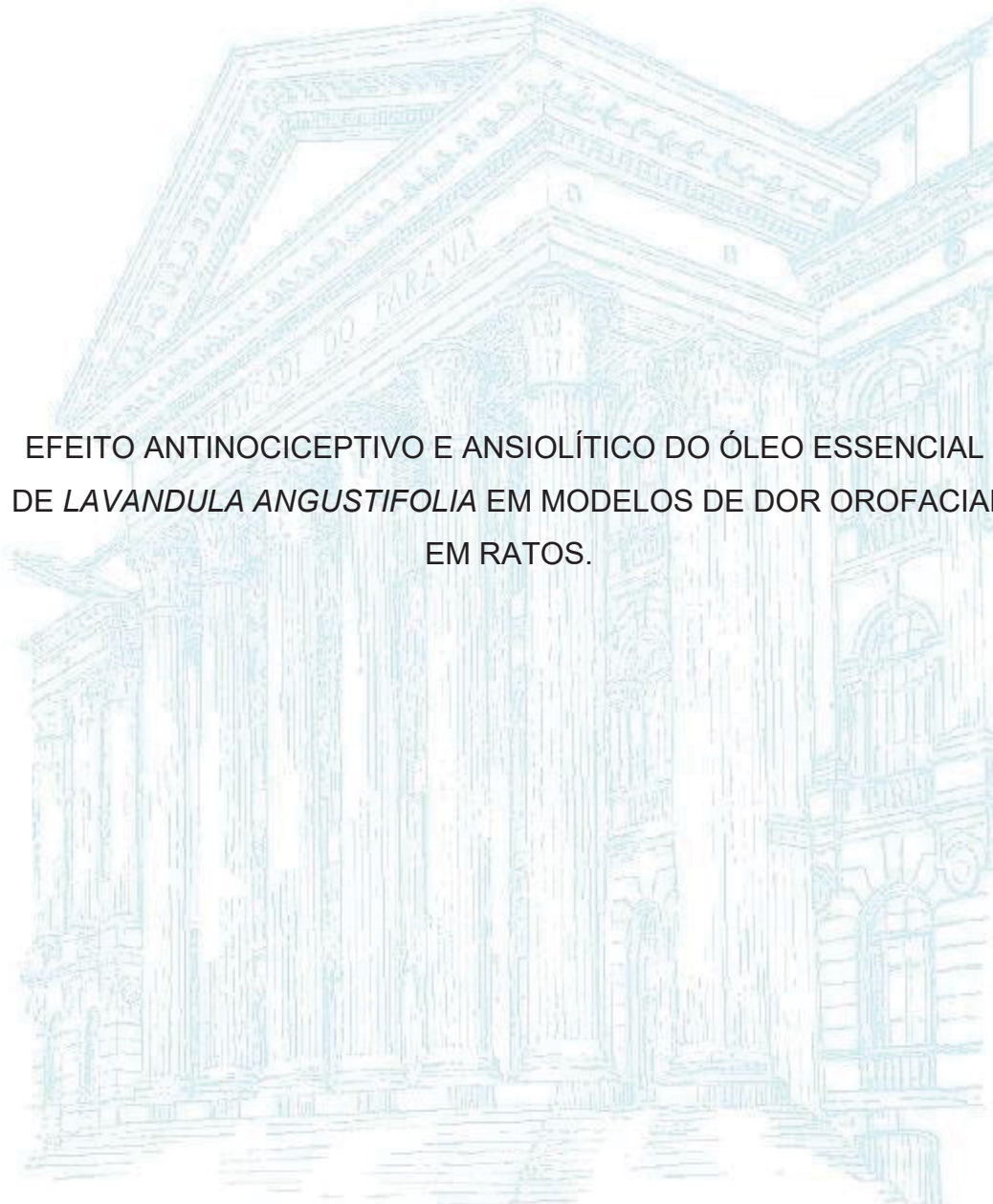


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA BORDENOWSKY PEREIRA LEJEUNE



EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANSIOLÍTICO DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* EM MODELOS DE DOR OROFACIAL
EM RATOS.

CURITIBA

2021

VANESSA BORDENOWSKY PEREIRA LEJEUNE

EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANSIOLÍTICO DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* EM MODELOS DE DOR OROFACIAL
EM RATOS.

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, no
curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Geremias
Chichorro

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Lejeune, Vanessa Bordenowsky Pereira.

Efeito antinociceptivo e ansiolítico do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* em modelos de dor orofacial em ratos. / Vanessa Bordenowsky Pereira Lejeune. – Curitiba, 2021.

62 f. : il.

Orientadora: Juliana Geremias Chichorro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Óleo - Indústria. 2. Lavandula. 3. Lavanda. 4. Inalação. 5. Dor pós-operatória. 6. Ansiedade. 7. Hiperalgisia. 8. Dor – Medição. I. Título. II. Chichorro, Juliana Geremias. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VANESSA BORDENOWSKY PEREIRA LEJEUNE** intitulada: **EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANSIOLÍTICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDULA ANGUSTIFOLIA EM MODELOS DE DOR OROFACIAL EM RATOS.**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA GEREMIAS CHICHORRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 06 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

07/12/2021 14:15:34.0

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

08/12/2021 15:27:04.0

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/12/2021 12:17:55.0

GABRIELA TREVISAN DOS SANTOS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 133212

De onde tirar palavras para agradecer a Deus e a todos que Ele colocou em meu caminho nessa jornada de vida tão inspiradora? Agradeço a todos que realizaram sonhos comigo e torceram pelas grandes conquistas até aqui.

AGRADECIMENTOS

A ciência sempre foi um sonho. Não imaginei que ao seguir este caminho, encontraria pessoas tão especiais que também sonhavam em mudar o mundo com conhecimento e deixar um legado bonito para gerações futuras.

Agradecimento especial à minha querida orientadora, mãe científica e inspiração maior, Juliana Geremias Chichorro, por me acolher em seu Laboratório e em seu grupo com tanta ternura e com o sorriso mais sincero desde nosso primeiro encontro. Muito além da orientação, seus ensinamentos e os inúmeros trabalhos que realizamos juntas me fizeram acreditar que sempre há tempo pra gente produzir, construir e crescer. Os tempos foram difíceis em meio à pandemia, mas você segurou minha mão e eu me senti corajosa para seguir nesse caminho científico, para o resto da vida.

À querida Maria Vital, por me conduzir até a Farmacologia com a frase inesquecível “Estude que você vai conseguir. A Farmacologia é linda!” e por me indicar para o Laboratório da Dor onde comecei a realizar meu sonho científico.

À Janaina Menezes Zanoveli por sua amizade e carinho incondicional, por todos os conhecimentos transmitidos com tanta sabedoria e amor à ciência. À Joice Maria da Cunha pelos ensinamentos, momentos de descontração, carinho, sorriso fácil e delícias culinárias levadas ao Laboratório.

Aos colaboradores deste trabalho, Raphael Vieira Lopes, Darciane Baggio e Laura Koren por todo apoio e ajuda nos experimentos em tempos de pandemia. Vocês merecem todo meu sentimento de gratidão! Contem comigo, sempre.

À minha madrinha científica e amiga, Erika Ivanna Araya, que tanto me ensinou, me incentivou e me encorajou nos experimentos, sem medir esforços, com seu baby Thomas no ventre.

Aos amigos do Orofacial Pain Group pelos encontros semanais sempre tão ricos de conhecimento e de momentos leves compartilhados. Renata dos Reis, Éder Gambeta, Carlos de Jesus, Wagner Hummig e Aléxia Thamara por todo o carinho que sempre tiveram e por me incentivarem com seus conhecimentos tão especiais.

Aos meus pais, Denise e Irineu pelo amor puro e tão intenso, por sempre incentivarem minhas escolhas e por se orgulharem tanto de todos os meus sonhos. Obrigada pela vida de puro amor que me proporcionam. Aos meus irmãos Leandro e Fernando por serem o amor e a amizade em forma de pessoas, pelo elo eterno que temos, às minhas cunhadas/irmãs Kamilla e Camila e meus sobrinhos Alice e Lucca pela alegria.

Ao meu marido, Philippe por todo amor, amizade e sorrisos. Por todo incentivo, caronas até a UFPR e por todos os cafés que tomamos falando de farmacologia, experimentos e resultados, sem entender, mas cheio de orgulho. Amo você. Estendo o agradecimento aos meus sogros, Sílvia e Jacques, que sempre torceram e estiveram muito presentes.

E ao meu filho, Dustin, por me emocionar todas as vezes que dizia que a mamãe é cientista. Um dia, quando você estiver grande quero que saiba que se eu consegui chegar até aqui e seguir a diante na ciência foi porque você permitiu com sua compreensão e amor enquanto a mamãe estudava. Momentos inesquecíveis ter você pertinho pintando estrelas enquanto eu assistia seminários. Essa conquista é nossa, meu amor!

À CAPES, pelo suporte financeiro e à UFPR pelos professores maravilhosos, pelo aperfeiçoamento profissional e pelos materiais e estrutura física. A todos os demais amigos e professores do departamento e colaboradores que, embora não citados nominalmente, foram importantes para realização desse trabalho.

Aos animais experimentais, que mesmo que de forma inconsciente, doaram suas vidas em prol da ciência.

“Não se volte, se a meta forem as estrelas.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

A dor orofacial nociceptiva e inflamatória é altamente prevalente na população, o que justifica a busca por analgésicos mais seguros. Certas condições de dor orofacial, especialmente dores crônicas de difícil tratamento são mais prevalentes no sexo feminino. Este cenário e a frequência de cirurgias nesta região exigem estudos inovadores visando a qualidade de vida dos pacientes e opções farmacológicas capazes de tratar a dor e seus aspectos afetivos. Há evidências crescentes do potencial analgésico e ansiolítico do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* (LAV OE), que através da inalação, pode representar uma alternativa segura e não invasiva a ser explorada em condições de dor orofacial. **Objetivos:** avaliar se o LAV OE por via inalatória tem efeito antinociceptivo no teste de formalina, e efeitos anti-hiperalgésicos e ansiolíticos em um modelo de dor pós-operatória orofacial em ratos. **Métodos:** Os experimentos foram conduzidos em fêmeas *Rattus norvegicus* variedade Wistar, e todos os protocolos foram previamente aprovados pelo CEUA/BIO 1348. Os animais foram expostos ao LAV OE (5%) por inalação durante 30 minutos, individualmente, e com uso de aparato específico desenvolvido para garantir a padronização da volatilização do LAV OE. O feltro recebeu 0,5 ml de óleo essencial (OE) ou veículo (VEIC) e foi trocado para cada animal. Após a exposição, os animais receberam uma injeção de formalina (2,5%, 50 µL) ou solução salina estéril no lábio superior ou pata traseira e o tempo de *grooming* ou número de *flinches* foram avaliados. Da mesma forma, no dia 3 após a incisão da mucosa intraoral, os animais foram expostos ao LAV OE e a hiperalgesia mecânica e térmica facial foi avaliada de hora em hora, até 4 horas. Em adição, animais receberam pré-tratamento com naltrexona (NTX) 15 minutos antes da exposição ao LAV OE para verificação de um possível mecanismo de ação opioide. A influência da inalação do LAV OE sobre o comportamento do tipo ansioso foi avaliada em ratos operados testando-os no campo aberto (CA) e labirinto em cruz elevado (LCE). **Resultados:** LAV OE reduziu a fase I (em 81%) e a fase II (em 76%) do teste de formalina orofacial, e apenas a segunda fase no teste da formalina na pata (em 47 %), sugerindo que as respostas nociceptivas faciais foram mais suscetíveis à inibição. No 3º dia pós-incisão, LAV OE reduziu a hiperalgesia térmica e mecânica, iniciando em 30 minutos até 3 horas. O pré-tratamento com NTX causou uma redução parcial de seu efeito anti-hiperalgésico, reforçando a ideia de que a ativação de receptores opioides contribui para a analgesia pelo LAV OE. LAV OE aumentou o número de entradas no centro do CA, e aumentou o número de entradas e permanência nos braços abertos do LCE, sem causar déficit locomotor. **Conclusão:** A inalação do LAV OE resulta em efeito antinociceptivo, e do tipo ansiolítico em ratos submetidos a modelos de dor orofacial, o que estimula a realização de estudos adicionais sobre as indicações do LAV OE e sua eficácia em outras condições de dor orofacial.

Palavras-chave: óleo essencial de lavanda; inalação; dor pós-operatória; ansiedade; hiperalgesia; teste de formalina.

ABSTRACT

Nociceptive and inflammatory orofacial pain is highly prevalent in the population, which justifies the search for safer analgesics. Certain conditions of orofacial pain, especially chronic pain difficult to treat are more prevalent in females. This scenario and the frequency of surgeries in this region require innovative studies aimed at the quality of life of patients and pharmacological options capable of treating pain and its affective aspects. There is growing evidence of the analgesic and anxiolytic potential of *Lavandula angustifolia* essential oil (LAV EO), which through inhalation may represent a safe and non-invasive alternative to be explored in orofacial pain conditions. **Aims:** evaluate whether inhalation of LAV EO has an antinociceptive effect on formalin testing and anti-hyperalgesic and anxiolytic effects in an orofacial postoperative pain model in rats. **Main methods:** The experiments were conducted in female *Rattus norvegicus* variety Wistar, and all protocols were previously approved by CEUA/BIO 1348. The animals were exposed to LAV EO (5%) by inhalation for 30 minutes, individually, and using a specific device developed to ensure the standardization of LAV EO volatilization. The rats received 0.5 ml of essential oil (EO) or vehicle (VEIC) and was changed for each animal. After exposure, the animals received an injection of formalin (2.5%, 50 μ L) or sterile saline solution in the upper lip or hind paw, and the grooming time or the number of flinches were evaluated. Similarly, on day 3 after the intraoral mucosa incision, the animals were exposed to LAV EO and facial mechanical and thermal hyperalgesia was evaluated every hour, up to 4 hours. In addition, animals received pretreatment with naltrexone (NTX) 15 minutes before exposure to LAV EO to verify a possible opioid mechanism of action. The influence of LAV EO inhalation on anxiety-like behavior was evaluated in operated rats testing them in the open field (AC) and elevated cross labyrinth (LCE). **Key Findings:** LAV EO reduced phase I (by 81%) and phase II (by 76%) of the orofacial formalin test, and only the second phase in the formalin test in the paw (in 47%), suggesting that the facial nociceptive responses were more susceptible to inhibition. On the 3rd post-incision day, LAV EO reduced thermal and mechanical hyperalgesia, starting in 30 minutes up to 3 hours. Pretreatment with NTX caused a partial reduction of anti-hyperalgesic effect, reinforcing the idea that the activation of opioid receptors contributes to analgesia by LAV OE. LAV EO increased the number of entries in the center of the CA, and increased the number of entries and permanence in the open arms of the LCE, without causing locomotor deficit. **Significance:** Inhalation of LAV EO results in an antinociceptive, and anxiolytic effect in rats submitted to orofacial pain models, which stimulates further studies on LAV EO indications and its efficacy in other orofacial pain conditions.

Key words: lavender essential oil; inhalation; post-operative pain; anxiety; hyperalgesia; formalin test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dispositivo difusor produzido em acrílico para inalação de LAV OE.....	27
Figura 2 - Testes da Formalina: injeção s.c na pata traseira ou lábio superior direito.....	28
Figura 3 - Localização da incisão na mucosa oral.....	29
Figura 4 - Avaliação da Hiperalgisia térmica.....	30
Figura 5 - Avaliação de limiar mecânico com filamentos de Von Frey.....	31
Figura 6 - Aparato: Campo aberto com demarcação dos quadrantes.....	31
Figura 7 - Aparato: Labirinto em cruz elevado.....	32
Figura 8 - LAV OE reduz o comportamento nociceptivo induzido por formalina na região orofacial.....	35
Figure 9 - LAV OE reduz o comportamento nociceptivo na fase II induzido por formalina na pata traseira dos ratos.....	37
Figura 10 - LAV OE reduz a hiperalgisia térmica e mecânica no modelo de dor orofacial pós-operatória em ratos.....	39
Figura 11 - A naltrexona reverteu parcialmente o efeito anti-hiperalgésico do LAV OE no modelo de dor pós-operatória em ratos.....	41
Figure 12 - LAV OE causa efeito ansiolítico em ratos submetidos à incisão intraoral e avaliados no teste de Campo Aberto.....	43
Figura 13 - LAV OE causa efeito ansiolítico em ratos submetidos à incisão intraoral e avaliados no Labirinto em cruz elevado.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LAV OE	óleo essencial de Lavandula angustifolia
OE	óleo essencial
OR	receptores olfativos
AINEs	anti-inflamatórios não esteroidais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNPICs	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
VEIC	veículo
SNC	sistema nervoso central
OR	receptores olfativos
SAL	solução salina estéril
µL	microlitro
GC-MS	cromatografia gasosa / espectrometria de massa
(v/v)	volume/volume
NTX	naltrexona
s.c.	subcutânea
i.p.	intraperitoneal
CA	campo Aberto
LCE	labirinto em cruz elevado
ANOVA	análise de variância
CFA	adjuvante completo de Freund
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide 1
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPM8	Receptor de potencial transitório melastatina 8

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	DOR OROFACIAL	15
1.2	ASPECTO AFETIVO-EMOCIONAL DA DOR	17
1.3	AROMATOLOGIA: ÓLEO ESSENCIAL DE <i>LAVANDULA ANGUSTIFOLIA</i>	19
1.4	ÓLEO ESSENCIAL DE <i>LAVANDULA ANGUSTIFOLIA</i>	20
1.5	OLFATO, INALAÇÃO E VIA 'NOSE TO BRAIN'	21
2	OBJETIVO	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	ANIMAIS	25
3.2	DROGAS E SOLUÇÕES	25
3.3	EXPOSIÇÃO AO LAV OE	26
3.4	MODELOS DE DOR	27
3.4.1	TESTE DA FORMAINA	27
3.4.2	MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA	28
3.5	TESTES COMPORTAMENTAIS	29
3.5.1	AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA	29
3.5.2	AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA	30
3.5.3	COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO	31
3.5.3.1	TESTE DO CAMPO ABERTO (CA)	31
3.5.3.2	TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	32
3.6	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	32
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4	RESULTADOS	34
4.1	LAV OE REDUZIU O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR FORMALINA	34
4.2	LAV OE REDUZIU A HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA NO MODELO DE DOR OROFACIAL PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS	38
4.3	A NALTREXONA REDUZIU O EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DO LAV OE NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA	40
4.4	LAV OE APRESENTOU EFEITO DO TIPO ANSIOLÍTICO EM RATOS SUBMETIDOS À INCISÃO INTRAORAL	42

5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERÊNCIAS.....	51
ANEXO I - CERTIFICADO DE CURSO TEÓRICO SOBRE MANIPULAÇÃO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	61
ANEXO II – CERTIFICADO CEUA #1348	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR OROFACIAL

A região orofacial abrange muitas estruturas distintas e com funções essenciais, incluindo córnea, meninges, dentes, mucosa nasal e oral e articulação temporomandibular, que são frequentemente acometidas por distúrbios dolorosos (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017). A dor trigeminal aguda é altamente frequente mesmo após pequenos procedimentos cirúrgicos orais, e afeta significativamente a recuperação do paciente e a sua qualidade de vida (HANZAWA; HANDA; KOHKITA; ICHINOHE *et al.*, 2018; SHUEB; NIXDORF; JOHN; ALONSO *et al.*, 2015).

Neste contexto, o nervo trigêmeo (ou V par craniano) tem grande importância, uma vez que os tecidos craniofaciais são inervados pelos seus três ramos, sendo eles: oftálmico, mandibular e maxilar (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017; DE TOLEDO; RÉUS; FERNANDES; PORPORATTI *et al.*, 2016). O nervo trigêmeo tem função mista, sendo esta sensorial e motora, com predominância da função sensorial (VAN DER CRUYSSSEN; POLITIS, 2018). Seus receptores especializados fornecem respostas tanto à ação mecânica leve, como o toque, ou a estímulos proprioceptivos. Há também as terminações nervosas livres, provenientes de fibras aferentes do tipo A δ e C. Uma vez ativadas, essas fibras conduzem impulsos para o sistema nervoso central (SNC), podendo, desta forma, fornecer informações sensoriais-discriminativas ao cérebro sobre a localização, qualidade, intensidade e duração do estímulo nocivo (WAITE; ASHWELL, 2012).

A maioria das fibras mielinizadas e não mielinizadas (A δ e C, respectivamente) tem suas terminações periféricas em tecidos orofaciais, enquanto que os corpos celulares dessas fibras estão localizados no gânglio do trigêmeo, estrutura que participa ativamente da transmissão nociceptiva orofacial (para revisão, ver (MESSLINGER; BALCZIAK; RUSSO, 2020; WAITE; ASHWELL, 2012).

Os componentes do complexo sensorial trigeminal incluem o núcleo sensorial principal e núcleo do trato espinhal, sendo que esse último se divide em três diferentes subnúcleos: *oralis*, *interpolaris* e *caudalis* (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017). Grande parte dos neurônios nociceptivos de segunda

ordem estão localizados no subnúcleo *caudalis*, o qual recebe a maior proporção das terminações centrais dos nociceptores, bem como projeções de áreas cerebrais com função modulatória na transmissão somatossensorial. Os neurônios de segunda ordem ascendem em tratos para o SNC, onde distribuem-se para diferentes estruturas cerebrais as quais estão envolvidas tanto com o processamento sensorial quanto com o processamento afetivo da dor (VEINANTE; YALCIN; BARROT, 2013).

Inúmeros fatores e/ou substâncias podem estar envolvidas na ativação dos nociceptores trigeminais. A presença de dano tecidual induz a liberação de mediadores químicos, como as prostaglandinas e bradicinina, substâncias estas que podem ativar e/ou sensibilizar as terminações nervosas livres ocasionando dor e/ou hiperalgesia (OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016).

Estima-se que a prevalência de dor orofacial em mulheres é duas vezes mais alta em comparação com os homens (DE TOLEDO; RÉUS; FERNANDES; PORPORATTI *et al.*, 2016), e o sexo feminino tem sido sugerido como sendo um fator de risco para a cronificação da dor orofacial (HONDA; HANDA; FUKUDA; KOUKITA *et al.*, 2018; HÄGGMAN-HENRIKSON; LIV; ILGUNAS; VISSCHER *et al.*, 2020).

No que tange a dor pós-operatória, é relevante mencionar a sua alta prevalência na região orofacial. É uma dor que persiste até que o tecido e/ou órgão se recupere. Inúmeros procedimentos odontológicos, tais como remoção de terceiros molares, implantes e cirurgias ósseas, cirurgias tumorais, dentre outras, afetam diretamente o sistema trigeminal. O manejo da dor inclui o uso farmacológico de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e analgésicos opioides (PERGOLIZZI; MAGNUSSON; LEQUANG; GHARIBO *et al.*, 2020). Apesar da vasta indicação, os AINES devem ter seu uso descontinuado assim que cessam os sintomas, tendo em vista os seus efeitos adversos associados a distúrbios gastrointestinais, renais e hepáticos, especialmente durante o uso prolongado (BJARNASON; SCARPIGNATO; HOLMGREN; OLSZEWSKI *et al.*, 2018; DOMPER ARNAL; HIJOS-MALLADA; LANAS, 2021; VARRASSI; PERGOLIZZI; DOWLING; PALADINI, 2020). Os opioides são considerados potentes em dores moderadas a graves (LIU; HE; MAI; YANG *et al.*, 2021), no entanto, apresentam uma série de efeitos adversos como depressão respiratória, sedação, náusea e constipação,

além do risco da dependência e desenvolvimento de tolerância pelos pacientes (STEIN, 2019).

Um risco associado a procedimentos cirúrgicos é a cronificação da dor e o desenvolvimento de transtornos de humor, como ansiedade e estresse (ABDULLAYEV; ULUDAG; CELIK, 2019; VEINANTE; YALCIN; BARROT, 2013). Inúmeros fatores estão associados a este risco de cronificação como, por exemplo, o tempo de cirurgia, danos do nervo, fatores genéticos, presença de outras condições dolorosas, ansiedade antes do procedimento e o manejo pós-operatório inadequado (PAK; YONG; KAYE; URMAN, 2018). Os cuidados com o paciente após a cirurgia devem priorizar não somente a redução da dor, mas o seu bem estar. Ademais, a dor trigeminal aguda também tem sido associada à comorbidades emocionais, especialmente a ansiedade, que tem sido considerada um fator contribuinte para a cronificação desta dor (GHURYE; MCMILLAN, 2017; HONDA; HANDA; FUKUDA; KOUKITA *et al.*, 2018). É extremamente relevante o controle da dor orofacial, uma vez que estudos sugerem que um estímulo de mesma intensidade é capaz de induzir a sensação de dor mais acentuada na região orofacial do que em outras partes do corpo (RODRIGUEZ; SAKURAI; XU; CHEN *et al.*, 2017). Os mecanismos envolvidos neste fato ainda permanecem desconhecidos, mas estudos sugerem que dores orofaciais exercem forte influência no estado emocional do indivíduo acometido (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017).

1.2 ASPECTO AFETIVO-EMOCIONAL DA DOR

O componente sensorial da dor refere-se às funções somáticas de reconhecimento da intensidade, duração, localização e modalidade, ou seja, a discriminação do estímulo. Mas é preciso considerar o componente afetivo-motivacional a que se referem estas sensações e respostas emocionais – medo, mal estar, ansiedade e estresse - provocados pela sensação somática da dor. No entanto, esse componente está relacionado à experiência individual da dor, à evocação de memórias e de sensações não primariamente relacionadas à sensação somática do estímulo (DA SILVA; RIBEIRO-FILHO, 2011).

O estudo dos aspectos emocionais associados à dor permite aproximar o estudo da prática clínica e expandir o aspecto translacional avaliando suas comorbidades e não apenas a dor isoladamente. O estado emocional e psicológico do paciente, sua experiência, motivação e cognição terão uma grande influência na experiência de dor de cada indivíduo (ABDULLAYEV; ULUDAG; CELIK, 2019; SILVA; RIBEIRO FILHO, 2011).

A dor, especialmente quando se apresenta de forma aguda, exerce um papel importante na adaptação, uma vez que é um sinalizador eficaz da presença de estímulo nocivo e evoca comportamentos rápidos de afastamento e proteção (VEINANTE; YALCIN; BARROT, 2013). Sendo uma sensação desagradável, a lembrança da dor ensina as pessoas a evitar objetos e situações que possam evocá-la ou piorá-la, como forma de prevenção. Esta alteração de rotina associada à dor propriamente dita desencadeia níveis de ansiedade, estresse e modificações emocionais que variam conforme a experiência, nível de dor, estado emocional e psicológico, motivação e cognição de cada indivíduo (DA SILVA; RIBEIRO-FILHO, 2011).

Evidências clínicas crescentes indicam que uma proporção significativa de pacientes com dor orofacial apresenta dor espontânea e que esta condição está associada com transtornos de humor, principalmente ansiedade e depressão (HUMPHRIS; ROGERS; MCNALLY; LEE-JONES *et al.*, 2003). Além dos inúmeros estudos em animais que observaram uma relação entre dor orofacial e ansiedade (GAMBETA; BATISTA; MASCHIO; TURNES *et al.*, 2018; GAMBETA; KOPRUSZINSKI; DOS REIS; ZANOVELI *et al.*, 2016), dados preliminares do nosso grupo indicam que animais submetidos à incisão da mucosa oral apresentam comportamento do tipo ansioso no terceiro dia após a cirurgia (ARAYA; BAGGIO; DE OLIVEIRA KOREN; ANDREATINI *et al.*, 2020; GAMBETA; BATISTA; MASCHIO; TURNES *et al.*, 2018; GAMBETA; KOPRUSZINSKI; DOS REIS; ZANOVELI *et al.*, 2016; 2017), entretanto poucos estudos tem avaliado estratégias de tratamento da ansiedade associada à dor. Neste sentido, muitas terapias naturais ganharam espaço nas pesquisas como forma de prevenção e tratamento desta comorbidade (CAVANAGH; WILKINSON, 2002; CHIOCA; FERRO; BARETTA; OLIVEIRA *et al.*, 2013; DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; SILVA; LUFT; LUNARDELLI; AMARAL *et al.*, 2015), já que proporcionam menos efeitos

adversos ou potencializam a atuação de outros fármacos através de terapias integrativas e complementares, garantindo melhor qualidade de vida aos pacientes (PERRY, R.; TERRY, R.; WATSON, L. K.; ERNST, E., 2012).

1.3 AROMATOLOGIA: ÓLEO ESSENCIAL DE *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA*

A Aromaterapia é classificada e reconhecida como uma Prática Integrativa e Complementar, inserida na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPICS) através da Portaria nº 702 de 21 de março de 2018 (BARROS, 2018).

A aromatologia é a ciência que estuda OEs e sua ação farmacológica no organismo (LINCK; DA SILVA; FIGUEIRÓ; CARAMÃO *et al.*, 2010). OEs são substâncias aromáticas e voláteis, mesmo em temperatura ambiente, produzidas através do metabolismo secundário das plantas. É importante ressaltar que apesar da crescente investigação dos OEs e seus compostos, mais estudos são necessários para esclarecer as suas atividades biológicas. O OE tem uma fitoquímica complexa compreendendo 60-100 moléculas, capazes de atuar farmacologicamente com várias respostas terapêuticas ao mesmo tempo. Através da cromatografia gasosa obtém-se o detalhamento de toda a sua complexa composição (CAI; LIN; ZHU; SU, 2006; CAVANAGH; WILKINSON, 2002; GALHIANE; RISSATO; CHIERICE; ALMEIDA *et al.*, 2006; TAKAHASHI; SATOU; OHASHI; HAYASHI *et al.*, 2011).

Dentre as propriedades farmacológicas dos OEs temos: propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antissépticas, imunoestimulantes, anti-inflamatórias, analgésicas, antialérgicas, mucolíticas, antiespasmódicas, dentre outras, diversificadas entre cada espécie botânica (BAKKALI; AVERBECK; AVERBECK; IDAOMAR, 2008; PERRY, R.; TERRY, R.; WATSON, L.; ERNST, E., 2012). Há diferentes formas de administração possíveis, como a inalação, uso tópico e oral, sendo que a via mais utilizadas é a inalatória. É válido ressaltar que em casos de anosmia, não há alteração nos efeitos dos OEs em nenhuma das concentrações analisadas (CHIOCA; ANTUNES; FERRO; LOSSO *et al.*, 2013). Isto ocorre, pois os efeitos farmacológicos são provenientes dos princípios ativos presentes no OE e não do aroma propriamente dito, sendo que o aroma tem sua

importância na identidade da planta e para evocar memória olfativa (FUJIWARA; KOMORI; MITSUO YOKOYAMA, 2002)

1.4 ÓLEO ESSENCIAL DE LAVANDULA ANGUSTIFOLIA

A Lavanda é um arbusto de aproximadamente 30 a 80 cm de altura, com folhas lanceoladas e flores de cor azul-violeta dispostas em espigas ou verticilos terminais. Pertence à família das Lamiaceae, é uma planta aromática encontrada em terrenos e encostas áridos, calcários e fortemente ensolarados na Europa Mediterrânea, especialmente Sul dos Alpes e França a até 1800 metros de altitude (KOULIVAND; KHALEGHI GHADIRI; GORJI, 2013).

A extração do LAV OE ocorre por destilação das flores, e sua composição apresenta como principais constituintes:

- álcoois terpênicos (30-50%) – linalol, terpinen-4-ol, Alfa terpineol
- terpenos (5%) – pinenos e ocimenos
- ésteres terpênicos (45-55%) – acetato de linalila, acetato de lavanduila (TAKAHASHI; SATOU; OHASHI; HAYASHI *et al.*, 2011)

Há evidências crescentes de que o LAV OE e seus principais componentes, linalol e acetato de linalila, apresentam efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios (PEANA; D'AQUILA; PANIN; SERRA *et al.*, 2002). Estudos pré-clínicos demonstram potencial anti-inflamatório e analgésico do LAV OE em experimentos que empregaram agentes algogênicos e inflamatórios, tais como formalina, carragenina, adjuvante completo de Freund (CFA), óleo de croton e ácido acético (PEANA; D'AQUILA; PANIN; SERRA *et al.*, 2002; PEANA; DE MONTIS; SECHI; SIRCANA *et al.*, 2004; PEANA; MARZOCCO; POPOLO; PINTO, 2006; SILVA; LUFT; LUNARDELLI; AMARAL *et al.*, 2015). Em adição, estudos clínicos sugerem o emprego do LAV OE como analgésico ou como terapia complementar. Nesse sentido, um estudo realizado após intervenção cirúrgica com 54 pacientes que receberam morfina e LAV OE via inalatória demonstrou que essa combinação resultou em redução nas doses de morfina, em comparação com os pacientes que receberam apenas o analgésico opioide (DOBETSBERGER; BUCHBAUER, 2011). É crescente o número de estudos conduzidos em humanos e, mais especificamente na dor pós-operatória, há inúmeros trabalhos que demonstram o benefício da

inalação do LAV OE (ARSLAN; AYDINOGLU; KARAN, 2020; BOZKURT; VURAL, 2019; GUO; LI; ZHANG; LIU *et al.*, 2020) sugerindo tanto seu potencial analgésico quanto ansiolítico.

O efeito ansiolítico do LAV OE tem sido demonstrado em muitos estudos clínicos e pré-clínicos (CHIOCA; FERRO; BARETTA; OLIVEIRA *et al.*, 2013; WOELK; SCHLÄFKE, 2010). O LAV OE diminui os níveis de ansiedade pré-cirúrgicas e em consultórios odontológicos (ARSLAN; AYDINOGLU; KARAN, 2020; BOZKURT; VURAL, 2019; DOBETSBERGER; BUCHBAUER, 2011; GHADERI; SOLHJOU, 2020; KRITSIDIMA; NEWTON; ASIMAKOPOULOU, 2010). Além disso, os pacientes tratados com LAV OE relataram mais tranquilidade e bem estar, segundo escala analógica, o que confere, além dos benefícios, um método simples, de baixo risco e econômico (HOYA; MATSUMURA; FUJITA; YANAGA, 2008). Uma pesquisa realizada na Alemanha (WOELK; SCHLÄFKE, 2010) comprovou que o LAV OE é tão eficaz quanto o Lorazepan para transtorno de ansiedade. Com base nisso, a indústria farmacêutica da Alemanha lançou o medicamento Silexan® para administração oral contendo 4 gotas de LAV OE sendo sua posologia de 1 comprimido ao dia (KASPER; MÜLLER; VOLZ; MÖLLER *et al.*, 2018; MÖLLER; VOLZ; DIENEL; SCHLÄFKE *et al.*, 2019)(H. WOELK, 2013).

Apesar das evidências crescentes acerca do LAV OE, faltam estudos padronizados com relação às doses, formas de administração e número amostral, comprometendo a qualidade destes estudos. Além disso, a via inalatória é pouco explorada nos estudos, sendo prevalente a via oral. Além disso, considerando a complexa fitoquímica do LAV OE e seus vários mecanismos de ação possíveis, parece interessante investigar seu potencial analgésico e anti-inflamatório em dores orofaciais bem como nos aspectos emocionais associados.

1.5 OLFATO, INALAÇÃO E VIA 'NOSE TO BRAIN'

A aplicação de OEs por inalação ativa a via '*Nose to Brain*', que pode representar uma alternativa interessante na aplicação de substâncias com potencial no tratamento de condições de dor orofacial. Através dela, o OE pode ter efeito direto e rápido sobre os aferentes trigeminais periféricos além de ser rapidamente transportado pela mucosa nasal para o SNC (SHARMA; KUMAR;

AIER; SEMWAL *et al.*, 2019). O sistema olfativo nos seres humanos é considerado menos potente em relação a outras espécies, no entanto, estudos mostram que atua com precisão, sendo capaz de detectar e discriminar milhões de moléculas (SHARMA; KUMAR; AIER; SEMWAL *et al.*, 2019). Os seres humanos possuem uma maquinaria olfativa especializada, formada por receptores olfativos (OR) pertencentes à superfamília de receptores acoplados à proteína G. A estimulação destes receptores converte a informação química em potencial de ação neuronal através de neurônios quimiossensoriais. O bulbo olfatório retransmite esse sinal para diferentes partes do cérebro de especial importância para vários aspectos cognitivos, comportamentais e emocionais. Com base nesse contexto, o uso de moléculas voláteis ganha especial importância. Pela inalação, chegam ao epitélio nasal olfatório, que leva à transdução e transmissão da informação para regiões corticais e sistema límbico (BREER, 2003). É importante mencionar que a ativação da via “nose to brain” requer que a substância inalada apresente características que incluem solubilidade em água para adesão à mucosa nasal, baixa polaridade, lipofilicidade, volatilidade, além da capacidade de sensibilizar as terminações nervosas dos cílios olfativos, as quais são encontradas nos OEs (MAßBERG; HATT, 2018; SHARMA; KUMAR; AIER; SEMWAL *et al.*, 2019).

Em adição, existem evidências de que o nervo trigêmeo também participe na via “nose to brain”, através da ativação e/ou sensibilização de seus aferentes. As fibras trigeminais intranasais, provenientes dos ramos oftálmico e maxilar, encontram-se distribuídas por toda a cavidade nasal, o que sugere sua participação nas respostas produzidas nos OEs administrados por via inalatória (DAMANN; ROTHERMEL; KLUPP; METTENLEITER *et al.*, 2006)

Um estudo conduzido por Hatt e colaboradores (LÜBBERT; KYEREME; SCHÖBEL; BELTRÁN *et al.*, 2013) demonstrou que os receptores de potencial transitório TRPV1, TRPA1 e TRPM8 estão envolvidos na ativação de neurônios trigeminais em resposta à exposição a estas moléculas voláteis presentes nos OEs. Estes receptores tem grande importância na ativação de vias nociceptivas orofaciais e inúmeros estudos mostram que esses receptores contribuem para a dor orofacial de origem inflamatória e neuropática (LUO; SUTTLE; ZHANG; WANG *et al.*, 2021). Dessa forma, torna-se relevante explorar o papel do nervo trigêmeo no efeito de OEs administrados por via inalatória, visto que esse aspecto é pouco

explorado, mas pode ampliar a aplicação terapêutica de substâncias por essa via, especialmente para o controle de dores orofaciais.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito antinociceptivo e ansiolítico do LAV OE em modelos de dor orofacial em ratos fêmeas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do LAV OE no teste de formalina orofacial;
- Avaliar o efeito do LAV OE no teste de formalina na pata;
- Investigar o efeito antinociceptivo do LAV OE na hiperalgesia térmica no modelo de dor pós-operatória;
- Investigar o efeito antinociceptivo do LAV OE na hiperalgesia mecânica no modelo de dor pós-operatória;
- Avaliar a influência da Naltrexona (antagonista opioide) no efeito antinociceptivo do LAV OE na hiperalgesia térmica associada ao modelo de dor pós-operatória;
- Avaliar o efeito do LAV OE no comportamento do tipo ansioso em animais previamente submetidos ao modelo de dor pós-operatória.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos em ratos Wistar fêmeas adultas (*Rattus norvegicus*) pesando de 180 a 200 g provenientes do biotério central do setor de Ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os ratos foram mantidos em grupos de quatro animais por gaiola em uma sala climatizada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7h da manhã) com comida e água ad libitum. O cepilho foi trocado em dias alternados para manter higiene e o bem estar dos animais. Os procedimentos foram realizados durante o dia, entre 8h e 18h, e os animais foram ambientados por pelo menos 48 horas antes de cada experimento. Todos os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR nº 1348) e realizados de acordo com a diretriz brasileira do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e as recomendações do ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) embasados nas diretrizes do Centro Nacional para a Substituição, Refinamento e Redução de Animais em Pesquisa (NC3RS).

3.2 DROGAS E SOLUÇÕES

LAV OE e óleo vegetal neutro (ou seja, óleo de abacate) foram obtidos de uma fonte comercial, sendo utilizado lote único (Quinarí - Ponta Grossa - Brasil) e ambos foram diluídos em álcool de cereais (Cloroquímica – Curitiba – Brasil) para uma concentração de 5% (v/v) segundo estudos anteriores (CHIOCA; FERRO; BARETTA; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A amostra foi analisada para confirmar a composição química e os principais componentes (Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa / Alta Resolução (GC-MS). As análises de GC tem sido amplamente utilizadas para a caracterização do LAV OE e outros OEs (CAI; LIN; ZHU; SU, 2006; CAVANAGH; WILKINSON, 2002; GALHIANE; RISSATO; CHIERICE; ALMEIDA *et al.*, 2006; TAKAHASHI; SATOU; OHASHI; HAYASHI *et al.*,

2011). LAV OE apresentou 30% de linalol e 40,1% de acetato de linalila, que são os principais componentes do LAV OE (CAVANAGH; WILKINSON, 2002; TAKAHASHI; SATOU; OHASHI; HAYASHI *et al.*, 2011), que estão de acordo com os padrões estabelecidos pela ISO-3515 de 2002 (STANDARDIZATION, 2002).

Cloridrato de cetamina (50 mg/kg, Syntec, São Paulo, Brasil) e cloridrato de Xylasina (7 mg/kg, Syntec, São Paulo, Brasil) foram utilizados como anestésicos. Alguns experimentos foram realizados com a administração da Formalina (Alphatec, Brasil) diluída a 2,5% em solução salina estéril a 0,9% (Indústria Farmacêutica EquiPLEX, Goiânia, Brasil). A naltrexona (5 mg/kg, NTX, Tocris Bioscience, Bristol, UK) foi diluída em solução salina estéril (Indústria Farmacêutica EquiPLEX, Goiânia, Brasil) e a dose utilizada foi baseada em estudos anteriores (EISENBERG, 1984; HANEY; MICZEK, 1994; SAVERNINI; SAVERNINI; DE AMARAL; ROMERO *et al.*, 2012). Todas as drogas foram preparadas pouco antes da realização dos experimentos.

3.3 EXPOSIÇÃO AO LAV OE

A exposição ao LAV OE ou veículo (óleo de abacate 5% - VEIC) foi feita individualmente em uma caixa moradia (41 x 32 x 16,5 cm), com um dispositivo especial desenvolvido para os experimentos (como mostrado na **FIGURA 1**) visando a volatilização padronizada e permitindo que os animais inalassem o OE por 30 minutos, conforme estudos anteriores (CHIOCA; FERRO; BARETTA; OLIVEIRA *et al.*, 2013; SHAW; ANNETT; DOHERTY; LESLIE, 2007). Os animais foram mantidos em salas separadas durante os experimentos para que o grupo controle não fosse exposto ao odor de LAV OE. Assim, evitou-se a interferência do OE no grupo controle. Além disso, a exposição ao OE ocorreu com apenas 1 animal por caixa para que não houvesse interferência na farmacocinética, considerando a via inalatória e a excreção por via pulmonar e urina. Considerando a baixa padronização de outros estudos, todos os procedimentos experimentais foram organizados e o aparato desenvolvido de forma a padronizar o estudo e proporcionar reprodutibilidade dos dados. Detalhes como o uso de feltro e abertura frontal no aparato difusor permitem volatilização padronizada. Além disso, a localização do

difusor na grade da caixa permitiu um distanciamento adequado e impossibilitou que os animais lambessem ou roessem o feltro contendo o LAV OE. As caixas foram parcialmente cobertas por papel *craft* para manter por mais tempo LAV OE no ambiente de forma padronizada. Os experimentos foram conduzidos sempre na mesma sala experimental para controle de iluminação, temperatura e tamanho do ambiente.

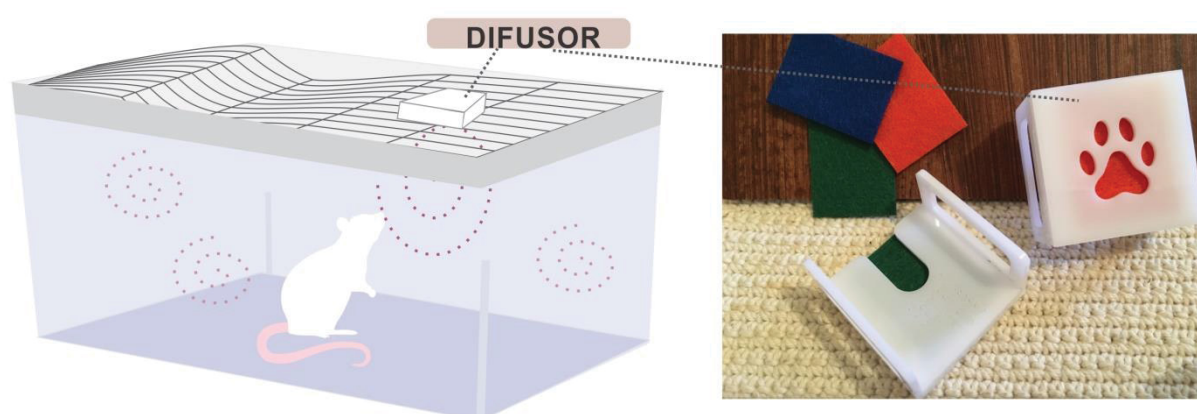


Figura 1 - Dispositivo especial produzido em acrílico para inalação de LAV OE ou de veículo (5%). O feltro recebeu 0,5 ml de LAV OE ou VEIC (óleo de abacate) e foi substituído para cada animal. A abertura frontal permite a volatilização padronizada do LAV OE. (Fonte: o autor, 2021)

3.4 MODELOS DE DOR

3.4.1 TESTE DA FORMAINA

O teste de formalina orofacial foi realizado conforme descrito por Clavelou et al. (DALLEL; RABOISSON; CLAVELOU; SAADE *et al.*, 1995) com pequenas modificações, conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo (CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004). O teste da formalina também foi realizado com injeção subcutânea (s.c.) na superfície plantar de uma das patas traseiras, como descrito anteriormente por Abbott et al. (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995). Resumidamente, os ratos foram colocados individualmente em caixas moradia por um período de ambientação de aproximadamente 15 minutos. Os animais receberam uma injeção s.c. de formalina (2,5%, 50 μ L) ou veículo (50 μ L de solução salina) no lábio superior ou pata traseira (**FIGURA 2**) e o comportamento de *grooming* (ou seja, o tempo gasto esfregando a área injetada com as patas dianteiras) foi avaliado por 30 minutos, e o número de *flinches* (ou seja, movimento

de agitação da pata injetada) foi contado durante 60 minutos, respectivamente. A primeira e segunda fases do teste de formalina orofacial foram consideradas 0 a 3 minutos e 12 a 30 minutos após a injeção, respectivamente. Após a injeção de formalina na pata traseira, a primeira fase foi considerada de 0 a 5 minutos, e a segunda fase de 15 a 60 minutos.

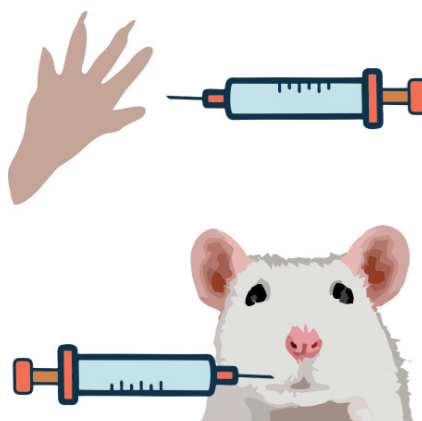


Figura 2 – Testes da Formalina: injeção s.c. de formalina a 2,5% na pata traseira direita ou lábio superior direito. (Fonte: o autor, 2021)

3.4.2 MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA

A dor pós-operatória foi induzida de acordo com o modelo proposto por Urata e colaboradores (URATA; SHINODA; HONDA; LEE *et al.*, 2015) e adicionalmente caracterizado pelo nosso grupo (ARAYA; BAGGIO; DE OLIVEIRA KOREN; ANDREATINI *et al.*, 2020; ARAYA; BARROSO; DE MELO TURNES; RADULSKI *et al.*, 2020). Os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (50 mg/kg e 7 mg/kg, i.p., respectivamente). Após a indução da anestesia, os animais foram mantidos com a boca aberta e colocados em posição lateral. Foi feita incisão na mucosa intraoral, padronizada no lado direito (profundidade, 2 mm; comprimento, 10 mm) e uma sutura foi feita no meio da incisão, como mostrado na **FIGURA 3**. Os ratos foram acompanhados até que se recuperassem da anestesia. O grupo falso-operado foi submetido à mesma manipulação, mas a incisão e a sutura não foram realizadas.

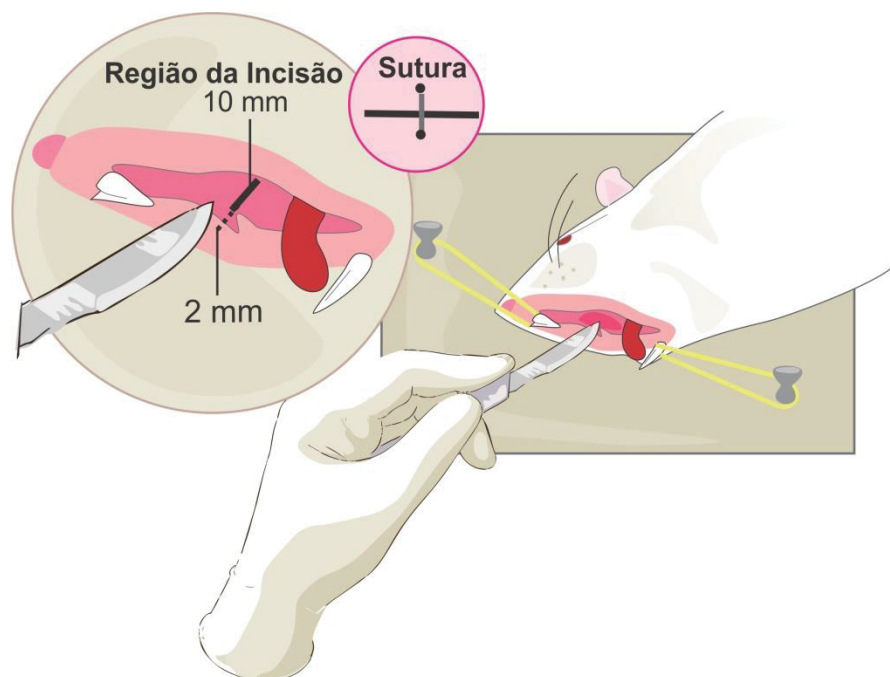


Figura 3 – Procedimento de incisão na mucosa oral (Fonte: o autor, 2021).

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.5.1 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA

A hiperalgesia térmica orofacial dos animais foi avaliada como descrito anteriormente pelo grupo (ARAYA; BAGGIO; DE OLIVEIRA KOREN; ANDREATINI *et al.*, 2020; ARAYA; BARROSO; DE MELO TURNES; RADULSKI *et al.*, 2020; CHICHORRO; ZAMPRONIO; CABRINI; FRANCO *et al.*, 2009). Inicialmente, os ratos foram habituados ao método de contenção para evitar estresse durante o teste. O limiar de resposta ao calor facial foi avaliado através da aproximação de uma fonte de calor radiante (cerca de 50°C) a uma distância de 1 cm da superfície da região das vibrissas no lado direito da face, ou seja, no mesmo lado da incisão na mucosa intraoral, conforme ilustrado na **FIGURA 4**. A latência de resposta foi registrada, sendo considerados os movimentos de retirada da cabeça ou a agitação vigorosa das vibrissas. Um tempo de corte de 20 segundos foi estabelecido para evitar danos teciduais.



Figura 4 – os animais foram gentilmente contidos e uma fonte de calor radiante (cerca de 50°C) foi aproximada a cerca de 1 cm da superfície da região das vibrissas. (Fonte: o autor, 2021)

3.5.2 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA

Os ratos foram mantidos individualmente para ambientação em caixas de observação por pelo menos 2 horas antes do teste. O limiar mecânico foi medido usando uma série de 8 filamentos de von Frey com gramaturas entre 0,04 a 8,0 g em ordem crescente (monofilamentos Semmes-Weinstein, Stoelting, Wood Dale, IL - EUA) como descrito anteriormente pelo nosso grupo (ARAYA; BAGGIO; KOREN; ANDREATINI *et al.*, 2020; ARAYA; BARROSO; DE MELO TURNES; RADULSKI *et al.*, 2020; CHICHORRO; ZAMPRONIO; CABRINI; FRANCO *et al.*, 2009; GAMBETA; KOPRUSZINSKI; DOS REIS; ZANOVELI *et al.*, 2016). O teste consistiu em três aplicações consecutivas de cada filamento de Von Frey na região das vibrissas do rato, no mesmo lado da incisão, com um intervalo de 30 segundos entre cada aplicação (**FIGURA 5**). Cada série de estimulação começou com o filamento produzindo a menor força e seguiu até o filamento que evocava duas respostas positivas, incluindo retirada rápida da cabeça, *grooming* ou reações de fuga ou ataque contra o filamento. Para evitar respostas inespecíficas, foi realizada uma seleção prévia e apenas animais que não responderam à aplicação do filamento de 8 g foram incluídos no estudo (CHICHORRO; ZAMPRONIO; RAE, 2006).

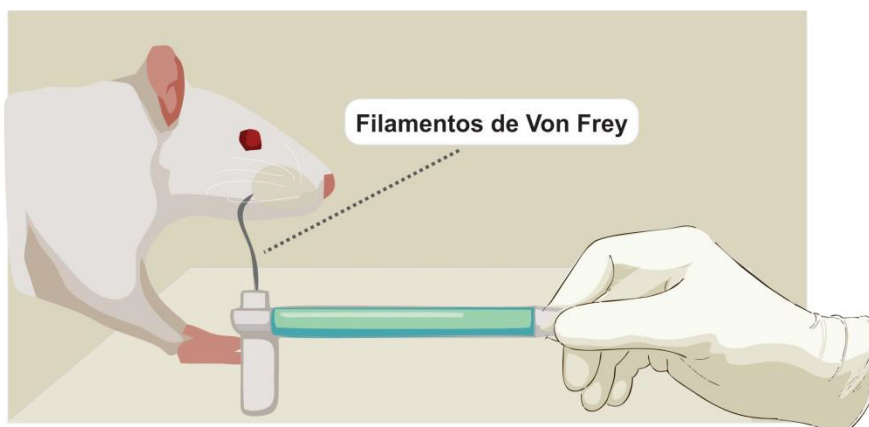


Figura 5 - O limiar mecânico foi avaliado através da aplicação de uma série de 8 filamentos de Von Frey, que variavam de 0,04 a 8,0 g, em ordem crescente na região das vibrissas do rato no mesmo lado da incisão mucosa intraoral. (Fonte: o autor, 2021).

3.5.3 COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO

3.5.3.1 TESTE DO CAMPO ABERTO (CA)

Este teste foi realizado conforme descrito anteriormente (WALSH; CUMMINS, 1976) e consistiu em colocar os ratos no centro de uma arena (50 cm de comprimento, 50 cm de largura e 40 cm de altura) com paredes laterais fechadas e o chão dividido em nove quadrantes (**FIGURA 6**). O comportamento dos ratos foi registrado durante 5 minutos para avaliação posterior do número de cruzamentos entre essas unidades (quadrados) e o número de cruzamentos no quadrante central, com as quatro patas.

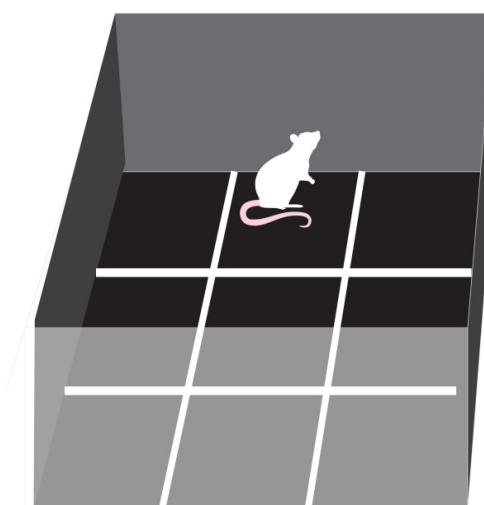


Figura 6 – Campo aberto com demarcação dos quadrantes (Fonte: o autor, 2021)

3.5.3.2 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Este teste foi realizado de acordo com estudos anteriores (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; PELLOW; CHOPIN; FILE; BRILEY, 1985; RODGERS; DALVI, 1997) em uma sala com luz controlada (60 lux). O teste teve início ao colocar o animal no centro do aparato (**FIGURA 7**), de frente para o braço aberto e, durante 5 minutos, o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados foi registrado. Além disso, foram avaliadas medidas etológicas, incluindo avaliação de risco e comportamento de *Head dip*, ou seja, “mergulho da cabeça” (BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1991; BLANCHARD; BLANCHARD, 1990)

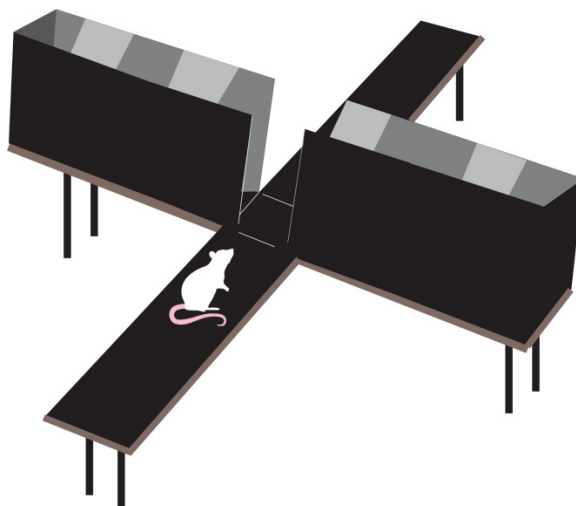


Figura 7 – Labirinto em cruz elevado (Fonte: o autor, 2021)

3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Teste de formalina (orofacial e pata traseira): os animais foram expostos ao veículo (VEIC) ou LAV OE 5% durante 30 minutos, e imediatamente após a inalação, receberam uma injeção (s.c.) de formalina ou salina no lábio superior e o tempo de *grooming* foi avaliado por 30 minutos. Um grupo independente de ratos foi submetido aos mesmos procedimentos, mas após a inalação receberam formalina

ou injeção de veículo na superfície plantar de uma das patas traseiras, e o número de *flinches* foi registrado durante 60 minutos.

Modelo de dor orofacial pós-operatória: a avaliação da hiperalgesia mecânica e térmica foi realizada em grupos independentes de animais. As respostas ao calor e ao estímulo mecânico foram avaliadas em animais submetidos à incisão da mucosa intraoral ou do grupo falso-operado. No terceiro dia após a cirurgia, os animais foram expostos ao LAV OE ou VEIC durante 30 minutos, seguidos de avaliação do calor e hiperalgesia mecânica aos 30 minutos após a inalação e em intervalo de 1 hora até a 4ª hora. Um terceiro grupo independente recebeu injeção intraperitoneal de NTX 15 minutos antes da inalação do LAV OE no terceiro dia após a incisão intraoral, e a avaliação da hiperalgesia térmica ocorreu conforme descrito anteriormente. Animais do grupo falso-operado receberam os mesmos tratamentos.

Testes no LCE e CA: No dia 3 após incisão intraoral, os animais foram expostos ao LAV OE ou VEIC durante 30 minutos, seguidos pela avaliação no LCE, e prontamente transferidos para o CA. Os mesmos animais foram registrados por 5 minutos em cada aparato para análise posterior de seu comportamento, considerando-se medidas clássicas e etológicas.

Todos os protocolos experimentais estão ilustrados antes de cada resultado.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para assegurar que os dados atendessem aos critérios para realização dos testes paramétricos. Quando os critérios foram aceitos, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 9 a 10 animais por grupo e o nível de significância foi definido em $P < 0,05$. A análise da variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguidas pelo teste pós-hoc de Bonferroni foi utilizada para analisar dados do teste de formalina e hiperalgesia mecânica e térmica induzida por incisão intraoral. Dados cumulativos das fases I e II do teste de formalina, e os dados dos testes CA e LCE foram analisados pela ANOVA de uma via seguida pelo teste pós-

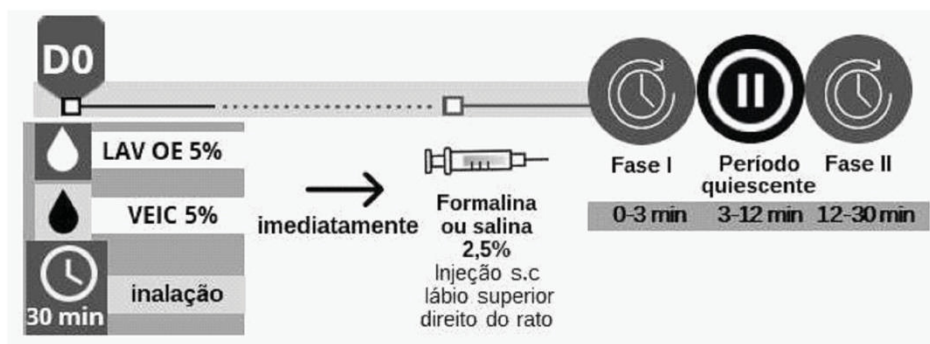
hoc de Bonferroni. A análise estatística foi realizada usando o GraphPad Prism 6 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

4 RESULTADOS

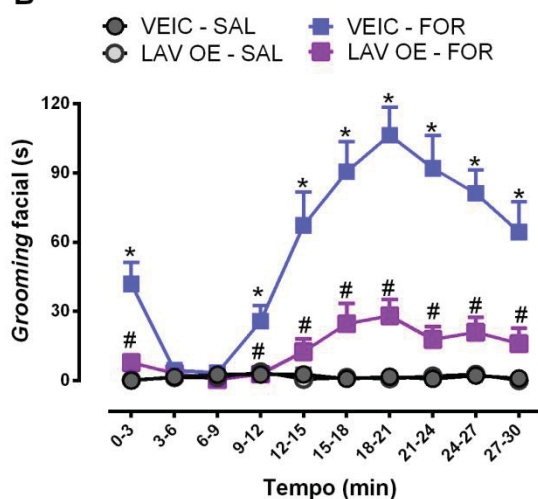
4.1 LAV OE reduziu o comportamento nociceptivo induzido por formalina

A injeção subcutânea de formalina (2,5%, 50 μ L) no lábio superior induziu uma resposta nociceptiva bifásica, que foi significativamente diferente dos ratos que receberam a injeção de salina ($P < 0,05$, **Figura 8B**). O tratamento com LAV OE causou uma redução significativa da nocicepção induzida por formalina em 0 a 3 min e no intervalo de 9 a 30 minutos. A **Figura 8C** ilustra o tempo de *grooming* na fase I (0-3 minutos) e na fase II (12-30 minutos) da nocicepção induzida por formalina. Ambas as fases do teste da formalina foram significativamente reduzidas após a inalação de LAV OE ($P < 0,05$). A exposição prévia ao LAV OE em ratos que receberam uma injeção de salina não alterou o tempo de *grooming* facial em comparação com o grupo controle (VEIC-SAL, $p > 0.05$) **Figuras 8B e 8C**.

A



B



C

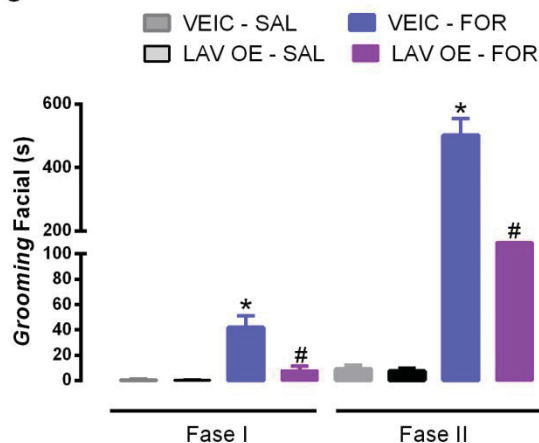
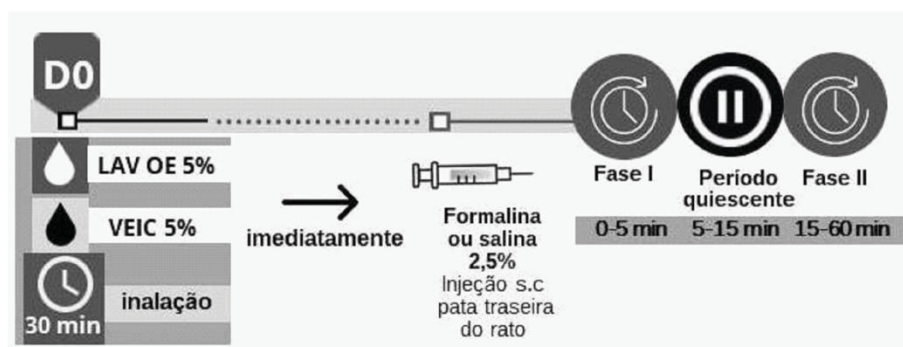


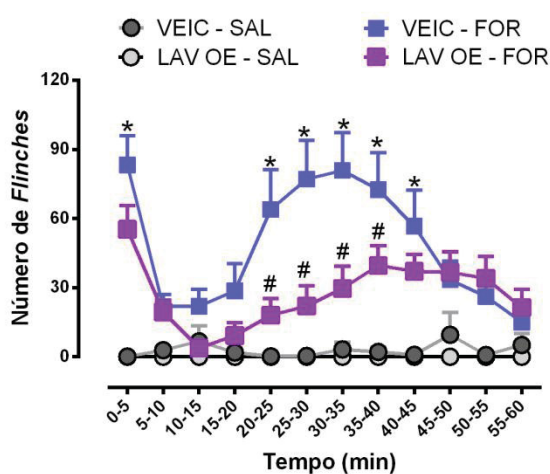
Figura 8. LAV OE reduziu o comportamento nociceptivo induzido por formalina na região orofacial. **(A)** Linha do tempo dos procedimentos experimentais. **(B)** Os ratos foram expostos ao LAV OE ou VEIC, ambos na concentração de 5%, por 30 minutos seguidos por injeção de Formalina (FOR, 2,5%/50 μ L) ou salina (SAL, 50 μ L) no lábio superior. O comportamento de *grooming* facial foi avaliado durante 30 minutos. **(C)** Efeito do LAV OE na fase I (0-3 minutos) e fase II (12-30 minutos) do teste da formalina orofacial. Os dados são expressos como média \pm EPM (n = 10). ANOVA de 2 vias (B) e 1 via (C) seguido do teste post-hoc de Bonferroni. *P < 0,05 quando comparado com o grupo VEIC-SAL e # P < 0,05 quando comparado com o grupo VEIC-FOR. VEIC - veículo; FOR - formalina;

A formalina (2,5%, 50 μ L) injetada na pata traseira dos ratos também induziu uma resposta nociceptiva bifásica, significativamente diferente dos ratos injetados por salina ($P < 0,05$) como mostrado na **Figura 9B**. No entanto, o tratamento com LAV OE não causou uma redução significativa da nocicepção induzida por formalina em 0-5 min, classificada como fase I ($P > 0,05$), mas a exposição prévia ao LAV OE causou uma redução significativa da nocicepção induzida por formalina no intervalo de 20 a 40 minutos ($P < 0,05$). A **Figura 9C** ilustra a resposta nociceptiva cumulativa na fase I (0-5 minutos) e na fase II (15-60 minutos) do teste de formalina. O LAV OE não alterou a resposta nociceptiva na fase I ($P > 0,05$) do teste, mas reduziu significativamente a fase II ($P < 0,05$). A exposição prévia ao LAV OE em ratos que receberam injeção de salina não alterou o tempo de *flinches* em comparação com o grupo controle (ou seja, VEIC-SAL, $P > 0,05$, **Figuras 9B e 9C**).

A



B



C

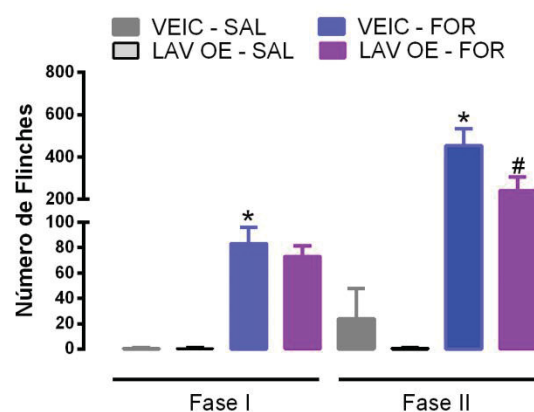
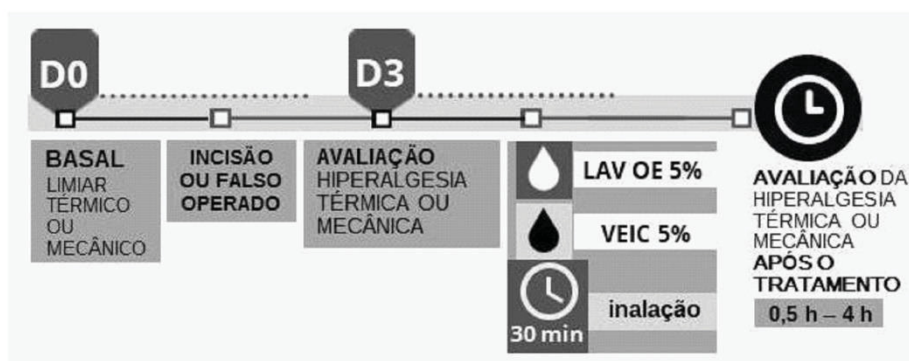


Figure 9. LAV OE reduziu o comportamento nociceptivo na fase II do teste de formalina na pata. **(A)** Linha do tempo dos procedimentos experimentais. **(B)** Os ratos foram expostos ao LAV OE ou VEIC, ambos na concentração de 5% por 30 minutos, e em seguida receberam uma injeção de Formalina (FOR, 2,5%/50 μ L) ou salina (SAL, 50 μ L) na pata traseira. O número de *flinches* foi registrado por 60 minutos. **(C)** Efeito do LAV OE na fase I (0-5 minutos) e fase II (15-60 minutos) do teste de formalina na pata. Os dados são expressos como média \pm EPM (n = 10). ANOVA de 2 vias (B) e 1 via (C) seguido do teste post-hoc de Bonferroni. *P < 0,05 quando comparado com o grupo VEIC-SAL e # P < 0,05 quando comparado com o grupo VEIC-FOR. VEIC - veículo; FOR - formalina;

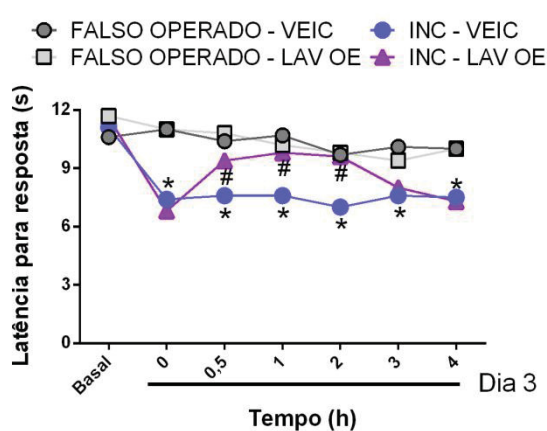
4.2 LAV OE reduziu a hiperalgesia térmica e mecânica no modelo de dor orofacial pós-operatória em ratos

De acordo com estudos prévios do nosso grupo (ARAYA; BAGGIO; DE OLIVEIRA KOREN; ANDREATINI *et al.*, 2020; ARAYA; BARROSO; DE MELO TURNES; RADULSKI *et al.*, 2020), a incisão intraoral causa hiperalgesia térmica e mecânica que atinge o pico no dia 3 após a cirurgia. A exposição ao LAV OE por inalação resultou em um aumento do tempo de latência em resposta ao estímulo térmico que começou em 30 minutos e persistiu até 2 horas após o tratamento ($P < 0,05$), como ilustrado na **Figura 10B**. A exposição prévia ao LAV OE não alterou significativamente o tempo de latência do grupo falso-operado, seja ele tratado com veículo ou LAV OE. Em adição, o LAV OE foi capaz de atenuar a hiperalgesia mecânica facial induzida pela incisão intraoral, com um efeito significativo que durou de 30 minutos até 3 horas ($P < 0,05$, **Figura 10C**). A exposição prévia ao LAV OE não alterou o limiar mecânico dos animais do grupo falso-operado durante todo o período de avaliação.

A



B



C

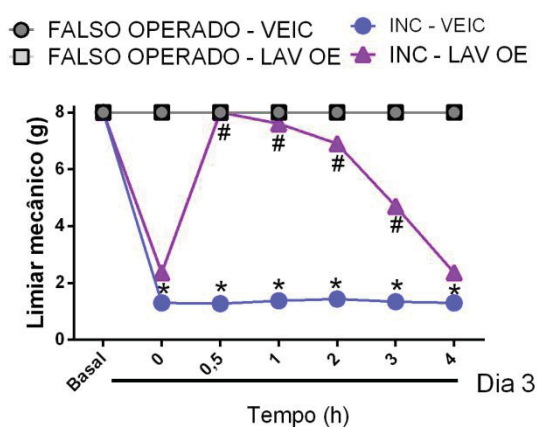
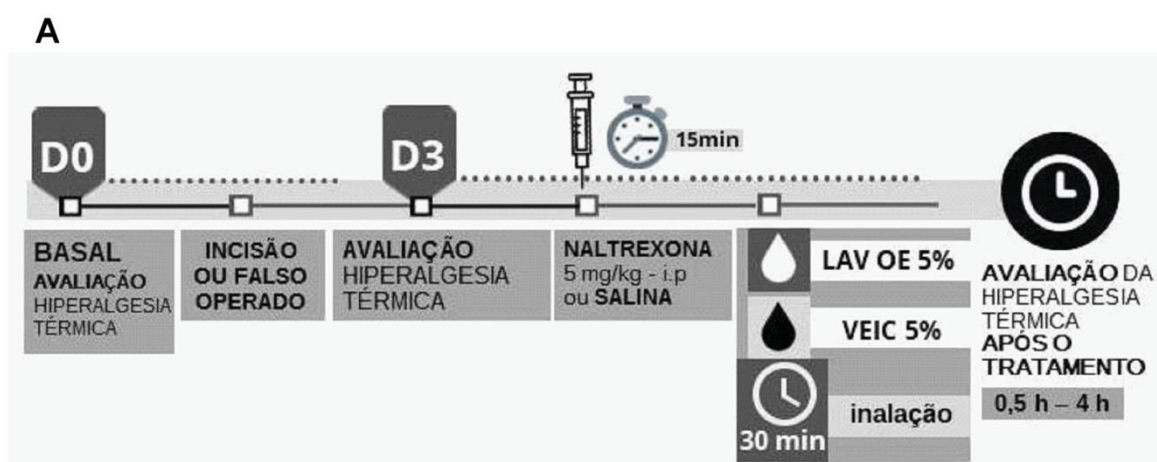


Figura 10 - LAV OE reduziu a hiperalgesia térmica e mecânica no modelo de dor orofacial pós-operatória em ratos. **(A)** Linha do tempo dos procedimentos experimentais. No dia 3, após a incisão oral, os ratos desenvolveram hiperalgesia térmica e mecânica que foram significativamente reduzidas pela exposição dos animais ao LAV OE (5% por 30 minutos) em comparação com o grupo exposto ao veículo **(B e C)**, respectivamente). Os dados são expressos como média \pm EPM ($n = 10$). ANOVA de 2 vias com medidas repetidas seguidas pelo teste post-hoc de Bonferroni. * $P \leq 0,05$ em comparação com o grupo falso-operado-VEIC; e # $P \leq 0,05$ em comparação com o grupo INC-VEIC. INC- incisão; VEIC- veículo.

4.3 A naltrexona reduziu o efeito anti-hiperalgésico do LAV OE no modelo de dor pós-operatória

A exposição dos animais ao LAV OE por inalação causou um aumento do tempo de latência para resposta ao estímulo térmico em ratos submetidos à incisão intraoral ($P < 0,05$), mas não alterou a resposta do grupo falso-operado ($P > 0,05$). O pré-tratamento sistêmico com naltrexona (15 min antes dos tratamentos inalatórios) não afetou a resposta dos grupos controle (falso-operado e incisão exposto ao veículo) ($P > 0,05$), entretanto causou uma redução parcial do efeito anti-hiperalgésico do LAV OE nos animais submetidos à incisão e expostos ao LAV OE ($P < 0,05$, **Figura 11B**).



B

- FALSO OPERADO - NTX - VEIC
- FALSO OPERADO - NTX - LAV OE
- ◆ INC - SAL - VEIC
- ▼ INC - SAL - LAV OE
- ▲ INC - NTX - LAV OE
- INC - NTX - VEIC

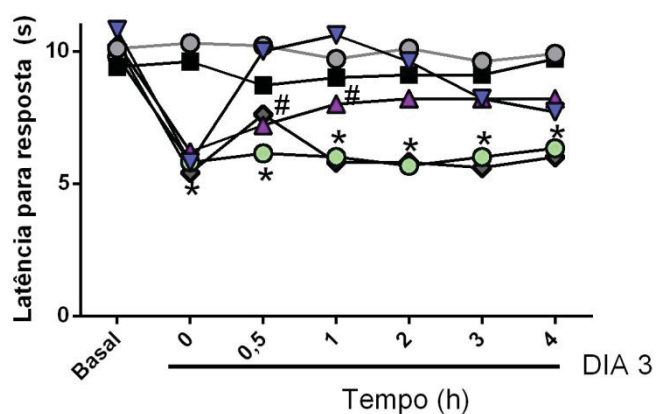
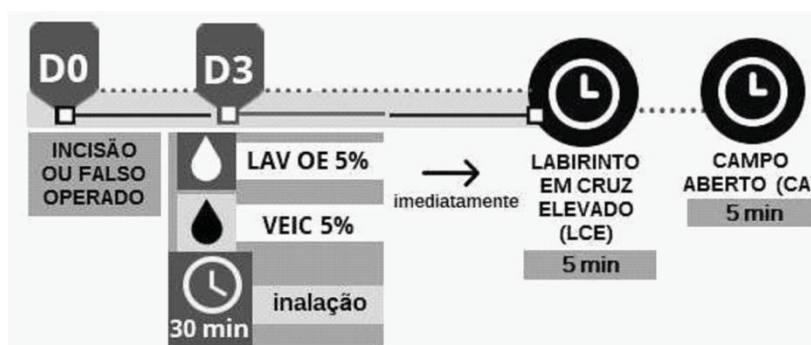


Figura 11 - A naltrexona reduziu o efeito anti-hiperalgésico do LAV OE no modelo de dor pós-operatória. **(A)** Linha do tempo dos procedimentos experimentais. **(B)** O pré-tratamento com naltrexona (NTX, 5 mg/kg, i.p.) atenuou o efeito do LAV OE na hiperalgésia térmica no dia 3 após a incisão. Os dados são expressos como média \pm EPM ($n = 10$), ANOVA de 2 vias com medidas repetidas seguidas do teste post-hoc da Bonferroni. * $P \leq 0,05$ quando comparado com Falso-operados-NTX-VEIC, e # $P \leq 0,05$ quando comparado com INC-SAL-LAV OE. NTX-naltrexona; VEIC-veículo; INC-incisão SAL-salina

4.4 LAV OE apresentou efeito do tipo ansiolítico em ratos submetidos à incisão intraoral

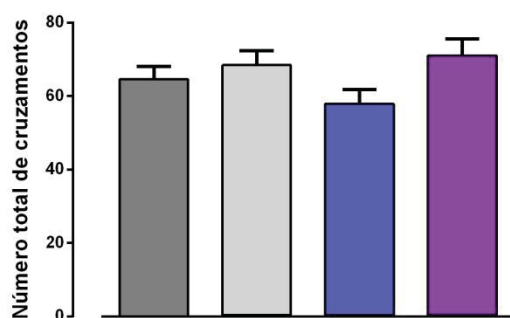
Um estudo anterior do nosso grupo demonstrou que no terceiro dia após a incisão intraoral, os ratos exibem comportamento do tipo ansioso (ARAYA; BAGGIO; DE OLIVEIRA KOREN; ANDREATINI *et al.*, 2020). Os dados do presente estudo mostram que o número de cruzamentos no CA não difere entre ratos do grupo falso-operado e incisão ($P > 0,05$), bem como, não é afetado pela exposição prévia do veículo ou LAV OE ($P > 0,05$) como ilustrado na **Figura 12B**. Da mesma forma, não houve diferença entre os grupos no número de entradas nos braços fechados no LCE ($P < 0,05$); **Figura 13A**), e, juntos, esses resultados indicam ausência de déficit locomotor. No entanto, ratos submetidos à incisão mostraram um número reduzido de entradas no centro da arena do CA, em comparação com ratos falso-operados ($P < 0,05$), que foi completamente restaurado pela exposição ao LAV OE ($P < 0,05$), mas não ao veículo ($P > 0,05$; **Figure 12C**). Além disso, como observado na **Figura 13D**, foi detectada uma diferença significativa entre os grupos quando o tempo gasto nos braços abertos de LCE foi avaliado. As figuras **13C e 13D** mostram que a inalação de LAV OE causou um aumento no número de entradas e no tempo gasto nos braços abertos ($P < 0,05$), indicando significativo efeito ansiolítico em comparação com os ratos tratados com veículo. As medidas etológicas de Avaliação de Risco e mergulho de cabeça (*head dip*) estenderam as observações de que ratos submetidos à incisão apresentam comportamento do tipo ansioso em comparação aos ratos falso-operados ($P < 0,05$). A exposição ao LAV OE causou uma diminuição no tempo do comportamento de avaliação de risco (**Figura 13E**) e induziu um aumento na frequência dos mergulhos da cabeça (**Figura 13F**), em relação ao grupo operado tratado com veículo ($P < 0,05$). Esses dados corroboram o efeito do tipo ansiolítico do LAV OE mostrado nos resultados anteriores.

A



B

■ FALSO OPERADOS - VEIC ■ INC - VEIC
 ■ FALSO OPERADOS - LAV OE ■ INC - LAV OE



C

■ FALSO OPERADOS - VEIC ■ INC - VEIC
 ■ FALSO OPERADOS - LAV OE ■ INC - LAV OE

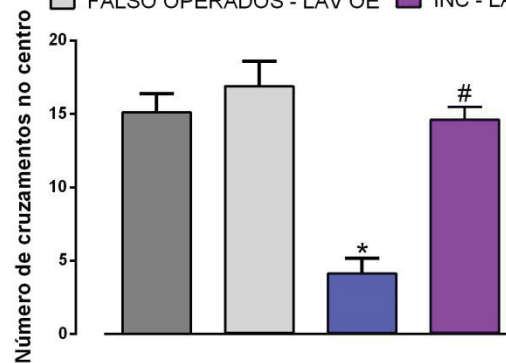


Figura 12 - LAV OE causou efeito ansiolítico em ratos submetidos à incisão intraoral e avaliados no teste de Campo Aberto. **(A)** Linha do tempo dos procedimentos experimentais; **(B)** Efeito do LAV OE no número de cruzamentos; **(C)** Efeito do LAV OE no número de entradas no centro do aparato. Os dados são expressos como média \pm EPM ($n = 9-10$). ANOVA de uma via seguido do teste post-hoc de Bonferroni. * $P \leq 0,05$ em comparação com o grupo falso-operado-VEIC; e # $P \leq 0,05$ em comparação com o grupo INC-VEIC. VEIC – veículo; INC – incisão.

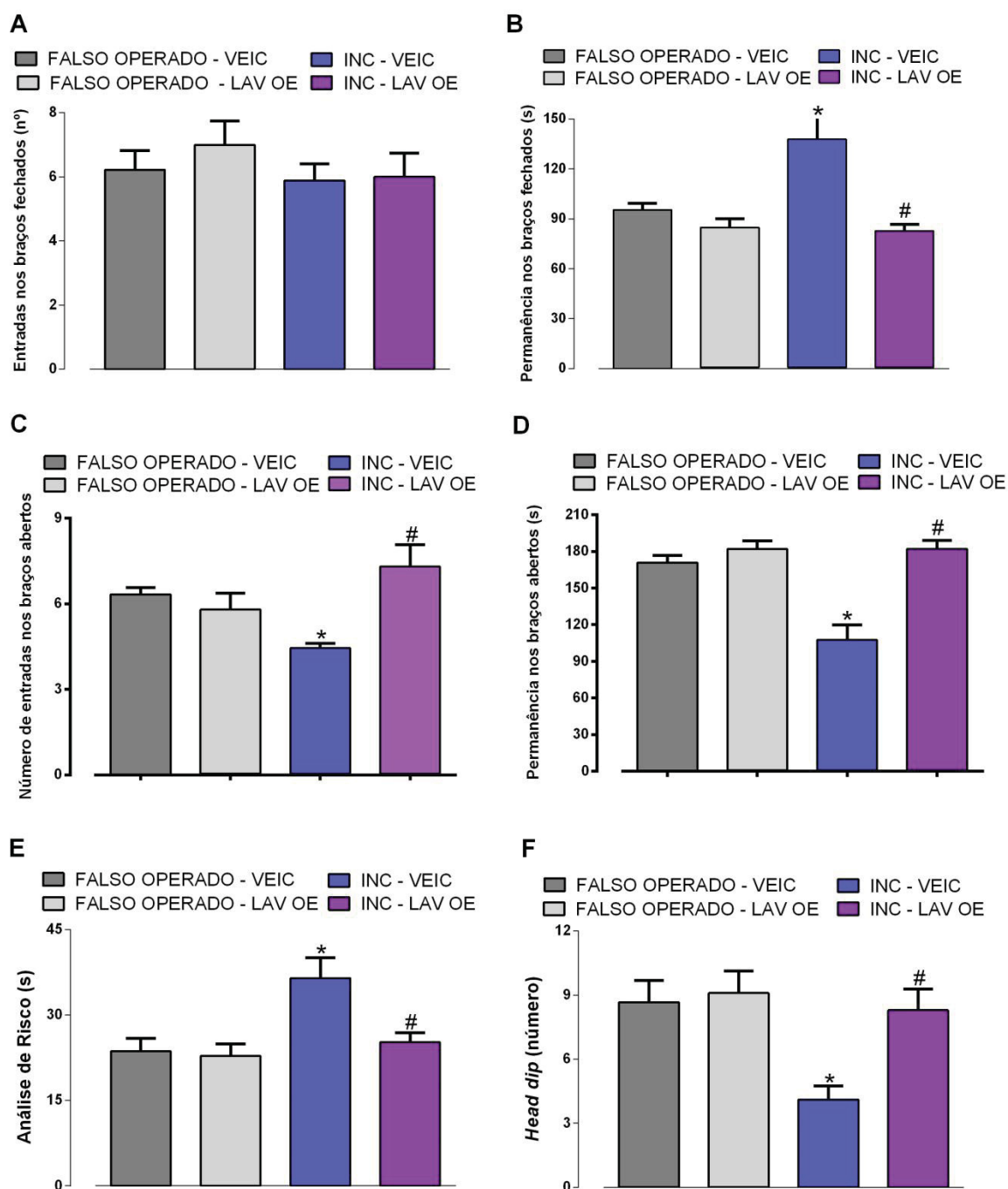


Figura 13 - LAV OE causou efeito do tipo ansiolítico em ratos submetidos à incisão intraoral e avaliados no LCE. **(A)** Efeito do LAV OE no número de entradas nos braços fechados; **(B)** Efeito do LAV OE no tempo de permanência nos braços fechados; **(C)** Efeito do LAV OE no número de entradas nos braços abertos; **(D)** Efeito do LAV OE sobre o tempo de permanência nos braços abertos; **(E)** Efeito do LAV OE em movimentos de *stretch* (avaliação de risco); **(F)** Efeito do LAV OE no número de mergulhos de cabeça dos animais. Os dados são expressos como média \pm EPM ($n = 9-10$). ANOVA de uma via seguido do teste post-hoc de Bonferroni. * $P \leq 0,05$ em comparação com o grupo SHAM-VEIC; e # $P \leq 0,05$ em comparação com o grupo INC-VEIC. VEIC – veículo; INC – incisão.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram, pela primeira vez, que o LAV OE por inalação promove efeito antinociceptivo e do tipo-ansiolítico em modelos de dor orofacial. Esses achados suportam o uso clínico do LAV OE como adjuvante no controle da dor e ansiedade associados aos procedimentos orofaciais, além de estimular novos estudos que examinam o benefício da inalação do LAV OE em outras condições de dor orofacial, inclusive dores orofaciais crônicas.

Há evidências crescentes de que o LAV OE e seus principais componentes, linalol e acetato de linalila, apresentam efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios. Experimentos *in vivo* demonstraram que a administração sistêmica de linalol reduziu o edema induzido por carragenina na pata traseira de ratos (PEANA; D'AQUILA; PANIN; SERRA *et al.*, 2002), enquanto que um experimento *in vitro* mostrou sua capacidade de reduzir a liberação de óxido nítrico (PEANA; MARZOCCO; POPOLO; PINTO, 2006). Da mesma forma, a administração oral do LAV OE causou uma redução na pleurisia e infiltração de leucócitos induzidos por carragenina, bem como, reduziu o edema de orelha dos ratos induzido por óleo de croton. É válido ressaltar, que nesse último experimento, a magnitude do efeito foi semelhante após a aplicação oral ou tópica (SILVA; LUFT; LUNARDELLI; AMARAL *et al.*, 2015). Além disso, o pré-tratamento oral com LAV OE também reduziu ambas as fases da resposta induzida pela formalina (2%) injetada na pata traseira dos ratos (SILVA; LUFT; LUNARDELLI; AMARAL *et al.*, 2015). Em consonância com este achado, demonstramos que a inalação de LAV OE causou uma redução significativa em ambas as fases do teste de formalina orofacial, e objetivando verificar o resultado em ratos fêmeas e através da via inalatória, avaliamos também a resposta do LAV OE após injeção de formalina na pata. Neste teste, verificamos que o LAV OE reduziu apenas a segunda fase. Além disso, destaca-se que, quando o percentual de inibição causado pela inalação de LAV OE foi calculado para cada fase de ambos os testes, a nocicepção orofacial foi mais suscetível ao efeito analgésico do LAV OE. As fases I e II do teste da formalina orofacial foram reduzidas em 81% e 76%, respectivamente, enquanto que na pata, a fase I não foi modificada e a fase II foi reduzida em 47%. Não temos conhecimento de estudos que avaliaram a distribuição do LAV OE após a inalação em ratos ou humanos, mas de acordo com esses dados,

a inalação pode favorecer o efeito do LAV OE na região orofacial. De acordo com nossos dados, é possível sugerir que o LAV OE pode ter uma influência direta sobre os aferentes trigeminais, bem como, pode ser rapidamente transportado diretamente para o cérebro a partir da cavidade nasal ao longo dos nervos olfatório e trigêmeo (CROWE; GREENLEE; KANTHASAMY; HSU, 2018; PERRY; PERRY, 2006). A via olfatória permite tanto o transporte de moléculas através da via intraneuronal (transporte axonal que pode levar horas), quanto a ativação dos aferentes nervosos periféricos, que gerariam respostas rápidas mediadas por canais iônicos (PERRY; PERRY, 2006). Esse último mecanismo poderia explicar o efeito analgésico rápido do LAV OE (ou seja, imediatamente após a exposição) e a aparente maior suscetibilidade da região orofacial. Ademais, a inalação do LAV OE possivelmente resulta na ativação da via '*Nose to Brain*', que tem atraído atenção no cenário clínico por muitas razões, incluindo efeitos rápidos no SNC associados à baixa incidência de efeitos adversos, podendo ser de especial interesse para o tratamento de condições de dor orofacial.

No cenário clínico, há vários relatos de benefícios da inalação do LAV OE na dor pós-operatória (ARSLAN; AYDINOGLU; KARAN, 2020; BOZKURT; VURAL, 2019; GUO; LI; ZHANG; LIU *et al.*, 2020). Apesar disso, é difícil estabelecer uma conclusão definitiva sobre sua aplicação, uma vez que os protocolos, condições e '*endpoints*' variam enormemente entre os estudos. Assim, é altamente recomendável o desenvolvimento de estudos pré-clínicos e clínicos padronizados de alta qualidade que permitam a inclusão de aromaterapia com uso do LAV OE em programas de saúde. Considerando a alta variabilidade entre os estudos, nossa proposta foi padronizar e detalhar o protocolo de exposição ao LAV OE, a fim de aumentar a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados. A exposição ao LAV OE ou VEIC foi feita individualmente com apenas um animal por caixa moradia. Além disso, os animais foram mantidos em salas separadas durante os experimentos para que o grupo controle não fosse exposto ao odor de LAV OE evitando qualquer interferência ou exposição residual. O difusor possui abertura frontal e recebeu um feltro que foi trocado para cada animal para permitir volatilização padronizada. Detalhes como a localização do difusor na grade evitando que os animais lambessem ou roessem o feltro e a condução dos experimentos sempre na mesma sala permitiram a padronização da temperatura, luminosidade e tamanho do ambiente,

proporcionando a volatilização das moléculas em quantidades muito semelhantes para cada animal. Através do emprego desse protocolo, demonstramos que a exposição prévia ao LAV OE causou um efeito anti-hiperalgésico rápido (ou seja, dentro de 30 minutos) e persistente (até 3 horas) na hiperalgesia térmica e mecânica em um modelo de dor pós-operatória. De acordo com essas observações, em um modelo de dor inflamatória induzida pela injeção de Adjuvante completo de Freund (CFA) na pata de camundongos, foi demonstrado que a inalação do LAV OE por 30 minutos causou redução da hiperalgesia mecânica sem afetar o desempenho locomotor, avaliado no teste de campo aberto (DONATELLO; EMER; SALM; LUDTKE *et al.*, 2020). Neste estudo, o bloqueio de receptores opioides e receptores canabinoides CB2 impediu o efeito anti-hiperalgésico do LAV OE, sugerindo o envolvimento de ambos os sistemas de controle endógeno da dor na analgesia induzida pelo LAV OE. Este achado corrobora estudos prévios que mostraram que o bloqueio de receptores opioides impediu o efeito analgésico do linalol (KATSUYAMA; OTOWA; KAMIO; SATO *et al.*, 2015; PEANA; DE MONTIS; NIEDDU; SPANO *et al.*, 2004). Em adição, no presente estudo foi demonstrado que, no dia 3 após a cirurgia de incisão, o pré-tratamento de ratos com naltrexona, 15 minutos antes da exposição ao LAV OE, causou uma redução parcial de seu efeito anti-hiperalgésico, reforçando a ideia de que a ativação de receptores opioides contribui para a analgesia pelo LAV OE. Esta observação poderia explicar os efeitos do LAV OE na primeira fase da formalina, que é suscetível a analgésicos opioides (ABBADIE; TAYLOR; PETERSON; BASBAUM, 1997; ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995; TASHIRO; YAMAGUCHI; ISHIKAWA; SAKURAI *et al.*, 2016). A naltrexona é um antagonista opioide não seletivo com rápida absorção, que apresenta tempo de meia vida de aproximadamente 4 horas em ratos (BHARGAVA; RAHMANI; VILLAR; LARSEN, 1993) A redução parcial do efeito do LAV OE pela NTX, juntamente com os estudos que mostram o envolvimento de outros receptores, indicam que vários mecanismos podem contribuir para o efeito analgésico do LAV OE.

O efeito ansiolítico do LAV OE está bem estabelecido e foi recentemente analisado em duas revisões sistemáticas (DONELLI; ANTONELLI; BELLINAZZI; GENSINI *et al.*, 2019; KANG; NAM; LEE; KIM, 2019). A conclusão de ambas as revisões é que o LAV OE administrado pela via oral parece proporcionar benefício

no controle da ansiedade, mas a baixa qualidade e a heterogeneidade dos estudos sobre o tema limitaram outras interpretações. Além disso, há vários relatos de que o LAV OE tomado como cápsulas (Silexan®) promove efeito ansiolítico em pacientes, o que é comparável ou até mesmo superior aos tratamentos padrão-ouro para ansiedade (KASPER, 2013; KASPER; MÜLLER; VOLZ; MÖLLER *et al.*, 2018; MÖLLER; VOLZ; DIENEL; SCHLÄFKE *et al.*, 2019; YAP; DOLZHENKO; JALAL; HADI *et al.*, 2019). No entanto, poucos estudos avaliaram o efeito ansiolítico LAV OE após a inalação, e os mesmos são bastante heterogêneos, e esses dois fatores limitam a interpretação dos achados. Nossos dados mostram que ratos com dor inflamatória persistente apresentaram comportamento do tipo ansioso, que foi significativamente reduzido pela exposição ao LAV OE por inalação. O efeito do tipo ansiolítico foi avaliado nos testes LCE e CA, que também revelaram que a inalação de LAV OE não causou déficit locomotor, uma vez que não alterou o número de cruzamentos no CA e o número de entradas nos braços fechados do LCE. Por outro lado, a inalação do LAV OE aumentou o número de entradas no centro do CA, e o número de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE de ratos operados, indicando efeito do tipo ansiolítico. Esses resultados corroboram evidências anteriores de que o LAV OE 5% por inalação diminui o comportamento do tipo ansioso em camundongos (CHIOCA; FERRO; BARETTA; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Além dos parâmetros clássicos do LCE, também foram avaliadas medidas etológicas (ou seja, avaliação de risco e movimento de mergulho da cabeça), permitindo uma caracterização comportamental mais completa (BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1991; BLANCHARD; BLANCHARD, 1990). O comportamento de avaliação de risco é direcionado para potenciais fontes de perigo e varredura do ambiente, enquanto o movimento de mergulho da cabeça indica comportamento exploratório, e ambos são considerados índices sensíveis de ansiedade e conforto, respectivamente (BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1991; RODGERS; DALVI, 1997; WEISS; WADSWORTH; FLETCHER; DOURISH, 1998). O LAV OE também atenuou o comportamento de análise de risco e aumentou significativamente o comportamento de mergulho da cabeça, reforçando a evidência de seu efeito do tipo ansiolítico após a inalação. É relevante mencionar que os animais falso-operados não apresentaram efeito ansiolítico após a inalação do LAV OE em comparação aos animais que receberam VEIC, podendo indicar uma

prevalência do efeito do LAV OE sobre o receptor de serotonina 5HT_{1A}, corroborando outros estudos (CHIOCA; FERRO; BARETTA; OLIVEIRA *et al.*, 2013; LÓPEZ; NIELSEN; SOLAS; RAMÍREZ *et al.*, 2017). Entretanto, são necessários estudos adicionais, uma vez que esta via de sinalização é complexa e com diferenças conforme a região cerebral – hipocampo e córtex pré frontal (ALBERT; VAHID-ANSARI, 2019) além de mecanismos pré e pós-sinápticos (BARNES; SHARP, 1999). Evidências de estudos pré-clínicos indicam que os mecanismos envolvidos no efeito do tipo ansiolítico do LAV OE incluem a inibição dos canais de cálcio voltagem dependente; antagonismo dos receptores NMDA, inibição do transportador de serotonina e ativação do receptor de serotonina 5HT_{1A} (CHIOCA; FERRO; BARETTA; OLIVEIRA *et al.*, 2013; LÓPEZ; NIELSEN; SOLAS; RAMÍREZ *et al.*, 2017; SCHUWALD; NÖLDNER; WILMES; KLUGBAUER *et al.*, 2013). Da mesma forma, todos esses mecanismos podem contribuir para o efeito analgésico do LAV OE, podendo ser de especial importância em condições em que a dor e a ansiedade coexistem. Os resultados do presente estudo sugerem que o LAV OE pode ser útil no tratamento da dor e ansiedade associada, o que está de acordo com alguns estudos clínicos (ARSLAN; AYDINOGLU; KARAN, 2020; GHADERI; SOLHJOU, 2020; SINGH; RAND; EROSA; CHO *et al.*, 2021; ŞAHIN; TOKGÖZ; DEMIR, 2021). Além disso, estudos realizados em humanos não esclarecem se os efeitos ansiolíticos do LAV OE são resultado de ação no SNC (através do sistema olfativo e límbico) ou se a ação é mediada periféricamente (CAVANAGH; WILKINSON, 2002). É importante ressaltar que o nervo olfatório conduz informações diretamente ao sistema límbico, região fundamental no processamento da dor e da emoção. No entanto, os mecanismos exatos, subjacentes aos efeitos analgésicos e ansiolíticos do LAV OE, bem como as estruturas periféricas e centrais envolvidas, ainda precisam ser elucidadas. Devido à complexa fitoquímica do LAV OE (CAVANAGH; WILKINSON, 2002; DONATELLO; EMER; SALM; LUDTKE *et al.*, 2020; LÓPEZ; NIELSEN; SOLAS; RAMÍREZ *et al.*, 2017; TAKAHASHI; SATOU; OHASHI; HAYASHI *et al.*, 2011) estudos adicionais são necessários para a compreensão dos aspectos farmacocinéticos após inalação, bem como dos mecanismos subjacentes aos seus efeitos na dor e ansiedade.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados sugerem que o LAV OE tem efeitos antinociceptivos em modelos de dor orofacial, corroborando evidências clínicas e pré-clínicas. Além disso, demonstramos efeito ansiolítico consistente do LAV OE após inalação em ratos com dor persistente. Este resultado, demonstrado pela primeira vez por via inalatória, em dois modelos diferentes de dor orofacial, corrobora as observações clínicas de que a aromaterapia com LAV OE pode proporcionar benefício na dor e ansiedade em condições em que ambas coexistem. Sugerimos também que a eficácia do LAV OE por inalação deve ser explorada em estudos pré-clínicos e clínicos, uma vez que representa um método simples e de baixo custo que pode ser particularmente útil em condições de dor orofacial.

7. REFERÊNCIAS

ABBADIE, C.; TAYLOR, B. K.; PETERSON, M. A.; BASBAUM, A. I. Differential contribution of the two phases of the formalin test to the pattern of c-fos expression in the rat spinal cord: studies with remifentanil and lidocaine. **Pain**, 69, n. 1-2, p. 101-110, Jan 1997.

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, 60, n. 1, p. 91-102, 1995.

ABDULLAYEV, R.; ULUDAG, O.; CELIK, B. Índice de Analgesia/Nocicepção: avaliação da dor aguda pós-operatória. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, 69, n. 4, p. 396-402, 2019.

ALBERT, P. R.; VAHID-ANSARI, F. The 5-HT_{1A} receptor: Signaling to behavior. **Biochimie**, 161, p. 34-45, Jun 2019.

ARAYA, E. I.; BAGGIO, D. F.; DE OLIVEIRA KOREN, L.; ANDREATINI, R. *et al.* Acute orofacial pain leads to prolonged changes in behavioral and affective pain components. **Pain**, 161, n. 12, p. 2830-2840, 2020.

ARAYA, E. I.; BAGGIO, D. F.; KOREN, L. O.; ANDREATINI, R. *et al.* Acute orofacial pain leads to prolonged changes in behavioral and affective pain components. **Pain**, 161, n. 12, p. 2830-2840, 12 2020.

ARAYA, E. I.; BARROSO, A. R.; DE MELO TURNES, J.; RADULSKI, D. R. *et al.* Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the trigeminal ganglion mediates facial mechanical and thermal hyperalgesia in rats. **Physiology & Behavior**, 226, p. 113127, 2020.

ARSLAN, I.; AYDINOGLU, S.; KARAN, N. B. Can lavender oil inhalation help to overcome dental anxiety and pain in children? A randomized clinical trial. **Eur J Pediatr**, 179, n. 6, p. 985-992, Jun 2020.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, 38, n. 8, p. 1083-1152, Aug 1999.

BARROS, R. Portaria nº 702 de 22 de março de 2018. Diário Oficial da República Federativa do Brasil: seção 1, Brasília DF, 56, pp. 65.

BHARGAVA, H. N.; RAHMANI, N. H.; VILLAR, V. M.; LARSEN, A. K. Effects of naltrexone on pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravenously administered morphine in the rat. **Pharmacology**, 46, n. 2, p. 66-74, 1993.

BJARNASON, I.; SCARPIGNATO, C.; HOLMGREN, E.; OLSZEWSKI, M. *et al.* Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Gastroenterology**, 154, n. 3, p. 500-514, 02 2018.

BLANCHARD, D.; BLANCHARD, R.; RODGERS, R. Risk assessment and animal models of anxiety. *In: Animal models in psychopharmacology*: Springer, 1991. p. 117-134.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Anti-predator defense as models of animal fear and anxiety. 1990.

BOZKURT, P.; VURAL, Ç. Effect of Lavender Oil Inhalation on Reducing Presurgical Anxiety in Orthognathic Surgery Patients. **J Oral Maxillofac Surg**, 77, n. 12, p. 2466.e2461-2466.e2467, Dec 2019.

BREER, H. Olfactory receptors: molecular basis for recognition and discrimination of odors. **Anal Bioanal Chem**, 377, n. 3, p. 427-433, Oct 2003.

CAI, J.; LIN, P.; ZHU, X.; SU, Q. Comparative analysis of clary sage (*S. sclarea* L.) oil volatiles by GC-FTIR and GC-MS. **Food chemistry**, 99, n. 2, p. 401-407, 2006.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev**, 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

CAVANAGH, H.; WILKINSON, J. Biological activities of lavender essential oil. **Phytotherapy research**, 16, n. 4, p. 301-308, 2002.

CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British journal of pharmacology**, 141, n. 7, p. 1175-1184, 2004.

CHICHORRO, J. G.; PORRECA, F.; SESSLE, B. Mechanisms of craniofacial pain. **Cephalalgia**, 37, n. 7, p. 613-626, Jun 2017.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; CABRINI, D. A.; FRANCO, C. R. *et al.* Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides**, 43, n. 2, p. 133-142, 2009.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ET(B) receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. **Exp Biol Med (Maywood)**, 231, n. 6, p. 1136-1140, Jun 2006.

CHIOCA, L. R.; ANTUNES, V. D.; FERRO, M. M.; LOSSO, E. M. *et al.* Anosmia does not impair the anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice. **Life sciences**, 92, n. 20-21, p. 971-975, 2013.

CHIOCA, L. R.; FERRO, M. M.; BARETTA, I. P.; OLIVEIRA, S. M. *et al.* Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission. **Journal of ethnopharmacology**, 147, n. 2, p. 412-418, 2013.

CROWE, T. P.; GREENLEE, M. H. W.; KANTHASAMY, A. G.; HSU, W. H. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. **Life Sci**, 195, p. 44-52, Feb 15 2018.

DA SILVA, J. A.; RIBEIRO-FILHO, N. P. A dor como um problema psicofísico. **Revista dor**, 12, n. 2, p. 138-151, 2011.

DALLEL, R.; RABOISSON, P.; CLAVELOU, P.; SAADE, M. *et al.* Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**, 61, n. 1, p. 11-16, Apr 1995.

DAMANN, N.; ROTHERMEL, M.; KLUPP, B. G.; METTENLEITER, T. C. *et al.* Chemosensory properties of murine nasal and cutaneous trigeminal neurons identified by viral tracing. **BMC Neurosci**, 7, p. 46, Jun 08 2006.

DE TOLEDO, I. P.; RÉUS, J. C.; FERNANDES, M.; PORPORATTI, A. L. *et al.* Prevalence of trigeminal neuralgia: A systematic review. **The Journal of the American Dental Association**, 147, n. 7, p. 570-576. e572, 2016.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

DOBETSBERGER, C.; BUCHBAUER, G. Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, 26, n. 5, p. 300-316, 2011.

DOMPER ARNAL, M. J.; HIJOS-MALLADA, G.; LANAS, A. Gastrointestinal and cardiovascular adverse events associated with NSAIDs. **Expert Opin Drug Saf**, p. 1-12, Aug 18 2021.

DONATELLO, N. N.; EMER, A. A.; SALM, D. C.; LUDTKE, D. D. *et al.* Lavandula angustifolia essential oil inhalation reduces mechanical hyperalgesia in a model of inflammatory and neuropathic pain: The involvement of opioid and cannabinoid receptors. **Journal of neuroimmunology**, 340, p. 577145, 2020.

DONELLI, D.; ANTONELLI, M.; BELLINAZZI, C.; GENSINI, G. F. *et al.* Effects of lavender on anxiety: A systematic review and meta-analysis. **Phytomedicine**, 65, p. 153099, Dec 2019.

EISENBERG, R. M. Effects of naltrexone on plasma corticosterone in opiate-naive rats: a central action. **Life Sci**, 34, n. 12, p. 1185-1191, Mar 19 1984.

FUJIWARA, R.; KOMORI, T.; MITSUO YOKOYAMA, M. Psychoneuroimmunological benefits of aromatherapy. 2002.

GALHIANE, M. S.; RISSATO, S. R.; CHIERICE, G. O.; ALMEIDA, M. V. *et al.* Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of Eugenia uniflora L. **Talanta**, 70, n. 2, p. 286-292, 2006.

GAMBETA, E.; BATISTA, M. A.; MASCHIO, G. P.; TURNES, J. M. *et al.* Anxiety- but not depressive-like behaviors are related to facial hyperalgesia in a model of trigeminal neuropathic pain in rats. **Physiol Behav**, 191, p. 131-137, 07 01 2018.

GAMBETA, E.; KOPRUSZINSKI, C. M.; DOS REIS, R. C.; ZANOVELI, J. M. *et al.* Evaluation of heat hyperalgesia and anxiety like-behaviors in a rat model of orofacial cancer. **Neuroscience letters**, 619, p. 100-105, 2016.

GAMBETA, E.; KOPRUSZINSKI, C. M.; DOS REIS, R. C.; ZANOVELI, J. M. *et al.* Facial pain and anxiety-like behavior are reduced by pregabalin in a model of facial carcinoma in rats. **Neuropharmacology**, 125, p. 263-271, 2017.

GHADERI, F.; SOLHJOU, N. The effects of lavender aromatherapy on stress and pain perception in children during dental treatment: A randomized clinical trial. **Complement Ther Clin Pract**, 40, p. 101182, Aug 2020.

GHURYE, S.; MCMILLAN, R. Orofacial pain - an update on diagnosis and management. **Br Dent J**, 223, n. 9, p. 639-647, Dec 2017.

GUO, P.; LI, P.; ZHANG, X.; LIU, N. *et al.* The effectiveness of aromatherapy on preoperative anxiety in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Int J Nurs Stud**, 111, p. 103747, Nov 2020.

HANEY, M.; MICZEK, K. A. Ultrasounds emitted by female rats during agonistic interactions: effects of morphine and naltrexone. **Psychopharmacology**, 114, n. 3, p. 441-448, 1994.

HANZAWA, A.; HANDA, T.; KOHKITA, Y.; ICHINOHE, T. *et al.* A Comparative Study of Oral Analgesics for Postoperative Pain After Minor Oral Surgery. **Anesth Prog**, 65, n. 1, p. 24-29, Spring 2018 2018.

HONDA, Y.; HANDA, T.; FUKUDA, K. I.; KOUKITA, Y. *et al.* Comparison of Risk Factors in Patients With Acute and Chronic Orofacial Pain. **Anesth Prog**, 65, n. 3, p. 162-167, 2018.

HOYA, Y.; MATSUMURA, I.; FUJITA, T.; YANAGA, K. The use of nonpharmacological interventions to reduce anxiety in patients undergoing gastroscopy in a setting with an optimal soothing environment. **Gastroenterol Nurs**, 31, n. 6, p. 395-399, 2008 Nov-Dec 2008.

HUMPHRIS, G. M.; ROGERS, S.; MCNALLY, D.; LEE-JONES, C. *et al.* Fear of recurrence and possible cases of anxiety and depression in orofacial cancer patients. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 32, n. 5, p. 486-491, 2003/01/01/ 2003.

HÄGGMAN-HENRIKSON, B.; LIV, P.; ILGUNAS, A.; VISSCHER, C. M. *et al.* Increasing gender differences in the prevalence and chronification of orofacial pain in the population. **Pain**, 161, n. 8, p. 1768-1775, 08 2020.

KANG, H. J.; NAM, E. S.; LEE, Y.; KIM, M. How Strong is the Evidence for the Anxiolytic Efficacy of Lavender?: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. **Asian Nurs Res (Korean Soc Nurs Sci)**, 13, n. 5, p. 295-305, Dec 2019.

KASPER, S. An orally administered lavandula oil preparation (Silexan) for anxiety disorder and related conditions: an evidence based review. **Int J Psychiatry Clin Pract**, 17 Suppl 1, p. 15-22, Nov 2013.

KASPER, S.; MÜLLER, W. E.; VOLZ, H. P.; MÖLLER, H. J. *et al.* Silexan in anxiety disorders: Clinical data and pharmacological background. **World J Biol Psychiatry**, 19, n. 6, p. 412-420, 09 2018.

KATSUYAMA, S.; OTOWA, A.; KAMIO, S.; SATO, K. *et al.* Effect of plantar subcutaneous administration of bergamot essential oil and linalool on formalin-induced nociceptive behavior in mice. **Biomed Res**, 36, n. 1, p. 47-54, 2015.

KOULIVAND, P. H.; KHALEGHI GHADIRI, M.; GORJI, A. Lavender and the nervous system. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, 2013, 2013.

KRITSIDIMA, M.; NEWTON, T.; ASIMAKOPOULOU, K. The effects of lavender scent on dental patient anxiety levels: a cluster randomised-controlled trial. **Community Dent Oral Epidemiol**, 38, n. 1, p. 83-87, Feb 2010.

LINCK, V. M.; DA SILVA, A. L.; FIGUEIRÓ, M.; CARAMÃO, E. B. *et al.* Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**, 2010.

LIU, Q.; HE, H.; MAI, L.; YANG, S. *et al.* Peripherally Acting Opioids in Orofacial Pain. **Front Neurosci**, 15, p. 665445, 2021.

LUO, Y.; SUTTLE, A.; ZHANG, Q.; WANG, P. *et al.* Transient Receptor Potential (TRP) Ion Channels in Orofacial Pain. **Mol Neurobiol**, 58, n. 6, p. 2836-2850, Jun 2021.

LÓPEZ, V.; NIELSEN, B.; SOLAS, M.; RAMÍREZ, M. J. *et al.* Exploring pharmacological mechanisms of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on central nervous system targets. **Frontiers in pharmacology**, 8, p. 280, 2017.

LÜBBERT, M.; KYEREME, J.; SCHÖBEL, N.; BELTRÁN, L. *et al.* Transient receptor potential channels encode volatile chemicals sensed by rat trigeminal ganglion neurons. **PLoS One**, 8, n. 10, p. e77998, 2013.

MAßBERG, D.; HATT, H. Human Olfactory Receptors: Novel Cellular Functions Outside of the Nose. **Physiol Rev**, 98, n. 3, p. 1739-1763, 07 01 2018.

MESSELINGER, K.; BALCZIAK, L. K.; RUSSO, A. F. Cross-talk signaling in the trigeminal ganglion: role of neuropeptides and other mediators. **J Neural Transm (Vienna)**, 127, n. 4, p. 431-444, 04 2020.

MÖLLER, H. J.; VOLZ, H. P.; DIENEL, A.; SCHLÄFKE, S. *et al.* Efficacy of Silexan in subthreshold anxiety: meta-analysis of randomised, placebo-controlled trials. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, 269, n. 2, p. 183-193, Mar 2019.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. D.; PORTELLA JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Revista Dor**, 17, p. 35-42, 2016.

PAK, D. J.; YONG, R. J.; KAYE, A. D.; URMAN, R. D. Chronification of Pain: Mechanisms, Current Understanding, and Clinical Implications. **Curr Pain Headache Rep**, 22, n. 2, p. 9, Feb 05 2018.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; PANIN, F.; SERRA, G. *et al.* Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, 9, n. 8, p. 721-726, Dec 2002.

PEANA, A. T.; DE MONTIS, M. G.; NIEDDU, E.; SPANO, M. T. *et al.* Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. **Eur J Pharmacol**, 485, n. 1-3, p. 165-174, Feb 06 2004.

PEANA, A. T.; DE MONTIS, M. G.; SECHI, S.; SIRICANA, G. *et al.* Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2. **Eur J Pharmacol**, 497, n. 3, p. 279-284, Aug 30 2004.

PEANA, A. T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO, A. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sci**, 78, n. 7, p. 719-723, Jan 11 2006.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PERGOLIZZI, J. V.; MAGNUSSON, P.; LEQUANG, J. A.; GHARIBO, C. *et al.* The pharmacological management of dental pain. **Expert Opin Pharmacother**, 21, n. 5, p. 591-601, Apr 2020.

PERRY, N.; PERRY, E. Aromatherapy in the management of psychiatric disorders: clinical and neuropharmacological perspectives. **CNS Drugs**, 20, n. 4, p. 257-280, 2006.

PERRY, R.; TERRY, R.; WATSON, L.; ERNST, E. Is lavender an anxiolytic drug? A systematic review of randomised clinical trials. **Phytomedicine**, 19, n. 8-9, p. 825-835, 2012.

PERRY, R.; TERRY, R.; WATSON, L. K.; ERNST, E. Is lavender an anxiolytic drug? A systematic review of randomised clinical trials. **Phytomedicine**, 2012.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, 21, n. 6, p. 801-810, Nov 1997.

RODRIGUEZ, E.; SAKURAI, K.; XU, J.; CHEN, Y. *et al.* A craniofacial-specific monosynaptic circuit enables heightened affective pain. **Nat Neurosci**, 20, n. 12, p. 1734-1743, Dec 2017.

SAVERNINI, Á.; SAVERNINI, N.; DE AMARAL, F. A.; ROMERO, T. R. *et al.* Assay of therapeutic ultrasound induced-antinociception in experimental trigeminal neuropathic pain. **J Neurosci Res**, 90, n. 8, p. 1639-1645, Aug 2012.

SCHUWALD, A. M.; NÖLDNER, M.; WILMES, T.; KLUGBAUER, N. *et al.* Lavender oil-potent anxiolytic properties via modulating voltage dependent calcium channels. **PLoS One**, 8, n. 4, p. e59998, 2013.

SHARMA, A.; KUMAR, R.; AIER, I.; SEMWAL, R. *et al.* Sense of Smell: Structural, Functional, Mechanistic Advancements and Challenges in Human Olfactory Research. **Curr Neuropharmacol**, 17, n. 9, p. 891-911, 2019.

SHAW, D.; ANNETT, J. M.; DOHERTY, B.; LESLIE, J. Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. **Phytomedicine**, 14, n. 9, p. 613-620, 2007.

SHUEB, S. S.; NIXDORF, D. R.; JOHN, M. T.; ALONSO, B. F. *et al.* What is the impact of acute and chronic orofacial pain on quality of life? **J Dent**, 43, n. 10, p. 1203-1210, Oct 2015.

SILVA, G. L.; LUFT, C.; LUNARDELLI, A.; AMARAL, R. H. *et al.* Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 87, n. 2, p. 1397-1408, 2015.

SILVA, J.; RIBEIRO FILHO, N. P. Pain as a psychophysical problem. **Rev dor**, 12, n. 2, p. 138-151, 2011.

SINGH, J. R.; RAND, E. B.; EROSA, S. C.; CHO, R. S. *et al.* Aromatherapy for Procedural Anxiety in Pain Management and Interventional Spine Procedures: A Randomized Trial. **Am J Phys Med Rehabil**, 100, n. 10, p. 978-982, 10 01 2021.

STANDARDIZATION, I. O. F. ISO 3515: Oil of lavender (*Lavandula angustifolia*). Geneva - Switzerland 2002.

STEIN, C. [Pain inhibition by opioids-new concepts]. **Anaesthetist**, 68, n. 2, p. 97-103, 02 2019.

TAKAHASHI, M.; SATOU, T.; OHASHI, M.; HAYASHI, S. *et al.* Interspecies comparison of chemical composition and anxiolytic-like effects of lavender oils upon inhalation. **Natural product communications**, 6, n. 11, p. 1934578X1100601148, 2011.

TASHIRO, S.; YAMAGUCHI, R.; ISHIKAWA, S.; SAKURAI, T. *et al.* Odour-induced analgesia mediated by hypothalamic orexin neurons in mice. **Sci Rep**, 6, p. 37129, 11 15 2016.

URATA, K.; SHINODA, M.; HONDA, K.; LEE, J. *et al.* Involvement of TRPV1 and TRPA1 in incisional intraoral and extraoral pain. **Journal of dental research**, 94, n. 3, p. 446-454, 2015.

VAN DER CRUYSSSEN, F.; POLITIS, C. Neurophysiological aspects of the trigeminal sensory system: an update. **Reviews in the Neurosciences**, 29, n. 2, p. 115-123, 2018.

VARRASSI, G.; PERGOLIZZI, J. V.; DOWLING, P.; PALADINI, A. Ibuprofen Safety at the Golden Anniversary: Are all NSAIDs the Same? A Narrative Review. **Adv Ther**, 37, n. 1, p. 61-82, Jan 2020.

VEINANTE, P.; YALCIN, I.; BARROT, M. The amygdala between sensation and affect: a role in pain. **Journal of molecular psychiatry**, 1, n. 1, p. 1-14, 2013.

WAITE, P.; ASHWELL, K. Trigeminal Sensory System. The Human Nervous System. USA: Elsevier: 1010-1142 p. 2012.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, 83, n. 3, p. 482-504, May 1976.

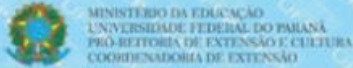

WEISS, S. M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A.; DOURISH, C. T. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, 23, n. 2, p. 265-271, 1998.

WOELK, H.; SCHLÄFKE, S. A multi-center, double-blind, randomised study of the Lavender oil preparation Silexan in comparison to Lorazepam for generalized anxiety disorder. **Phytomedicine**, 2010.

YAP, W. S.; DOLZHENKO, A. V.; JALAL, Z.; HADI, M. A. *et al.* Efficacy and safety of lavender essential oil (Silexan) capsules among patients suffering from anxiety disorders: A network meta-analysis. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 18042, 12 02 2019.

ŞAHİN, S.; TOKGÖZ, B.; DEMİR, G. Effect of Lavender Aromatherapy On Arteriovenous Fistula Puncture Pain and the Level of State and Trait Anxiety in Hemodialysis Patients: A Randomized Controlled Trial. **Pain Manag Nurs**, 22, n. 4, p. 509-515, 08 2021.

ANEXO I - CERTIFICADO DE CURSO TEÓRICO SOBRE MANIPULAÇÃO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Certificado


VANESSA BORDENOWSKY PEREIRA LEJEUNE
 frequentou o curso de extensão "Curso Teórico sobre Manipulação na Experimentação Animal - 16ª edição (10/2019)", realizado no período de 14/10/2019 a 18/10/2019, num total de 40 horas, conforme programa no verso, promovido pelo(a) Departamento de Patologia Básica, do(a) Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, obtendo aprovação com frequência: 100% e aproveitamento: 95, conforme Resolução 72/11 - CEPE.

10 de Março de 2020.

Prof. Dr. Leandro Franklin Gorsdorf
Pró-Reitor de Extensão e Cultura

Prof.ª Dr.ª Maria Virginia Filomena Cremasco
Coordenadora de Extensão

Código de validação: "PT69791"
 Para verificar a autenticidade deste certificado, acesse:
<https://intranet.ufpr.br/sigeu/public/certificado/execute/Validade>



CURSO DE EXTENSAO

Curso Teórico sobre Manipulação na Experimentação Animal - 16ª edição (10/2019)

PROGRAMAÇÃO:
 A frequência será controlada por uma lista onde os alunos irão assinar para comprovar a presença. A avaliação será realizada por meio de prova teórica (com base nas palestras e material didático fornecido) e prática (com base na programação da aula prática)
 O(A) participante deverá obter uma frequência maior ou igual a 80% e nota maior ou igual 70 que deverá contar no verso do certificado. Aqueles que não atingirem a exigência descrita neste item não terá direito ao certificado.

COORDENADOR(A): MARCIA KIYOE SHIMADA

Código de validação: "PT69791"
 Para verificar a autenticidade deste certificado, acesse: <https://intranet.ufpr.br/sigeu/public/certificado/execute/Validade>

ANEXO II – CERTIFICADO CEUA #1348



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1348

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, CERTIFICA que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.010462/2020-19

APROVADO/APPROVAL: 17/03/2020 – R.O. 02/2020

TÍTULO: Avaliação do efeito do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* no comportamento nociceptivo e do tipo ansioso em modelo de dor orofacial em ratos.

TITLE: Evaluation of the effect of *Lavandula angustifolia* essential oil on nociceptive and anxiety-like behavior in a rat orofacial pain model.

AUTORES/AUTHORS: Juliana Geremias Chichorro, Vanessa Bordenowsky Pereira Lejeune, Erika Ivanna Araya.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, Institucional, em 30/04/2020, às 14:06, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.