhar se estendendo pela linha média do pé; B: Depois da homeostase a incisão é suturada; Cicatrização, 5 dias depois da incisão.

Tratando-se da fisiopatologia da dor pós-operatória alguns estudos demonstraram o envolvimento da AEA e 2-AG atuando sobre os receptores CB₁ e CB₂ na modulação do processamento nociceptivo (DI MARZO, 2008),⁷⁰ é sugerido que baixos níveis de AEA encontrados na medula espinal podem contribuir para a alodinia da pata induzida pela incisão, juntamente com níveis mais elevados de 2-AG contribuem para uma resolução espontânea da hipersensibilidade, propõem-se, que a administração crônica dos receptores CB₁ e CB₂ resultam em alodinia mecânica sugerindo que a sinalização dos receptores canabinóides é necessária para a melhora da dor pós-operatória (ALKAITIS et al., 2010).⁷¹

2.4 TERAPIAS INTEGRATIVAS

As terapias e práticas integrativas em saúde crescem fortemente no âmbito mundial, de acordo com o *National Center for Research on Complementary and Integrative Health* (NCRCI) dos Estados Unidos, o termo medicina complementar e integrativa é o conjunto de práticas que não são consideradas como parte da medicina convencional e que dedicam a atenção à saúde. Medicina complementar é considerada uma prática terapêutica utilizada juntamente com a terapia alopática; e medicina Integrativa, inclui como forma de tratamento e cuidados a saúde uma abordagem que trás não só o uso das medicinas tradicionais. As medicinas complementares e integrativas, segundo o NCRCI, estão divididas em: homeopatia e medicina ayurvédica, como práticas alternativas; práticas baseados em produtos naturais não reconhecidos cientificamente, como terapias biológicas; massagens e exercícios, como terapias de manipulação corporal e reiki, Liang Gong, como terapias energéticas.⁷²

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS), utiliza o termo Práticas Integrativas e Complementares (PIC), e com aprovação da portaria 971, de 3 de maio de 2006, incorpora a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), que regulamenta o uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, incluindo assim, o uso dos óleos essenciais para tratamentos de saúde. Esta medida do MS faz diminuir os gastos com medicamentos no setor público, além de incentivar a população a buscar tratamentos naturais de cura.⁷³

A utilização de plantas medicinais é uma das mais antigas práticas terapêuticas utilizadas pela humanidade, a Organização Mundial da Saúde (OMS) observou que a maior parte da população mundial depende da medicina tradicional para cuidados primários de saúde.⁷⁴ As plantas medicinais e aromáticas são amplamente utilizadas como medicamentos e constituem uma fonte importante de compostos orgânicos biologicamente ativos, os óleos essenciais apresentam uma variedade de propriedades terapêuticas as quais eles podem ser empregados, como: *Cedrus atlantica*, antibactericida;⁷⁵ *Lavandula hybrida*, antinociceptivo e gastroprotetor;⁷⁶ *Cedrus deodara*, antioxidante^{77,78} e *Melaleuca alternifolia*, *Cinnamomum verum*, *Origanum compactum* e *Lavandula angustifolia*, antimicrobiano.⁷⁹ Existe um crescente número de estudos pré-clínicos e clínicos que relatam os benefícios dos óleos essenciais, seu uso é cada vez mais comum dentro do sistema de saúde, sendo assim, é de fundamental importância o conhecimento científico do uso terapêutico das plantas medicinais e seus derivados, ampliando o conhecimento e formas de utilização.⁸⁰

2.4.1 Aromaterapia

A história da aromaterapia é bastante antiga, foi conhecida e utilizada por diferentes povos devido ao seu potencial terapêutico. Na China, encontram-se registros dos benefícios de ervas aromáticas e sua utilização datados de 4.500 anos atrás, sendo ainda hoje as mesmas propriedades medicinais empregadas em diversos tratamentos.⁸¹ Os egípcios utilizavam as plantas aromáticas em rituais de embalsamamento e através da maceração obtinham substâncias aromáticas, as quais eram utilizadas em massagens e no cuidado da saúde em geral. Os gregos conheciam as propriedades medicinais e aplicavam seu conhecimento em suas casas de banho e em prol da saúde. Sabe-se hoje, que a maior parte dos estudos sobre ervas e fitoterápicos, suas propriedades medicinais e utilização, foram preservados ao longo da história por esses povos e transmitidos pelas medicinas tradicionais.⁸²

Os estudos sobre a extração dos óleos essenciais foi iniciado no século XVI por Paracelso, conhecido como o pai da Farmaquímica, no entanto, apenas em 1927 o termo *aromathérapie* foi criado pelo químico francês René-Maurice Gatefossé que durante pesquisas em seu laboratório, sofreu uma queimadura no braço e instintivamente mergulhou o ferimento em um pote com óleo essencial (OE) de lavanda, observando assim, a rápida analgesia e recuperação. A partir disso intensificou suas pesquisas sobre os óleos essenciais, observando seus efeitos no combate de doenças, infecções, queimaduras e na cicatrização. Mais tarde na Europa, por volta de 1950, a enfermeira Marquerite Maury, conhecida como a mãe da aromaterapia moderna, demonstrou através de pesquisas os efeitos terapêutico dos óleos essenciais por meio de inalação e absorção da pele.⁸¹

A partir disso, a aromaterapia ficou conhecida como o uso terapêutico dos óleos essenciais, que são substâncias complexas, de propriedade volátil, com odor e coloração variáveis, solúveis em lipídeos e em solventes orgânicos, com uma densidade geralmente menor do que a da água. São produzidos como metabolitos secundários e extraídos de diversas partes da planta, como folhas, flores, frutos, sementes, raízes e galhos.⁸³ São obtidos por meio de destilação a vapor, prensagem a frio e extração por meio de solvente, métodos que são capazes de extrair as substâncias químicas,⁸⁴ contendo uma variedade de moléculas aromáticas com funções orgânicas derivadas dos álcoois, aldeídos, ésteres, fenóis e hidrocarbonetos.⁸² Os monoterpenos e sesquiterpenos representam umas das mais diversas classes de metabolitos secundários de plantas, os quais contém propriedades farmacológicas

que influenciam diretamente no funcionamento do corpo, modificando aspectos somáticos, psíquicos (emoções, aprendizado e memória) e auxiliando na melhora da saúde.⁸⁵

Os óleos essenciais, são empregados de acordo com o potencial terapêutico e utilizados como forma de medicamentos complementares no tratamento de disfunções orgânicas.⁸⁶ De acordo com sua composição química podem apresentar uma variedade de efeitos, tais como: ansiolítico,^{87,88} hipertensivo,⁸⁹ antidepressivo,⁹⁰ analgésico na dor pós-operatória,^{91,92} antinociceptivo e antiinflamatório,⁹³ antiespasmódico,⁹⁴ antiestresse,⁹⁵ antiulcerogênico e gastroprotetor.⁹⁶

A aromaterapia é uma prática terapêutica, dentro das terapias integrativas e complementares e é considerada uma terapia adjuvante em muitos países. O uso dos óleos essenciais utilizados por meio de aplicação dérmica ou inalação, são capazes de apresentar uma variedade de respostas farmacológicas e fisiológicas.⁸⁶ Atualmente, são conhecidos cerca de 3.000 diferentes óleos essenciais, sendo que dentre eles aproximadamente 300 são comercialmente utilizados pela indústria farmacêutica, agronômica, alimentícia, sanitária e cosmética.⁸³

2.4.2 Óleo essencial *Cedrus atlantica*

O Cedro, como é popularmente conhecido, pertence a classe das Gimnospermas (*gminos* - nu e *sperma* - semente), plantas vasculares que possuem sementes, mas não produzem frutos, são plantas nativas particularmente de clima temperado ou frio e faz parte do filo das coníferas (*Coniferophyta*, *conus* - cone, do latim e *phoros* - portador, do grego), árvores e arbustos que possuem sua estrutura reprodutiva em forma de cones. É considerado uma conífera de grande porte, possui caule lenhoso e pode atingir até 50 metros de altura.⁹⁷

O Cedro é nativo das montanhas do Atlas da região mediterrânea do Marrocos e Argélia, sua árvore possui uma madeira de qualidade com alto teor de OE, possui importância histórica e socioeconômica, seu OE é aplicado de forma terapêutica, conhecido como agente aromatizante na perfumaria e cosmetologia e é utilizado pela indústria farmacêutica.^{98,99,100} O OE_{Ca} é empregado para fins terapêuticos. Na literatura recebe indicações clínicas, como: antiséptico, diurético, adstringente, sedativo, estimulante,¹⁰¹ fungicida¹⁰² e antibactericida.⁹⁸

Estudos realizados com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, demonstram que o OE de cedro é composto principalmente por hidrocarbonetos monoterpenos e sesquiterpenos, em particular α -pineno, β -pineno, himachalol, β -

himachaleno, γ -himachaleno e α -himachaleno entre outros grupos expressos em menor quantidade.^{75,100} Esses compostos químicos derivados dos terpenos, representam um grupo de compostos orgânicos com estrutura molecular constituído de isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) formando uma base de 5 carbonos (C5), essas moléculas possuem uma grande variedade, cerca de 20.000 metabolitos diferentes¹⁰³ e estão presentes em 90% dos óleos essenciais.⁸³ Estudos evidenciam que os monoterpenos e sesquiterpenos, presente em muitos óleos essenciais, são excelentes candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de processos patológicos e produzem efeito antinociceptivo em modelos inflamatórios agudos.¹⁰⁴

O gênero vegetal *Cedrus* possui uma variedade de espécies, como: *C. atlantica*, *C. brevifolia*, *C. libani* e *C. deodara*,¹⁰⁰ que apresentam uma similaridade em sua composição química, na literatura encontra-se estudos realizados com a espécie *C. deodara* que comprovam o potencial antiinflamatório de fases proliferativa e crônica da inflamação, na atividade analgésica mediada central e periféricamente,¹⁰⁵ na atividade antimicrobiana e antioxidante.⁷⁷ No entanto, referente ao OECA, são poucos estudos científicos publicados com indicações clínicas e não existem estudos sobre seu mecanismo de ação.

2.5 SISTEMA OLFATIVO – VIA INALATÓRIA

O olfato é o sentido que permite reconhecer e discriminar sinais químicos no ambiente, está relacionado a detecção ou ausência de substâncias voláteis, fornece informações essenciais para a sobrevivência e influencia no comportamento das espécies. O sistema olfativo discrimina uma variedade de moléculas odoríferas, de diferentes formas e tamanhos, que possam estar presentes em pequenas quantidades no ambiente.¹⁰⁶ A anatomia básica desse sistema é bem conhecida, contudo, a capacidade discriminatória ocorre em estruturas anatômicas distintas e depende de receptores olfativos.¹⁰⁷ Os neurônios receptores olfativos (NRO) detectam moléculas de odor por meio do epitélio olfativo (EO) que reveste toda a cavidade nasal, região da lâmina crivosa, septo dorsal, cornetos superior e médio.¹⁰⁸

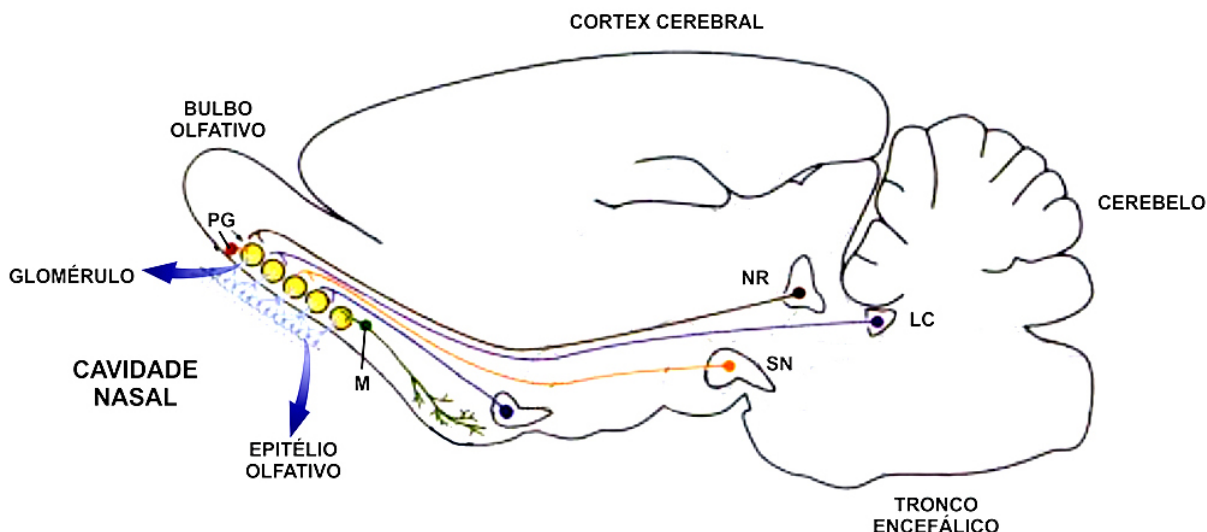
O conjunto de axônios dos NRO formam o nervo olfativo (I par de nervo craniano), suas conexões aferentes do epitélio olfativo, atravessam a placa cribiforme, e transmitem a informação para os glomérulos que estão dispostos sobre a camada glomerular do bulbo olfativo.¹⁰⁹ Os glomérulos, são compostos de axônios sensoriais dos NRO e fazem sinapses com as células mitrais (M) e em tufo (T), as quais constituem os neurônios eferentes do bulbo e transmitem informações para o córtex olfativo. O processamento olfativo ocorre

no bulbo olfativo, recebe projeções de neurônios e codifica as informações sensoriais que são processadas e refinadas antes de serem transmitidas para o córtex olfativo.^{106,110}

O córtex olfativo é dividido em cinco áreas principais: o núcleo olfativo anterior, tubérculo olfativo, córtex piriforme, núcleo amigdalóide, córtex periamigdalóide e córtex entorrinal.¹¹¹ As informações transmitidas para essas áreas ocorrem através de projeções diretas para as vias límbicas mediando os aspectos afetivos da percepção olfativa. Em regiões do tálamo, responsável pela percepção consciente e discriminação de odores, no hipotálamo, importante no comportamento alimentar e no hipocampo relacionado a comportamento e aprendizagem, nestas regiões, as informações do olfato são integradas com outras informações sensoriais, aprendizagens anteriores, experiências do passado e comportamento.¹¹²

Sabe-se que a via inalatória é uma importante via de administração terapêutica com alvo o SNC. Os botões dendríticos presentes nos cílios das células receptoras olfativas inervam toda a cavidade nasal, estas células são neurônios de primeira ordem e formam os nervos olfativos que projetam seus axônios diretamente para SNC,¹¹³ no qual o bulbo olfativo é o primeiro rele de informação olfativa.¹¹⁴ Estudos demonstram (Figura 7) que as projeções das fibras nervosas passam pelo bulbo olfativo e chegam a regiões como a substância *nigra* (SN), núcleos da rafe (NR) e LC, núcleos estes, envolvidos com o processamento e modulação da dor.¹¹⁵

Figura 7 – Projeções da via olfativa no sistema nervoso central

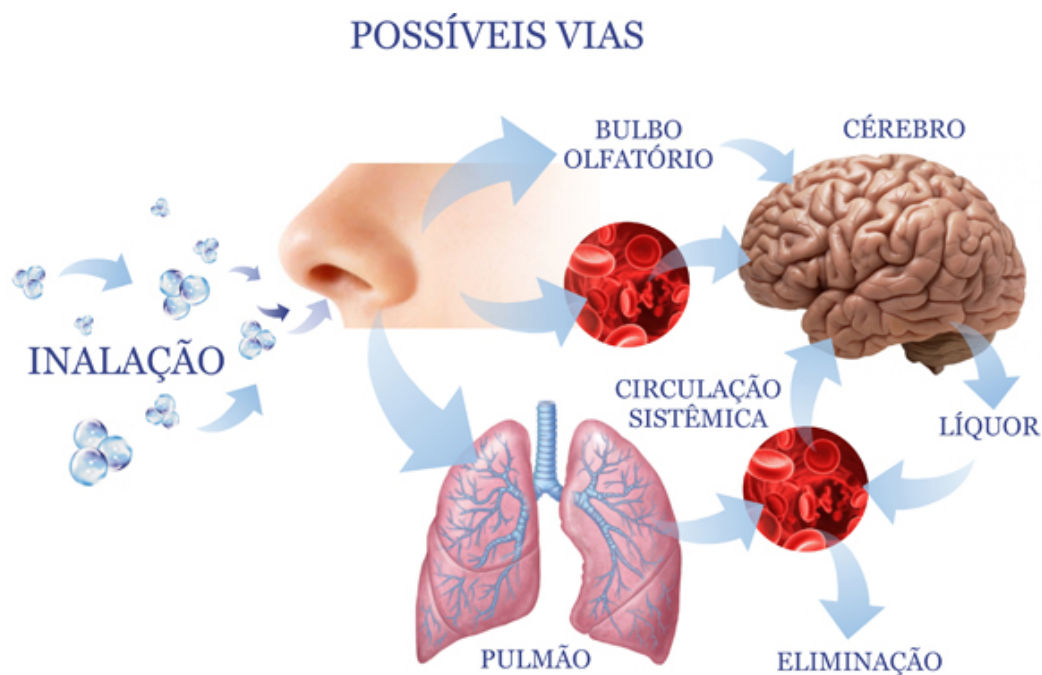


Fonte: Adaptado de Doty (2008).¹¹⁵

Legenda: Ilustração esquemática mostrando as projeções da via olfativa no SNC. A cavidade nasal está revestida pelo epitélio olfativo. No bulbo olfativo, os neurônios receptores olfativos enviam seus axônios para os glomérulos. O processamento ocorre através de sinapses excitatórias entre células periglomerulares (PG), células mitraes (M) e em tufo, que formam o trato olfativo e fazem sinapses diretamente em neurônios piramidais no córtex olfativo. As projeções das fibras nervosas fazem conexões com regiões como a substância *nigra* (SN), núcleos da raia (NR) e *locus coeruleus* (LC), regiões que estão envolvidas com o processamento e modulação da dor.

Após a inalação (Figura 8), as moléculas químicas são transportadas através do epitélio olfativo, por meio do nervo olfativo, penetram nos espaços perineurais e perivasculares diretamente ligados ao tecido cerebral, ao líquido cefalorraquidiano, preenchendo o espaço subaracnóide, chegando a circulação sistêmica.¹¹⁶ Pesquisas recentes demonstraram que os efeitos da administração de morfina pela via inalatória, indicam o sistema pulmonar como uma importante via de administração para opióides, baseado no fato que as pequenas moléculas podem ser absorvidas rapidamente devido a elevada permeabilidade dos alvéolos.¹¹⁷ A administração por meio da via intranasal apresenta vantagens para o tratamento de diversas doenças, principalmente as neurológicas. Estudos demonstram que esta forma administração tem alcance através da barreira hemato-encefálica, age de forma não invasiva, apresenta o efeito desejado em curto espaço de tempo, age de forma segura, baixo custo e efeitos secundários reduzidos.¹¹³

Figura 8 – Possíveis vias de passagem após a administração intranasal.



Fonte: Adaptado de Prediger e colaboradores (2012).¹¹⁶

Legenda: Ilustração esquemática das possíveis vias de passagem após a administração intranasal. Após a inalação a informação pode percorrer diferentes vias até a eliminação. 1 – Via central – a molécula odorífica, por meio de projeções de neurônios olfativos, ativa regiões a partir bulbo olfativo até o SNC, envolvendo regiões do sistema límbico. 2 – Via sistêmica – após a inalação, a molécula odorífica pode ser levada através da via pulmonar para a corrente sanguínea.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento do sistema endocanabinóide no efeito antihiperálgico induzido pela inalação do OECA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o perfil fitoquímico do OECA;

Identificar qual tempo de inalação do OECA que induz efeito antihiperálgico mais prolongado no modelo de dor pós-operatória em camundongos;

Verificar o envolvimento de receptores canabinóides CB₁ e CB₂ sistêmicos, periféricos e centrais (espinais) no efeito antihiperálgico da inalação do OECA em camundongos;

Avaliar o envolvimento do sistema endocanabinóide no efeito antihiperálgico do OECA por meio da verificação de um possível efeito sinérgico entre a inalação do OECA com inibidores de enzimas de degradação dos endocanabinóides.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE PESQUISA

A pesquisa caracteriza-se por experimental de natureza quantitativa.^{118,119} Os experimentos deste estudo terão a finalidade de observar e interpretar, sob um controle adequado, o comportamento dos camundongos nos testes para verificar a participação dos receptores canabinóides no efeito antihiperálgico e os possíveis sítios de ação deste óleo.

4.2 EXPERIMENTO 1: ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA

A análise cromatográfica do OE_{Ca} foi realizada por meio de um cromatógrafo gasoso da Agilent 5975 com detector por espectrometria de massa (CG-EM). Foi utilizada uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm × 0,25 µm). As condições da análise foram: gás carreador: He, (1 mL/min.); temperatura da coluna programada de 60-290 °C (3 °C/min) com isoterma a 290 °C por 5/min; temperatura do injetor em 260 °C e temperatura do detector em 280 °C. Razão de split de 1:10. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV. As amostras foram diluídas em clorofórmio. A concentração dos componentes do OE foram calculadas utilizando as áreas individuais dos picos de cada componente que foram identificados pela comparação dos espectros de massas obtidos com os dados descritos na literatura.¹²⁰ Os índices de retenção (IR) foram calculados por meio da co-injeção de uma mistura de n-alcenos de série (C5 - C30), usando a equação descrita por Vandendool e Kratz (1963).¹²¹

4.3 EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS

4.3.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos após a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL com o protocolo número 13.012.4.08.IV. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25 a 35 g), obtidos do Biotério Central da UFSC, aclimatados a 22±2 °C, no ciclo 12h-claro/12h-escuro (claro a partir das 6:00 h.), com acesso a ração e água *ad libitum*. Os animais foram

homogeneamente distribuídos entre os grupos e aclimatizados no laboratório por pelo menos 1 hora antes dos testes. Todos 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.¹²²

4.3.2 Drogas e reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas neste trabalho: NaCl (Sigma, Brasil), AM281, AM630, URB937 e JZL184 obtidos de Cayman (Ann Arbor, Michigan, US).

4.3.3 Cirurgia de incisão plantar

A cirurgia de incisão plantar (CIP) foi realizada em camundongos como descrito previamente por Pogatzki e Raja (2003).¹²³ Os animais foram anestesiados com 1–2% de isoflurano a 100% de O₂. Após a preparação estéril da pata traseira direita, foi realizada uma incisão de 5 mm longitudinal na pele e fáscia da parte plantar, utilizando um bisturi de lâmina número 11. A incisão iniciou a 2 mm da extremidade proximal do calcanhar em direção aos dedos dos pés. Após a incisão, a pele foi suturada com um fio de nylon 6.0 mm e a sutura foi coberta com 10% de solução povidine-iodo®. O grupo controle foi submetido a um falso procedimento cirúrgico, que consistiu na aplicação da anestesia pelo mesmo período. Para a recuperação, os animais permaneceram em suas caixas moradias após o procedimento. Os animais foram avaliados 24 horas após quanto a hiperalgesia mecânica.^{124,125,126}

4.3.4 Tratamento inalatório com óleo essencial

Para inalação do OE_{Ca}, foi utilizado uma caixa plástica semelhante a caixa moradia dos animais (20 cm de altura, 30 cm de largura e 20 cm de profundidade), no seu interior foi posicionado um béquer contendo 200 µl do OE, a caixa foi coberta totalmente por um plástico por um período de 30 minutos antes de receber os animais, afim de saturar o ambiente. Os animais foram colocados dentro da caixa e permaneceram inalando o ar do ambiente interno da caixa saturado com os vapores do óleo ou de salina durante diferentes períodos de tempos (1, 5, 30 e 60 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. Os animais do grupo controle foram colocados na caixa nas mesmas condições, mas com 200

μl de salina.⁷⁶ O OECA utilizado nesta pesquisa é comercialmente processado por destilação à vapor e disponibilizado por *Penny Price Aromatherapy*®.

4.3.5 Avaliação da hiperalgesia mecânica

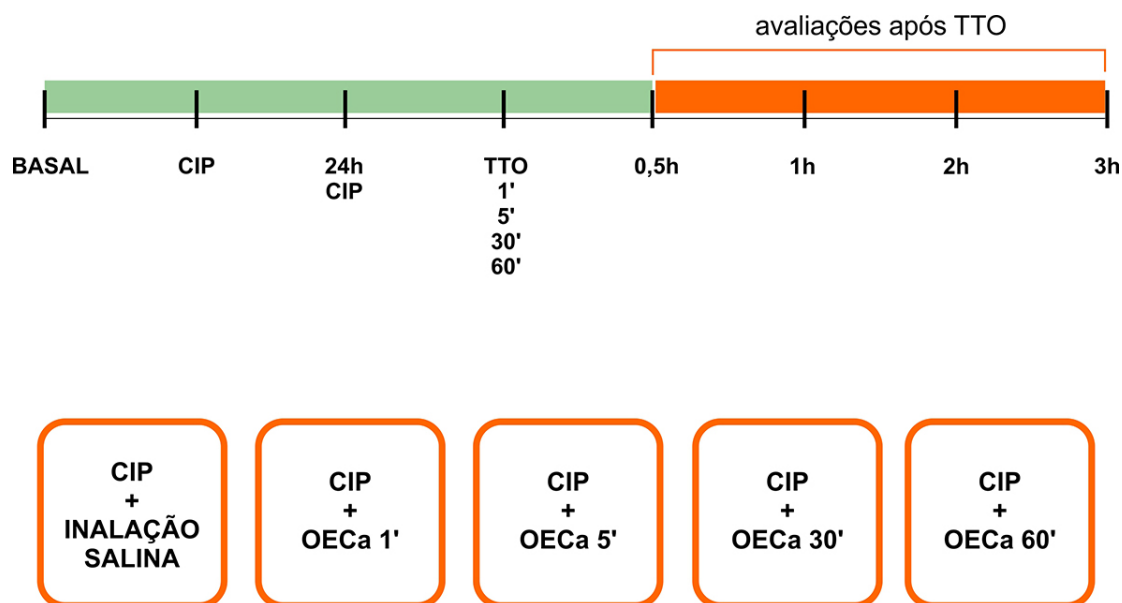
A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando o monofilamento de von Frey como descrito previamente.¹²⁵ Para aplicação do teste, os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação de acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre uma plataforma de tela de arame com malha de 6mm (70 x 40 cm). O teste foi aplicado utilizando um filamento de von Frey (0,4 g) (VFH, Stoelting, Chicago, USA), foram realizadas aplicações do filamento na superfície ventral da pata posterior direita do animal (pata operada), 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 estiverem acomodadas sobre a tela; a resposta de retirada foi considerada quando o animal remover totalmente a pata da tela de apoio. Como indicativo de resposta foram utilizados os valores percentuais da frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento. No dia anterior a cirurgia os animais foram submetidos ao teste para obtenção da resposta basal. Apenas os animais que apresentaram uma porcentagem de resposta por volta de 20% foram selecionados.¹²⁷

4.3.6 Avaliação do efeito antihiperalgésico da inalação do OECA

4.3.6.1 Experimento 2: determinação do tempo de inalação

Com o objetivo de definir qual o tempo de inalação do OECA que induz o maior e mais duradouro efeito antihiperalgésico, diferentes grupos de animais foram submetidos primeiramente a um modelo de dor pós operatória, por meio da CIP e após 24 horas, os animais foram colocados nas caixas saturadas com salina ou OECA onde permaneceram inalando por 1, 5, 30 ou 60 minutos. A hiperalgesia mecânica foi avaliada em 0, 0,5, 1, 2 e 3 horas após os diferentes tempos de tratamento (TTO). Para este experimento foram utilizados os seguintes grupos ($n = 8$) (Figura 9): 1) CIP + Inalação Salina; CIP + Inalação OECA 1 minuto; 2) CIP + Inalação OECA 5 minutos; 3) CIP + Inalação OECA 30 minutos e; 4) CIP + Inalação OECA 60 minutos.

Figura 9 – Desenho experimental – tempo de inalação

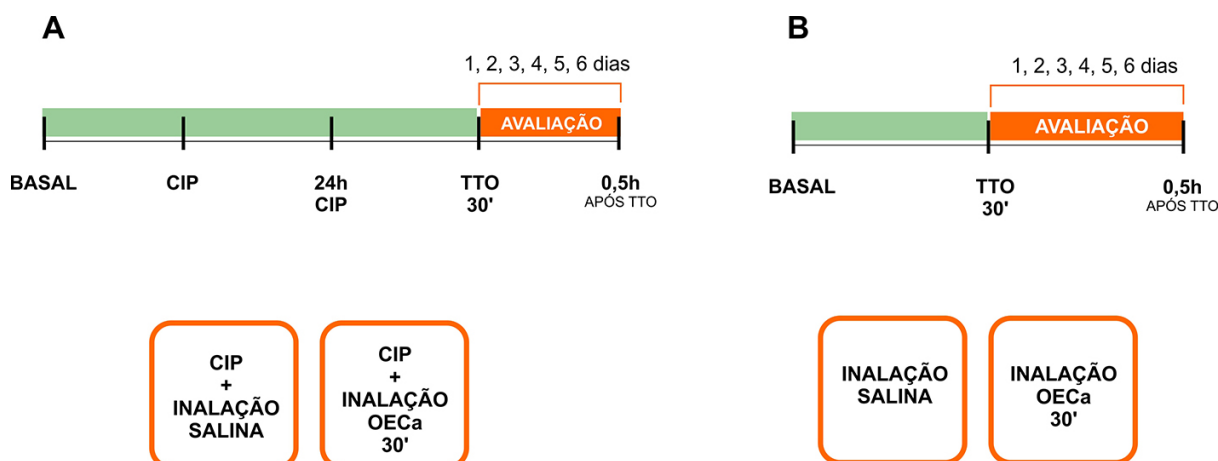


Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.3.6.2 Experimento 3: análise do efeito da inalação diária do OECa

Em outro experimento, para verificar o efeito de inalações diárias (crônico) do OECa, os animais submetidos ou não a CIP, a partir do primeiro dia pós operatório foram submetidos a inalação diária do OECa durante 6 dias consecutivos. A hiperalgesia mecânica foi avaliada sempre 30 minutos após a inalação. Os seguintes grupos foram utilizados ($n = 8$) (Figura 10 – painel A): 1) CIP + Inalação Salina; 2) CIP + Inalação OECa 30 minutos. Para verificar o efeito *per se* do OECa (Figura 10 – painel B): 1) Inalação Salina e, 2) Inalação OECa 30 minutos.

Figura 10 – Desenho experimental – inalação diária e efeito *per se*



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.3.7 Análise do mecanismo endógeno do efeito antihiperálgico do OECA

4.3.7.1 Procedimento para realização da injeção intraperitoneal

Para estudar o efeito sistêmico dos antagonistas CB₁ ou CB₂ sobre a antihiperálgia induzida pelo OECA, os animais foram contidos com a mão e receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) no quadrante inferior direito do abdome, a agulha foi introduzida com uma inclinação aproximada de 45° para evitar a perfuração de vísceras ou vasos. Em seguida o volume de 10 ml/kg foi injetado lentamente com uma seringa de 1 ml com agulha longa calibre 12,7 x 0,3 mm.¹²⁵

4.3.7.1.1 Experimento 4: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB₁ sistêmicos na antihiperálgia induzida pelo OECA

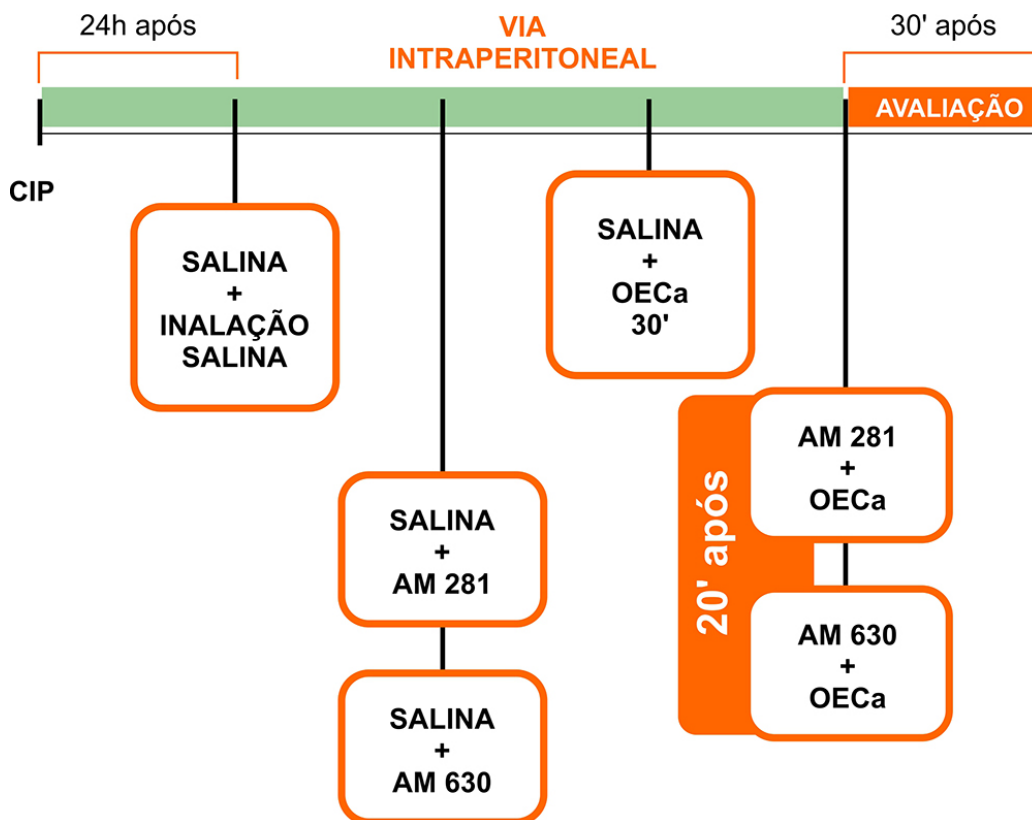
Afim de evidenciar a participação dos receptores CB₁ sistêmicos sobre a atividade antihiperálgica do OECA, os animais foram submetidos a CIP e 24 horas após, foram pré-tratados pela via i.p. com AM281 (antagonista seletivo para receptores canabinóides CB₁, 0,5 mg/kg, i.p.) ou salina (10 ml/kg, i.p.). Após 20 minutos os animais foram submetidos a inalação do OECA durante 30 minutos. A hiperálgia mecânica foi avaliada 30 minutos após o término da inalação.¹²⁵ Neste experimento foram utilizados os seguintes grupos ($n = 8$) (Figura 11): 1) Salina (10 ml/kg, i.p.) + Inalação Salina; 2) Salina (10 ml/kg, i.p.) + OECA 30

minutos; 3) AM281 (0,5 mg/kg, i.p.) + Inalação Salina; 4) AM281 (0,5 mg/kg, i.p.) + OECa 30 minutos.

4.3.7.1.2 Experimento 5: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB₂ sistêmicos na antihiperálgia induzida pelo OECa

Com o intuito de verificar o envolvimento dos receptores CB₂ sobre a atividade antihiperálgica do OECa, os animais foram submetidos a CIP e 24 horas após, foram pré-tratados pela via i.p. com AM630 (antagonista seletivo para receptores canabinóides CB₂, 3 mg/kg, i.p.) ou salina (10 ml/kg, i.p.). Após 20 minutos os animais foram submetidos a inalação do OECa durante 30 minutos. A hiperálgia mecânica foi avaliada 30 minutos após o término da inalação.¹²⁵ Neste experimento foram utilizados os seguintes grupos ($n = 8$) (Figura 11): 1) Salina (10 ml/kg, i.p.) + Inalação Salina; 2) Salina (10 ml/kg, i.p.) + OECa 30 minutos; 3) AM630 (3 mg/kg, i.p.) + Inalação Salina; 4) AM630 (3 mg/kg, i.p.) + OECa 30 minutos.

Figura 11 – Desenho experimental – envolvimento dos receptores canabinóides sistêmicos



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.3.7.2 Procedimento para realização da injeção intraplantar

Para estudar o efeito local (periférico) dos antagonistas CB₁ ou CB₂, sobre a atividade antihiperálgica do OECA, foi realizada uma administração local (periférica) dos antagonistas, os animais foram colocados em tubos de contenção e receberam uma injeção intraplantar (i.pl.) com volume de 20 µl por pata, na superfície ventral da pata traseira direita. Foi utilizado uma seringa de 0,5 ml com agulha curta calibre 8,0 x 0,3 mm.¹²⁸

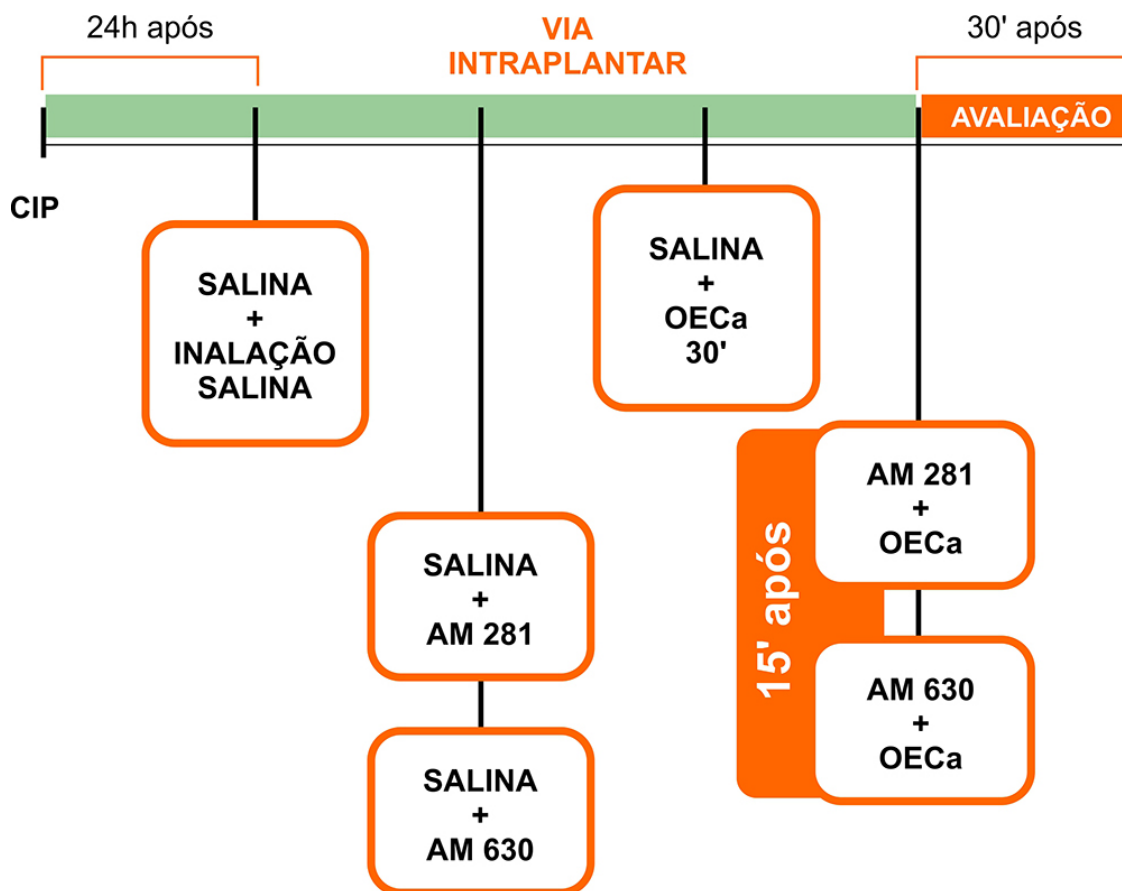
4.3.7.2.1 Experimento 6: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB₁ periféricos na antihiperálgia induzida pelo OECA

Para verificar o envolvimento dos receptores CB₁ periféricos sobre a atividade antihiperálgica do OECA, os animais foram submetidos a CIP e 24 horas após, foram pré-tratados pela via i.pl. com AM281 (10 µg/i.pl.) ou salina (20 µl/i.pl.). Após 15 minutos os animais foram submetidos a inalação do OECA durante 30 minutos. A hiperálgia mecânica foi avaliada 30 minutos após o término da inalação.¹²⁵ Neste experimento foram utilizados os seguintes grupos ($n = 8$) (Figura 12): 1) Salina (20 µl/i.pl.) + Inalação Salina; 2) Salina (20 µl/i.pl.) + OECA 30 minutos; 3) AM281 (10 µg/i.pl.) + Inalação Salina; 4) AM281 (10 µg/i.pl.) + OECA 30 minutos.

4.3.7.2.2 Experimento 7: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB₂ periféricos na antihiperálgia induzida pelo OECA

Para avaliar o envolvimento dos receptores CB₂ periféricos sobre a atividade antihiperálgica do OECA, os animais foram submetidos a CIP e 24 horas após, foram pré-tratados pela via i.pl. com AM630 (4 µg/i.pl.) ou salina (20 µl/i.pl.). Após 15 minutos os animais foram submetidos a inalação do OECA durante 30 minutos. A hiperálgia mecânica foi avaliada 30 minutos após o término da inalação.¹²⁵ Para este experimento foram utilizados os seguintes grupos ($n = 8$) (Figura 12): 1) Salina (20 µl/i.pl.) + Inalação Salina; 2) Salina (20 µl/i.pl.) + OECA 30 minutos; 3) AM630 (4 µg/i.pl.) + Inalação Salina; 4) AM630 (4 µg/i.pl.) + OECA 30 minutos.

Figura 12 – Desenho experimental – envolvimento dos receptores canabinóides periféricos



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.3.7.3 Procedimento para realização da injeção intratecal

A administração central foi realizada pela via intratecal (i.t.), como descrita previamente por Hylden e Wilcox (1980).¹²⁹ Os animais foram mantidos conscientes e a pele do dorso foi raspada, para a aplicação da injeção eles foram contidos com a mão, deixando a coluna vertebral arqueada, e uma agulha de calibre 30 foi introduzida no espaço subaracnóide entre as vértebras L4 e L5. A aplicação correta da injeção i.t. é verificada após posicionamento da ponta de agulha e confirmada por uma resposta de retirada da cauda característica no animal. O volume de 5 µl da solução foi injetado lentamente com uma micro-seringa Hamilton de 25 µl (Hamilton, Birmingham, Reino Unido). A injeção i.t. foi administrada por um período de 5 segundos.

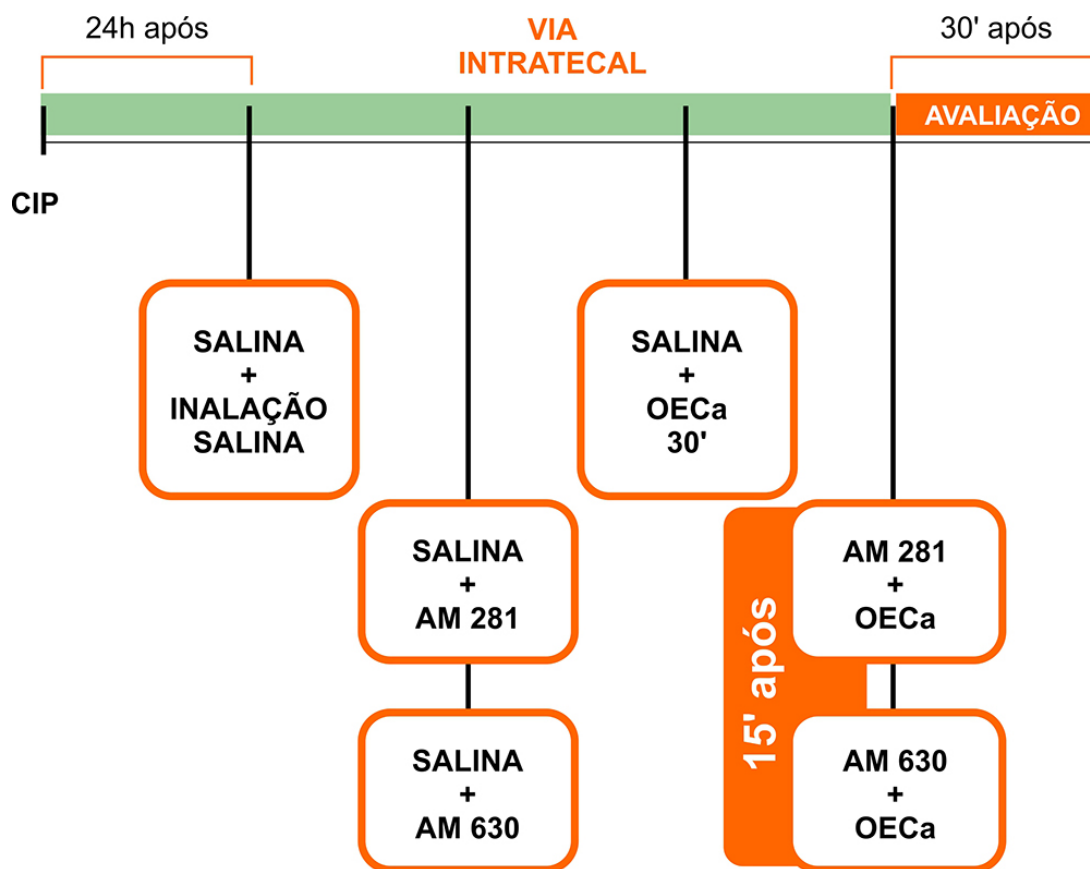
4.3.7.3.1 Experimento 8: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB₁ espinais na antihiperlgesia induzida pelo OECA

Para determinar o envolvimento dos receptores CB₁ centrais (espinais) sobre a atividade antihiperlgesia do OECA, os animais foram submetidos a CIP e 24 horas após, foram pré-tratados pela via i.t. com AM281 (2 µg/i.t.) ou salina (20 µl/i.t.). Após 15 minutos os animais foram submetidos a inalação do OECA durante 30 minutos. A hiperlgesia mecânica foi avaliada 30 minutos após o término da inalação.¹²⁵ Neste experimento foram utilizados os seguintes grupos ($n = 8$) (Figura 13): 1) Salina (20 µl/i.t.) + Inalação Salina; 2) Salina (20 µl/i.t.) + OECA 30 minutos; 3) AM281 (10 µg/i.t.) + Inalação Salina; 4) AM281 (10 µg/i.t.) + OECA 30 minutos.

4.3.7.3.2 Experimento 9: análise do envolvimento dos receptores canabinóides CB₂ espinais na antihiperlgesia induzida pelo OECA

Para avaliar o envolvimento dos receptores CB₂ centrais (espinais) sobre a atividade antihiperlgesia do OECA, os animais foram submetidos a CIP e 24 horas após, foram pré-tratados pela via i.t. com AM630 (2 µg/i.t.) ou salina (20 µl/i.t.). Após 15 minutos os animais foram submetidos a inalação do OECA durante 30 minutos. A hiperlgesia mecânica foi avaliada 30 minutos após o término da inalação.¹²⁵ Neste experimento foram utilizados os seguintes grupos ($n = 8$) (Figura 13): 1) Salina (20 µl/i.t.) + Inalação Salina; 2) Salina (20 µl/i.t.) + OECA 30 minutos; 3) AM630 (2 µg/i.t.) + Inalação Salina; 4) AM630 (2 µg/i.t.) + OECA 30 minutos.

Figura 13 – Desenho experimental – envolvimento dos receptores canabinóides espinais



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

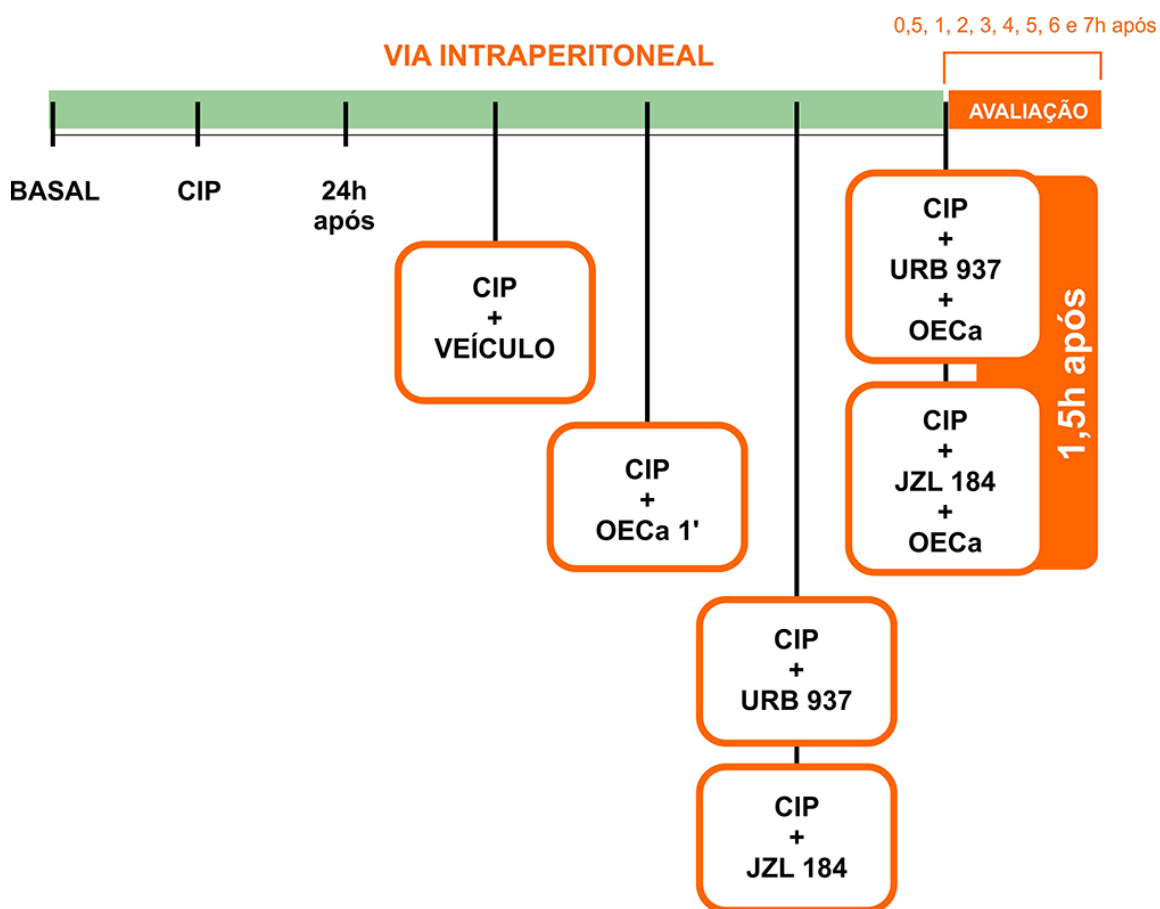
4.3.7.4 Experimento 10: avaliação do efeito sinérgico do OECa com o inibidor da amido hidrolase de ácidos graxos

Com o objetivo de verificar o efeito do sinergismo entre um inibidor da enzima FAAH e do OECa sobre a dor pós operatória, os animais foram submetidos a CIP, 24 horas após foram pré-tratados com uma dose subefetiva de URB937 (0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.), 1,5 horas após receberam tratamento com OECa de 1 minuto, um tempo subefetivo do OECa. A hiperalgesia mecânica foi avaliada em 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas após o tratamento com o OECa.¹²⁵ Neste experimento foram utilizados os seguintes grupos ($n = 8$) (Figura 14): 1) CIP + Veículo (10 mg/kg, i.p.); 2) CIP + Inalação OECa 1 minuto; 3) CIP + URB937 (0,1 mg/kg, i.p.) e 4) CIP + URB937 (0,1 mg/kg, i.p.) + Inalação OECa 1 minuto.

4.3.7.5 Experimento 11: avaliação do efeito sinérgico do OECa com o inibidor da lipase mono acil glicerol

Com o intuito de avaliar o efeito do sinergismo entre uma dose subefetiva de inibidor da enzima MAGL e do OECa sobre a dor pós operatória, os animais foram submetidos a CIP e 24 horas após foram pré-tratados com uma dose subefetiva de um inibidor da enzima MAGL o JZL184 (1,6 mg/kg) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), 1,5 horas após receberam tratamento por via inalatória com OECa por 1 minuto. A hiperalgesia mecânica foi avaliada em 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas após o tratamento com o OECa.¹²⁵ Neste experimento foram utilizados os seguintes grupos ($n = 8$) (Figura 14): 1) CIP + Veículo (10 mg/kg, i.p.); 2) CIP + Inalação OECa 1 minuto; 3) CIP + JZL184 (1,6 mg/kg, i.p.) e 4) CIP + JZL184 (1,6 mg/kg, i.p.) + Inalação OECa 1 minuto.

Figura 14 – Desenho experimental – efeito sinérgico



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

4.3.8 Morte Indolor Assistida dos animais

Para realizar o método de Morte Indolor Assistida (MIA) após os experimentos foram obedecidas as disposições da resolução número 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) de 12 de maio de 2012, bem como da Instrução Normativa número 13 – Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) de 20 de setembro de 2013, sendo o procedimento realizado pelo Médico Veterinário responsável pelo Biotério Experimental do Laboratório Sandro Melim Sgrott, CRMV/ SC 03844, por sobredose anestésica (cloridrato de xilazina 30 mg/kg associado a cloridrato de dextrocetamina 150mg/kg IM) seguida de aplicação de solução eutanásica T61®, por via intraperitoneal.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

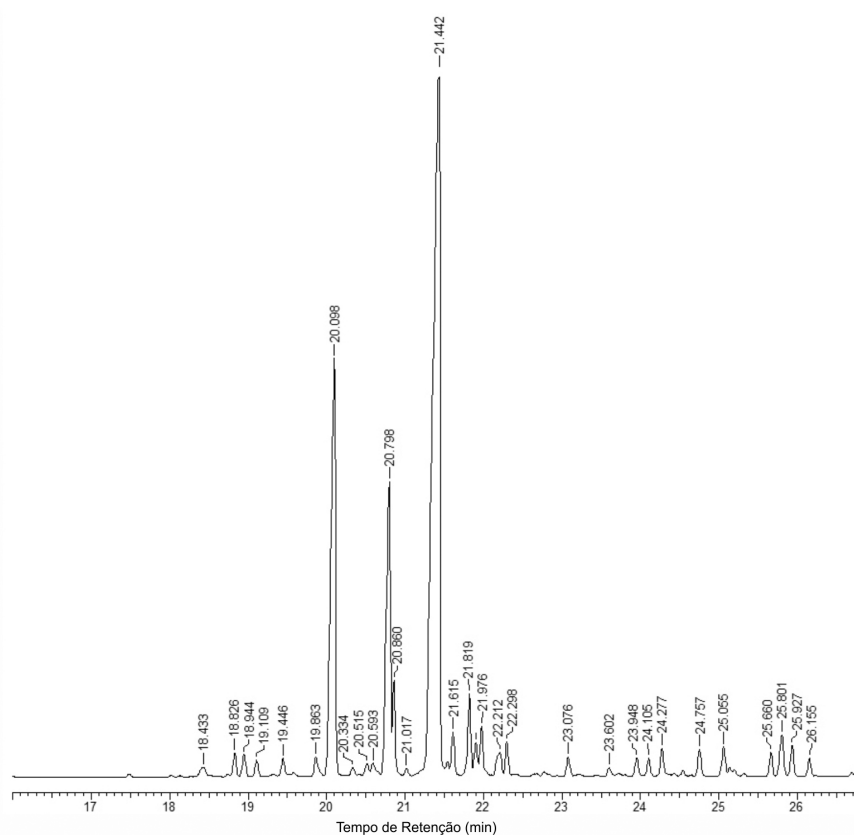
Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Apenas na análise do efeito diário (0 à 6 dias) da inalação com o OECa foi realizada análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni, para múltiplas comparações. Para os demais resultados foi utilizado a ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Em todas as análises, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Para o cálculo estatístico, foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1 – ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS DO ÓLEO ESSENCIAL *Cedrus atlantica*

A análise dos componentes do OECA foi obtida por meio da comparação dos dados de espectros de massa obtidos por GC-MS, de índices de retenção (IR) calculados e dados da literatura.¹²⁰ As substâncias identificadas com a análise estão apresentadas na Tabela 1 e os dados espectrais na Figura 15. No total, foram identificados vinte e um elementos constituintes (90,2%), sendo considerados doze hidrocarbonetos sesquiterpenos (83,6%) e nove sesquiterpenos oxigenados (6,6%). Dentre os compostos encontrados, os hidrocarbonetos sesquiterpenos α -himachaleno (16,6%), γ -himachaleno (10,4%) e β -himachaleno (46,4%) são os compostos majoritários, em que o componente β -himachaleno é o mais abundante e representa praticamente a metade da percentagem da composição de óleo.

Figura 15 – Perfil fitoquímico do óleo essencial *Cedrus atlantica*.



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial *Cedrus atlantica*

Componentes	TR* (min)	IR**	Concentração (%)
Iso-longifoleno (1)	18,826	1387	0,6
β -cubebeno (2)	18,944	1390	0,6
α -cedreno (3)	19,109	1409	0,5
α -himachaleno (4)	20,098	1447	16,6
γ -Gurjuneno (5)	20,593	1470	0,5
γ -himachaleno (6)	20,798	1480	10,4
ar-curcumeno (7)	20,860	1483	2,3
β -himachaleno (8)	21,442	1510	46,4
α -dehydro-ar-himachaleno (9)	21,615	1518	1,2
δ -cadineno (10)	21,819	1527	2,3
γ -dehydro-ar-himachaleno (11)	21,976	1532	1,4
α -calacoreno (12)	22,298	1548	0,8
óxido de himachaleno (13)	23,076	1582	0,6
β óxido de himachaleno (14)	23,602	1605	0,2
α -acorenol (15)	24,227	1631	0,8
himachalol (16)	24,757	1648	0,7
bulnesol (17)	25,055	1660	0,9
Z- γ -atlantona (18)	25,660	1682	0,6
deodarona (19)	25,801	1687	1,5
E- γ -atlantona (20)	25,927	1692	0,9
Z- α -atlantona (21)	26,155	1701	0,4
Total			90,2

*TR, tempo de retenção

** IR, índice de retenção

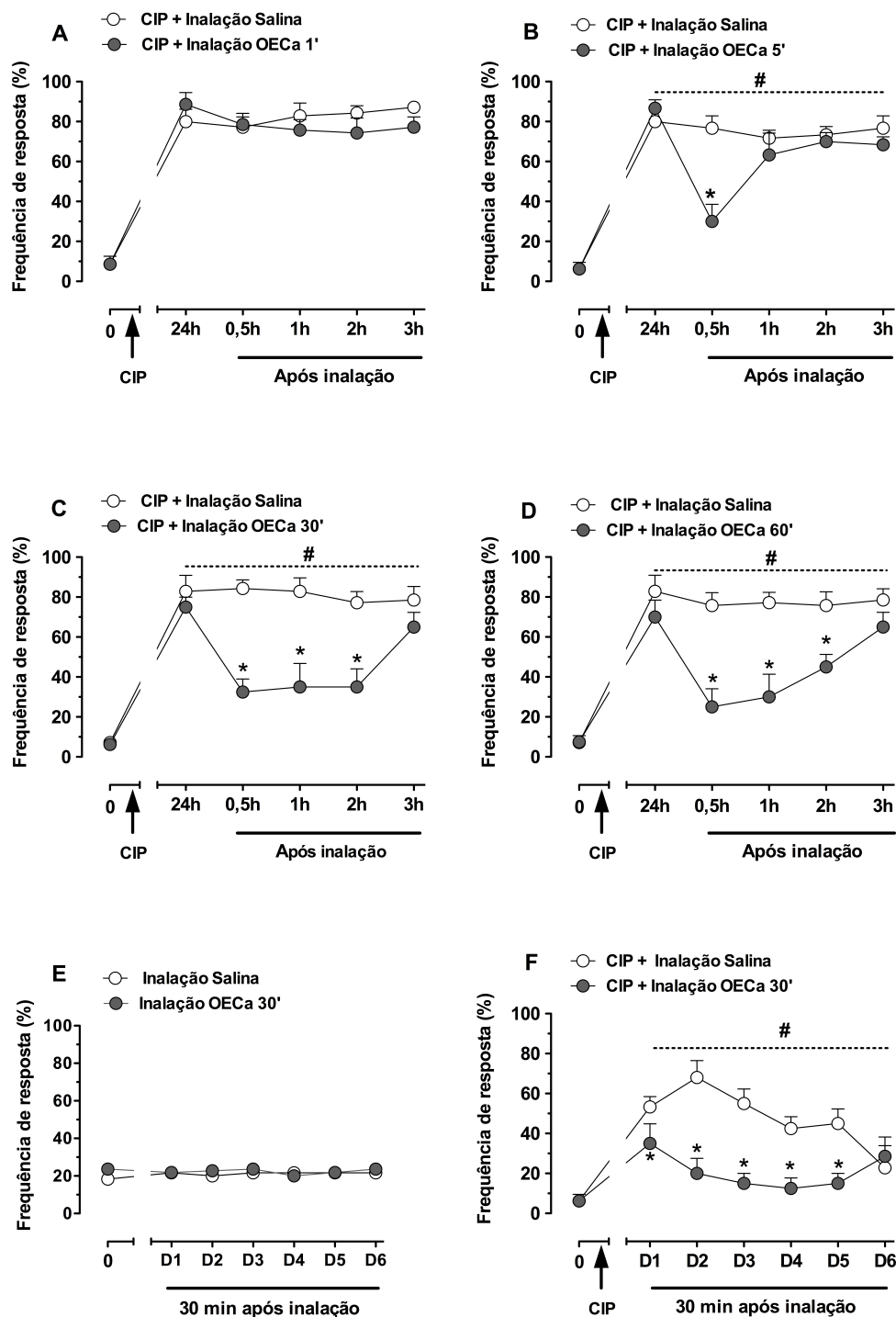
5.2 EFEITO ANTIHIPERALGÉSICO DA INALAÇÃO DO OECA

5.2.1 Experimento 2 e 3: determinação do tempo de inalação e efeito da inalação diária

Os resultados apresentados na figura 16A demonstram que o tratamento dos animais com Inalação Salina (200 μ l) ou OECA por 1 minuto não apresentaram diferença estatística em todos os tempos avaliados após os tratamentos. A figura 16B mostra que os animais que permaneceram inalando o OECA por 5 minutos (OECA 5 minutos) apresentaram um efeito antihiperálgico ($p < 0,05$) somente 30 minutos após a inalação quando comparado com o grupo controle (Inalação Salina). No entanto, nas Figuras 16C e 16D foi possível verificar que quando os animais inalaram por 30 (OECA 30 minutos) ou 60 minutos (OECA 60 minutos), respectivamente, observou-se uma redução ($p < 0,05$) da hiperálgia mecânica em até 2 horas após o tratamento quando comparado com o grupo controle.

Na análise do efeito da inalação diária do OECA, verifica-se na figura 16F que o protocolo de exposição por 6 dias por 30 minutos diários, diminuiu significativamente a hiperálgia mecânica, até o quinto dia, onde os animais ainda apresentavam dor. No sexto dia o limiar dos animais voltaram a valores basais. Além disso, foi verificado que os animais que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico mas inalaram o OE durante 6 dias consecutivos não apresentaram alterações dos seus limiares sensoriais (figura 16E).

Figura 16 – Efeito antihiperálgico do OECA



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

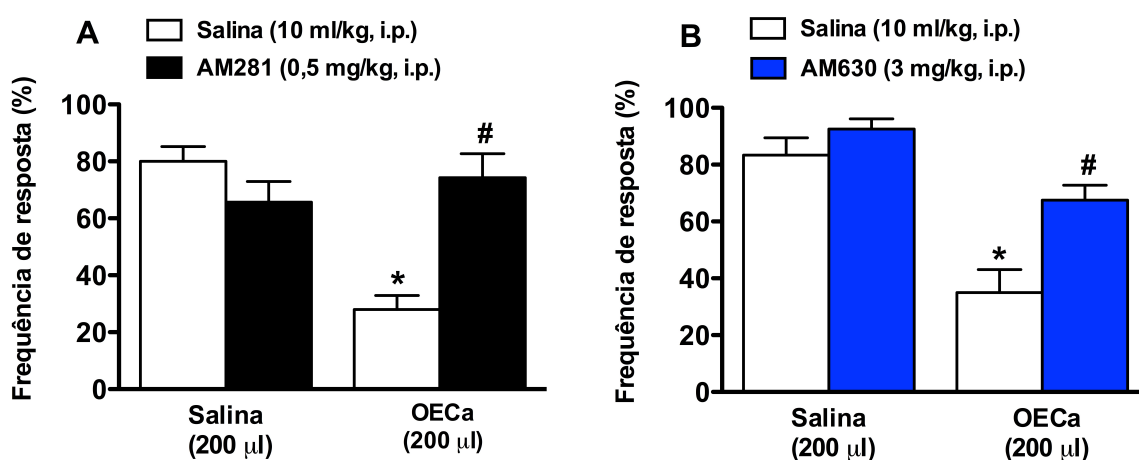
Legenda: Avaliação do efeito de diferentes tempos de inalação do OECA na hiperálgia mecânica (painéis A-D). Efeito *per se* do OECA (painel E). Efeito da inalação diária do OECA por 6 dias consecutivos (painel F). Cada ponto representa a média dos valores obtidos de 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. * $p = 0,05$ quando comparado com o grupo controle. # $p = 0,05$ quando comparado com a avaliação no tempo 0. A diferença estatisticamente significativa foi determinada pela ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. CIP: cirurgia de incisão plantar. D: dia. 0: limiar sensorial basal.

5.3 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA CANABINÓIDE NO EFEITO ANTIHIPERALGÉSICO DO OECA

5.3.1 Experimento 4 e 5 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂ sistêmicos

Os resultados apresentados nas figuras 17 demonstram que a pré administração de salina i.p. e a Inalação Salina não reduzem a hiperalgesia mecânica. Além disso, o pré-tratamento dos animais com AM281 (painel A) ou AM630 (painel B) e Inalação Salina também não alteraram os limiares nociceptivos dos animais. No entanto, a inalação por 30 minutos (OECA 30 minutos) produziu um pronunciado efeito antihiperálgico ($p \leq 0,05$) no qual foi prevenido pelos pré-tratamentos dos animais com AM281 (painel A) ou AM630 (painel B).

Figura 17 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides sistêmicos



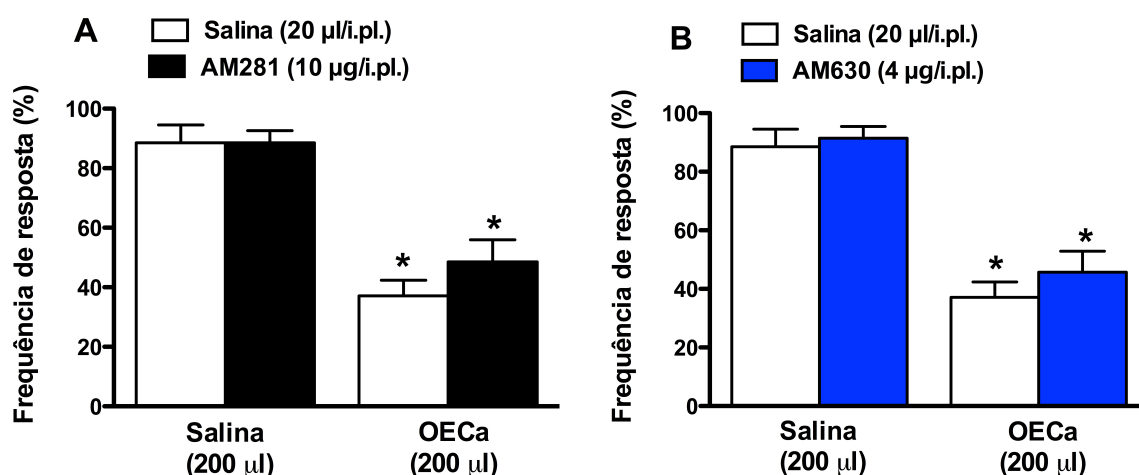
Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Legenda: Avaliação do envolvimento dos receptores CB₁ (painel A) e CB₂ (painel B) sistêmicos no efeito antihiperálgico do OECA. 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 (Salina + Inalação Salina). # $p = 0,05$ quando comparado com o grupo que inalou o OE (Salina + OECA 30 minutos). A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. AM281: antagonista de receptores CB₁. AM630: antagonista de receptores CB₂. OECA: óleo essencial *Cedrus atlantica*.

5.3.2 Experimento 6 e 7 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂ periféricos

Os resultados apresentados na Figura 18 demonstram que a pré administração de salina i.p. e a Inalação Salina não reduzem a hiperalgesia mecânica. O pré-tratamento dos animais com AM281 (painel A) ou AM630 (painel B) e Inalação Salina também não alteraram os limiares nociceptivos dos animais. No entanto, a inalação por 30 minutos (OECa 30 minutos) produziu um pronunciado efeito antihiperálgico ($p \leq 0,05$), o qual não foi prevenido pelos pré-tratamentos dos animais com AM281 (painel A) ou AM630 (painel B).

Figura 18 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides periféricos



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

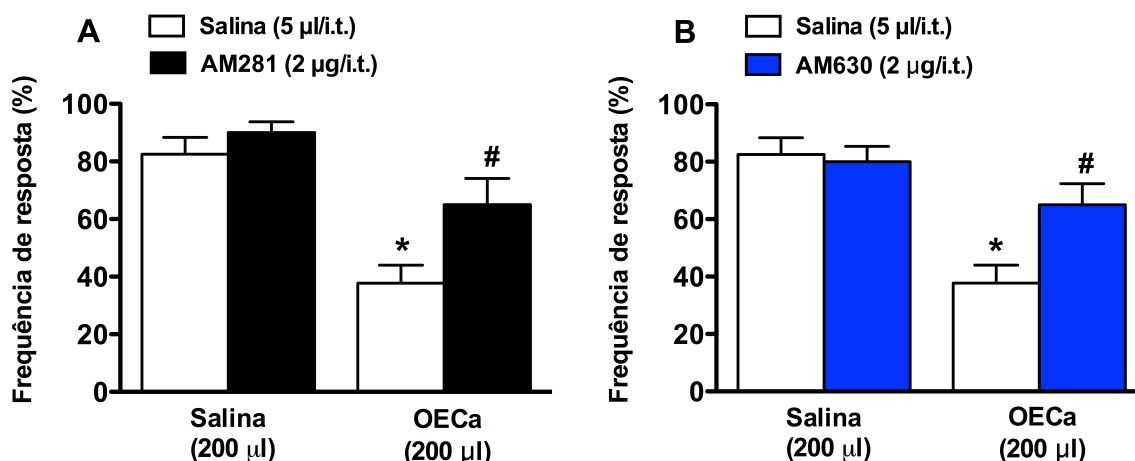
Legenda: Avaliação do envolvimento dos receptores CB₁ (painel A) e CB₂ (painel B) periféricos no efeito antihiperálgico do OECa. Cada coluna representa a média dos valores obtidos em 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. * $p = 0,05$ quando comparado com o grupo controle (Salina + Inalação Salina). # $p = 0,05$ quando comparado com o grupo que inalou o OE (Salina + OECa 30 minutos). A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. AM281: antagonista de receptores CB₁. AM630: antagonista de receptores CB₂. OECa: óleo essencial *Cedrus atlantica*.

5.3.3 Experimento 8 e 9 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂ centrais (espinais)

Os resultados apresentados na Figura 19 demonstram que a pré administração de salina i.p. e a Inalação Salina não reduzem a hiperalgesia mecânica. Além disso, o pré-tratamento dos animais com AM281 (painel A) ou AM630 (painel B) e Inalação Salina também não alteraram os limiares nociceptivos dos animais. No entanto, a inalação por 30

minutos (OECa 30 minutos) produziu um pronunciado efeito antihiperálgico ($p \leq 0,05$) no qual foi prevenido pelos pré-tratamentos dos animais com AM281 (painel A) ou AM630 (painel B).

Figura 19 – Avaliação do envolvimento dos receptores canabinóides espinais



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Legenda: Avaliação do envolvimento dos receptores CB₁ (painel A) e CB₂ (painel B) espinais no efeito antihiperálgico do OECa. 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 (Salina + Inalação Salina). # $p = 0,05$ quando comparado com o grupo que inalou o OE (Salina + OECa 30 minutos). A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. AM281: antagonista de receptores CB₁. AM630: antagonista de receptores CB₂. OECa: óleo essencial *Cedrus atlantica*.

5.4 SINERGISMO DO EFEITO DA INALAÇÃO DO OECa COM INIBIDORES DA DEGRADAÇÃO DE ENDOCANABINÓIDES

5.4.1 Experimento 10 – Avaliação do efeito sinérgico do OECa com o inibidor da FAAH

Para verificar se existe sinergismo entre o efeito da inalação do OECa e o efeito de inibidor das enzimas de degradação de endocanabinóides, foi realizada a administração de uma dose subefetiva de um inibidor seguida pela inalação do OECa por um tempo que apresenta um efeito subefetivo (1 minuto).

Na Figura 20 (painel A) é possível observar que o pré-tratamento com uma dose subefetiva do inibidor URB937 (0,1 mg/kg, i.p.) não apresentou efeito antihiperálgico quando comparado com o grupo controle (CIP + Veículo [10 ml/kg, i.p.]). O OECa quando inalado por 1 minuto (CIP + Inalação OECa 1 minuto) também não apresentou alteração do

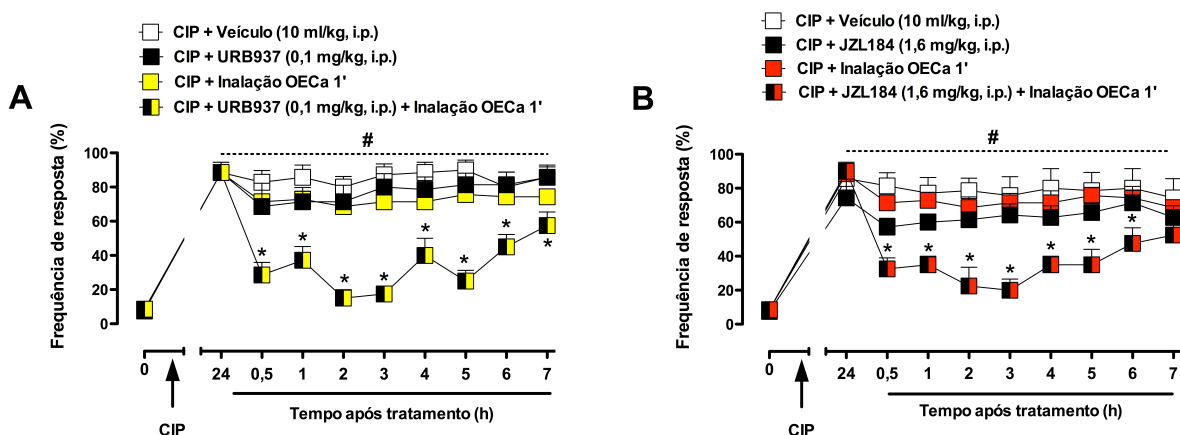
limiar hiperalgésico dos animais quando comparado ao grupo controle. No entanto, quando os animais receberam o pré-tratamento com URB937 (0,1 mg/kg, i.p.) e após 1,5 horas inalaram OECA por 1 minutos (CIP + URB937 [0,1 mg/kg, i.p.] + Inalação OECA 1 minuto) apresentaram um efeito antihiperalgésico de até 7 horas após inalação. Estes resultados mostram que existe um sinergismo entre os tratamentos realizados.

5.4.2 Experimento 11 – Avaliação do efeito sinérgico do OECA com o inibidor da MAGL

Para avaliar se existe sinergismo entre o efeito da inalação do OECA e o efeito de inibidor das enzimas de degradação de endocanabinóides, foi utilizado a união dos seguintes tratamentos: a administração de uma dose subefetiva de um inibidor seguida pela inalação do OECA por um tempo que apresenta um efeito subefetivo (1 minuto).

Na Figura 20 (painel B) é possível observar que o pré-tratamento com uma dose subefetiva do inibidor JZL184 (1,6 mg/kg,i.p.) não apresentou efeito antihiperalgésico quando comparado com o grupo controle (CIP + Veículo [10 ml/kg, i.p.]). O OECA quando inalado por 1 minuto (CIP + Inalação OECA 1 minuto) também não apresentou alteração do limiar hiperalgésico dos animais quando comparado ao grupo controle. No entanto, quando os animais receberam o pré-tratamento com JZL184 (1,6 mg/kg,i.p.) e após 1,5 horas inalaram OECA por 1 minutos (CIP + JZL184 [1,6 mg/kg,i.p.] + Inalação OECA 1') apresentaram um efeito antihiperalgésico de até 6 horas após inalação. Estes resultados mostram que existe um sinergismo entre os tratamentos realizados.

Figura 20 – Sinergismo do efeito da inalação do OEa com inibidores da degradação de endocanabinóides



Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Legenda: Avaliação do envolvimento sinérgico do efeito da inalação do OEa com inibidores da degradação de endocanabinóides. Cada ponto 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 (CIP + Veículo [10 ml/kg, i.p.]). # $p = 0,05$ quando comparado com o grupo que inalou o OE (CIP + Inalação OEa 1 minuto). A análise estatística foi realizada pela ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni. CIP: cirurgia de incisão plantar. 0: limiar basal de retirada da pata. h: horas após o tratamento. FAAH: amido hidrolase de ácidos graxos. MAGL: lipase mono acil glycerol. URB937: inibidor da enzima FAAH. JZL184: inibidor da enzima MAGL. OEa: óleo essencial *Cedrus atlantica*.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo demonstrou-se que a inalação do OECA produz efeito antihiperálgico em um modelo pré-clínico de dor pós-operatória. No qual, foi também verificado pelo nosso grupo, que este efeito é mediado pela ativação do sistema descendente inibitório da dor, envolvendo os sistemas opioidérgico, serotoninérgico e noradrenérgico.¹³⁰ Aqui, demonstrou-se que este efeito é também dependente da ativação do sistema endocanabinóide. O envolvimento do sistema endocanabinóide é suportado neste estudo pelas seguintes evidências: i) as administrações sistêmica e central (espinal) dos antagonistas para os receptores canabinóides preveniram o efeito antihiperálgico do OECA; e ii) o pré-tratamentos dos animais com dose sub-efetiva dos inibidores da degradação de endocanabinóides induziu um efeito duradouro do OECA, por um tempo de inalação que antes não produzia efeito antihiperálgico.

O controle da dor envolve ativação ou inibição de uma série de complexos sistemas endógenos que culminam principalmente em inibir a atividades de fibras ascendentes nociceptivas.⁵ Tem sido demonstrado, que vários sistemas participam desta regulação, destacando os sistemas opioidérgico, serotoninérgico, noradrenérgico e mais recentemente o sistema endocanabinóide.¹³¹ Dentro do SNC, existem sistemas descendentes que participam da modulação endógena da percepção da dor. De interesse particular, estes sistemas (vias) projetam-se para a SCP e para o BVMR que consequentemente inibe a neurotransmissão nociceptiva no corno posterior da medula espinal.¹³²

Estudos prévios tem mostrado, que a ativação de vias descendentes inibitórias resultam em analgesia após cirurgias. Em estudos pré-clínicos, utilizando o modelo de incisão plantar em ratos, foi observado que a atividade tônica do sistema descendente noradrenérgico, está aparentemente mais ativa no período pós operatório.¹³³ Corroborando com esses achados, foi demonstrado que ratos submetidos a incisão plantar, apresentam hiperálgia mais intensa quando submetidos a lesão ou bloqueio neural do núcleo pré tectal anterior, uma estrutura do mesencéfalo, envolvida nas vias descendentes que age no controle das entradas nociceptivas no corno posterior da medula espinal.^{134,135} Finalmente, tem sido extensamente mostrado que estes centros modulatórios da dor no tronco encefálico, podem reduzir a dor (hiperálgia) por intermédio de fibras de projeções serotoninérgicas e noradrenérgicas que agem por meio da ativação de seus receptores a nível espinal.¹⁴

Neste sentido, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa,¹³⁰ demonstrou que o efeito antihiperálgico do OECA, no modelo pré-clínico de dor pós-operatória é mediado

pelos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico. Esta afirmação está baseada no fato que o pré-tratamento dos animais com *p*-clorofenilalanina (PCPA) – um inibidor da síntese de serotonina ou com Alfa-metilparatirosina (AMPT) – inibidor da síntese de noradrenalina, preveniram o tratamento antihiperálgico da inalação do OECA. Assim estes, dados sugerem que a inalação do OECA é capaz de ativar vias descendentes serotoninérgica e noradrenérgica inibitórias da dor, vias estas, consideradas principais na modulação descendente da dor.^{14,13}

Por outro lado, tem sido constatado que os principais endocanabinóides como a AEA e o 2-AG, produzem potente efeito antihiperálgico em modelos pré-clínicos de dor, incluindo dores agudas, inflamatórias e neuropáticas.^{136,46,137} O mesmo efeito também foi observado em estudos em humanos saudáveis e pacientes com dores.¹³⁸ Recentes evidências apontam para uma interação entre os sistemas endocanabinóide, serotoninérgico e noradrenérgico no controle descendente inibitório da dor.¹⁹

No presente estudo, foi constatado o envolvimento do sistema endocanabinóide no controle da dor pós-operatória induzido pela inalação do OECA. Esta afirmação se dá pelo fato que inicialmente a administração sistêmica dos antagonistas para os receptores CB₁ e CB₂, AM281 ou AM630 respectivamente, preveniram o efeito antihiperálgico do OECA. Outro interessante achado do presente estudo foi que quando os animais receberam pré-tratamento pela via intratecal com os antagonistas dos receptores CB₁ e CB₂, o efeito antihiperálgico produzido pelo OECA foi prevenido. Com isso, confirma-se o envolvimento dos receptores canabinóides sistêmicos e especificamente os espinais no efeito antihiperálgico causado pelo OECA no controle da dor pós-operatória. No entanto, o pré-tratamento deste animais por meio da administração periférica desses mesmos antagonistas, não preveniu o efeito do OECA, desse modo, exclui-se o envolvimento dos receptores periféricos no efeito causado pelo óleo essencial.

Esses resultados também são suportados por evidências na literatura que demonstram a expressão de receptores canabinóides principalmente em estruturas do SNC (medula espinal, incluindo núcleos do tronco encefálico) envolvidas na modulação da dor. Os efeitos analgésicos produzido pelos canabinóides, podem ocorrer principalmente por meio da ativação de receptores CB₁ no cérebro, medula espinal, mas também em alguns sítios periféricos.^{59,46,43}

Estudos tem lançado a hipótese de que a analgesia endocanabinóide é mediada indiretamente por meio de receptores canabinóide CB₁ que inibem interneurônios GABAérgicos nas terminações nervosas que modulam a atividade dos neurônios glutamatérgicos na SCP e no BVMR. Isso faz, com que haja uma liberação tônica de

neurotransmissores glutamatérgicos que consequentemente ativa o circuito descendente SCP-BVMR-corno posterior da medula espinal. Assim entende-se que a desinibição GABAérgica mediada por canabinóides, inibe a transmissão nociceptiva ao nível da medular.¹³²

Os endocanabinóides AEA e 2-AG, são considerados agonista dos receptores CB₁ e CB₂, no entanto, a AEA é agonista parcial e 2-AG, agonista total.^{139,140} Neste sentido inibidores da degradação tais como o inibidor da enzima FAAH que degrada a AEA e da MAGL que degrada o 2-AG, são potenciais terapêuticos comprovados em modelos pré-clínicos de dor pós-operatória.^{43,125} Nesse sentido, no presente estudo após a identificação do possível envolvimento dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂ sistêmicos e centrais no efeito antihiperálgico do OECA, os esforços se direcionaram em analisar o possível efeito do OECA sobre estas enzimas de degradação. Para tal objetivo foi verificado se existe sinergismo entre a inalação do OECA com inibidores da degradação de endocanabinóides. Observou-se que a administração de uma dose sub-efetiva dos inibidores da degradação de endocanabinóides induziu um efeito duradouro do OECA por um tempo de inalação que antes não produzia efeito antihiperálgico. Assim sugere-se, que uma das maneiras pelas quais o OECA produz seu efeito por ativar receptores canabinóides, seja inibir a atividade dessas enzimas de degradação. Consequentemente, este fenômeno favoreça a permanência destes endocanabinóides por mais tempo na fenda sináptica e promova ativação dos receptores CB₁ e CB₂.

As plantas medicinais e seus metabolitos secundários disponibilizam uma diversa fonte de compostos considerados alvo para produtos terapêuticos e desenvolvimento de medicamentos analgésicos.^{141,142} Dentre os metabolitos, os óleos essenciais são uma classe importante e apresentam efeitos farmacológicos que podem ser explicados devido a diversidade da composição química estrutural em sua composição. Pertencem a diferentes classes químicas e dentre elas destaca-se os terpenos.¹⁴³ Os monoterpenos e sesquiterpenos, estão presentes em 90% dos óleos essenciais⁸³ e geralmente são responsáveis pelo efeito analgésico.^{144,145}

Nesse sentido, foi pertinente no presente estudo verificar o perfil fitoquímico do OECA. Com os dados obtidos a partir da análise GC-MS, foram encontrados hidrocarbonetos sesquiterpenos α -himachaleno (16,6%), γ -himachaleno (10,4%) e β -himachaleno (46,4%) como compostos majoritários, em que o componente β -himachaleno é o mais abundante e representa praticamente a metade da percentagem da composição de óleo. Esses dados estão de acordo com os resultados encontrados na literatura, que descrevem a composição química do OECA identificando como compostos majoritários α -himachaleno (7,4 - 16,4%), γ -

himachaleno (5,1 - 8,6%), β -himachaleno (23,4 - 40,4%) e (E)- α - atlantona (5,2 - 29,5%).^{120,146,75,147}

Na literatura, a aromaterapia é extensamente estudada para o tratamento da dor, tanto em estudos pré-clínicos^{76,148,149} como em estudos clínicos.^{91,150,151,152} Os óleos essenciais são substâncias muito complexas, podem conter entre 20 a 60 componentes distintos em diferentes concentrações. Geralmente são caracterizados por apenas dois ou três componentes principais presentes em concentrações elevadas (20-70%) em comparação com os outros componentes presentes em quantidades menores. Acredita-se que os efeitos produzidos pelos óleos essenciais são devido a sinergia e interação de todas as moléculas.⁸³

Na literatura está bem estabelecido que a percepção de dor pode ser alterada por um componente emocional.¹⁵³ Neste sentido, como a utilização de odores agradáveis ou desagradáveis podem modular o estado emocional, consequentemente podem alterar também a percepção da dor. Assim neste contexto, a aromaterapia pode induzir efeito analgésico indireto.^{154,155} A aromaterapia é indicada como um dos possíveis métodos de redução da dor peri-operatória.¹⁵⁶ Um ensaio clínico randomizado realizado com pacientes pediátricos, avaliou o efeito do óleo essencial de lavanda na dor pós-operatória, os autores observaram que nos pacientes que inalaram o óleo essencial a quantidade de analgésicos solicitados no período pós operatório foi menor do que nos controles.¹⁵⁷ Pelo fato da aromaterapia ser uma forma de terapia geralmente segura, não invasiva e não apresentar efeitos colaterais, torna-se uma ferramenta interessante no tratamento da dor.

No presente estudou-se os efeitos antihiperálgico do OECA. Um aspecto interessante dos efeitos dos óleos essenciais é a via pela qual eles exercem seus efeitos sobre um sistema biológico. A via inalatória tem sido recentemente estudada como uma nova e potente abordagem de medicamentos analgésicos.¹¹⁷ Pelo fato da fossa nasal possuir neurônios (olfativos) os quais fazem conexões diretas com estruturas importantes (centrais) no controle das emoções e dor,^{158,113} faz da via inalatória um alvo importante no tratamento da dor. Tem sido postulado que as moléculas odoríficas exaladas pelos óleos essenciais são transformados em sinais químicos e ativam os neurônios olfativos, que conduzem as informações ao SNC.¹⁰⁸ A informação é transmitida por meio de neurônios de primeira ordem para o bulbo olfativo que, por sua vez, projeta as informações para regiões como o tálamo e córtex, e possivelmente, para outras regiões do sistema límbico, interagindo com essas estruturas produzindo respostas fisiológicas.¹⁵⁹

No entanto, o efeito observado pela inalação não deve somente a estimulação de neurônios olfativos conectados com estruturas do SNC, pode ser também pelo fato que após a

inalação, as moléculas podem ser transportadas a partir do epitélio olfativo chegam as membranas pulmonares e por meio dos capilares pulmonares atingem a circulação sanguínea sistêmica, produzindo assim, um efeito sistêmico, que podem exercer efeitos tanto periféricos como centrais.¹⁵⁹

Um estudo demonstrou que a administração de morfina por meio da via inalatória apresentou efeito analgésico eficiente em pacientes em pós-operatório.¹¹⁷ Este efeito pode ser explicado devido as moléculas ao serem inaladas são absorvidas rapidamente devido à grande área de superfície e elevada permeabilidade da membrana alveolar. Considerando assim, que esta via de administração de medicamentos é uma forma de tratamento simples, rápida, não invasiva, segura e eficaz no alívio da dor.^{160,161} A via inalatória é a forma de administração mais indicada para a utilização dos óleos essenciais. E uma das explicações para o mecanismo neurobiológico que envolve esta via, pode ser baseado na absorção de moléculas voláteis através da mucosa nasal.¹⁰⁶

Com base no exposto acima, ainda continua a questão acerca de como o OECA induz seus efeitos. Pode-se sugerir que os efeitos do OECA podem ser mediados pela ativação de neurônios olfativos que consequentemente ativam regiões específicas no encéfalo responsáveis pela modulação da dor. Assim, futuros estudos são necessários para estabelecer a predominância dos efeitos dos óleos essenciais, seja por via direta sobre o SNC por meio do bulbo olfativo ou via sistêmica por meio das membranas pulmonares.

7 CONCLUSÃO

Com a avaliação dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- Hidrocarbonetos sesquiterpenos β -himachaleno (46,4%), α -himachaleno (16,6%) e γ -himachaleno (10,4%) são os compostos majoritários presentes no OECa utilizado no presente estudo;
- A inalação do OECa por 30 minutos foi o tempo de inalação que produziu maior duração do efeito antihiperálgico;
- A hipótese inicial de que o sistema endocanabinóide (receptores canabinóides CB₁ e CB₂ sistêmicos e espinais) está envolvido no efeito antihiperálgico do OECa foi corroborada;
- O efeito sinérgico observado entre o OECa e os inibidores da degradação de endocanabinóides, confirmam o envolvimento da participação do sistema endocanabinóide no efeito antihiperálgico do OECa.

Dessa forma, os resultados apresentados nesta dissertação demonstram, que o OECa apresenta grande potencial terapêutico no tratamento da dor, sugerindo nova aplicação terapêutica para o OECa. Esta afirmação se justifica pelo evidente efeito do OECa em reduzir a dor e principalmente pela demonstração do mecanismo neurobiológico que medeia este efeito. Assim, a partir desse estudo pré-clínico sugere-se que sejam realizados estudos clínicos a fim de corroborar os presentes resultados e principalmente estabelecer uma nova abordagem no tratamento da dor para a sociedade.

REFERÊNCIAS

- 1 Wall PD. Introduction to the fourth edition. In: Wall PD, Melzack R. Text book of pain. Churchill Livingstone: Londres. 1999. p. 1-8.
- 2 Griffin SC, Tsao JW. A mechanism-based classification of phantom limb pain. *Pain*. 2014;(14):249-8.
- 3 Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008;137(3):473-7.
- 4 Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413(6852):203-10.
- 5 Wilder-Smith CH. The balancing act: endogenous modulation of pain in functional gastrointestinal disorders. 2011. 60:1589–99.
- 6 Steeds CE. The anatomy and physiology of pain. *Surgery*. 2009;27(12): 507-11.
- 7 Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-84.
- 8 Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol*. 2006. 4(3):197-206.
- 9 Fein A. Nociceptores: as células que sentem dor. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line; 2011. Disponível em: www.dol.inf.br/nociceptores.
- 10 Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest* 2010;120: 3779–87.
- 11 Bingel U, Tracey I. Imaging CNS modulation of pain in humans. *Physiology*. 2008. 23:371-80.
- 12 Treister R, Pud D, Ebstein RP, Laiba E, Raz Y, Gershon E et al. Association between polymorphisms in serotonin and dopamine-related genes and endogenous pain modulation. *Pain*. 2011. 12(8):875-83.
- 13 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.
- 14 Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 2002; 66(6):355-474.
- 15 Ren K, Dubner R. Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2008;21(5):570-9.
- 16 Seifert F, Kiefer G, DeCol R, Schmelz M, Maihöfner C. Differential endogenous pain modulation in complex-regional pain syndrome. *Brain*. 2009;132(3):788-800.

- 17 Mason P. Ventromedial medulla: pain modulation and beyond. *J Comp Neurol*. 2005;493(1):2-8.
- 18 Benarroch EE. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. *Neurology*. 2008;71(3):217-21.
- 19 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(1):97-105.
- 20 Li HL. An archaeological and historical account of cannabis in China. *Econ Botany*. 1973;28(4):437-48.
- 21 Malcher-Lopes R, Ribeiro S. Maconha, Cérebro e Saúde. Rio de Janeiro: Vieira & Lent, 2007.
- 22 Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol*. 2006;147(1):163-71.
- 23 Kalant H. Medicinal use of cannabis: history and current status. *Pain Res Manag*. 2001;6(2):80-91.
- 24 Tounsi M. The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs*. 1981;13(1):23-34.
- 25 Fankhauser M. History of Cannabis in Western Medicine. In: Grotenhermen F, Russo EB. (Ed.). *Cannabis and Cannabinoids*. New York: The Haworth Integrative Healing Press. History of Cannabis in Western Medicine. 2002. p.37-51.
- 26 Organização Das Nações Unidas. Convenção de Substâncias Psicotrópicas. 1971.
- 27 Di Marzo V, De Petrocellis L. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med*. 2006;57:553-74.
- 28 Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*. 1964;86:1646.
- 29 Mechoulam R, Hanus L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids*. 2000;108(1-2):1-13.
- 30 Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol*. 1999;58(4):315-48.
- 31 Di Marzo V. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1392:153-75.
- 32 Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(1):83-90.

- 33 Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;215(1):89-97.
- 34 Sugiura T, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids*. 2000;108(1-2):89-106.
- 35 Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301(3):1020-4.
- 36 Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE et al. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(7):3662-5.
- 37 Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agrò A, Hillard C et al. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem*. 2001;268(7):1982-9.
- 38 De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol*. 2004;141(5):765-74.
- 39 Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994;372(6507):686-91.
- 40 Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T. The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;(168):147-85.
- 41 Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neurosci*. 1998;83(2):393-11.
- 42 Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*. 1997;277(5329):1094-7.
- 43 Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009;8(6):403-21.
- 44 Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci*. 2005;8(5):585-9.
- 45 Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR et al. Procannabinoid receptor localization in brain. *Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(5):1932-6.
- 46 Hohmann AG, Suplita RL. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J*. 2006;8:693-708.
- 47 Howlett AC. Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;53-79.

- 48 Bosier B, Muccioli GG, Hermans E, Lambert DM. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(1):1-12.
- 49 Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346(6284):561-4.
- 50 Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5.
- 51 Begg M, Pacher P, Bátkaí S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo FM et al. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther*. 2005;106(2):133-45.
- 52 Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):161-02.
- 53 Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 1995;232(1):54-61.
- 54 Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. 2005;310(5746):329-32.
- 55 Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S et al. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse*. 2004;53(4):208-13.
- 56 Malan TP Jr, Ibrahim MM, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F. Inhibition of pain responses by activation of CB(2) cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids*. 2002;121(1-2):191-200.
- 57 Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A. et al. Cannabinoid CB₂ receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*. 2006;1071(1):10-23.
- 58 Beltramo M. CB₂ receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms. *The Eur J Neurosci*. 2006;23(6):1530-38.
- 59 Dogrul A, Gul H, Akar A, Yildiz O, Bilgin F, Guzeldemir E. Topical cannabinoid antinociception: synergy with spinal sites. *Pain*. 2003;105(1-2):11-6.
- 60 Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol*. 2001;63(5):569-611.
- 61 Kawahara H, Drew GM, Christie MJ, Vaughan CW. Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *Br J Pharmacol*. 2011;163(6):1214-22.

- 62 Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart G. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996;64(3):493-01.
- 63 Zahn PK, Brennan TJ. Lack of effect of intrathecally administered Nmethyl-D-aspartate receptor antagonists in a rat model for postoperative pain. *Anesthesiol Phil*. 1998;88(1):143-56.
- 64 Zahn PK, Umali E, Brennan TJ. Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. *Pain*. 1998;74(2-3):213-23.
- 65 Cousins MJ, Power I, Smith G. 1996 Labat lecture: pain--a persistent problem. *Reg Anesth Pain Med*. 2000;25(1):6-21.
- 66 Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet*. 2006. 13;367(9522):1618-25.
- 67 Oliveira SM, Drewes CC, Silva CR, Trevisan G, Boschen SL, Moreira CG et al. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. *Eur J Pharmacol*. 2011;672(1-3):88-95.
- 68 Pogatzki EM, Gebhart GF, Brennan TJ. Characterization of A delta and C fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. *J Neurophysiol*. 2002;87(2):721-31.
- 69 Brennan TJ. Pathophysiology of postoperative pain. *Pain*. 2011;152(3):33-40.
- 70 Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(5):438-55.
- 71 Alkaitis MS, Solorzano C, Landry RP, Piomelli D, DeLeo JA, Romero-Sandoval EA. Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain. *PLoS One*. 2010;5(5):e10891.
- 72 National Center for Complementary and Alternative Medicine. Fields of Practice: what is CAM? 2014. Disponível em: <<http://nccam.nih.gov/health/whatiscam/overview.htm>>. Acesso em: 30 de outubro de 2014.
- 73 Brasil. Ministério da saúde. Instrução normativa 004/2010. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>> Acesso em: 20 de março de 2014.
- 74 Veiga-Junior VF. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(2):308-13.
- 75 Derwich E, Benziane Z, Boukir A. Chemical Composition and In Vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Cedrus atlantica*. *Int J Agric Biol*. 2010;12(3):381-85.

- 76 Barocelli E, Calcina F, Chiavarinia M, Impicciatore M, Brunib 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.
- 77 Zeng W, Zhang Z, Gao H, Jia L, He Q. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oil from Pine Needle (*Cedrus deodara*) *Journal of Food Science.* 2012;77(7):824-29.
- 78 Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracuncululus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracuncululus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J Agric Food Chem.* 2005;53(24):9452-8.
- 79 Haba E, Bouhdid S, Torrego-Solana N, Marqués AM, Espuny MJ, García-Celma MJ et al. Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: Antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Pharm.* 2014;476(1-2):134-41.
- 80 Cooke B, Ernst E. Aromatherapy: a systematic review. *Br J Gen Pract.* 2000;50(455):493-6.
- 81 Stevensen CJ. Aromatherapy in Dermatology. *Clin Dermatol.* 1998;16(6):689-94.
- 82 Hoare J. Guia Completo de aromaterapia: um curso estruturado para alcançar a excelência profissional. São Paulo: Pensamento; 2010.
- 83 Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):446-75.
- 84 Wolffenbutter AN. Base química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica. São Paulo: Rocca, 2010.
- 85 Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochem.* 2009;70(15-16):1621-37.
- 86 Horowitz S. Aromatherapy: Current and Emerging Applications. *Alternative and Compl Therap.* 2011;17(1):26-31.
- 87 Costa CA, Kohn DO, de Lima VM, Gargano AC, Flório JC, Costa M. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citratus* (lemongrass). *J Ethnopharmacol.* 2011;137(1):828-36.
- 88 Linck VM, Silva AL, Figueiró M, Caramão EB, Moreno PRH, Elisabetsky E. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomed.* 2010;17(8-9):679-83.
- 89 Hur MH, Lee MS, Kim C, Ernst E. Aromatherapy for treatment of hypertension: a systematic review. *J Eval Clin Pract.* 2012;18:37-41.

- 90 Yim VW, Ng AK, Tsang HW, Leung AY. A review on the effects of aromatherapy for patients with depressive symptoms. *J Altern Complement Med* 2009;15(2):187-95.
- 91 Olapour A, Behaeen 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.
- 92 Kim JT, Wajda M, Cuff G, Serota D, Schlame M, Axelrod DM et al. Evaluation of aromatherapy in treating postoperative pain: pilot study. *Pain Pract*. 2006;6(4):273-77.
- 93 Pinheiro BG, Silva AS, Souza GE, Figueiredo JG, Cunha FQ, Lahlou S et al. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *J Ethnopharmacol*. 2011;138(2):479-86.
- 94 Ventura-Martínez R, Rivero-Osorno O, Gómez C, González-Trujano ME. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. *J Ethnopharmacol*. 2011;137(3):1528-32.
- 95 Komiya M, Takeuchi T, Harada E. Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behav Brain Res*. 2006;172(2):240-9.
- 96 Moraes TM, Kushima H, Moleiro FC, Santos RC, Rocha LR, Marques MO et al. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chem Biol Interact*. 2009;180(3):499-505.
- 97 Wang XQ, Ran JH. Evolution and biogeography of gymnosperms. *Mol Phylogenet Evol*. 2014;22(75):24-40.
- 98 Dakir M, El Hanbali F, Mellouki F, Akssira M, Benharref A, Quilez Del Moral JF et al. Antibacterial diterpenoids from *Cedrus atlantica*. *Nat Prod Res*. 2005;19(7):719-22.
- 99 Terrab A, Paun O, Talavera S, Tremetsberger K, Arista M, Stuessy TF. Genetic diversity and population structure in natural populations of Moroccan Atlas cedar (*Cedrus atlantica*; Pinaceae) determined with cpSSR markers. *Am J Bot*. 2006;93(9):1274-80.
- 100 Paoli M, Nam AM, Castola V, Casanova J, Bighelli A. Chemical variability of the Wood Essential Oil of *Cedrus atlantica* MANETTI from Corsica. *Chem Biodivers*. 2011;8(2):344-51.
- 101 Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complem Altern Med*. 2006;6(39):1-8.
- 102 Bouchra C, Achouri M, Idrissi Hassani LM, Hmamouchi M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers Fr. *J Ethnopharmacol*. 2003;89(1):165-9.
- 103 Tholl D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol*. 2006;9(3):297-304.

- 104 Lima DF, Brandão MS, Moura JB, Leitão JMRS, Carvalho FAA, Miúra LMCV et al. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. *J Pharm and Pharm*. 2011;64:283-92.
- 105 Shinde UA, Phadke AS, Nair AM, Mungantiwar AA, Dikshit VJ, Saraf MN. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. wood oil. *J Ethnopharmacol*. 1999;65(1):21-7.
- 106 Buck LB. Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu Rev Neurosci*. 1996;19:517-44.
- 107 Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*. 1991;65(1):175-87.
- 108 Doty CR, Kennedy DW, Yousem DM. Evaluation of Olfactory Deficits by Structural Medical Imaging. In: Doty RL Handbook of Olfaction and Gustation. 2 ed. New York, NY: Marcel Dekker. 2003. p. 593-613.
- 109 Kratskin IL, Belluzzi O. Anatomy and neurochemistry of the olfactory bulb. In: Doty RL, editor. Handbook of olfaction and gustation. New York: Marcel Dekker; 2003. 235-76.
- 110 Purves, Augustine, Fitzpatrick, Hall, Lamantia, Mcnamara, White. Neurociências. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 111 Simpson KL, Sweazey RD. Olfacção e Paladar. In: Haines DE. Neurociência Fundamental Para Aplicações Básicas e Clínicas. Editora. 2006. p. 427-35.
- 112 Su CY, Menuz K, Carlson JR. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell*. 2009;139(1):45-59.
- 113 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.
- 114 Alvarez-Buylla A. Mechanism of migration of olfactory bulb interneurons. *Semin Cell Dev Biol*. 1997;8(2):207-13.
- 115 Doty RL. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol*. 2008;63(1):7-15.
- 116 Prediger RD, Aguiar AS Jr, Matheus FC, Walz R, Antoury L, Raisman-Vozari R et al. Intranasal administration of neurotoxins in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2012;21(1):90-116.
- 117 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.
- 118 Prestes MLM. A pesquisa e a construção do conhecimento científico: do planejamento aos textos, da escola à academia. 2. ed. São Paulo: Rêspel, 2003.

- 119 Gil AC. Como elaborar projetos de pesquisa. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2002.
- 120 Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 1st. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 1995. 469
- 121 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.
- 122 Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain. 1983;16(2):109-10.
- 123 Pogatzki EM, Raja SN. A mouse model of incisional pain. Anesthesiol. 2003;99(4):1023-7.
- 124 Nucci C, Mazzardo-Martins L, Stramosk J, Brethanha LC, Pizzolatti MG, Santos AR, Martins DF. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. J Ethnopharmacol. 2012;143(1):170-8.
- 125 Martins DF, Mazzardo-Martins L, Cidral-Filho, FJ, Gadotti VM, Santos ARS. Peripheral and spinal activation of cannabinoid receptors by joint mobilization alleviates postoperative pain in mice. Neurosci. 2013;10(255):110-21.
- 126 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 Mar;29(2):695-702.
- 127 Pitcher GM, Henry JL. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. Exp Neurol. 2004;186(2):173-97.
- 128 Meotti FC, Coelho Idos S, Santos AR. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. J Pain. 2010;11(6):570-8.
- 129 Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. Eur J Pharmacol. 1995;21(1):34-40.
- 130 Emer AA, Martins DF. Mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo do óleo essencial *Cedrus atlantica* [Trabalho de conclusão do Curso de Naturologia Aplicada]. Palhoça: Unisul; 2012.
- 131 Walker JM, Hohmann AG. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. Handb Exp Pharmacol. 2005;(168):509-54.
- 132 Lau BK, Vaughan CW. Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. Curr Opin Neurobiol. 2014;29C:159-16.

- 133 Wang Y, Feng C, Wu Z, Wu A, Yue Y. Activity of the descending noradrenergic pathway after surgery in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008;52(10):1336-41.
- 134 Rees H, Roberts MH. Anterior pretectal stimulation alters the responses of spinal dorsal horn neurones to cutaneous stimulation in the rat. *J Physiol*. 1987;385:415-36.
- 135 Villarreal CF, Del Bel EA, Prado WA. Involvement of the anterior pretectal nucleus in the control of persistent pain: a behavioral and c-Fos expression study in the rat. *Pain*. 2003;103(1-2):163-74.
- 136 Dogrul A, Gardell LR, Ma S, Ossipov MH, Porreca F, Lai J. 'Knock-down' of spinal CB1 receptors produces abnormal pain and elevates spinal dynorphin content in mice. *Pain*. 2002;100(1-2):203-9.
- 137 Gunduz O, Karadag HC, Ulugol A. Synergistic anti-allodynic effects of nociceptin/orphanin FQ and cannabinoid systems in neuropathic mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011;99(4):540-4.
- 138 Hosking RD, Zajicek JP. Therapeutic potential of cannabis in pain medicine. *Br J Anaesth*. 2008;101(1):59-68.
- 139 Abood ME, Ditto KE, Noel MA, Showalter VM, Tao Q. Isolation and expression of a mouse CB1 cannabinoid receptor gene. Comparison of binding properties with those of native CB1 receptors in mouse brain and N18TG2 neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol*. 1997;53(2):207-14.
- 140 Bisogno T, Cascio MG, Saha B, Mahadevan A, Urbani P, Minassi A et al. Development of the first potent and specific inhibitors of endocannabinoid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(2):205-12.
- 141 Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos AR, Filho VC, Yunes RA. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother Res*. 2000;14(6):401-18.
- 142 Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev*. 2012;6(11):1-5.
- 143 Dewick PM. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2nd ed.; Wiley: West Sussex, UK, 2001; p. 121-485.
- 144 Oliveira FS, De Sousa DP, De Almeida RN. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. *Biol Pharm Bull*. 2008;31(4):588-91.
- 145 De Sousa DP. Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*. 2011;16(3):2233-52.
- 146 Aberchane M, Fechtal M, Chaouch A. Analysis of Moroccan Atlas Cedarwood Oil (*Cedrus atlantica* Manetti) J. *Essent. Oil Res*. 2004;16:542-547.
- 147 Boudarene L, Rahim L., Baaliouamer A, Meklati BY. Analysis of Algerian Essential Oils from Twigs, Needles and Wood of *Cedrus atlantica* G.Manetti by GC/MS J. *Essent. Oil Res.*, 2004;16:531-534.

- 148 Ikeda H, Takasu S, Murase K. Contribution of anterior cingulate cortex and descending pain inhibitory system to analgesic effect of lemon odor in mice. *Mol Pain*. 2014;10:14.
- 149 Wu G, Wu H. Analgesia Synergism of Essential Oil from Pericarp of *Zanthoxylum schinifolium* and Verapamil. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:505876.
- 150 Sadeghi Aval Shahr H, Saadat M, Kheirkhah M, Saadat E. The effect of self-aromatherapy massage of the abdomen on the primary dysmenorrhoea. *J Obstet Gynaecol*. 2014;25:1-4.
- 151 Tang SK, Tse MY. Aromatherapy: does it help to relieve pain, depression, anxiety, and stress in community-dwelling older persons? *Biomed Res Int*. 2014;2014:430195.
- 152 Cino K. Aromatherapy hand massage for older adults with chronic pain living in long-term care. *J Holist Nurs*. 2014;32(4):304-13.
- 153 Bushnell MC, Ceko M, Low LA. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(7):502-11.
- 154 Villemure C, Slotnick BM, Bushnell MC. Effects of odors on pain perception: deciphering the roles of emotion and attention. *Pain*. 2003 Nov;106(1-2):101-8.
- 155 Martin GN. The effect of exposure to odor on the perception of pain. *Psychosom Med*. 2006;68(4):613-6.
- 156 Stea S, Beraudi A, De Pasquale D. Essential oils for complementary treatment of surgical patients: state of the art. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:726341.
- 157 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.
- 158 Merkus FW, van den Berg MP. Can nasal drug delivery bypass the blood-brain barrier?: questioning the direct transport theory. *Drugs R D*. 2007;8(3):133-44.
- 159 Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD. Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev*. 2005;85(1):281-317.
- 160 Thipphawong JB, Babul N, Morishige RJ, Findlay HK, Reber KR, Millward GJ et al. Analgesic efficacy of inhaled morphine in patients after bunionectomy surgery. *Anesthesiology*. 2003;99(3):693-700.
- 161 Ballas SK, Viscusi ER, Epstein KR. Management of acute chest wall sickle cell pain with nebulized morphine. *Am J Hematol*. 2004;76(2):190-1.