



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS-CB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PSICOLOGIA FISIOLÓGICA

Efeito neuroprotetor do óleo essencial da *Lippia alba* sobre a neuropatia causada por constrição do nervo ciático de ratos

DANIELE OLIVEIRA SOUZA

NATAL-RN
2021

DANIELE OLIVEIRA SOUZA

Efeito neuroprotetor do óleo essencial da *Lippia alba* sobre a neuropatia causada por constrição do nervo ciático de ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia da Universidade Federal de Rio Grande do Norte-UFRN, como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Psicobiologia.

Área de Concentração: Psicologia fisiológica; Linha de Pesquisa: Psicofarmacologia.

Orientador:
Expedito Silva do Nascimento Júnior
Co-orientadora: Kerly S. da Silva Alves

NATAL- RN
2021

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Souza, Daniele Oliveira.

Efeito neuroprotetor do óleo essencial da Lippia alba sobre a neuropatia causada por constrição do nervo ciático de ratos / Daniele Oliveira Souza. - Natal, 2021.

94 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Expedito Silva do Nascimento Júnior.
Coorientadora: Dra. Kerly Shamyra da Silva Alves.

1. Lippia alba - Tese. 2. Nervo ciático - Tese. 3. Lesão neuronal - Tese. 4. Potencial de ação composto - Tese. I. Nascimento Júnior, Expedito Silva do. II. Alves, Kerly Shamyra da Silva. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 633.88

Título: Efeito neuroprotetor do óleo essencial da *Lippia alba* sobre a neuropatia causada por constrição do nervo ciático de ratos

Autora: Daniele Oliveira Souza

Data da defesa: 05 de março de 2021

Banca Examinadora:

Expedito Silva do Nascimento Júnior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Kerly S. da Silva Alves
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Fernando Vagner Lobo Ladd
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Profa. Dra. Renata Figueiredo Anomal
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Prof. Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico,
Aos meus pais: **M^a Celimária Oliveira Silva
Souza e José Luiz de Souza.**

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por conceder a Graça da vida em sua plenitude, direcionar meus passos e renovar minha fé, me fortalecendo a cada novo dia na caminhada;

Aos meus pais, **Maria Celimária Oliveira Silva Souza e José Luiz de Souza**, por sonharem comigo na realização dos meus objetivos. Meu exemplo de força, coragem, amor, honestidade, sabedoria, respeito e trabalho;

A minha **família**. Meus irmãos: **Jailson, Ison, Helenilce, Adriana, Eliane, Francisco, Janeilson, Daniel** e **Ana Laura**. Meus cunhados (as): **Dora, Gennffer e Robson**, sobrinhos (as) e meu noivo: **Marcelo Correa de Moraes**. Por todo carinho, pela compreensão da ausência em momentos familiares, por serem minha base e sempre estarem à disposição quando preciso;

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Expedito Silva do Nascimento Júnior**, por acolher-me, pela orientação, competência, ensinamentos, confiança e compreensão;

A minha co-orientadora Profa. Dra. **Kerly S. da Silva Alves**, pela orientação, competência, confiança, apoio e disponibilidade;

Ao Prof. Dr. **José Henrique Leal-Cardoso**, a palavra “agradecer” tem o seu significado na sua essência a este ser exemplo de Profissional e ser humano. Obrigada pelo valioso apoio, contribuição e aprendizado fundamentais para realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. **Francisco Walber Ferreira da Silva**, pelo apoio, questionamentos que me faziam refletir e enriquecer este trabalho, disponibilidade de ensinar sempre e pela gentileza e atenção de participar da banca avaliadora;

À Profa. Dra. **Andreлина Noronha Coelho de Souza** e todos que fazem parte do Laboratório de Fisiologia Experimental - LAFIEX pela solicitude e colaboração nos experimentos;

À Profa. Dra. **Roseli Barbosa**, pelo o convite de ficar a frente deste projeto, um presente para mim. Por seres exemplo de profissionalismo e competência, que se somam a sua doçura e humanidade;

Aos Professores: Dr. **Fernando Vagner Lobo Ladd** e Dra. **Renata Figueiredo Anomal**, por terem a gentileza de prontamente aceitarem o convite de participação da banca de avaliação deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Eletrofisiologia (LEF) da UECE: **Alan, Átila, Carol, Karen, Klausen, Narcélio Victor, Nathália, Thais, Ruth**, e **Pedro Militão**, pelo ambiente agradável de convívio, pela estimada amizade e momentos de alegria.

À amiga **Laura Hévila**, por todo carinho e apoio em momentos que mais precisei.

Às meninas de casa (Fortaleza): **Ticiane Saboya e Débora Viana**, pela amizade, apoio e ambiente agradável de convívio.

Ao **Programa de Pós-graduação em Psicobiologia e Professores**, pelos os ensinamentos e disponibilidade.

A **Universidade Estadual do Ceará-UECE**, pelos animais cedidos e apoio na parceria para realização deste trabalho e seus funcionários na pessoa do seu **Aquino**, pelo auxílio no cuidado dos animais.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN** e a **todos** que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

Aos **animais** de experimentação e **plantas** utilizados neste trabalho, pelo sacrifício de suas vidas em prol da ciência;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Muito obrigada!

“As pessoas mais bonitas que conhecemos são aquelas que conheceram o sofrimento, conheceram a derrota, conheceram o esforço, conheceram a perda e encontraram seu caminho para fora das profundezas. Essas pessoas têm uma apreciação, uma sensibilidade e uma compreensão da vida que as enche de compaixão, gentileza e uma profunda preocupação amorosa. Pessoas bonitas não acontecem por acaso...”

Elisabeth Kubler-Ross

RESUMO

As lesões dos nervos periféricos constituem um problema de saúde pública. Os déficits motores, sensoriais, autonômicos e o desenvolvimento de Dor Neuropática (DN), decorrentes das lesões dos nervos periféricos, podem comprometer a qualidade de vida dos pacientes. Após a lesão nervosa ocorre estresse oxidativo e liberação de citocinas inflamatórias e mediadores alógenos que induzem a DN. A ocorrência destes problemas instiga a busca na natureza por compostos para a manipulação de novas drogas. A *Lippia alba* é uma planta medicinal cujo óleo essencial apresenta atividade biológica no Sistema Nervoso Periférico (SNP). O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do tratamento com o óleo essencial da *Lippia alba* (OELa) sobre a neuropatia periférica causada pela Constrição Crônica do Nervo Ciático (CCNC) de ratos. Foram utilizados 30 ratos *Rattus norvegicus* (Wistar), de ambos os sexos, com massa corpórea variando entre 200-250 g. Os animais foram divididos nos grupos experimentais: Controle tratado veículo (CON), controle tratado com OELa 100 mg/Kg, v.o. (CON + OELa), grupo submetido a CCNC tratado com solução veículo (CCNC) e grupo submetido a CCNC tratado com OELa 100 mg/Kg (CCNC + OELa). O tratamento via oral, foi administrado 30 minutos antes da realização da CCNC no nervo ciático direito do animal e durante 14 dias seguidos. Realizou-se o teste de hipersensibilidade à dor, através do teste de von Frey e placa quente, 24 horas antes da indução da CCNC (dia 0), e nos dias 5, 7, 9 e 14 após a CCNC. No 14º dia após CCNC os animais foram submetidos a eutanásia. Em seguida realizada a dissecação do nervo ciático direito e esquerdo para análise do registro extracelular do Potencial de Ação Composto (PAC). Os parâmetros avaliados do PAC foram: Amplitude Pico-a-Pico (APP), cronaxia, reobase, amplitude positiva, velocidade de condução e duração da 1ª e 2ª componentes do PAC. A análise fitoquímica do OELa identificou uma variação quantitativa de substâncias, cujo composto majoritário foi o citral (geranial com 42,59 % e neral com 28,21 %). A avaliação da sensibilidade mecânica apresentou no CON uma média de 20,87 g para o limiar de reação ao estímulo. No grupo CCNC houve um aumento da força aplicada de 72,4 %, aumentando assim o limiar de retirada da pata no 5º dia após CCNC. Entretanto, nos dias 7, 9 e 14, houve aumento significativo da reação ao estímulo com uma menor força aplicada, reduzindo em 54,65%, 59,34% e 58,8% nos dias 7, 9 e 14, respectivamente, em relação ao grupo CON, caracterizando hiperalgesia mecânica. O grupo CCNC+OELa, aumentou o limiar ao estímulo mecânico em 116,79 %, 145,4 %, 54,56 % e 62 % nos dias de avaliação 5, 7, 9 e 14, respectivamente em relação ao CON. No grupo CON+OELa também apresentou aumento em 141,2 % a partir do 5º de avaliação, mostrando maior resposta no 7º dia de avaliação, apresentando um aumento de 260 %. Não houve diferença significativa na sensibilidade do estímulo térmico em ratos submetidos à CCNC e grupo CON. No entanto, no grupo CON+OELa houve aumento de 56,25 % do limiar ao estímulo no 7º dia de avaliação, comparado ao CON. Nos demais grupos experimentais não houve diferença significativa. A CCNC provocou alterações eletrofisiológicas em todos os parâmetros avaliados. A excitabilidade do nervo ciático no grupo CCNC aumentou em 27,53 %, ao reduzir a reobase, comparado ao CON. Enquanto, o valor da cronaxia aumentou 54,89 % no grupo CCNC em relação ao CON. No grupo CCNC+OELa, a reobase aumentou em 39,5 %, em relação ao grupo CCNC, a cronaxia neste grupo não alterou. A reobase no grupo CON +OELa diferiu em 16,5 % em relação ao CON. E a APP reduziu em 54,8 % comparado ao CON. A amplitude positiva da primeira componente no grupo CCNC reduziu 52,53 % em relação ao CON. No grupo CCNC+OELa reduziu 74,59 %. O grupo CON+OELa também mostrou redução de 57 %. A segunda componente não foi registrada no grupo CCNC. Entretanto, esta foi preservada quando a CCNC foi associada ao tratamento com OELa (CCNC+OELa), apresentando diminuição da amplitude em 88,14 % em relação ao CON. O grupo CON+OELa também diminuiu amplitude da segunda componente em 34,78% em relação ao CON. Quanto à velocidade de condução do PAC, o grupo CCNC mostrou redução de 44,73 % na primeira componente do PAC, comparado ao CON.

tratamento com OELa (CCNC + OELa) reverteu esta diminuição em 102,96%, comparado ao grupo CCNC. Os demais grupos experimentais não mostraram diferença estatística. Na segunda componente do PAC, a velocidade de condução não foi alterada nos grupos CCNC+OELa e CON+OELa em comparação ao CON. A duração da primeira componente do PAC aumentou 45,21 % no grupo submetido à CCNC, em relação ao CON. Os demais grupos não apresentaram diferença significativa comparado ao CON. Quanto à duração da segunda componente do PAC, no grupo CCNC não foi possível avaliar, haja vista não registrada. Nos demais grupos experimentais não houve diferença estatística em relação ao CON. Os resultados mostraram que o tratamento com OELa nos animais submetidos a CCNC, diminuiu a hipersensibilidade da neuropatia periférica e também evidenciou um potencial efeito neuroprotetor ao preservar fibras que constituem o potencial de ação de composto. Evidenciando consonância dos dados comportamentais e eletrofisiológicos do PAC, sugerindo um efeito anestésico do OELa. Portanto, a ação neuroprotetora do OELa na redução do dano neuronal causado pela CCNC, contribui para a preservação da estrutura e função da bainha e axônios mielinizados. Os mecanismos pelos quais o OELa exerce potencial efeito neuroprotetor frente a lesão do nervo periférico ainda precisa ser elucidado. No entanto, nossos resultados representam evidências de que a suplementação oral com o OELa promove a diminuição da hipersensibilidade após lesão neuronal que apontam para uma combinação de múltiplos alvos, envolvendo componentes neuronais e imunológicos, que desencadeia efeitos na modulação da sensibilidade neuropática.

Palavras chaves: *Lippia alba*, nervo ciático, lesão neuronal, potencial de ação composto.

ABSTRACT

Peripheral nerve injuries are a public health problem. Motor, sensory, autonomic deficits and the development of Neuropathic Pain (NP), resulting from peripheral nerve injuries, can compromise patients' quality of life. After nerve damage, oxidative stress occurs and the release of inflammatory cytokines and allogeneic mediators that induce NP. The occurrence of these problems instigates the search in nature for compounds for the manipulation of new drugs. *Lippia alba* is a medicinal plant whose essential oil has biological activity in the Peripheral Nervous System (SNP). The aim of this study is to evaluate the effect of treatment with *Lippia alba* essential oil (OELa) on peripheral neuropathy caused by Chronic Sciatic Nerve Constriction (CCNC) in rats. Thirty *Rattus norvegicus* (Wistar) rats, of both sexes, with body mass varying between 200-250 g were used. The animals were divided into the experimental groups: Control treated vehicle (CON), control treated with OELa 100 mg / Kg, v.o. (CON + OELa), group submitted to CCNC treated with vehicle solution (CCNC) and group submitted to CCNC treated with OELa 100 mg / Kg (CCNC + OELa). Oral treatment was administered 30 minutes before the CCNC was performed on the animal's right sciatic nerve and for 14 consecutive days. The pain hypersensitivity test was performed, using the von Frey test and hot plate, 24 hours before CCNC induction (day 0), and on days 5, 7, 9 and 14 after CCNC. On the 14th day after CCNC, the animals were euthanized. Afterwards, dissection of the right and left sciatic nerve was performed to analyze the extracellular recording of the Compound Action Potential (PAC). The evaluated parameters of the PAC were: Pico-a-Pico Amplitude (APP), chronaxia, reobase, positive amplitude, conduction speed and duration of the 1st and 2nd components of the PAC. The phytochemical analysis of OELa identified a quantitative variation of substances, the major compound of which was citral (geranial with 42.59% and neral with 28.21%). The evaluation of the mechanical sensitivity presented in the CON an average of 20.87 g for the threshold of reaction to the stimulus. In the CCNC group, there was an increase in applied force of 72.4%, thus increasing the threshold for removing the paw on the 5th day after CCNC. However, on days 7, 9 and 14, there was a significant increase in the reaction to the stimulus with less force applied, decreasing by 54.65%, 59.34% and 58.8% on days 7, 9 and 14, respectively, in relation to the CON group, characterizing mechanical hyperalgesia. The CCNC + OELa group increased the threshold to the mechanical stimulus by 116.79%, 145.4%, 54.56% and 62% on the evaluation days 5, 7, 9 and 14, respectively in relation to the CON. In the CON + OELa group it also showed an increase of 141.2% from the 5th evaluation, showing greater response on the 7th evaluation day, presenting an increase of 260%. There was no significant difference in the sensitivity of the thermal stimulus in rats submitted to CCNC and CON group. However, in the CON+OELa group there was an increase of 56.25% in the stimulus threshold on the 7th day of evaluation, compared to the CON. In the other experimental groups, there was no significant difference. CCNC caused electrophysiological changes in all evaluated parameters. The sciatic nerve excitability in the CCNC group increased by 27.53%, by reducing the reobase, compared to the CON. Meanwhile, the chronaxia value increased by 54.89% in the CCNC group in relation to the CON. In the CCNC+OELa group, the rheobase increased by 39.5%, compared to the CCNC group, the chronaxia in this group did not change. The reobase in the CON + OELa group differed by 16.5% in relation to the CON. And APP decreased by 54.8% compared to CON. The positive amplitude of the first component in the CCNC group decreased by 52.53% in relation to the CON. In the CCNC + OELa group, it decreased 74.59%. The CON+OELa group also showed a 57% reduction. The second component was not registered in the CCNC group. However, this was preserved when CCNC was associated with treatment with OELa (CCNC + OELa), presenting a decrease in amplitude of 88.14% in relation to the CON. The CON + OELa group also decreased the amplitude of the second component by 34.78% in relation to the CON. As for the speed of conduction of the PAC, the CCNC group showed a 44.73% reduction in the

first component of the PAC, compared to the CON. Treatment with OELa (CCNC + OELa) reversed this decrease by 102.96%, compared to the CCNC group. The other experimental groups showed no statistical difference. In the second component of the PAC, the conduction velocity was not altered in the CCNC+OELa and CON+OELa groups compared to the CON. The duration of the first component of the CAP increased by 45.21% in the group submitted to CCNC, compared to the CON. The other groups showed no significant difference compared to the CON. As for the duration of the second component of the PAC, in the CCNC group it was not possible to evaluate, due to an unregistered visa. In the other experimental groups, there was no statistical difference in relation to the CON. The results showed that treatment with OELa in animals submitted to CCNC, decreased the hypersensitivity of peripheral neuropathy and also showed a potential neuroprotective effect when preserving fibers that constitute the action potential of the compound. Evidence of the behavioral and electrophysiological data of the PAC, suggesting an anesthetic effect of the OELa. Therefore, the neuroprotective action of OELa in reducing neuronal damage caused by CCNC, contributes to the preservation of the structure and function of the myelinated sheath and axons. The mechanisms by which OELa has a potential neuroprotective effect against peripheral nerve damage have yet to be elucidated. However, our results represent evidence that oral supplementation with OELa promotes a decrease in hypersensitivity after neuronal injury that points to a combination of multiple targets, involving neuronal and immunological components, which triggers effects on the modulation of neuropathic sensitivity.

Key words: *Lippia alba*, sciatic nerve, neuronal injury, compound action potential.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 01 | Figura 01: Estrutura do Isopreno | 21 |
| Figura 02 | Distribuição geográfica da família Verbenaceae J. St.–Hil | 22 |
| Figura 03 | Folhas da espécie de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown. | 23 |
| Figura 04 | Principais vias ascendentes e descendentes da dor | 29 |
| Figura 05 | Lesão neural em fibras C e brotamento de fibras A β | 36 |
| Figura 06 | Processo de Degeneração Walleriana e regeneração no SNP | 40 |
| Figura 07 | Ilustração esquemática do modelo experimental de DN | 50 |
| Figura 08 | Esquema ilustrativo do “set up” para registro extracelular do PAC | 53 |
| Figura 09 | Traçado ilustrativo do PAC | 54 |
| Figura 10 | Parâmetro de amplitudes mensuradas no PAC. | 55 |
| Figura 11 | Curso temporal da resposta no teste de von Frey | 58 |
| Figura 12 | Curva tempo resposta para o efeito antinociceptivo do OELa na hiperlagesia térmica induzida pela CCNC | 59 |
| Figura 13 | Traçados representativos do PAC | 60 |
| Figura 14 | Reobase e Cronaxia do PAC | 61 |
| Figura 15 | Amplitude Pico a Pico do PAC | 61 |
| Figura 16 | Amplitude positiva da 1ª componente do PAC | 62 |
| Figura 17 | Amplitude positiva da 2ª componente do PAC | 63 |
| Figura 18 | Velocidade de Condução da 1ª componente do PAC | 63 |
| Figura 19 | Velocidade de Condução da 2ª componente do PAC | 64 |
| Figura 20 | Duração da 1ª componente do PAC | 65 |
| Figura 21 | Duração da 1ª componente do PAC | 65 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Quadro 01 | Classificação funcional das fibras nervosas de mamíferos | 30 |
| Quadro 02 | Delineamento experimental do teste de Von Frey | 51 |
| Quadro 03 | Delineamento experimental do teste da placa quente | 52 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Tabela 01 | Especificações operacionais da análise do OELa por GC/MS | 48 |
| Tabela 02 | Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo de animais (N). | 49 |
| Tabela 03 | Delineamento experimental da pesquisa ao longo do tempo | 49 |
| Tabela 04 | Composição química (%) do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> (OELa) | 57 |
| Tabela 05 | Médias dos grupos experimentais no teste de von-Frey em ratos | 95 |
| Tabela 06 | Médias dos grupos experimentais no teste da Placa quente em ratos | 95 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A/D – Analógico digital
AMPA – Ácido aminometil-fosfônico
ANOVA – Análise de variância
APP – Amplitude pico-a-pico
AVC – Acidente Vascular Cerebral
BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CCL2– quimiocina ligante 2
CCL3– quimiocina ligante 3
CCNC – Constrição Crônica do Nervo Ciático
CEUA – Comitê de Ética para o Uso de Animais
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COX – enzima cicloxigenase
CS – Células de Schwann
DN – Dor Neuropática
DW – Degeneração Walleriana
EPM – Erro Padrao da Média
GABA – ácido γ -aminobutírico
GAP-43 – Growth Associated Protein 43
GRD – Gânglio da Raiz Dorsal
HCl –ácido clorídrico
Hz – Hertz
IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1 α Interleucina 1 α
IL -1 β – Interleucina 1-beta
IL-18 – Interleucina 18
IL-6 – interleucina6
KCl – Cloreto de potássio
LIF – Fator de Inibição da Leucemia
LPS – Lipopolissacarídeo
M – molar
MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos 1
MEC – Matriz Extracelular
mg/Kg – Miligrama por quilo de peso
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
mM – Milimolar
mm/dia – milímetro por dia
ms – Milissegundo
mV – Milivolt
n = Número de experimentos
Nav1.3– canal de sódio tipo 3
Nav1.8 – canal de sódio tipo 8
NMDA – N-metil D-Aspartato
OE – Óleo Essencial
PADETEC – Parque de Desenvolvimento Tecnológico
p.o. – administração oral
P2X3 –Receptores Purinérgicos P2X3
PAC – Potencial de Ação Composto

TRP – Receptor de Potencial Transitório
TRPA1 – Proteína anquirina do tipo 1
TRPV1 – Receptor de Potencial Transitório Vanilóide tipo 1
TRPV4 – Receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 4
TLRs – Receptores Toll-like
TLR4 – Receptor do tipo Toll 4
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TNF α –fator de necrose tumoral alfa
TRIS –Tris-Hidroximetil-Aminometano
V – Volts
VDAC1 – canal de anion dependente de voltagem 1
V_m – potencial de membrana
VR1 – Receptor vanilóide 1
WDR – Neurônios de projeção de ampla faixa dinâmica

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Óleos essenciais | 19 |
| 1.1.1 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown e Citral | 21 |
| 1.1.2 Atividades Biológicas | 23 |
| 1.2 Dor | 26 |
| 1.2.1 Fisiologia da Dor | 27 |
| 1.2.2 Dor Neuropática (DN) | 32 |
| 1.2.3 Mecanismo da DN | 33 |
| 1.3 Degeneração e regeneração de nervos periféricos | 38 |
| 2.JUSTIFICATIVA | 43 |
| 3. OBJETIVOS | 45 |
| 3.1 Objetivo geral | 45 |
| 3.2 Objetivos específicos | 45 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 46 |
| 4.1 Exigências legais - aspectos éticos da pesquisa | 46 |
| 4.2 Material | 46 |
| 4.2.1 Óleo essencial da <i>Lippia alba</i> | 46 |
| 4.2.2 Animais | 46 |
| 4.2.3 Solução | 47 |
| 4.3 Métodos | 47 |
| 4.3.1 Cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massa GC/MS | 47 |
| 4.3.2 Procedimento experimental | 48 |
| 4.3.3 Modelo de indução de neuropatia por Constrição Crônica do Nervo Ciático (CCNC) | 49 |
| 4.3.4 Avaliação da sensibilidade mecânica: Teste de von Frey | 50 |
| 4.3.5 Avaliação da sensibilidade térmica: Placa quente | 51 |
| 4.3.6 Eutanásia dos animais | 52 |
| 4.3.7 Montagem do sistema extracelular de registro do PAC | 52 |
| 4.3.8 Análise Eletrofisiológica | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.9 Tratamento Estatístico..... | 56 |
| 5. RESULTADOS | 57 |
| 5.1 Análise química do OELa | 57 |
| 5.2 Avaliação da sensibilidade mecânica e térmica em ratos. | 57 |
| 5.3 Efeito do OELa sobre funcionamento elétrico (<i>in vitro</i>) do nervo ciático.. | 59 |
| 6. DISCUSSÃO | 66 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 73 |
| REFERÊNCIAS..... | 74 |
| APÊNDICE | 95 |
| ANEXO..... | 96 |

1. INTRODUÇÃO

O uso terapêutico das plantas medicinais na saúde humana constitui-se como uma prática que atravessa milênios, estando historicamente presente na sabedoria do senso comum, articulando cultura e saúde (Alvim et al., 2006). São os mais antigos recursos empregados pelo homem no tratamento de enfermidades de todos os tipos. Assim, a utilização de plantas na prevenção e/ou na cura de doenças é um hábito que sempre existiu na história da humanidade (Oliveira e Araujo, 2007).

A terapêutica com plantas medicinais para distúrbios do sistema nervoso tem crescido nos últimos anos, na intenção de minimizar os efeitos colaterais e/ou melhorar a eficácia farmacológica na terapêutica destas distúrbios. No entanto, é frequente o uso de plantas medicinais sem validade científica, e esta é necessária para investigação dos fins medicinais que estão sendo empregadas, além da verificação da toxicidade.

Os medicamentos obtidos a partir de produtos naturais são uma fonte promissora de alta diversidade química, especificidade bioquímica e várias outras propriedades moleculares que os tornam favoráveis ao processo de regeneração nervosa e sintomas associados a Dor Neuropática (DN) (Quintans et al., 2014; Guimaraes et al., 2014).

As atividades biológicas das plantas são correlacionadas à presença de compostos químicos, particularmente os metabólitos secundários, cuja composição sofre influência direta dos fatores geográficos e ambientais (Kiran et al., 2008). Tais metabólitos apresentam estrutura complexa e uma variedade de atividades biológicas, destacando-se como exemplo, as saponinas, cumarinas, flavonóides, alcalóides, taninos, entre outros (Poser e Mentz, 2003). Estes têm função de defesa contra pragas e doenças, que no Homem pode possuir efeito benéfico atuando como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (Briskin, 2000).

Dados da literatura reporta prevalência de DN em torno de 8% da população geral. Tais condições podem ser causadas por grande número de estímulos ou etiologias e isso inclui lesões neurais, amputações, traumatismos, inflamações crônicas ou distúrbios metabólicos (Shannon et al., 2005). A lesão nos neurônios do SNC/SNP, normalmente está associada a uma inibição dos sistemas inibitórios ou a uma hipersensibilidade das fibras de condução do impulso doloroso.

Os distúrbios no SNP produzem combinações de sintomas motores, sensoriais e autonômicos, que são essencialmente determinados pela localização das lesões e classe de fibras nervosas afetadas, em vez de pela etiologia do processo (Chalk, 2008). As medicações podem ser úteis para fins de tratamento da DN, contudo o alívio completo da dor é mínimo com a oferta

atual e tem uso limitado devido aos efeitos colaterais. A busca por novos compostos como alternativas terapêuticas para tais distúrbios têm progredido constantemente.

Um recente estudo, demonstrou que o óleo essencial de *Lippia alba* e o constituinte majoritário citral, agem como bloqueador da excitabilidade neural (Sousa et al, 2015). Outros trabalhos na literatura também relatam efeito de espécies do gênero *Lippia* sobre o sistema nervoso, tais como: anestésico, ansiolítico, anticonvulsivante, sedativo, antinociceptivo (Cunha et al., 2010, Hatano et al., 2012). Somando-se ao conhecimento etnofarmacológico da *L. alba*, que é reportado uso da espécie para uma variedade de afecções, dentre as quais se destaca doenças respiratórias, digestivas, cardiovasculares, para hipertensão e como sedativa (Hennebelle et al., 2008), sendo indicada como analgésico e anti-inflamatório. Foi identificada também a ação antioxidante *in vitro* do seu óleo essencial (Stashenko et al., 2004). Quimiotipo de extratos hidroalcoólicos das folhas de *L. alba*, que tinham carvona e geranial como compostos majoritários reduziram significativamente a frequência e a intensidade da dor, em estudo clínico de fase II (Conde, 2011).

Nesse contexto, é importante investigar o potencial efeito neuroprotetor do óleo essencial de *L. alba* sobre DN após lesão neuronal, por meio do modelo de lesão por Constricção Crônica do Nervo Ciático (CCNC), sob uma perspectiva funcional. O modelo de lesão neuronal por CCNC foi amplamente empregado para a indução de DN em animais experimentais (Bennett & Xie, 1988; Wang & Wang, 2003), devido similaridade de DN em humanos. Os resultados mostraram que o tratamento com OELA nos animais submetidos a CCNC, diminuiu a hipersensibilidade da neuropatia periférica e também evidenciou um potencial efeito neuroprotetor ao preservar fibras que constituem o potencial de ação de composto.

Dessa forma, nossos resultados representam evidências de que a suplementação oral com o OELA promove a diminuição da hipersensibilidade após lesão neuronal que apontam para uma combinação de múltiplos alvos, pelos quais o OELA pode estar atuando. Sendo assim, importante a investigação dos mecanismos que o OELA exerce seu efeito neuroprotetor.

1.1 Óleos essenciais

Os Óleos Essenciais (OE) são considerados misturas complexas de substâncias, voláteis, geralmente odoríferos e lipofílicos, que podem ser obtidos a partir de qualquer órgão vegetal, apresentam-se como líquidos oleosos em temperatura ambiente. De forma geral, os OE são substâncias instáveis, sobretudo na presença de calor, umidade, luz, metais, substâncias oxidantes ou redutoras (Simões et al., 2010; Bakkali, et al., 2008).

A extração dos OE se dá, muitas vezes, por meio de arraste a vapor e, também, através da técnica de prensagem do pericarpo de frutos. Praticamente todas as partes do vegetal podem contribuir na sua produção como cascas, flores, folhas, frutos e rizomas (Bizzo et al., 2009).

É possível dividir os constituintes dos OE das plantas em duas classes químicas: terpenóides e fenilpropanóides. Os terpenóides possuem a maior diversidade estrutural entre os produtos naturais advindos de vegetais, com aproximadamente de 29.000 compostos identificados (Adam e Zapp, 1998). Possuem baixo peso molecular e baixa solubilidade em água. São produzidos a partir do metabolismo secundário junto com a produção de compostos orgânicos, e não estão diretamente ligados ao crescimento e desenvolvimento da planta, e sim com a interação da planta com o meio ambiente (Santos, 2007). Sendo assim, importante para sobrevivência da planta e continuidade das espécies na natureza, por exemplo, considerando a existência de funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra a perda de água e aumento da temperatura, entre outras.

Os monoterpenos são constituídos de duas unidades de isopreno (Figura 01), têm demonstrado um perfil promissor podendo penetrar na barreira hematoencefálica e produzir seus efeitos ansiolíticos, sedativos e anticonvulsivantes no SNC (Quintans-Júnior et al., 2008; DeSousa, 2011), atuar como agentes que reduzem o processo inflamatório e também modulam os principais mediadores químicos da cascata inflamatória, como citocinas (de Cassia da Silveira & Sa et al., 2013; Juergens, 2014).

A diversidade química encontrada nos OE, provendo compostos puros a exemplo do limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol, pode ser responsável pela ampla variedade de atividades farmacológicas e, possivelmente, os vários mecanismos de ação de seus constituintes químicos (Oliveira, 2014) atuam de forma sinérgica ou antagônica (Baser & Buchbauer, 2010; Elshafie et al., 2015). As moléculas dos constituintes ativos dos OE têm agido como modelo, para que, por meio de mudanças de grupamentos moleculares e análise de relação entre estrutura química e ação farmacológica, descubram-se novos fármacos, com maior eficácia e seletividade.

Dessa forma, os OE e seus principais compostos (monoterpenos) são importantes por exibir uma ampla gama de novas entidades bioativas que conferem as plantas medicinais seu potencial terapêutico.

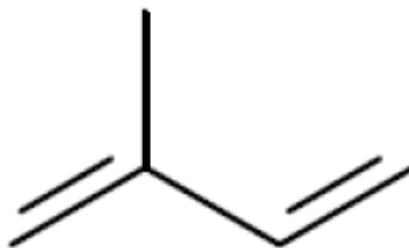


Figura 01: Estrutura do Isopreno. Fonte: Reis, 2008.

A presença desses compostos nos OE pode variar tanto qualitativamente quanto quantitativamente, e isso se deve a influência de vários fatores, dos quais é possível citar: fatores climáticos e geográficos, as estações do ano, a época de floração, solo, índice pluviométrico, partes da planta e a fase que ela se encontra podem influenciar em conjunto na síntese destes metabólitos. Além da influência de fatores ambientais, ainda é possível identificar variação em função da variabilidade genética (Oliveira et al., 2006; Camêlo et al., 2011). Sendo assim, as diversas substâncias presentes nos OE são encontradas em diferentes concentrações, sendo de duas a três substâncias majoritárias, que são geralmente responsáveis pelas propriedades biologicamente ativas das plantas aromáticas (Tavares et al., 2011).

1.1.1 *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown e Citral

Lippia alba (Mill.) N.E. Brown é uma espécie pertencente à família Verbenaceae J. St.-Hil. A maioria das espécies do gênero *Lippia*, está localizada no Brasil, Paraguai e Argentina (Praça-Fontes et al., 2011). O Brasil é um dos centros de origem sendo nativa da Mata Atlântica (Stefanini et al., 2001). Encontrada em todas as áreas tropicais e subtropicais da América do Sul-regiões do Brasil, América Central, Ilhas Caribenhas e na região sul dos Estados Unidos (Pascual, et al.,2001). É possível encontrá-la também na Índia e Austrália (Aquino et al., 2010). Essa larga distribuição mostrada na figura 02, levou a geração de vários nomes populares, como: erva-cidreira, falsa melissa, chá-de-tabuleiro, erva-cidreira-do-campo, salva-do-Brasil, erva-cidreira-brasileira, alecrim-do-mato e alecrim-do-campo (Matos, 2000; Pascual et al., 2001).

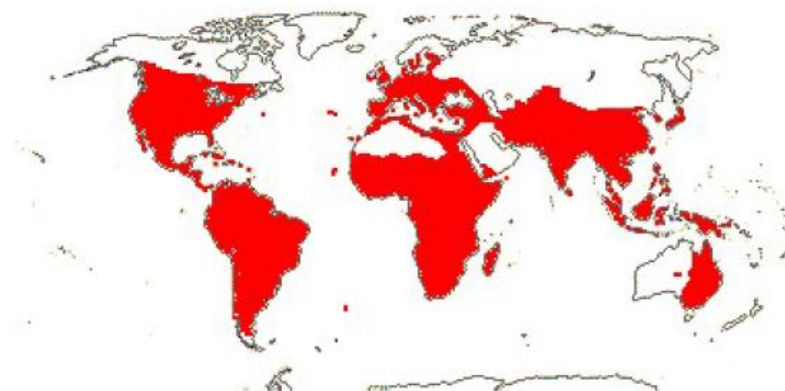


Figura 02 – Distribuição geográfica da família Verbenaceae J. St.-Hil. na América do Sul e Europa. Fonte: Missouri Botanical Garden. (Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em 15 de dezembro de 2019).

A produção de OE de *L. alba* apresenta variação quantitativa e qualitativa, levando à sua separação em quimiotipos de acordo com seus principais componentes (Hennebelle et al., 2008). No Brasil, existem pelo menos três principais quimiotipos de *L. alba* com uma grande variação em alguns terpenóides, especialmente citral, carvona e linalol. Portanto, tendo diferentes efeitos farmacológicos (Linde et al., 2016).

Do ponto de vista botânico, *L. alba* (Figura 03) é um subarbusto de variável morfologia, que possui ramos esbranquiçados finos, quebradiços e arqueados, suas folhas possuem formato elíptico que varia na largura, mas possui ápice agudo, estão dispostas de forma opostas (Matos, 2000). Podem atingir até cerca de 3 metros de altura, e podem florescer o ano todo. Possui inflorescências que variam nas cores, podendo ser brancas, rosas ou violeta, que formam com o cálice frutífero uma porção dispersora de sementes através do vento (Salimena, 2002). É considerada uma planta rústica, porte arbustivo, com ciclo perene e veloz crescimento e desenvolvimento, que facilmente se coloniza através de enraizamento dos ramos que tenham contato com o solo (Biasi & Costa, 2003). Habitualmente apresenta-se prostrada, decumbente, e seu potencial colonizador se encontra facilmente em solos arenosos, quanto em margens de rios, lagos e açudes (Stefanini et al., 2001).

Um das formas de reconhecer a *L. alba* é observando suas folhas (Figura X) que são simples, inteiras, serrilhadas, oblonga, agudas e dispostas de formas opostas, ocorrem em número de duas por nó. São membranáceas, pecioladas, pubescente e com aroma cítrico característico (Castro, 2001).



Figura 03: Folhas da espécie de *L. alba* (Mill.) N. E. Brown. Fonte: Coutinho Neto, 2007.

1.1.2 Atividades Biológicas

Diversas pesquisas etnofarmacológicas constataram uma grande variedade no uso tradicional da *L. alba*, sendo as principais indicações, como: analgésico, anti-inflamatório, antipirético, sedativo, tempero culinário, disenterias e diarreias, doenças cutâneas, doenças hepáticas, cólicas menstruais, antiespasmódico, tratamento de sífilis, gonorreia, doenças respiratórias, digestivas, cardiovasculares, para hipertensão e como sedativos (Medzhitov, 2010; Hennebelle et al., 2008).

Para esses fins terapêuticos observa-se diversas formas de utilização da *L. alba*, de suas folhas ou raízes, como chás, infusões, banhos, extratos alcoólicos, compressas, xaropes (Julião et al., 2003).

Os principais estudos farmacológicos, decorrentes do uso popular, constataram diversas atividades cardiovasculares (Gazola et al., 2004), anticonvulsivante (Soares, 2001), sedativo, analgésico, broncodilatador (Carvalho et al., 2018) antioxidante, anti-inflamatório (Viana, 1998;

Zétola et al., 2002; Hennebelle et al., 2008; Haldar et al., 2012; Hatano et al., 2012), bem como efeitos antiulcerogênicos (Pascual et al., 2001).

Considerando as atividades biológicas de extratos e/ou frações polares da espécie *L. alba*, foram realizados estudos *in vitro* que constataram: atividade antioxidante, que preserva o DNA de um possível estresse oxidativo (Ramos et al., 2003); atividade antimicrobiana evidenciada contra bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*), causadoras de infecções respiratórias (Cáceres et al., 1991). Em outro estudo usando extratos hidroalcoólicos a 90% de teor alcoólico não se observou atividade antimicrobiana, porém, evidenciou-se que o mesmo apresentou atividade antifúngica moderada contra *C. Krusei* (Holetz et al., 2002). Atividade antimicrobiana foi encontrada por Mamun-Or-Rashid et al., 2012, utilizando extrato etanólico de raiz de *L. alba* contra *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Sacrinautea*, *Xanthomonas campestris* e *Escherichia coli* (Mamun-Or-Rashid et al., 2012). Em outras espécies de microrganismos utilizando extratos brutos, OE e mel do néctar das flores de *L. alba*, esta atividade também foi mostrada frente ao fungo *Candida albicans* (Holetz et al., 2002), contra os vírus da Herpes simples tipo I e da pólio tipo 2 (Andregghetti-Frohner et al., 2005), contra o vírus influenza tipo A (subtipo H3N2) (Ruffa et al., 2004) e contra a replicação do vírus da febre amarela (Gomez et al., 2013). Constatou-se ainda ação em potencial frente a fungos dermatófitos com OE rico em linalol (Costa et al., 2013).

No intuito de avaliar um dos seus principais usos tradicionais, modelos de investigação que usaram a *L. alba* para hipertensão observaram que o extrato da mesma reduziu a frequência cardíaca em coração isolado de rato, porém sem mudança da sua força contrátil (Gazola et al., 2004). Em artéria mesentérica isolada de ratos, o OE de *L. alba* apresentou vasorrelaxamento independente de endotélio (Maynard et al., 2011) e ainda ação hipotensora causada pelo quimiotipo citrionelol (Bastos et al., 2009).

Foi investigada a ação antioxidante do OE das folhas de *L. alba*, obtidos por hidrodestilação, e constatou-se resultado significativo semelhante ao da vitamina E, usada como controle positivo (Stashenko et al., 2004). Identificado também em extratos metanólicos das folhas de *L. alba*, que mostrou propriedade antioxidante atribuída a flavonoides e cumarinas (Hennebelle et al., 2008).

Na realização de testes *in vivo* observou-se que a infusão da *L. alba* protege contra o aparecimento de úlceras gástricas induzidas por indometacina, considerando assim sua atividade antiulcerogênica (Pascual et al., 2001), e ainda relatos da mesma atividade determinada por constituintes majoritários, como 1,8-cineol (Santos e Rao, 2001), linalol (Barocelli et al., 2004), limoneno (Moraes et al., 2009) e citral (Ortiz et al., 2010). Em testes realizados *in vivo* em juvenis

de jundiá observou-se que o OE de *L. alba* é eficaz na indução da sedação e anestesia (Cunha et al., 2010).

O citral é um quimiótipo da *L. alba*, bastante estudado. Apresenta atividades biológicas tais como: calmante, antiespasmódica, analgésica, sedativa, ansiolítica, e antibacteriana (Silva et al., 2012; Sena Filho, et al., 2006). É um monoterpene bastante apreciado pelas indústrias de alimentos, farmacêuticas e ainda de cosméticos e perfumaria (Lalko & Api, 2006). É possível defini-lo como um metabólito secundário, resultante da união de dois aldeídos isométricos: o trans- isômero geranial ((E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal) e o cis-isômero neral ((Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienal) (Matos, 2000). O geranial representa até 55-70% desta combinação, possuindo um forte odor cítrico. O neral corresponde até 35-45%, menos expressivo e apresenta um aroma mais suave.

É um constituinte que apresenta aroma bastante característico, comparado ao intenso odor do limão, o que conferiu ao citral grande aplicabilidade nas indústrias de perfumaria, detergentes e alimentícias, bem difundido na cozinha do Sudeste Asiático (Dudai et al., 2005). Além disso, é utilizado na produção das ionona, beta caroteno e para composição da vitamina A (Martins et al., 2004).

Como o citral está como constituinte majoritário em várias plantas medicinais é atribuído a sua molécula algumas atividades biológicas. Observou-se atividade antisséptica (Harborne et al., 1999), ação calmante e espasmolítica (Matos, 2000). Na espécie *Cytopogon citratus* onde mais de 70% do seu óleo essencial é constituído de citral, atribuiu-se a esta a responsabilidade pelas atividades: antifúngica (Paranagama et al., 2003; Mahanta et al., 2007; Rozwalka et al., 2008; Guimarães et al., 2011; Aquino et al., 2012), anti-helmíntica (Almeida et al., 2003), antibacteriana (Pereira et al., 2004; Vargas et al., 2010; Valeriano et al., 2012), antiprotozoários (Rojas et al., 2012), repelente (Yanes, 2011), larvicida (Furtado et al., 2005; Freitas et al., 2010), inseticida (Soares et al., 2011), anti-mutagênico, antimicrobiano e inibidor enzimático (Rao et al., 2005).

A ação antinociceptiva do citral foi demonstrada em camundongos submetidos a diferentes modelos experimentais de nocicepção aguda e crônica. O pré-tratamento com citral (25, 100 ou 300 mg/kg, v.o.) inibiu a contorção induzida por formalina nas fases neurogênica e inflamatória (inibição de 54% e 65% com dose de 300 mg/kg, respectivamente). Esse resultado demonstra o potencial do citral para o tratamento da dor inflamatória e neuropática (Nishijima et al., 2014).

Estudos realizados para avaliarem propriedades sedativas, mostrou ação fraca ou moderada do citral sobre os receptores benzodiazepínicos (Hennebelle et al., 2008). A atividade da carvona, outro quimiotipo do OE de *L. alba*, evidenciou ação ansiolítica (Hatano et al., 2012).

Efeito anticonvulsivante de três quimiotipos foi testado. Os animais foram tratados com citral (100 mg/kg, i.p.), α -mirceno ou limoneno (200 mg/kg, i.p.), e apresentaram aumentos significativos na latência de convulsão e porcentagem de sobrevivência. A associação de OE ao diazepam potencializou significativamente seus efeitos, sugerindo um mecanismo de ação semelhante (Almeida et al., 2011). Atividades antinociceptiva e antiedematogênica dos quimiotipos citral-limoneno e carvona-limoneno mostraram resultados significativos para os testes de placa quente e contorções abdominais (Viana et al., 1998).

1.2 Dor

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou relacionada à lesão real ou potencial dos tecidos. A dor refere-se à percepção de um sentimento ou sensação, na qual cada indivíduo expressa de acordo com o aprendizado frente as suas experiências prévias. Por envolver sensações físicas e psíquicas, se torna difícil de defini-la e tratá-la, sendo responsável pela maioria das queixas dos pacientes.

A dor pode ser classificada de acordo com a duração e patogênese. De acordo com a duração pode ser aguda e crônica. A dor aguda é de caráter fisiológico, sendo deflagrada por lesão corporal e tem função de alerta e defesa contribuindo para a preservação da vida (Oliveira, 2001). Possui início súbito relacionado a afecções traumáticas, infecciosas ou inflamatórias. Espera-se que desapareça após intervenção na causa como a cura da lesão, imobilização ou em resposta a medicamentos. Alguns sinais associados à dor são de natureza neurovegetativa como aumento da pressão arterial, taquicardia, taquipneia, agitação psicomotora e ansiedade (Brasil, 2001).

A dor quando se torna crônica, não tem papel fisiológico e pode constituir razão para incapacidade funcional, situação que justifica medidas destinadas a sua supressão. Muitas vezes manifesta-se na ausência de agressões teciduais, tal como ocorre em casos de neuropatia periférica ou central e em certas afecções psicopatológicas (Teixeira & Figueró, 2001). Enquanto a dor aguda provoca uma resposta simpática, a dor crônica permite uma adaptação a esta situação. Não é bem delimitada no tempo e espaço e persiste em condições patológicas crônicas de forma contínua ou recorrente. Normalmente, resulta em respostas emocionais de ansiedade e depressão (Brasil, 2001).

De acordo com a patogênese, a dor pode ser principalmente nociceptiva e neuropática. A dor nociceptiva ocorre por ativação fisiológica de receptores, nos tecidos periféricos, ou da via dolorosa e está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares, pele ou ligamentos (Bryce, 2012; Treede et al., 2008), podendo ser subdividida em dor musculoesquelética e dor visceral. A dor musculoesquelética é uma forma de dor comum e frequentemente experimentada por trauma ou inflamação nos ossos, articulações, músculos ou outro tecido conjuntivo. Também pode surgir de instabilidade mecânica, espasmos musculares ou síndromes de uso excessivo como tendinite ou bursite. Para esta classe de dor, é necessário que o paciente tenha pelo menos alguma sensação preservada onde a dor está localizada. A evidência de patologia musculoesquelética subjacente à dor também deve existir (Widerström-Noga et al., 1999). A dor visceral é tipicamente mal localizada e é o resultado da ativação de nociceptores nos órgãos e tecidos abdominal, torácico ou pélvico. Esta dor é frequentemente associada a diagnósticos como infartos do miocárdio, colecistite e cálculos renais. Podem ser ativadas por estímulos como distensão, compressão, inflamação e isquemia que afetam os órgãos viscerais (Widerström-Noga et al., 1999).

A DN é definida como uma dor que ocorre em áreas ou órgãos envolvidos em lesões ou doenças neurológicas (Backonja, 2003), pode ser dividida em DN central e DN periférica. Uma lesão no nervo periférico gera DN periférica, tais como lesões traumáticas, dor pós- amputação, mono ou polineuropatias periféricas dolorosas, neuralgia trigeminal ou aracnoidite. Em contraste uma lesão no SNC gera DN central, no caso da esclerose múltipla, tumores de origem encefálica, doença de Parkinson ou epilepsia (Costa, 2009). Em geral, os indivíduos com lesão da medula espinal têm DN central, no entanto aqueles que têm uma lesão na medula espinal devido a trauma também podem ter DN periférica. Independentemente da origem da DN, as opções de tratamento são as mesmas (Widerström-Noga et al., 1999).

1.2.1 Fisiologia da Dor

A compreensão dos vários mecanismos envolvidos na fisiopatologia da dor é importante, pois permitirá uma decisão racional com relação ao plano da terapêutica para o paciente (Jones, 2001). À medida que vários mecanismos compartilhados são identificados entre dor nociceptiva e neuropática justifica a reconsideração da nossa compreensão, diagnóstico e tratamento destas (Bennett, 2006).

O componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, que consiste dos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo (Tranquilli, 2004). Na transdução, a energia do estímulo externo é convertida em

atividade eletrofisiológica. Qualquer que seja a natureza do estímulo, este provoca de imediato uma mudança no potencial de membrana, que altera a permeabilidade de íons surgindo uma onda de despolarização/repolarização, que é transmitida unidirecionalmente ao longo da membrana da célula nervosa, desde a periferia até ao SNC. Na segunda fase, da transmissão, a informação codificada é transmitida através da via medular espinal para o tronco encefálico e tálamo (Dourado, 2007; Moffat & Rae, 2010). Esse mecanismo de nociceção é mediado por nociceptores, que são receptores sensoriais especializados responsáveis pela detecção de estímulos nocivos, transformando os estímulos em sinais elétricos, e conduzidos ao SNC como supracitado. Estes receptores são chamados terminações nervosas livres das fibras aferentes primárias A δ e C, distribuídas em todo corpo, sensíveis aos estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (Min, et al., 2016). A classificação do nociceptor é baseada na classificação da fibra nervosa da qual este compõe a extremidade terminal (Patel, 2010).

As projeções para o córtex cerebral são enviadas por vias ascendentes da medula espinal: sistema coluna dorsal-Lemnisco medial e sistema ântero-lateral, como mostrado na figura 04. No sistema medial, projetam-se para o córtex cingulado anterior e o córtex insular. No sistema lateral, os neurônios são projetados para o córtex somatossensorial. O sistema lateral está envolvido na percepção da intensidade da dor e no local da transmissão; o sistema medial está envolvido na ansiedade e no medo associados à dor (Nishikawa, 2017). Estas vias de projeções podem ser consideradas como uma cadeia de três-neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinal, onde têm seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal. O neurônio de segunda ordem ascende pela medula espinal ao tálamo, e deste, parte o neurônio de terceira ordem que se projeta para o córtex cerebral (Tranquilli, 2004) (Figura 04). Portanto, participam da transmissão rostral através da medula espinal até centros supraespinais como o mesencéfalo e córtex (Drewes, 2006).

Os neurônios de primeira ordem são classificados em três grandes grupos, segundo seu diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução (Klaumann et al., 2008). Essas fibras foram denominadas como grupos A e C, suas propriedades estão sumarizadas no quadro 01. As fibras A são consideradas as mais calibrosas e as fibras C as mais delgadas. As fibras A são subdivididas em fibras alfa (13-20 μ m), beta (6-13 μ m), gama (3-8 μ m) e delta (1-5 μ m). Dentre estas fibras, aquelas mais calibrosas mostram uma velocidade de condução mais rápida do que as de menor calibre. As fibras C têm uma espessura que varia entre 0,5-1 μ m e velocidade de condução de 0,5 a 2 m/s.

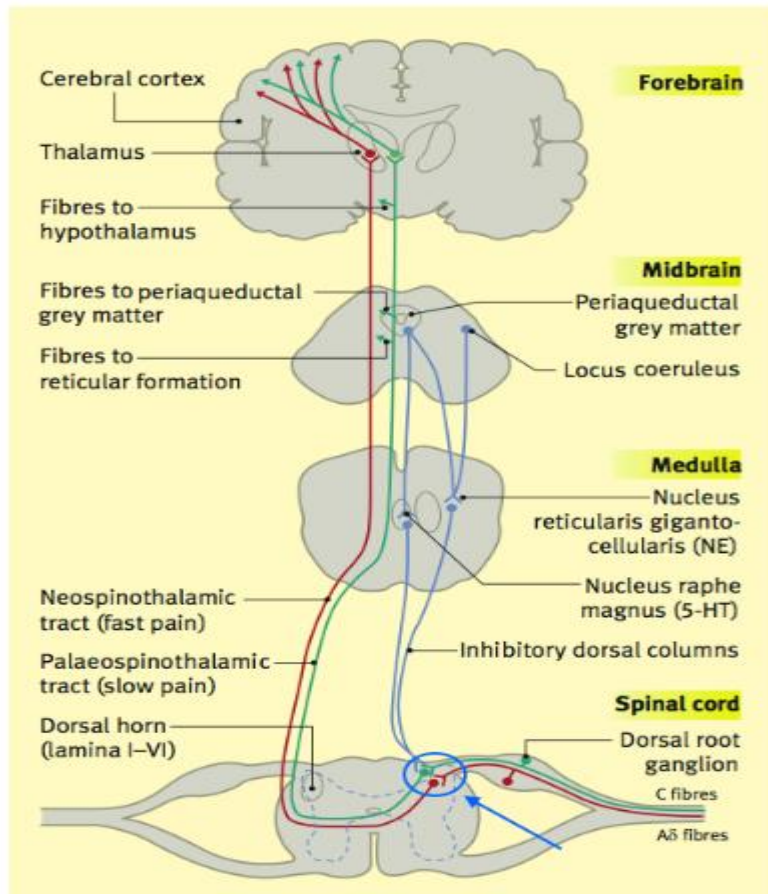


Figura 04: Principais vias ascendentes e descendentes da dor e estruturas associadas. Vias nociceptivas ascendentes rápidas (vermelhas) e lentas (verdes). Tratos inibitórios descendentes (azul). NA, noradrenalina; 5-HT, 5-hidroxitriptamina. A zona marcada com uma seta no corno posterior da medula espinhal é o principal local de convergência das vias ascendentes e descendentes. Adaptado de Steeds, C.E., 2013.

O tipo de impulso transmitido está relacionado com o tipo de fibra que o transmite, este padrão é explicado pela diferença na velocidade de propagação do impulso nervoso nos tipos de fibras. Ou seja, fibras de condução rápida, como A alfa, beta e gama, conduzem estímulos de propriocepção e tato, enquanto fibras A delta, que são mais lentas são responsáveis pela primeira fase da dor, rápida e forte, do tipo picada ou ferroadada e são sensíveis a estímulos mecânicos intensos (mecanorreceptores de alto limiar) e térmicos. As fibras C, também mais lentas, conduzem estímulos dolorosos (Okeson, 2005), que produzem uma segunda fase de dor mais difusa e persistente, e possuem receptores de alto limiar para estímulos térmicos e/ou mecânicos. O quadro 01, abaixo resume as principais características destas fibras nervosas.

| Tipo | Grupo | Diâmetro (µm) | Velocidade de condução (m/s) | Função |
|----------------|-------|---------------|------------------------------|---|
| A alfa (α) | | 15-20 | 50-120 | Fibras motoras para músculo esquelético; Propriocepção |
| A alfa (α) | Ia | 15-20 | 70-120 | Terminações primárias no fuso muscular |
| A alfa (α) | Ib | 12-20 | 70-120 | Aferentes no órgão tendinoso de Golgi |
| A beta (β) | II | 5-10 | 30-70 | Terminações secundárias nos fusos musculares, tato, pressão |
| A gama (γ) | | 3-6 | 15-30 | Inervação motora dos fusos musculares |
| A delta (δ) | III | 2-5 | 5-25 | Receptores de pressão, dor rápida e aguda; temperatura. |
| B | | <3 | 3-15 | Autônoma pré-ganglionar |
| C, raiz dorsal | IV | 0,4-1,2 | 0,5-2 | Sensibilidade dolorosa e térmica (não-mielinizadas) |
| C, simpático | | 0,3-1,3 | 0,7-2,5 | Pós-ganglionar simpática (não-mielinizadas) |

Quadro 01: Classificação funcional das fibras nervosas de mamíferos. A classificação do I a IV aplica-se somente a fibras sensoriais. Fonte: Erlanger e Gasser (1930).

As fibras aferentes primárias terminam no corno dorsal da medula, esta pode ser dividida em seis lâminas de acordo com as características citológicas de seus neurônios. A maioria dos neurônios da lâmina I responde exclusivamente a estímulos nocivos, recebem conexões diretas de fibras Aδ e C. A lâmina II é formada quase que exclusivamente por interneurônios excitatórios e inibitórios, alguns dos quais respondem somente a aferências nociceptiva. As lâminas III e IV contêm neurônios que recebem aferências de fibras A beta, respondendo predominantemente a estímulos não-nocivos. A lâmina V recebe aferências de fibras A beta, A delta, C e também de estruturas viscerais (Purves et al., 2005). Os neurônios da lâmina VI estão conectados de forma monossináptica com aferentes A de músculos e articulações e respondem a estímulos inócuos. No corno ventral, os neurônios das lâminas VII e VIII respondem a estímulos nociceptivos, de forma mais complexa, através de conexões polissinápticas (Pisera, 2005).

As fibras aferentes de primeira ordem formam conexões diretas ou indiretas com uma das três populações de neurônios do corno dorsal da medula: 1) interneurônios excitatórios e inibitórios; 2) neurônios propriospinais que estendem-se por múltiplos segmentos espinais e estão envolvidos na atividade reflexa; 3) neurônios de projeção de ampla faixa dinâmica (WDR), efetivos na discriminação entre diferentes intensidades de estímulos dolorosos (Klaumann et al., 2008). Os três componentes são interativos e essenciais para o processamento da informação nociceptiva, facilitando a geração de uma resposta apropriada e organizada à dor (Drewes, 2006).

A comunicação da informação nociceptiva entre neurônios ocorre por mediadores químicos (neurotransmissores) que são aminoácidos excitatórios ou inibitórios e neuropeptídeos produzidos, armazenados e liberados tanto nas terminações dos nervos aferentes como nos neurônios do corno dorsal. Os principais aminoácidos excitatórios são o glutamato e o aspartato, porém, em fibras aferentes do tipo C também se encontra uma variedade de neuropeptídeos como a substância P, neurotensina, peptídeo intestinal vasoativo, peptídeo relacionado com o gene da calcitonina e colecistocinina (Lamont e Tranquilli, 2000; Rygh et al., 2005).

Nos terminais nervosos no corno dorsal da medula espinal, os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N liberam neurotransmissores, como o glutamato e a substância P, que atuam nos receptores pós-sinápticos. Essas substâncias químicas influenciam o grau de atividade do nervo e assim a intensidade da sensação de dor. Este passo é regulado tanto por interneurônios inibitórios locais quanto por neurônios de projeção descendente do tronco encefálico da medula espinal. Os principais neurotransmissores inibitórios incluem peptídios opióides, norepinefrina, glicina e ácido γ -aminobutírico (GABA).

A inibição pré-sináptica da liberação de glutamato possui efeitos neuroprotetores e parece ser uma melhor alternativa, pois não causa os efeitos colaterais normalmente provocados pelos antagonistas de receptores tipo NMDA e AMPA (Lagréze, 2001).

Cada estímulo está associado com certo grau de inflamação levando a sensibilização periférica. A inflamação é uma tentativa protetora do organismo de remover os estímulos prejudiciais e iniciar o processo de cicatrização. No entanto, o resultado pode ser prejudicial se levar a inflamação crônica sem resolução do processo prejudicial subjacente (Medzhitov, 2010).

No local da lesão ocorre uma cascata de eventos bioquímicos envolvendo o sistema vascular regional, sensibilização do sistema imunológico e diferentes tipos de células encontradas no tecido envolvido (Ferrero-Miliani et al., 2007). Esses eventos induzem a resposta inflamatória, na qual há um aumento da permeabilidade das células do revestimento endotelial e influxos de leucócitos no interstício, explosão oxidativa e liberação de citocinas [interleucinas e fator de necrose tumoral- α (TNF- α)]. Ao mesmo tempo, há também uma indução da atividade de

várias enzimas (oxigenases, óxido nítrico sintases, peroxidases), bem como o metabolismo do ácido araquidônico (Gomes et al., 2008).

Todos estes fatores induzem a ativação das fibras nociceptivas prolongando a liberação de mediadores pró-inflamatórios que podem causar alterações no SNC, resultando em DN, quando o estímulo nocivo não é transitório e pode estar associado com inflamação e injúria nervosa significativa. Sob tais circunstâncias, alterações dinâmicas no processamento da informação nociva são evidentes no sistema nervoso periférico e central (Klaumann et al, 2008).

1.2.2 Dor Neuropática (DN)

A DN é definida pela IASP como dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial (Haanpää et al., 2011). O termo “doença” refere-se a processos patológicos específicos, como doenças autoimunes, canalopatias, tornando a dor um estado patológico e não um estado fisiológico de proteção a lesão no corpo (Bennett, 2003), e o termo “lesão” se refere a um dano macro ou microscopicamente identificável (Garcia, 2010). Assim, a DN é uma condição debilitante de dor crônica causada por uma consequência direta de lesão, ou disfunção dos neurônios somatossensoriais (Kaur, 2016). De difícil tratamento (Carlton et al. 2009; Toth, 2011), afetando a qualidade de vida e reduzindo a produtividade individual e aumentando o custo por recursos de saúde dos pacientes (Navarro et al., 2011).

A literatura relata uma prevalência de DN que varia entre 6,9 e 10%. Estas diferenças destacam as dificuldades, já que não tem sido realizada avaliação padronizada para a identificação da DN nos estudos epidemiológicos (van Hecke, 2014). Na América Latina, afeta 2% da população, os casos mais comumente encontrados nesta região foram lombalgia com componente neuropático, neuropatia diabética, neuralgia pós-herpética, e DN como complicação pós-operatória (Garcia, 2010). No entanto, a prevalência de DN provavelmente aumentará no futuro, devido ao aumento da sobrevivência de pacientes com doenças crônicas e ao envelhecimento populacional, já que a DN é mais freqüente no idoso, portador de enfermidades como a herpes zóster e diabetes (Schestatsky, 2008).

A DN pode ser classificada como periférica (mononeuropatia periférica e polineuropatia dolorosa) ou central (pós-AVC, após lesão da medula espinhal) e pode ser originada por lesão do nervo após uma grande variedade de condições/eventos, tais como: trauma direto no nervo, inflamação/neurite/compressão do nervo, diabetes, infecções (herpes zóster, HIV), tumores (compressão nervosa/infiltração), toxinas (quimioterapia) e doenças que afetam o sistema nervoso periférico e central (Smith, 2004).

As pessoas que experimentam DN frequentemente apresentam dores espontâneas e evocadas (Bryce, 2012). As dores espontâneas são descritas como parestesias e disestesias. A parestesia é uma sensação anormal, como os formigamentos e os agulhamentos. Já a disestesia é uma sensação desagradável, normalmente de “queima” provocada provavelmente por descargas ectópicas em qualquer tipo de fibra nervosa. As dores evocadas são chamadas de hiperalgesia e alodinia. A hiperalgesia, também chamada de hiperpatia, é a resposta exagerada a um estímulo doloroso e a alodinia é uma dor produzida por um estímulo que normalmente não causa dor, como por exemplo, um toque leve na pele (Woolf e Max, 2001; Woolf, 2004). Esta condição parece envolver fibras aferentes (A β), que medeiam à sensação tátil, mas não a dor em condições normais (Nishikawa & Nomoto, 2017).

A origem da dor pode ser de neurônios não lesionados projetando-se para nervos lesionados (Koltzenburg et al., 1994; Ali et al., 1999). Esta diferença na qualidade e no padrão de alteração da sensibilidade dolorosa ocorre devida uma reorganização da transmissão sensorial, um processamento anormal das informações sensoriais pelo o sistema nervoso após lesão do nervo (Boyce-Rustay & Jarvis, 2009). Tais mudanças incluem alterações na expressão de neurotransmissores, neuromoduladores, receptores, canais iônicos e proteínas estruturais (Mathews, 2008). Dessa forma, a dor crônica está associada a uma grande variedade de padrões desordenados de neurotransmissão em múltiplos níveis do neuroeixo.

Há situações com lesão neuronal definida, sem exibição de dor, como na síndrome das pernas inquietas, e condições com dor sem lesão neural comprovada, como nas neuralgias (Griffin; McArthur; Polydefkis, 2001).

1.2.3 Mecanismo da DN

A DN é um fenômeno complexo causado por interações entre múltiplos sistemas fisiológicos, incluindo o sistema imunológico. As citocinas pró e anti-inflamatórias parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da DN (Hung, 2017). Estudos experimentais revelam que a inflamação é a principal causa de DN. As citocinas inflamatórias e o estresse oxidativo junto com mediadores alógenos liberados após lesão no nervo induzem DN através da sensibilização dos receptores nociceptivos (Goecks et al., 2012; Pathak, et al., 2013). Assim, uma grande quantidade de receptores, neurotransmissores, sistemas secundários de mensagem, fatores de transcrição e outras moléculas de sinalização (Scholz & Woolf, 2002), além da excitação excessiva de canais iônicos contribuem para sensação de DN (Zimmermann, 2001).

A ativação intensa e frequente dos neurônios aferentes primários promove na medula espinhal, a liberação contínua de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, ativando os

neurônios medulares secundários. Assim, esses eventos induzem a reorganização neuroquímica da medula espinhal, associada à hiperplasia das células da glia e à neuroinflamação, o que contribui para a atividade espontânea e maior capacidade de resposta (Schmidt et al., 2010).

Lesão de fibras distais ao Gânglio da Raiz Dorsal (GRD) resulta em Degeneração Walleriana (DW) no local, associada a fenômenos inflamatórios e ativação de macrófagos, facilitando descargas elétricas anormais de regiões não comprometidas pela lesão (Kraychete, Gozzani e Kraychete, 2008). As alterações elétricas são expressas por atividade elétrica contínua anormal a partir de neuromas formados após lesão neural em neurônios aferentes axotomizados (Devor; Seltzer, 1999) e pode induzir sensibilização central (Coderre et al., 1993). Ocorrem também alterações gênicas na expressão e atividade de canais de cálcio e sódio associados à geração de potencial de ação, repetido ou prolongado em aferentes sensoriais primários, desencadeando uma sensibilização periférica (Scholz e Woolf, 2002).

No corpo celular, as alterações gênicas pode se dá devido às fibras sensitivas iniciarem a DW (Bennett, 1999), cuja expressão pode ser a alteração do tipo e nível de neurotransmissor ou modulador tal como diminuição da substância P e BDNF na fibra C ou aumento de galanina e substância P em fibras A β (Malcangio et al., 2000).

As alterações gênicas na expressão dos canais de sódio do tipo III, a proteína do canal de sódio tipo 3 (Nav1.3) e a proteína do canal de sódio tipo 8 (Nav1.8) nos neurônios aferentes primários, pode explicar o aumento da atividade ectópica nas fibras danificadas. O Nav1.3 é um canal de sódio que após lesão nervosa, se acumula ao redor de neurônios sensoriais e desempenha papel significativo no aumento da excitabilidade neuronal, contribuindo para a DN (Wood et al., 2004). O Nav1.8 está envolvido predominantemente na abertura dos canais de sódio em condições fisiopatológicas da dor, sendo assim a localização deste canal sugere que intervenções farmacológicas podem ajudar na terapia de neuropatias (Lai et al., 2003). Esses canais de sódio não só acumulam no local da lesão no nervo periférico, mas também ao redor e dentro do GRD intacta. Assim os disparos ectópicos ocorrem no GRD quando atingem seu limiar (Amir, 2002).

Outras alterações gênicas envolvem o aumento da expressão dos receptores vanilóides (VR1) e purinérgicos (P2X3). Os P2X estão acoplados a canais de cátions ativados por ATP, causando despolarização, e são mediadores de corrente dos neurônios sensitivos. Também são importantes na nocicepção e estão localizados no GRD, lâmina II da medula espinhal e núcleo do trato solitário (Fukuoka et al., 2000).

Os VR1 são canais catiônicos permeáveis a Na⁺ e principalmente a Ca⁺⁺, podendo ser ativado por baixo pH, altas temperaturas e alguns ligantes endógenos. São essenciais para o

desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia térmica e alodínea relacionadas à inflamação e injúria tecidual (Fukuoka et al., 2000). A capsaicina é uma proteína expressa predominantemente pelas fibras aferentes nociceptivas, e possui VR1 específicos nas terminações nervosas dos neurônios nociceptivos.

Em estudo com ratos diabéticos, após lesão parcial do nervo periférico mostrou baixa regulação do receptor VR1 nas fibras lesionadas, mas grande regulação destes receptores nas fibras A β e C intactas no corno dorsal da medula espinal. Visto que ocorre um aumento da disponibilidade de fatores de crescimento na periferia para estas fibras, estes podem se tornar um gatilho para as alterações gênicas. Assim, um aumento de NGF leva a maior liberação de substância P pelas fibras A β , *up-regulation* de receptores VR1 e P2X₃ (Fukuoka et al., 2000), canais de sódio do tipo III ou NaV 1.8 (Boucher et al., 2000), desencadeando maior atividade elétrica espontânea nessas fibras (Ali et al., 1999).

O brotamento das fibras A β , que normalmente chega às lâminas I e II, ou mais profundas, permite conexões sinápticas com a lâmina II, sítio de chegada de aferentes nociceptivos da fibra C, ampliando o campo receptivo do neurônio e facilitando a interpretação de estímulos mecânicos periféricos inócuos como agressivos e causadores de sensação de dor, constituindo o sintoma clínico denominado alodínia mecânica (Mannion e Woolf, 2000) (Figura 05). A persistência de receptores VR1 nessas fibras próximas a lesão e no GRD intacto pode ser crucial para o desenvolvimento ou manutenção da DN (Hudson, 2001), e como esses neurônios ainda estão conectados com seus órgãos alvo eles podem ter um papel crucial na geração da DN (Baron, 2006).

Além disso, um neuroma pode se formar no local da lesão, e descargas anormais ectópicas a partir do neuroma parecem ser causadas por alterações intracelulares de diferentes subtipos de canais de sódio (Matzner e Devor, 1994; Black et al., 2008), devido o aumento da expressão de canais de íons dependente de voltagem nos neurônios periféricos e espinais. Isto leva ao aumento da frequência de disparo, possivelmente resultando em dor espontânea e sensibilização central (Stacey, 2005). Ocorre também uma maior atividade glutamatérgica e uma diminuição concomitante da neuromodulação inibitória GABAérgica ao nível do corno dorsal da medula (Scholz e Woolf, 2002). Esta mudança no equilíbrio de sistemas excitatórios e inibitórios também incorporam ativação de cascatas de sinalização intracelular e recrutamento de neuropeptídeos neurotróficos (Boyce-Rustay, 2009).

Alterações estruturais, tais como: degeneração axonal e desmielinização, atrofia transneuronal, reconexão e hiperexcitabilidade de circuitos neuronais (Buss & Schwab, 2003; Jones & Pons, 1998; Ghosh et al., 2009; Yague, 2011), correlacionam-se com o

comprometimento sensorial e DN. Machado et al., (2000) mostraram que a neuropatia diabética periférica desenvolveu diminuição significativa no número de fibras mielínicas, aumento no número de fibras nervosas de pequeno calibre, aumento do número de depósitos intraaxonais de glicogênio, sugerindo processos de degeneração, atrofia e desmielinização da fibra nervosa e dos axônios após 9^o e 12^o mês do desenvolvimento da diabetes em ratos.

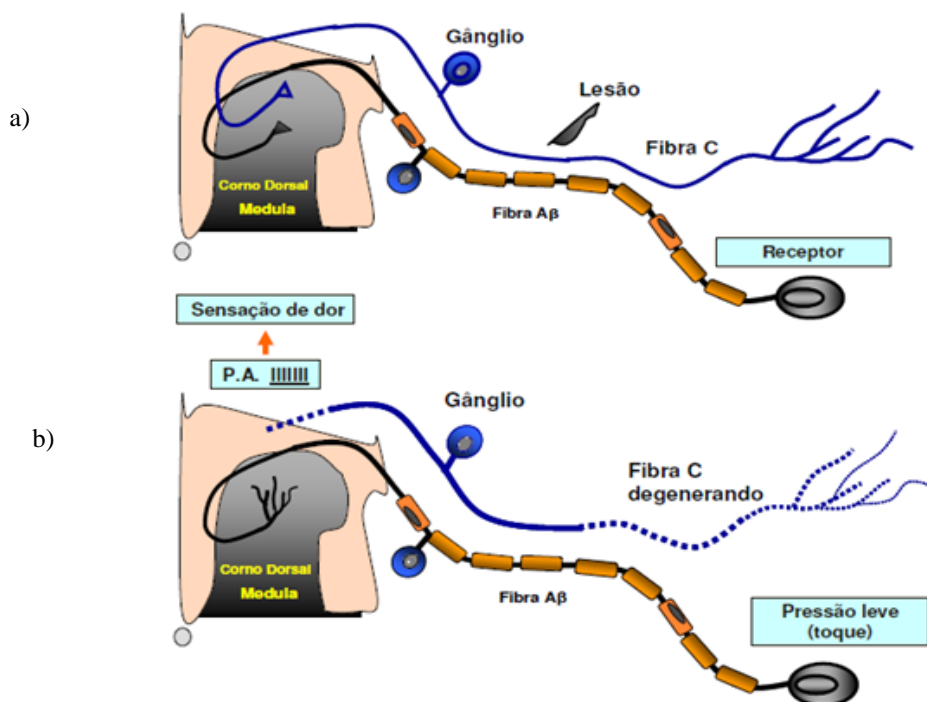


Figura 05: a) Lesão neural em fibras C, b) Brotamento de fibras A β no corno dorsal da medula alcançando a lâmina II, sítio de chegada de aferentes nociceptivos. Fonte: Câmara, 2009.

Em condições fisiológicas, as terminações nervosas aferentes primárias não são sensíveis às catecolaminas, portanto, o sistema simpático não causa dor. Estímulos ameaçadores que ativam o sistema nervoso simpático, geralmente inibem a dor (Wall, 1979, Walters, 1994) por mecanismos centrais que operam em vários níveis na via da dor para inibir a transmissão da informação nociceptiva para o cérebro até que a ameaça tenha passado (Treede, 2016). Durante a fase de recuperação a atividade simpática intensa cessa e hipersensibilidade dolorosa torna-se proeminente (Watkins & Maier, 2000, Janig, 2014). Lesões de nervos periféricos induzem uma hipersensibilidade noradrenérgica fazendo com que contribua para DN (Schaible e Richter, 2004).

Baixo nível de atividade simpática disseminada continua durante a fase de recuperação e níveis mais altos de atividade podem ocorrer em neurônios simpáticos pós-ganglionares selecionados intermitentemente durante reflexos autonômicos (Janig, 2014). Sugere-se que o

mecanismo da ativação simpática é determinado pelo aumento da resposta dos nervos lesionados à adrenalina circulante ou a norepinefrina liberada das terminações simpáticas pós-ganglionares (Devor e Seltzer, 1999). Receptores α 1-adrenérgicos são expressos nas terminações das fibras adjacentes às lesionadas. Essas fibras desenvolvem sensibilidade a norepinefrina (Paccola, 2008). Assim, a atividade simpática contínua tem sido implicada como um contribuinte significativo para a manutenção de muitos estados de dor crônica (Borchers e Gershwin, 2014, Drummond, 2013, Mantyh, 2014, Schlereth et al., 2014).

Estudos em ratos, após dano no nervo ciático, demonstraram que axônios noradrenérgicos cresceram nos GRD provocando estimulação simpática repetida (Mcmachlan et al., 1993). Em humanos, a noradrenalina aplicada perto de um neuroma ativou as fibras A δ e C produzindo potenciais de ação espontâneos (Teixeira, 2001). Além disso, a estimulação elétrica da cadeia simpática causa liberação de noradrenalina endógena aumentando a descarga elétrica em fibras sensoriais não degeneradas após lesão e mediadas por receptores α -2-adrenérgicos (Sato e Perl, 1991). De fato, o bloqueio simpático local e as lesões simpáticas são amplamente utilizados para tratar condições dolorosas, como a síndrome de dor regional complexa, dor de membro fantasma, dor do câncer, neuralgia postreperética e dor isquêmica (Abramov, 2014, Agarwal-Kozlowski et al., 2011, Mercadante et al., 2015).

Em modelos animais de DN de ligadura do nervo espinal no nível de L₆, mais de 60% dos nociceptores intactos exibem atividade espontânea e mais de 50% respondem a antagonistas α -adrenérgicos (Garcia-Larrea e Magnin, 2008; Campbell e Meyer, 2006). No entanto, a eficácia clínica das intervenções simpáticas ainda não foi demonstrada de forma conclusiva (Abramov, 2014, Dworkin et al., 2013, Zernikow et al., 2015).

A DN responde pobremente aos opióides e aos antiinflamatórios não esteroidais, e vem sendo tratada com drogas anti-epilépticas e antidepressivas. Entretanto, ambas têm um uso limitado devido aos seus efeitos adversos (Backonja, 2000; Tremont-Lukats et al., 2000). Um dos desafios para a compreensão e eficácia terapêutica da DN vem da dificuldade de compreender os mecanismos subjacentes, tanto periféricos como centrais. Somando-se a mudança dinâmica dessas estruturas periféricas e centrais em consequência da neuroplasticidade. Esse fenômeno pode levar à diversidade de mecanismos ao longo da evolução temporal da condição. Nesse contexto, receptores de membrana e canais iônicos, podem sofrer diversidade, tornando-se assim a intervenção terapêutica caótica e imprevisível dentro da bruma de sintomas inespecíficos (De Castro-Costa et al, 1981). Contudo, a compreensão da neurobiologia da DN, é importante para estudos futuros de alvos terapêuticos.

1.3 Degeneração e regeneração de nervos periféricos

Embora os axônios do SNP tenham a capacidade de regenerar, a recuperação funcional nos humanos geralmente é incompleta. Os axônios de grande diâmetro são remielinizados, mas a mielina é mais fina (Schröder, 1972), a reinervação do alvo pode ser lenta e mal direcionada e, como consequência, os resultados funcionais em pacientes são freqüentemente pobres (Palispis e Gupta, 2017).

As lesões no sistema nervoso podem ser classificadas anatomicamente em três graus, segundo Seddon: neuropraxia, axonotmese e neurotmeze. Na neuropraxia, a bainha do axônio se encontra lesada, porém a fibra nervosa está intacta (sem degeneração). Já na axonotmese e na neurotmeze tem-se a interrupção do axônio e do tronco nervoso, respectivamente, seguido de DW. Sunderland refinou a classificação de Seddon dividindo-a em cinco tipos ou graus. A neuropraxia foi classificada como grau I; já a axonotmese foi dividida em três tipos, que variam de acordo com o grau da lesão. Grau II – lesão do axônio, grau III – lesão da fibra nervosa (axônio + endoneuro) e grau IV – lesão do fascículo (axônio + endoneuro + perineuro). A lesão grau IV tem pior prognóstico que a III, e esta pior que a II, devido ao risco de uma regeneração imperfeita (reinervação cruzada), causando déficit motor e sensitivo residual e possível necessidade de reeducação sensitiva. No grau IV a lesão pode ser tratada através da reparação cirúrgica por envolver até o perineuro. Nervos com este tipo de lesão podem evoluir com a formação de neuromas em continuidade e grave comprometimento da função. Na axonotmese o epineuro sempre se encontra preservado. É raramente possível, através da classificação de Sunderland, classificar com exatidão uma lesão axonotmética com base em dados clínicos e eletromiográficos. O subtipo é geralmente discriminável pelo exame histológico da lesão do nervo (Grant, 1999; Lee, 2000). A neurotmeze, classificada como lesão de grau V, todo o nervo e suas estruturas estão lesionados. Não há integridade do epineuro. A reparação sempre é cirúrgica. A regeneração e reinervação nunca é completa e, geralmente, os pacientes evoluem com alguma deficiência residual quanto à função motora e sensitiva (Mattar Junior e Azze, 2000).

As lesões dos nervos periféricos induzem a degeneração dos axônios lesados causando déficits funcionais, que podem ser recuperados por dois mecanismos endógenos: a regeneração de axônios lesados e o surgimento de axônios (Navarro et al., 2007), resultando na reinervação de alvos desnervados. Cada um desses mecanismos também pode contribuir para a ocorrência de efeitos secundários, como hiperalgesia, hiperreflexia e DN. A reinervação bem-sucedida, com

restauração das funções motoras e sensoriais normais, depende de diversos fatores, como a gravidade e o local da lesão nervosa, à distância para atingir os alvos distais, a excitabilidade axonal e o meio inflamatório da lesão tecidual (Allodi et al., 2012).

O atraso entre lesão e degeneração axônica é de 24-48 horas em ratos jovens (Lubinska, 1977;) e camundongos (Beirowski et al., 2005), enquanto axônios de primatas levam vários dias para degenerarem (Chaudhry & Cornblath, 1992). Assim, a degeneração axônica não inicia imediatamente após a lesão. No segmento distal inicia-se uma "fase latente" de intervalos variados de horas-dias em diferentes espécies, caracterizada por evocação persistente de atividade elétrica e integridade morfológica (Lubinska, 1977; Beirowski et al., 2005). Com o tempo, a condutividade elétrica do segmento distal falha antes que as alterações morfológicas se tornem aparentes, ocorre às primeiras modificações, com o aumento da atividade de algumas proteinases e lipases culminando em desintegração do axônio e mielina que progride distalmente (Murray, 2005).

A degeneração axonal pode ser iniciada por uma ampla gama de gatilhos, tais como lesões, injúria tóxica e genética, sendo um importante evento precoce em muitas condições patológicas (Adalbert et al, 2012; Fischer-Hayes et al, 2013). No entanto, ainda são desconhecidos os fatores que governam este processo que estabelece a DW.

A DW corresponde à primeira fase da resposta à lesão, envolvendo destruição de axônios distais, infiltração de macrófagos, ativação de uma resposta inflamatória, desmielinização e início da mitose das Células de Schwann (CS) (Chen et al., 2007; Jessen e Mirsky, 2016).

Os mecanismos moleculares que regulam a DW ainda não são completamente compreendidos, mas a compreensão dos fatores que regulam as respostas rápidas durante a DW pode revelar os mecanismos subjacentes à reparação e regeneração do nervo (Boivin et al., 2007). A degeneração intrínseca dos axônios distais é o evento chave na DW, desencadeando uma cascata de respostas celulares não neuronais, que conduz à produção de um ambiente que sustente o crescimento de axônios após a lesão (Griffin et al., 1995; Vargas e Barres et al., 2007).

As CS apresentam uma notável participação na resposta à lesão neuronal contribuindo para capacidade regenerativa do SNP em relação ao SNC (Fancy et al., 2011; Rambukkana, 2010). As CS mielinizadas associadas a axônios isolados respondem a lesões, antes do início da degeneração axônica, alterando a expressão gênica (Guertin et al, Guertin; Murinson et al, 2005). Dentro de 48 horas após a lesão, deixam de produzir proteínas de mielina (Trapp et al, 1988; White et al, 1989), "upregulate" os genes associados à regeneração (GAP-43, fatores neurotróficos e seus receptores, neuregulina e seus receptores) e começam a proliferar (Murinson et al, 2005).

A resposta precoce das CS a lesão axonal, resulta na fragmentação de seus axônios associados por espirais citoplasmáticas ricas em actina conhecidas como incisões de Schmidt-Lanterman (Catenaccio et al., 2017). Em estágios mais avançados da degeneração axonal as CS desempenham um papel de remoção de restos de mielina.

Estudos têm demonstrado como as CS e as células do sistema imunológico respondem inicialmente as lesões nos axônios. Os produtos endógenos da degeneração neural, normalmente não presentes no meio extracelular, tais como proteínas de choque térmico (Vabulas et al., 2001), RNAm (Kariko et al., 2004) e componentes da matriz extracelular degradada (Brunn et al., 2005) são liberados de axônios lesionados e estimulam CS e macrófagos, via Receptores Toll-like (TLRs), a expressão da Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (MCP-1/CCL2) (Lee et al., 2006) e TLR4 (Karanth et al., 2006). A MCP-1/CCL2 estimula a quimiotaxia de monócitos e vários eventos celulares associados à quimiotaxia, incluindo o fluxo de Ca^{2+} e a expressão de integrinas. Também induz expressão de citocina em monócitos e, em altas concentrações, desencadeia a explosão respiratória, que gera espécies reativas de oxigênio (Jiang et al., 1992; Rollins et al., 1988), conduzindo a ativação de cascatas inflamatórias que podem ser essenciais para promover a regeneração dos axônios (Gaudet et al., 2011). Outras citocinas, como TNF α e IL-1 α , também são expressas por CS após lesão do nervo, seguido pela expressão de IL-1 β e, portanto, também pode contribuir para a resposta precoce à lesão (Sawada et al., 2007; Shamash et al., 2002). Subsequentemente, quando os macrófagos entram no nervo, eles também expressam TNF- α , IL-1 α e IL-1 β (Shamash et al., 2002).

De S, (2003), relata que em horas após lesão por esmagamento do nervo ciático, uma forma da fosfolipase A2, dependente de cálcio (FLAc2 grupo IVA) e da FLA2 secretada (FLAs2 grupo IIA) são expressos nas CS e macrófagos, permanecendo elevadas por duas semanas, o que se correlaciona com o curso de tempo da DW após lesão no nervo. Em três semanas retornam os níveis basais de FLA2, associando à regeneração e remielinização do axônio. Assim, a atividade da FLA2 é necessária para o início da degradação da mielina e para a progressão da DW após lesão no nervo (Gaudet et al., 2011).

As FLA2s hidrolisam o fosfolípido fosfatidilcolina em lisofosfatidilcolina e ácido araquidônico, o primeiro elicita a quebra da mielina, enquanto o segundo produz prostanóides como a prostaglandina E₂ a partir da ação da cicloxigenase (COX). Os prostanóides são mediadores inflamatórios que atuam em receptores ligados a proteína G que ativam proteína quinase A e proteína quinase E, que medeiam à concentração intracelular de cálcio (Gaudet et al., 2011; Okuse, 2006). Sendo assim, mecanismos intrínsecos aos axônios lesionados são subjacentes à degeneração induzida por lesão, que se desintegram e incham antes da

fragmentação do citoesqueleto (George & Griffin, 1995; Sievers et al., 2003). A entrada de cálcio no axoplasma, a partir de estoques extracelulares e intracelulares (Nikolaeva e Mukherjee, 2005; Stirling e Stys, 2010), também fluindo através do canal de anion dependente de voltagem 1 (VDAC1) da membrana mitocondrial externa das CS, altera a fisiologia mitocondrial e ativa calpaína. Calpaínas são conhecidos por regular atividade de várias enzimas, incluindo várias proteínas quinases e fosfatases que modificam o citoesqueleto, além de clivar proteínas do citoesqueleto diretamente (Johnson e Guttmann, 1997; Ekinci e Shea, 1999). Assim, a calpaína 1 e 2 integra a proteólise dependente de cálcio, um mecanismo ubiquitina chave de modulação dos fenômenos de adesão e migração, incluindo inchaço, protusão de membrana, agrupamento de integrinas e desprendimento do citoesqueleto (Lebart, M.-C e Benyamin, 2006). O momento da desintegração granular do citoesqueleto e degeneração do axônio definem quando começam os processos degenerativos subseqüentes e mais extensos (Gaudet et al., 2011), tais como a desintegração da bainha de mielina, acumulação de macrófagos e regeneração axonal (Bisby e Chen, 1990).

A DW serve para criar um microambiente distal à lesão favorável ao recrescimento axonal dos neurônios sobreviventes, e as CS promovem o ambiente permissivo à regeneração axonal (Chen et al., 2007). Eliminados os restos celulares pelas CS e macrófagos, inicia-se o processo de regeneração (Chen et al., 2007; Navarro, 2007). No local da lesão há formação do cone de crescimento e reestruturação da matriz extracelular (Martins et al., 2005). As CS se proliferam e se diferenciam alinhando-se dentro da lâmina basal formando as colunas de CS ou bandas de Büngner, as quais fornecem o suporte mecânico para os axônios em regeneração guiando-os em direção à célula alvo (Dahlin et al., 2004; Navarro, 2007; Campbell, 2008) (Figura 06). Nestas células ocorre *up-regulation* da expressão de moléculas adesivas e neurotrofinas, importantes para a fase de regeneração (Murray, 2005), estas substâncias tróficas fornecidas pelos órgãos-alvo atraem brotos colaterais e terminais do coto proximal (Siqueira, 2007).

Ao mesmo tempo, a remielinização envolve os novos axônios em uma relação um-para-um com as CS. Esta formação de bainha de mielina, agora é mais fina e com mais internodos em comparação com a bainha original. A última etapa da regeneração envolve a formação de contatos efetivos com os órgãos alvos, seja a formação da placa motora ou das terminações de receptores sensoriais (Murray, 2005).

Em experimentos com animais, tem-se demonstrado que há um crescimento axonal de 2,0 a 3,5 mm/dia em lesões do tipo neurotmeze e de 3,0 a 4,5 mm/dia nas do tipo axonotmeze.

Em humanos, a taxa de crescimento axonal não é linear, estima-se que a taxa de crescimento seja de aproximadamente 1 a 2 mm/dia (Lundborg, 1987).

Mesmo nos melhores resultados funcionais raramente a regeneração é completamente eficaz, podendo resultar em déficits residuais sutis como a perda da destreza ou distúrbios sensoriais, relatados com frequência pelos pacientes. Isso pode ser justificado por diversos motivos como alterações no número de conexões sinápticas no corpo celular, alterações na nova bainha de mielina, que, em geral, se apresenta mais fina e irregular, falhas na reinervação de parte das fibras motoras acometidas ou reinervação de músculos diferentes do previamente acometido, levando às chamadas sincinesias (Murray, 2005).

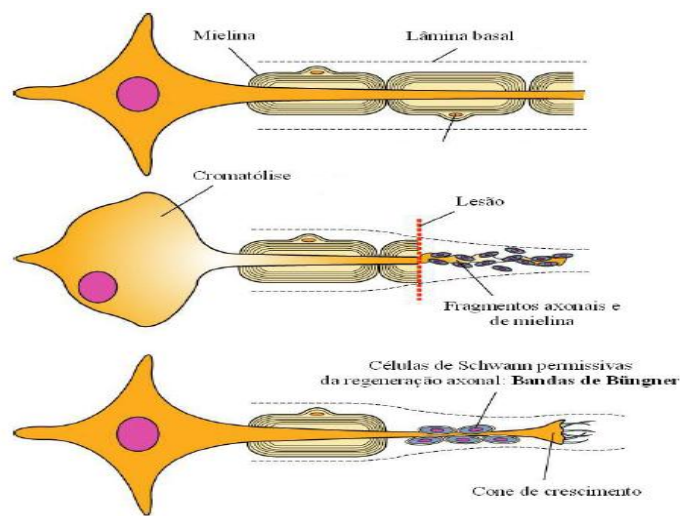


Figura 06: Processo de Degeneração Walleriana e regeneração no SNP. Fonte: Sacharuk, 2009.

2. JUSTIFICATIVA

Após lesão nervosa, são liberados citocinas inflamatórias, que resulta em estresse oxidativo juntamente com mediadores alogênicos induzem DN por meio da sensibilização dos receptores nociceptivos (Goecks, 2012; Pathak, 2013).

O tratamento paliativo atual da DN não possui eficácia farmacológica e/ou possuem efeitos colaterais intoleráveis. Assim, a necessidade de descobrir novos compostos que venham amenizar ou prevenir lesões neuronais que acometem indivíduos com DN, instiga a indústria farmacêutica a buscar na natureza, compostos para a manipulação de novas drogas.

Os produtos naturais são uma fonte inestimável de novas entidades químicas para o tratamento de várias doenças, incluindo distúrbios inflamatórios, que na medicina moderna ainda são desafios, visto a oferta dos medicamentos atualmente disponíveis, muitas vezes, não sendo eficazes (Dutra et al., 2016; Suroowan & Mahomoodally, 2018).

Nesse contexto, plantas medicinais e seus metabólitos secundários se destacam como uma opção interessante para a descoberta de novas moléculas bioativas, principalmente como uma alternativa para reduzir o processo inflamatório (De Cassia da Silveira & Sa et al., 2013) e neste cenário o Brasil é, reconhecidamente, uma fonte de riquezas naturais. Sua flora abriga espécies de caráter medicinal, fornecem diversidade estrutural única de novas entidades químicas que oferecem oportunidades para a descoberta de novos compostos de baixo peso molecular (Dias et al., 2012).

A *L. alba*, é um vegetal presente na fitoterapia popular por apresentar uma vasta diversidade de ações medicinais. Na literatura, encontramos confirmação da eficácia do óleo essencial extraído de suas folhas frente a vários distúrbios que acometem o sistema nervoso central e periférico. Porém, ainda não há estudos que envolvam a ação desse óleo sobre a neurodegeneração do nervo. Assim, torna-se importante analisar a ação do óleo essencial de *L. alba* sobre os parâmetros eletrofisiológicos do nervo ciático em ratos com CCNC na pata traseira.

A hipótese levantada com base nos dados da literatura é que ocorrem efeitos deletérios neuronais promovidos pela CCNC, que acarreta em aumento na excitabilidade neuronal, e deprimindo a amplitude do PAC do nervo ciático de roedores. Nos estudos feitos com o óleo essencial da *L. alba*, o que se sabe até o presente momento é que este age como agente antioxidante (Fabri et al., 2011) e isso nos leva a sugerir que o óleo essencial da *L. alba* também pode agir revertendo o processo neurodegenerativo causado pela CCNC, conseqüentemente diminuindo a excitabilidade neuronal e atenuando a degeneração da bainha de mielina.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais é uma propriedade biológica de grande interesse, pois podem desempenhar um papel importante em algumas doenças, como disfunção cerebral,

câncer, doenças cardíacas e declínio do sistema imunológico. Evidências crescentes sugerem que essas doenças podem resultar de danos celulares causados por radicais livres (Kamatou, 2010). Diante do exposto, fica demonstrada a relevância da proposta, que visa contribuir para a descoberta de um possível fármaco que possa atuar sobre o sistema nervoso periférico e amenizar as complicações produzidas pelo o processo de neurodegeneração. Assim, este estudo é de importância tanto do ponto de vista científico, tecnológico e financeiro como no ponto de vista social. Uma vez, que os resultados desse trabalho fortalece as bases científica e tecnológicas agregando valores econômicos, segurança e eficácia desta espécie de planta medicinal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito do tratamento com o óleo essencial da *Lippia alba* (OELa) sobre a neuropatia causada por Constrição Crônica do Nervo Ciático (CCNC) de ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e quantificar os componentes do OELa;
- Avaliar o efeito do tratamento OELa sobre a sensibilidade mecânica de ratos após CCNC;
- Avaliar o efeito do tratamento OELa sobre a sensibilidade térmica de ratos após CCNC;
- Avaliar o efeito do tratamento com OELa sobre a excitabilidade e condutibilidade das fibras do nervo ciático de ratos após CCNC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Exigências legais - aspectos éticos da pesquisa

Toda a proposta da pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN, credenciado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), pelos termos da Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde; com parecer nº 047.017/2017.

Procurou-se, durante todo o experimento, seguir as normas estabelecidas na Lei Arouca (11.794/2008), na qual dispõe que todo experimento que cause dor ou angústia ao animal deve ser desenvolvido sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas. Também se seguiu normas da *International Association for the study of Pain* (IASP) que estabelece que deva se utilizar o menor número possível de animais, que o modelo desenvolvido não leve a incapacitação definitiva, que não interfira nas suas atividades rotineiras e que se dêem condições a esses animais para que possam aliviar a dor (IASP, 1983).

4.2 Material

4.2.1 Óleo essencial da *Lippia alba*

O OELa foi fornecido pelo Prof. Dr. Sergio Horta e analisado para quantificação de seus constituintes por meio da técnica de cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massa, sob responsabilidade do Dr. Craveiro no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2.2 Animais

Para estudo do tratamento com o OELa, foram utilizados 30 *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, de ambos os sexos, adultos jovens com massa corpórea entre 200-250 gramas, provenientes do Biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará-UECE. Os animais foram mantidos em caixas plásticas, a temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclos claro/escuro de 12/12h, recebendo ração (Labina, Purina®) e água “*ad libitum*”.

A manipulação dos animais foi realizada seguindo os princípios éticos para a experimentação animal, relatados nos princípios éticos da experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

Após os experimentos, os animais foram submetidos à eutanásia por inalação de CO₂ e acondicionados em sacos plásticos sob-refrigeração a – 20°C; o recolhimento foi realizado por empresa especializada no descarte de material biológico.

4.2.3 Solução

O nervo ciático foi nutrido com solução de Locke modificada, contendo a seguinte composição (em mM): NaCl: 140; KCl: 5,6; MgCl₂: 1,2; CaCl₂: 2,2; Tris-Hidroximetil-Aminometano (TRIS): 10; Glicose: 10. O pH ajustado para 7,40 ± 0,01, utilizando NaOH ou HCl à temperatura ambiente.

Os sais utilizados no preparo da solução fisiológica são de grau de pureza analítica, obtidos das companhias Sigma Chemical Corporation (St. Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany) ou Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Br).

4.3 Métodos

4.3.1 Cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massa GC/MS

O OELa foi fornecido pelo Prof. Dr. Sergio Horta e analisado para quantificação de seus constituintes por meio da técnica de cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massa, sob responsabilidade do Dr. Craveiro no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A análise de GC/MS foi realizada em um cromatógrafo gás-líquido acoplado a espectrômetro de massa do fabricante Shimadzu, modelo GCMS-QP2010S que foi gentilmente concedido pelo PADETEC. No que refere ao cromatógrafo, a separação dos analitos voláteis foi feita com uma coluna capilar de fase estacionária RTX-5. Foi realizada a injeção de 1µL da amostra do OELa pelo método de injeção splitless a 250 °C no injetor e utilizou-se Hélio como gás de arraste, com fluxo total de 78,1 mL/min. Todas as especificações operacionais estão presentes na Tabela 01.

No referente às condições de injeção no espectrômetro de massa, trabalhou-se com uma temperatura de 260 °C na câmara de íons, na interface e no detector. O analisador utilizado é do tipo quadrupolar a uma voltagem de 70eV e com faixa de aquisição de 33 a 750 daltons. A identificação dos componentes foi baseada na comparação de seu espectro de massa EI com os contidos no banco de dados do equipamento (Willey 229).

| Parâmetro | Especificação | Observação |
|------------------|-----------------------------|---|
| Coluna Capilar | RTX-5 | 30M X0,25mm com filme de 0,1µm |
| Injeção | Splitless a 250° no injetor | Rampa de 2,5°C/min até atingir 150° e 25°C/min dos 150°C aos 250°C. Manteve-se por 25min a 250°C. |
| Gás de arraste | Hélio | Fluxo total de 78,1 mL/min e fluxo na coluna de 2,52 mL/min a uma velocidade linear de 58,2cm/s com fluxo de purga de 3,0 mL/min e razão de split de 30 |

Tabela 01: Especificações operacionais da análise do OELa por GC/MS.

4.3.2 Procedimento experimental

Para estudo do tratamento com OELa, os animais foram divididos em grupos experimentais conforme tabela 02 e seguindo o delineamento experimental descrito na tabela 03.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos: controle tratado com veículo (CON); controle tratado com OELa (CON+OELa); grupo submetido a Constricção Crônica do Nervo Ciático- CCNC tratado com veículo (CCNC); e grupo submetido a CCNC tratado com OELa (CCNC+OELa).

Os animais dos grupos CCNC e CCNC+OELa tiveram seu nervo ciático direito da pata traseira “amarrado” por ligadura frouxa, enquanto os animais dos grupos CON e CON+OELa foram pseudo-operados (grupo sham), ou seja, realizou-se o procedimento cirúrgico idêntico, exceto a ligadura do nervo ciático. Os animais do grupo CCNC+OELa e CON+OELa receberam por via oral (gavagem) 100 mg/kg do OELa diluído em Tween 1% v/v, diariamente as 10 horas a partir do dia da operação e durante 14 dias.

É importante ressaltar que o nervo esquerdo dos animais do grupo CCNC serviu de controle interno a fim de comparar a funcionalidade eletrofisiológica entre os nervos direito (submetido à CCNC) e esquerdo (não submetido à CCNC) nos animais deste grupo. Assim, o nervo esquerdo do grupo CCNC constituiu o grupo: NE CCNC (NE= Nervo esquerdo).

| Grupos | Tratamento | N |
|---|--|-----------|
| CON (controle veículo sham-operados) | Sem CCNC na pata traseira direita, tratados com água e o diluente do óleo Tween a 1% | 6 |
| CON+OELa (controle tratado com OELa sham-operados) | Sem CCNC na pata traseira direita, tratados com OELa (gavagem-100 mg/kg) | 8 |
| CCNC (tratado com solução veículo) | Com CCNC na pata traseira direita, tratados com água e o diluente do óleo Tween a 1% | 8 |
| CCNC+ OELa (tratado com OELa) | Com CCNC na pata traseira direita, tratados com OELa (gavagem-100 mg/kg) | 8 |
| Total | | 30 |

Tabela 02: Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo de animais (N).

| Dia 1 | Dias 1-14 | Dia 14 |
|---|--|---------------|
| Tratamento com OELa ou solução veículo e CCNC na pata traseira direita ou sham-operados | Tratamento com OELa ou solução veículo | Eutanásia |

Tabela 03: Delineamento experimental da pesquisa ao longo do tempo (em dias da esquerda para a direita).

4.3.3 Modelo de indução de neuropatia por Constrição Crônica do Nervo Ciático (CCNC)

No presente estudo, foi utilizado o modelo de constrição crônica do nervo ciático (CCNC) de Bennet e Xie (1988). A figura 07 mostra a ilustração esquemática do modelo de indução da neuropatia. Previamente os animais foram anestesiados com quetamina (75 mg/Kg) e xilasina (10 mg/Kg) após realizou-se a tricotomia e anti-sepsia do campo cirúrgico na pata traseira direita do rato. Com o animal em decúbito ventral, foi feita uma incisão horizontal de cerca de 3cm na pele que cobre a área entre os músculos glúteo e bíceps femoral da pata traseira (nível da metade da coxa). O bíceps femoral e o glúteo superficial foram separados por dissecação sem corte e o nervo ciático direito foi acessado e exposto. Próximo à bifurcação do nervo ciático ($\approx 0,5\text{cm}$), um segmento de cerca de 7 mm do nervo foi exposto e feita a liberação do tecido aderente e então atados quatro nós frouxos, com fio de nylon Procure 4-0 ao redor do nervo a uma distância de 1mm entre si. O máximo de cuidado nas ligaduras foi tomado, de modo que os nós foram apenas levemente atados ao redor do diâmetro do nervo (mal constritado). O nível de constrição desejado retarda, mas não prende a circulação através da vasculatura superficial epineural. Ocorreu uma pequena e breve contração da musculatura que circunda a exposição do nervo.

Após a realização da ligadura nervosa, a camada muscular e da pele foram imediatamente suturada com fio e um antibiótico tópico aplicado de uma só vez. Em controles pseudo-operados

(grupo sham), realizou-se o procedimento cirúrgico idêntico, exceto a ligadura do nervo ciático. Os animais submetidos à cirurgia foram colocados individualmente em gaiolas de propropileno e administrado na água de beber ibuprofeno na dose de 0,2 mg/ml VO no período noturno por 3 dias.

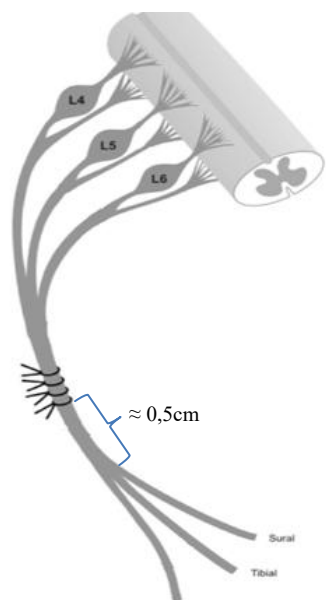


Figura 07: Ilustração esquemática do modelo experimental de neuropatia com base na lesão de estruturas periféricas do nervo ciático. Fonte: Klusakova adaptada (2009).

4.3.4 Avaliação da sensibilidade mecânica: Teste de von Frey

A hiperalgesia mecânica foi avaliada no modelo CCNC por meio de analgesímetro digital (Insight®, Brasil) de acordo com a metodologia descrita por Martinov et al. (2013).

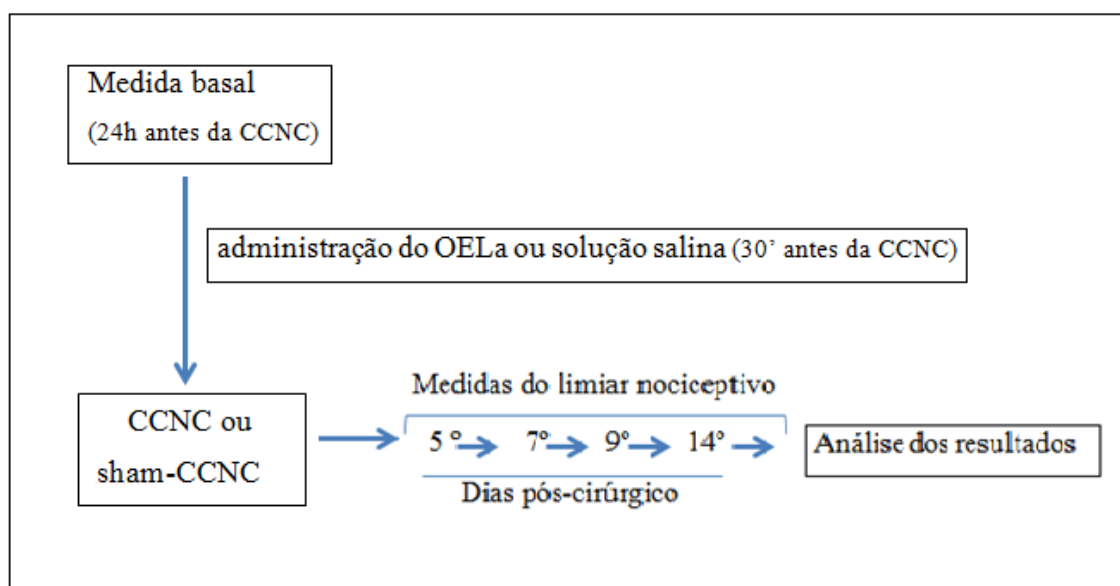
O uso de filamentos de von Frey é um método utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, sendo bastante utilizado clinicamente. Este método passou a ser utilizado também em experimentos laboratoriais, no sentido de avaliar a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva em animais.

Brevemente, em uma sala silenciosa os foram selecionados aleatoriamente 5 animais de cada grupo experimental, e nestes foi quantificado o limiar de retirada da pata, quando aplicado uma pressão crescente contínua na pata direita traseira do animal. Essa medida foi obtida 24 horas antes da indução da CCNC e da administração do OELa (ou solução salina), sendo nomeada de medida basal ou avaliação do dia 0. Após indução da CCNC e da administração do OELa ou solução salina, as medidas foram realizadas nos dias: 5º, 7º, 9º e 14º, sendo este último o dia da eutanásia do animal. O delineamento experimental seguido está mostrado no quadro 02.

Os animais foram alocados em caixas de acrílico durante 30 minutos para adaptação. O assoalho da caixa é feito de arame não maleável na forma de rede. Em seguida, foi aplicado um

estímulo mecânico não nocivo, por meio do uso de um anestesiomêtro digital modelo von Frey (Insight Instrumentos, Ribeirão Preto, Brasil), que consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a pata é realizado através de uma ponta descartável de polipropileno. As alterações nos limiares nociceptivos, foram avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal até a produção de uma resposta caracterizada como sacudida (flinches) da pata estimulada. Os limiares nociceptivos referem-se ao limiar nociceptivo de resposta da retirada da pata que foi aplicado o estímulo mecânico.

Os estímulos mecânicos de pressão sob a pata direita do rato foram repetidos três vezes, em geral até o animal apresentar três medidas similares do estímulo de pressão aplicado, com uma clara resposta de flinch após a retirada da pata, sendo a média destes 3 valores considerado como o limiar de retirada propriamente dito.



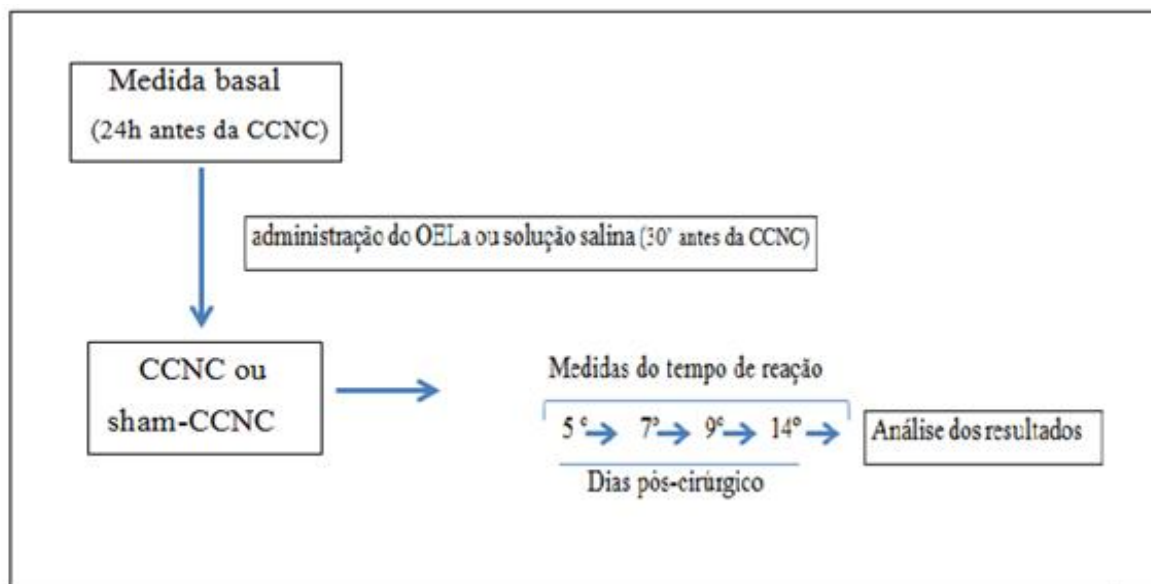
Quadro 02: Delineamento experimental do teste de von Frey.

4.3.5 Avaliação da sensibilidade térmica: Placa quente

A hiperalgesia térmica foi avaliada no modelo CCNC utilizando a placa quente (Insight®, Brasil) de acordo com a metodologia utilizada por Jacob e Ramabadran (1978).

Conforme o delineamento mostrado no quadro 03, os animais foram pré-selecionados pela passagem individual na placa quente mantida a $60 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Aqueles animais que mostraram tempo de reação (lamber as patas traseiras ou saltar) superior a 30 segundos foram descartados.

O tempo de reação dos animais foi avaliado antes da administração do OELa (100 mg/Kg) ou veículo (solução aquosa a 1% de tween) e nos dias 5, 7, 9 e 14 após a cirurgia de lesão de nervo. A nocicepção foi avaliada por meio da quantificação do tempo que o animal permaneceu na placa sem saltar ou lamber as patas traseiras.



Quadro 03: Delineamento experimental do teste da placa quente

4.3.6 Eutanásia dos animais

No 14º dia de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia por inalação de CO₂, mantendo o fluxo por pelo menos 1 minuto após a parada respiratória. Em seguida foi realizada a dissecação do nervo ciático de ambos os lados para registro extracelular do PAC.

4.3.7 Montagem do sistema extracelular de registro do PAC

O nervo ciático foi dissecado de sua origem e inserção e imediatamente acondicionado em solução de Locke durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o nervo foi posicionado horizontalmente sobre os eletrodos de uma câmara de registro preenchida com 8 ml de solução de Locke. Deixando uma alça de aproximadamente 20 milímetros do nervo submerso na solução a fim de que, por capilaridade, a solução fosse administrada ao tecido. A câmara foi mantida hermeticamente fechada para evitar a desidratação da preparação.

A extremidade proximal do nervo foi eletricamente estimulada com pulsos de onda quadrada (40 V de amplitude, 100µs de duração e 0,2 Hz de frequência), por pares de eletrodos acoplados a um estimulador (Grass S48; Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA) ligado por sua vez a uma unidade de isolamento de estímulo (SIU 4678; Grass Instrument Co.).

O PAC evocado foi coletado por eletrodos de registro na outra extremidade do nervo. O sinal foi aumentado em 1000X por um amplificador e visualizado em osciloscópio (TDS 340A; Tektronix, Inc., Portland, OR, USA). Uma placa de interface análogo-digital (A/D) (Digidata 1322 A; Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) transformou o sinal para tornar possível a sua leitura e armazenamento em um computador por meio do software Axoclamp (AxonScope, da Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA). Um esquema contendo as conexões entre os equipamentos elétricos (set up) utilizados para o registro do PAC está demonstrado na figura 08.

O nervo direito passou por um período de estabilização de 120 minutos, tempo geralmente superior ao necessário para que ocorra e se comprove a ausência de alterações na amplitude pico-a-pico do PAC. Em seguida foi coletado registros do PAC para posterior análise, logo após foi medido a reobase e a cronaxia do PAC. Os dados de registro extracelular foram analisados utilizando o software Clampfit versão 10.7 (Axon Instruments Inc.).

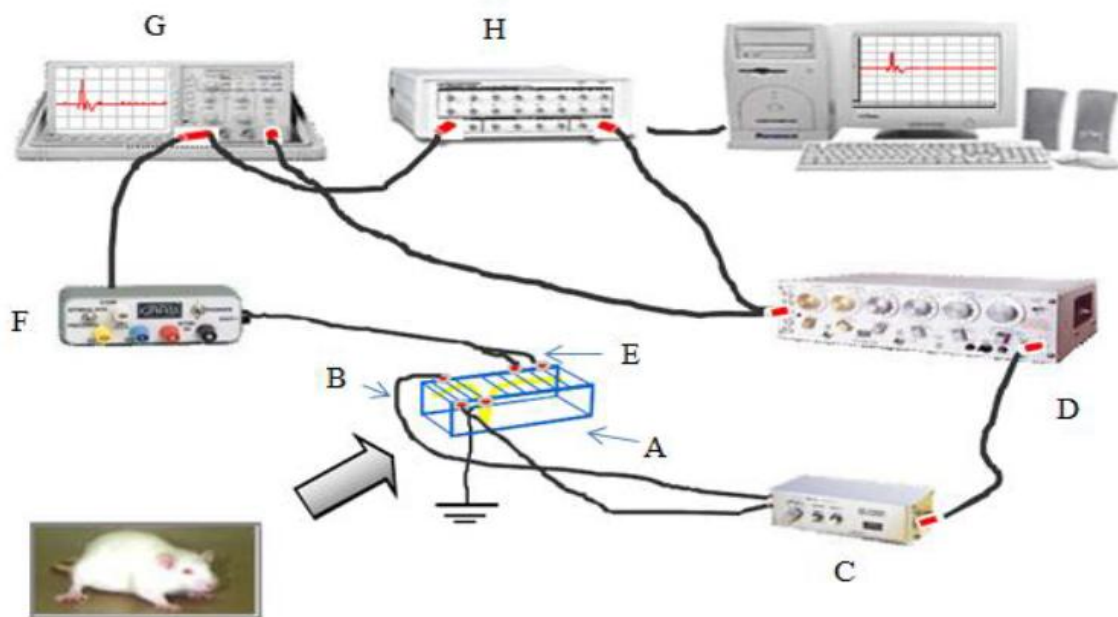


Figura 08: Esquema ilustrativo do “set up” para registro extracelular do PAC. A- câmara de Harvard; B- eletrodos de estímulo; C- unidade isoladora de estímulo; D- estimulador; E- eletrodos de registro; F- amplificador; G- osciloscópio; H- placa de interface análogo-digital. Fonte: adaptado de Alves, 2009.

4.3.8 Análise Eletrofisiológica

O PAC é registrado em tronco nervoso, englobando diversas fibras com diâmetros, profundidade, limiar de excitabilidade e fisiologia diferentes. Esse registro representa o somatório do potencial de ação individual das fibras que disparam de forma quase simultânea.

Ao aplicar-se um estímulo maximal ao nervo é verificado o surgimento de ondas, aqui denominadas componentes (figura 09). A formação destas componentes se dá pelo fato das diferenças anatomofisiológicas das fibras que compõem o nervo, fazendo com que os potenciais de ação atinjam os eletrodos de registro em tempos distintos. A maior amplitude verificada no registro do PAC é resultado da contribuição das fibras mais espessas, que constituem a geração das maiores componentes do PAC.

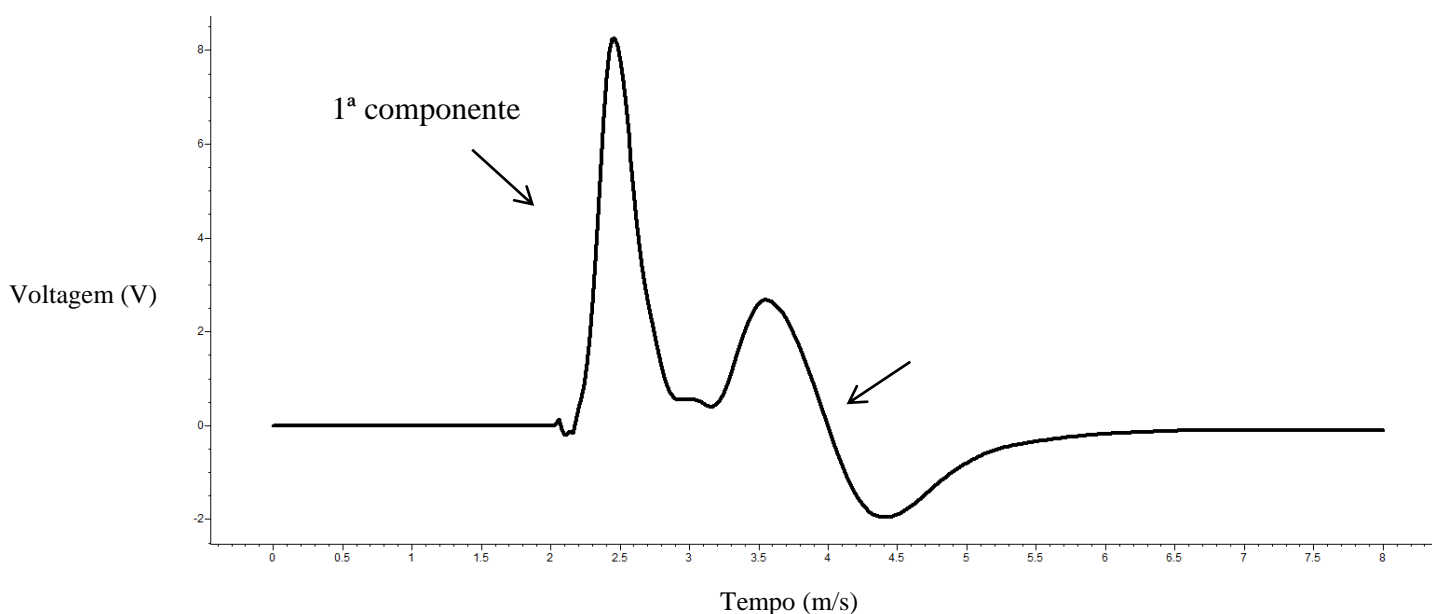


Figura 09: Traçado ilustrativo do PAC.

Considerando o registro extracelular do PAC, analisamos o efeito do OELa sobre a excitabilidade nervosa, obtida através da avaliação da reobase e cronaxia, e sobre as alterações da condutibilidade nervosa, avaliada através das mudanças observadas na amplitude pico-a-pico, amplitude positiva, velocidade de condução e duração das componentes do PAC evocado.

4.3.8.1 Reobase

A reobase é definida como a voltagem limiar do estímulo capaz de gerar uma resposta ativa com uma longa duração do pulso (1000 μ s). Foi obtida aumentando-se a amplitude (voltagem) do pulso de onda quadrada até obterem-se os primeiros sinais da geração de uma resposta do tronco nervoso.

4.3.8.2 Cronaxia

A cronaxia corresponde a menor duração do estímulo, com voltagem igual ao dobro do valor da reobase, capaz de desencadear uma resposta do tronco nervoso. Ou seja, a cronaxia

indica a duração limiar para uma resposta ativa quando se utiliza um pulso de voltagem igual ao dobro da reobase.

4.3.8.3 Amplitude Pico-a-Pico (APP) e amplitude positiva das componentes do PAC

A APP foi estabelecida através da soma da maior amplitude positiva com o módulo da maior amplitude negativa no registro do PAC. A amplitude positiva foi estabelecida através da amplitude máxima positiva de cada componente (Figura 10).

4.3.8.4 Velocidade de condução das componentes do PAC

Para medir a velocidade de condução nervosa foi utilizada a distância percorrida pelo PAC, a partir do eletrodo de estímulo mais próximo ao ponto de imersão do nervo na preparação, até o termino de seu percurso, no último eletrodo de registro. Foi calculada dividindo a distância percorrida pelo PAC pelo intervalo de tempo compreendido entre o artefato de estímulo, verificado no gráfico de registro, e o pico de cada componente, conforme mostrado na figura 10. Esta foi utilizada para classificar os tipos de fibras nervosas presentes nas componentes do PAC.

4.3.8.5 Duração das componentes do PAC

A duração do PAC foi determinada como o intervalo de tempo entre os pontos em que o potencial de ação, no ramo ascendente e descendente, alcança 50% do valor de sua amplitude, como demonstrado na figura 10.

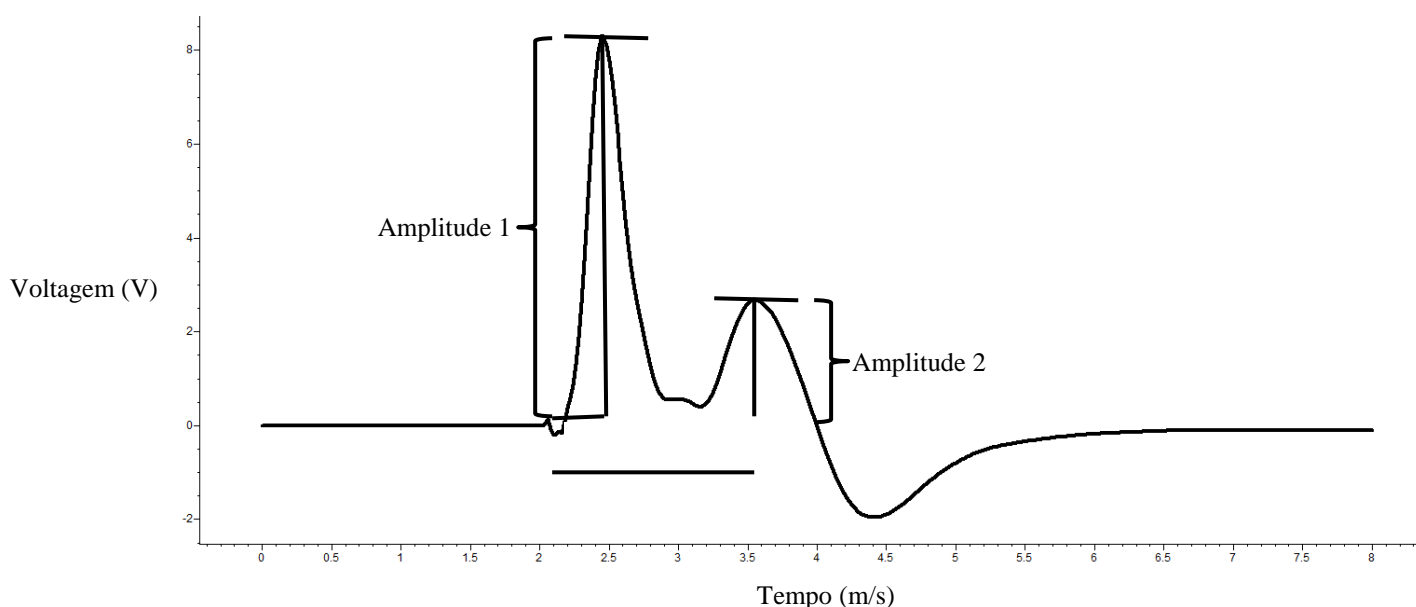


Figura 10 - Parâmetros mensurados no PAC. A medida da amplitude das componentes está representada respectivamente por amplitude 1 e amplitude 2; T 1 e T2= Tempo 1 e tempo 2, utilizados para o cálculo da velocidade de condução da primeira e segunda componente, respectivamente.

4.3.9 Tratamento Estatístico

As diferenças estatísticas entre os grupos foram analisados por Análise de Variância (ANOVA). Os dados eletrofisiológicos foram seguidos pelo teste de Student Newman Keuls e os dados comportamentais foram analisados por Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

Foram considerados estaticamente significativos os valores de $p < 0,05$. A análise estatística e os gráficos foram obtidos utilizando o software Prism for Windows (GraphPad Software). Todos os dados foram analisados por meio do software Clampift® versão 10.7 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Análise química do OELa

A análise química do OELa revelou a presença de 8 compostos. O componente principal foi o Geranial (42,59 %) e o isômero Neral (28,53 %). Os demais compostos estão compilados na tabela 04.

| Pico | Composto | Teor (%) |
|------|------------------|------------|
| 1 | Diacetona álcool | 2,87 |
| 2 | Sulcatona | 1,31 |
| 3 | Para-cimeno | 4,41 |
| 4 | Limoneno | 12,54 |
| 5 | Neral | 28,21 |
| 6 | Carvona | 6,50 |
| 7 | Geranial | 42,59 |
| 8 | Beta-Elemeno | 1,57 |
| | | Total: 100 |

Tabela 04: Composição química (%) do óleo essencial de *Lippia alba* (OELa)

5.2 Avaliação da sensibilidade mecânica e térmica em ratos.

A sensibilidade mecânica e térmica dos animais foram avaliadas por meio dos testes de von Frey eletrônico e da placa quente, respectivamente. Os testes foram realizados antes da indução da CCNC, no dia 0, e nos dias 5, 7, 9 e 14 após a CCNC. Todos os valores absolutos mensurados para os diversos grupos estão compilados nas tabelas 04 e 05 em apêndice. É importante ressaltar que não houve diferença estatística dos valores mensurados entre os grupos experimentais no dia 0 da avaliação ($p > 0,05$, Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

A CCNC resultou em desenvolvimento significativo de hiperalgesia mecânica, enquanto o tratamento com o OELa foi capaz de reverter essa alteração, conforme pode ser observado na Figura 11. Ao longo dos 14 dias, foi observado para os animais do grupo CCNC, um comportamento de hiperalgesia mecânica. No 5º dia após CCNC, houve um aumento da força aplicada de 72,4 %, aumentando assim o limiar de retirada da pata no 5º dia após CCNC. Entretanto, nos dias 7, 9 e 14, houve aumento significativo da reação ao estímulo com uma menor força aplicada, reduzindo em 54,65%, 59,34% e 58,8% nos dias 7, 9 e 14, respectivamente, em relação ao grupo CON.

A incisão cirúrgica não alterou o limiar de retirada da pata contralateral dos animais operados não tratados com OELa (dados não mostrados). No grupo CCNC+OELa, também observou-se um aumento inicial do limiar ao estímulo mecânico, entretanto com o pico ocorrendo no 7º dia, seguido de uma redução sustentada desses valores. Os valores percentuais obtidos foram 116,79%, 145,4%, 54,56% e 62% nos dias de avaliação 5, 7, 9 e 14, respectivamente, em relação ao CON. A curva do grupo CCNC+OELa foi diferente estatisticamente da curva do grupo CON e do grupo CCNC.

No grupo Con+OELa o curso temporal de retirada de pata mediante a força aplicada aumentou significativamente em 141,2% a partir do 5º de avaliação, com um pico de 260,06% ocorrendo no 7º dia de avaliação. Seguido esse pico, como observado também nos outros grupos experimentais, esses valores reduziram para 83% e 90,6% nos dias 9 e 14 em relação ao grupo CON. As médias dos grupos experimentais estão apresentadas na tabela 05 em anexo.

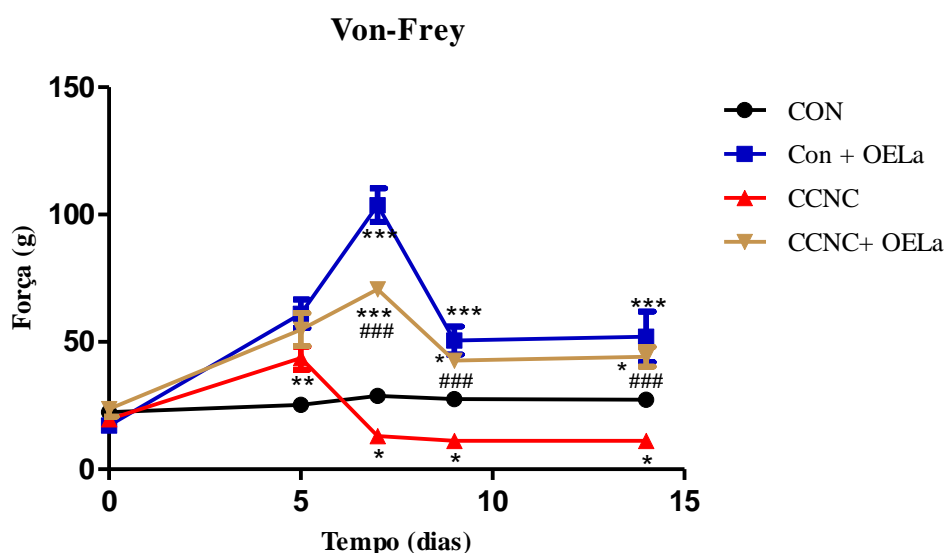


Figura 11: Curso temporal da resposta de retirada de pata a força aplicada na avaliação da neuropatia induzida pela CCNC. Os valores basais foram obtidos no dia anterior à cirurgia de CCNC. Cada grupo representa a média de 5 animais. * difere significativamente do grupo CON; # difere significativamente do grupo CCNC. *P<0,05; **P<0,01 e ***P <0,001; ###P<0,001.

Em relação à sensibilidade térmica dos animais, não houve diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 12). No entanto, houve aumento de 56,25% na latência de tempo de reação ao estímulo nos animais do grupo CON+OELa quando comparado ao CON no 7º dia de avaliação. As médias dos grupos experimentais estão apresentadas na tabela 06 em anexo.

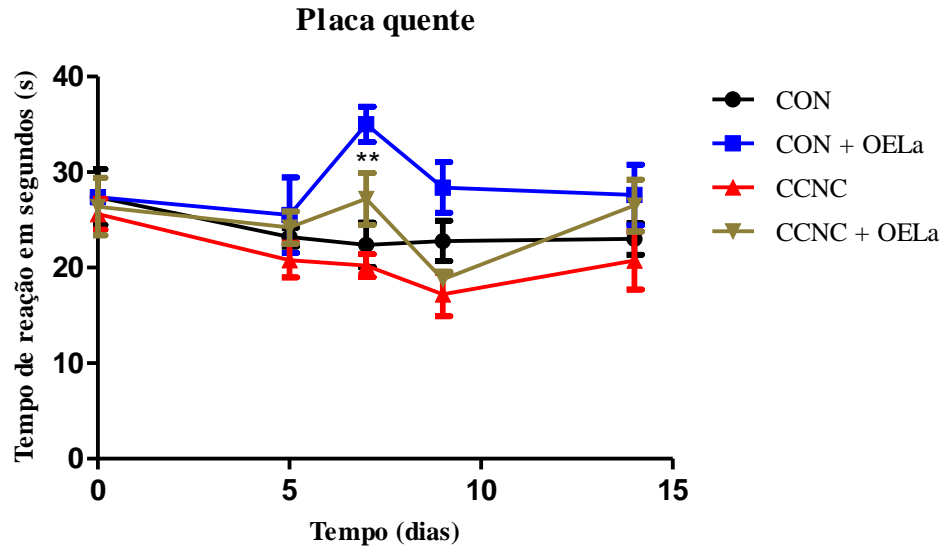


Figura 12: Curva tempo resposta para o efeito antinociceptivo após tratamento por via oral com OELa na hiperlagesia térmica induzida pela CCNC. Os valores basais foram obtidos no dia anterior à cirurgia de CCNC. Cada grupo representa a média de 5 animais. ** difere significativamente do grupo CON; **P<0,01.

5.3 Efeito do OELa sobre funcionamento elétrico (*in vitro*) do nervo ciático

A forma do PAC nos experimentos controle apresentou duas ou três ondas, denominadas de componentes (figura 13). O terceiro componente esteve presente no começo do período de estabilização em aproximadamente 20% dos registros do grupo controle, porém, ao final desse período tornou-se indistinguível da linha de base.

Ao estimular nervos ciáticos a 0,2 Hz, os valores médios dos parâmetros analisados do grupo controle foram: $13,85 \pm 0,11$ mV para APP, reobase e cronáxia foram de $3,56 \pm 0,23$ V e $49,50 \pm 0,34$ μ s, respectivamente. Para amplitude positiva da 1ª e 2ª componente, foram: $8,391 \pm 0,27$ e $2,534 \pm 0,22$ mV, respectivamente. A velocidade das componentes do PAC foram de $125,7 \pm 13,97$ m/s para o 1ª componente e $44,27 \pm 3,451$ m/s para a 2ª componente. E para a duração do PAC foram de $0,2301 \pm 0,014$ e $0,3614 \pm 0,034$ ms, respectivamente para 1ª componente e 2ª componente do PAC.

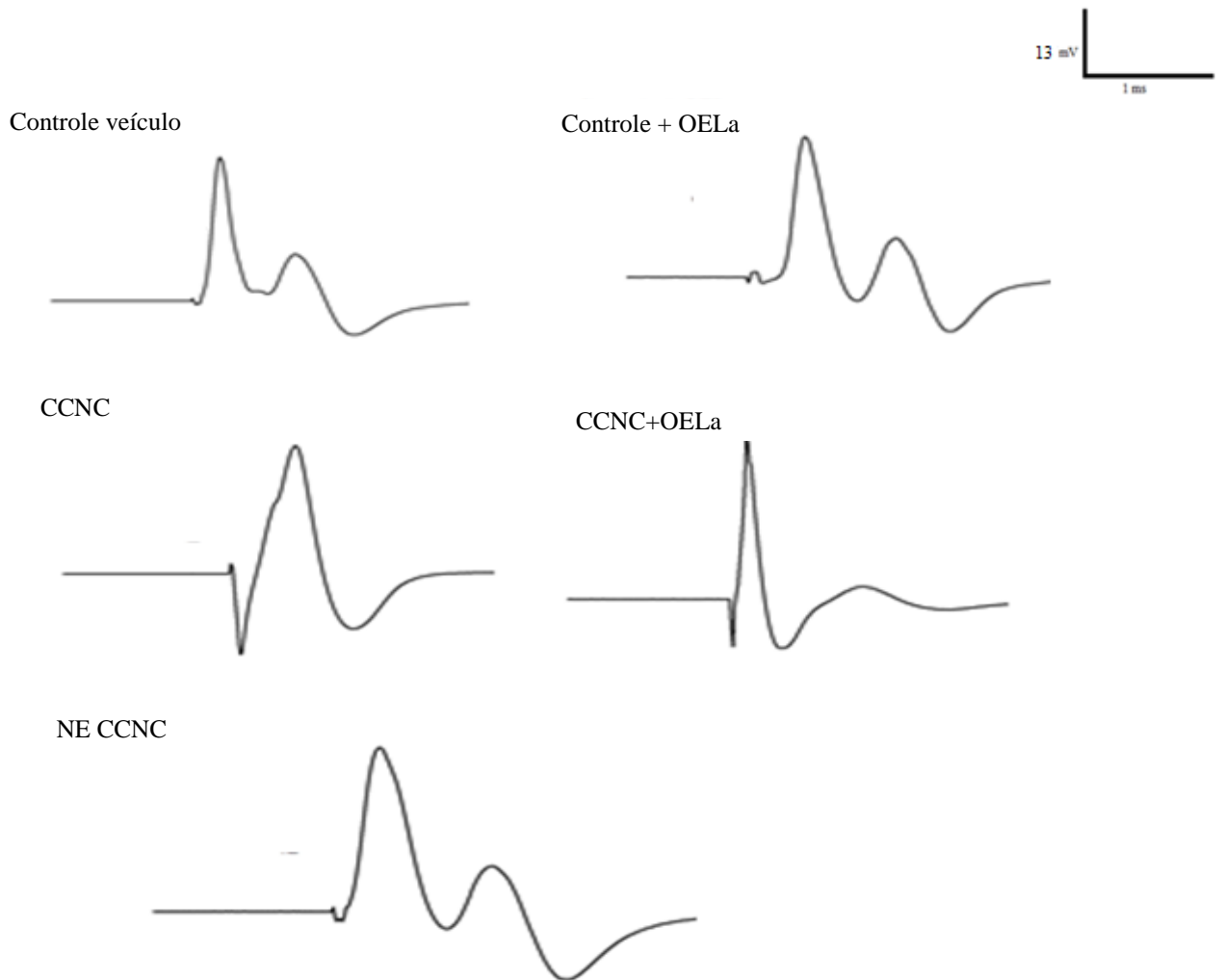


Figura 13: Traçados representativos do PAC. Legenda: CON= Controle veículo; CON+OELa= Controle tratado com OELa; CCNC= Constrição Crônica do Nervo Ciático tratado com solução veículo; CCNC + OELa= Constrição Crônica do Nervo Ciático tratado com OELa; NE CCNC= Nervo Esquerdo do grupo CCNC.

Nos animais submetidos à cirurgia de CCNC, o grupo CCNC, evidenciou-se uma tendência de maior comprometimento das fibras nervosas que compõem a segunda componente do PAC e efeito depressor de todos os parâmetros eletrofisiológicos avaliados, exceto duração do PAC.

Na análise da reobase (Painel A, Figura 14), obteve-se redução de 27,53% no grupo CCNC (média de $2,58 \pm 0,14V$; $n=6$) em relação ao CON. Enquanto, o valor da cronaxia (Painel B, Figura 14) aumentou 54,89% (média de $76,67 \pm 7,45\mu s$; $n=8$). No grupo CCNC + OELa, houve aumento da reobase em 39,5%, mostrando valores de média de $3,60 \pm 0,05V$, $n=7$ em relação ao grupo CCNC. A cronaxia neste grupo não alterou em relação ao CON, apresentando média: $59,71 \pm 1,12\mu s$; $n=7$. A reobase no grupo CON +OELa (média de $4,14 \pm 0,18 V$; $n=7$) apresentou diferença de 16,5% em relação ao CON. A reobase do NE CCNC (média de $3,15 \pm 0,25 V$; $n=7$) não diferiu do CON. A cronaxia para os grupos CON+OELa e NE CCNC não diferiu do CON, apresentando médias: $68,50 \pm 2,70 \mu s$; $n=7$; $65,20 \pm 5,70 \mu s$; $n=6$, respectivamente.

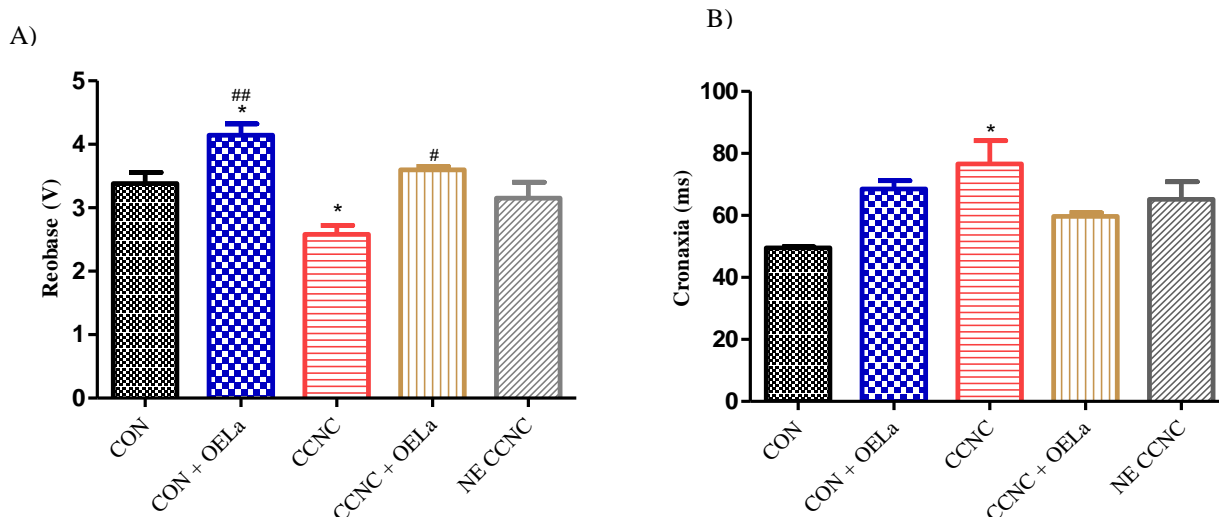


Figura 14: Painel A e B. Painel (A): Reobase do PAC, Média \pm EPM: CON= 3,56 \pm 0,23, n=6; CON+OELa= 4,14 \pm 0,18; n=7; CCNC = 2,58 \pm 0,14, n=6; CCNC + OELa= 3,60 \pm 0,05, n=6; NE = 2,97 \pm 0,20, n=7. *P <0,05 em relação ao CON; e #P<0,05; ##P<0,01em relação ao grupo CCNC. Painel B: Cronaxia do PAC, Média \pm EPM: CON= 49,50 \pm 0,34, n= 6; CON+OELa= 68,50 \pm 2,7; n=6; CCNC = 76,67 \pm 7,45, n=8; CCNC + OELa= 59,71 \pm 1,12, n=7; NE = 65,20 \pm 5,7, n=6. *P <0,05 em relação ao CON.

A APP no grupo CCNC foi reduzida em 51,62% em relação ao CON. Apresentando a média de 6,69 \pm 0,89 mV (n=7). Quando a CCNC foi associada ao tratamento com OELa a redução da APP foi de 73%, apresentando média de 3,734 \pm 0,31mV (n=7).

Em relação ao grupo CON+OELa também mostrou redução deste parâmetro em 54,8% (média de 6,25 \pm 1,25mV; n=8) comparado ao CON. O grupo NE CCNC não diferiu do CON. Apresentando média de 13,34 \pm 1,87mV(n=7), quando em relação ao grupo CCNC a diferença foi de 99%. Conforme apresentado na figura 15.

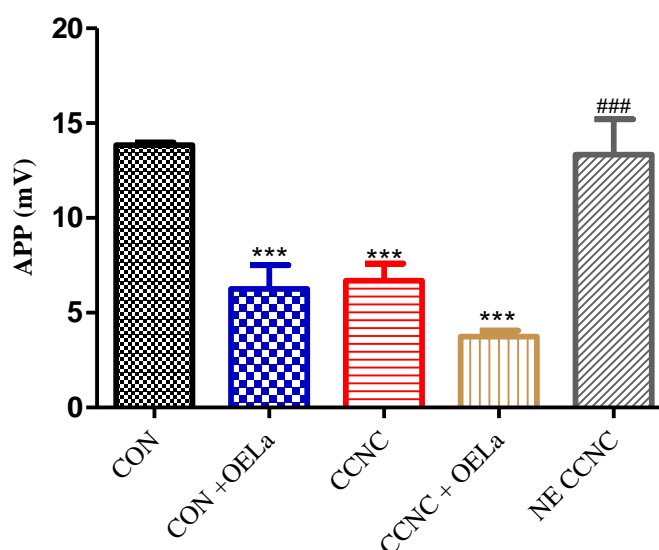


Figura 15: Amplitude Pico a Pico do PAC. Média \pm EPM: CON= 13,85 \pm 0,11 mV (n= 6); CON+OELa= 6,25 \pm 1,25; n=8; CCNC = 6,69 \pm 0,8991 (n=7); CCNC + OELa= 3,734 \pm 0,31, n=7; NE = 13,34 \pm 1,87 (n=7). ***P <0,001 em relação ao CON; e ###P<0,001em relação ao grupo CCNC.

A amplitude das componentes do PAC (figura 16), foi estabelecida através da amplitude máxima positiva de cada componente. A amplitude positiva da primeira componente no grupo CCNC foi reduzida para $3,982 \pm 0,61\text{mV}$; $n=8$ (52,53%), comparado ao CON. Quando associada ao tratamento com OELa (CCNC+ OELa), a redução foi para $2,132 \pm 0,22 \text{ mV}$; $n=7$ (74,59%). O grupo CON+OELa também mostrou redução deste parâmetro $3,6 \pm 0,51 \text{ mV}$, $n=8$ (57,09%) em relação ao CON. A diferença estatística do grupo CCNC + OELa em relação ao CON+OELa foi de 40,8%.

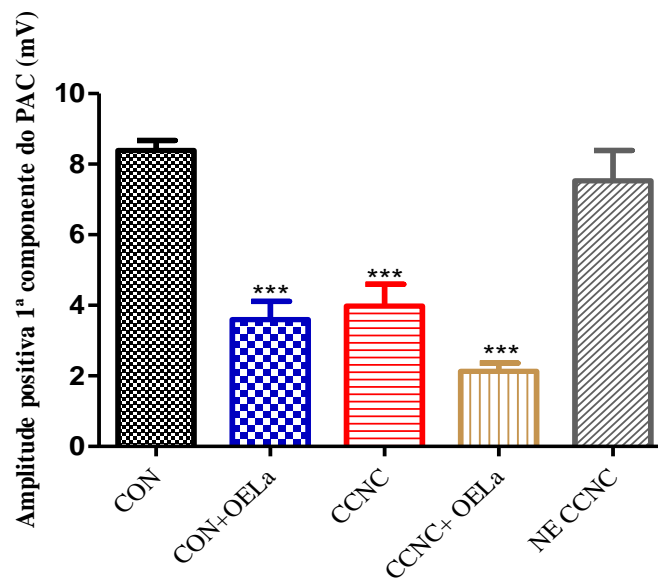


Figura 16: Amplitude positiva da 1ª componente do PAC. Média ± EPM: CON= $8,39 \pm 0,27 \text{ mV}$, $n= 5$; CON+OELa= $3,59 \pm 0,51$; $n=8$; CCNC = $3,98 \pm 0,61$, $n=8$; CCNC + OELa= $2,13 \pm 0,22$, $n=7$; NE = $7,53 \pm 0,85$, $n=8$. *** $P < 0,001$ em relação ao CON.

Quanto a segunda componente do PAC (Figura 17), não se obteve registro desta no grupo CCNC. Entretanto, esta foi preservada quando CCNC foi associado ao tratamento com OELa (CCNC+OELa) em 62,5% dos animais que compuseram este grupo, apresentando média de $0,3 \pm 0,03 \text{ mV}$, $n=6$ e 88,14% de diferença significativa em relação ao CON. O grupo CON+OELa também diminui a amplitude em 34,78%, com média de $1,65 \pm 0,14\text{mV}$, $n=8$, em relação ao CON. O grupo CCNC+OELa apresentou diferença significativa de 82% em relação ao grupo CON+OELa. O grupo NE CCNC não mostrou alteração ($2,24 \pm 0,10 \text{ mV}$, $n=6$) comparado ao CON.

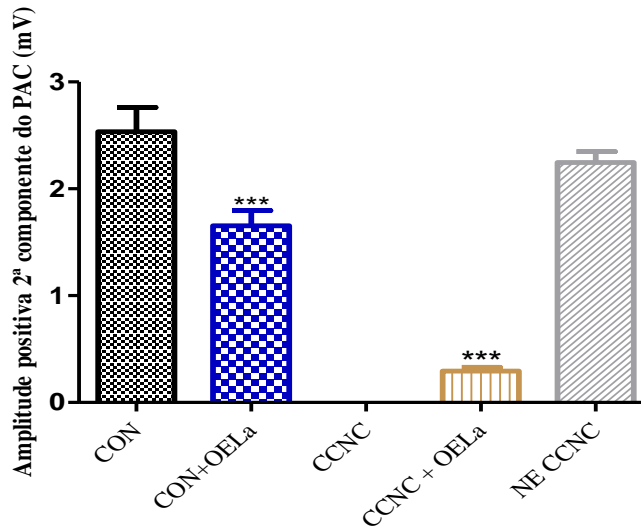


Figura 17: Amplitude positiva da 2ª componente do PAC. Média ± EPM: CON= 2,534 ± 0,22 mV, n= 5; CON+OELa= 1,653 ± 0,14; n=8; CCNC = - n=8; CCNC + OELa= 0,3 ± 0,03, n=6; NE = 2,24 ± 0,10 n=8. ***P <0,001 em relação ao CON.

O grupo CCNC mostrou redução da velocidade de condução da primeira componente do PAC para 69,47±9,65 m/s; n=6, representando redução de 44,73 % em relação ao CON. O tratamento com OELa (CCNC + OELa) reverteu esta diminuição em 102,96%, comparado ao grupo CCNC. Os demais grupos experimentais não mostraram diferença estatística entre si e CON. Apresentando as seguintes médias: CON + OELa: 92,36 ± 5,28 m/s, n=7; NE CCNC: 112,1 ± 14,45 m/s, n=6. Conforme mostrado na figura 18.

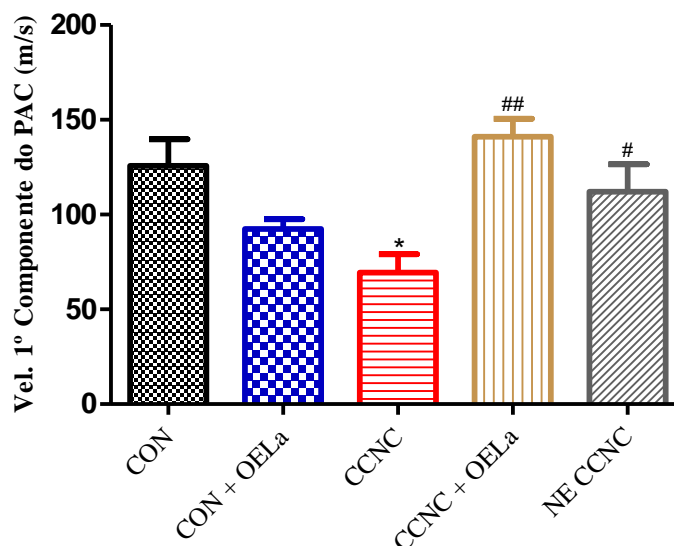


Figura 18: Velocidade de Condução da 1ª componente do PAC. Média ± EPM: CON= 125,7 ± 13,97, n=5; CON+OELa= 92,36 ± 5,281; n=7; CCNC = 69,47 ± 9,659, n=6; CCNC + OELa= 141,0 ± 9,64, n=7; NE = 112,1 ± 14,45, n=6. *P <0,05 em relação ao CON; e #P <0,05; ##P <0,01 em relação ao grupo CCNC.

Quanto a segunda componente do PAC (Figura 19), como já mencionado não foi evidenciado registro no grupo CCNC. Para o grupo com lesão neuronal e tratado com OELa (CCNC+OELa) com média de $37,27 \pm 1,80$ m/s; n=6, a velocidade de condução não diferiu em comparação ao CON. O grupo CON+OELa, também não demonstrou alteração significativa em relação ao CON, apresentando média de $36,38 \pm 2,98$ m/s, n=6.

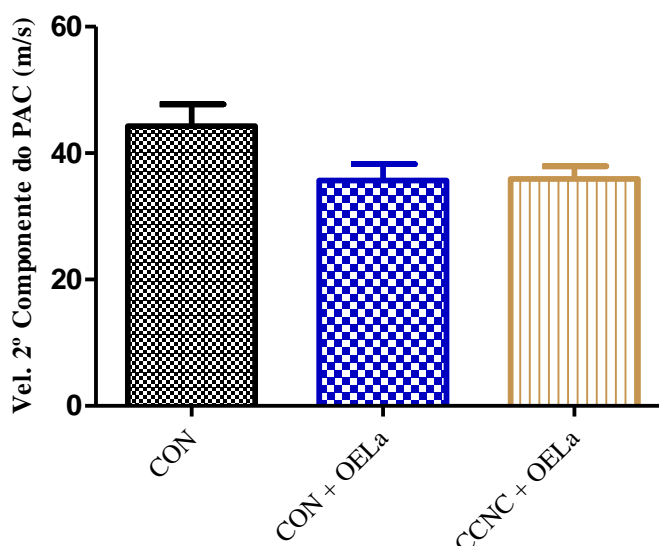


Figura 19: Velocidade de Condução da 2ª componente do PAC. Média \pm EPM: CON= $44,27 \pm 3,45$, n=6; CON+OELa= $36,38 \pm 2,9$, n=6; CCNC = n=6; CCNC + OELa= $37,27 \pm 1,8$, n=6.

A duração do primeiro componente do PAC, mostrada na figura 20, sofreu elevação de 45,21% em relação ao CON no grupo submetido à CCNC, apresentando média de $0,334 \pm 0,04$ ms, n=7. Os demais grupos não apresentaram diferença significativa em relação ao CON. A elevação da duração no grupo CCNC em comparação aos demais grupos experimentais foi de 64,69%, 58,44%, 37,33%, respectivamente para CON + OELa ($0,2028 \pm 0,013$ ms, n=7); CCNC+ OELa ($0,2108 \pm 0,03674$ ms, n=6) e NE CCNC ($0,2432 \pm 0,01$ ms, n=7).

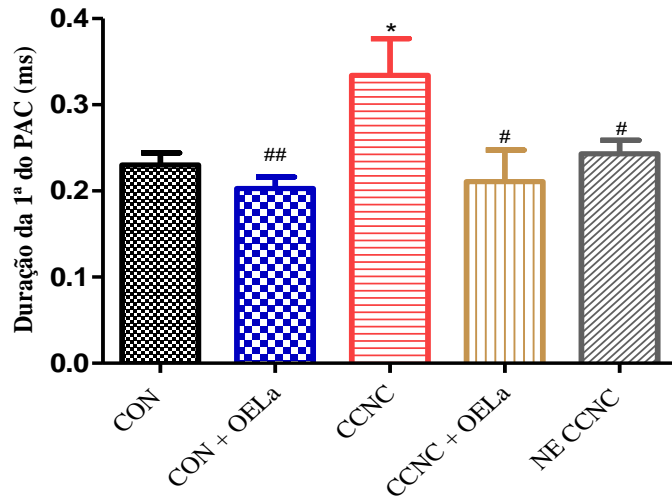


Figura 20: Duração da 1ª componente do PAC. Média ± EPM: CON= 0,23 ± 0,014, n=5; CON+OELa= 0,2028 ± 0,013, n=7; CCNC = 0,3340 ± 0,04, n=7; CCNC + OELa= 0,2108 ± 0,03674, n=6; NE CCNC= 0,2432 ± 0,01, n=7. *P <0,05 em relação ao CON; e #P <0,05; ##P<0,01 em relação ao grupo CCNC.

A segunda componente do PAC (figura 21), não foi obtida no grupo CCNC. Nos demais grupos experimentais não se obtiveram diferença estatística. Apresentaram as seguintes médias: CON+OELa (0,3434 ± 0,03 ms, n=8) , CCNC+OELa (0,3126 ± 0,03 ms, n=6), NE CCNC (0,417 ± 0,035 ms, n=7).

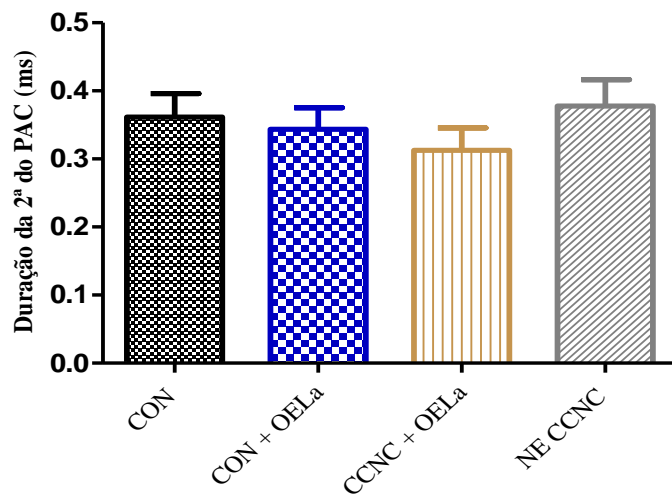


Figura 21: Duração da 2ª componente do PAC. Média ± EPM: CON= 0,3614 ± 0,034, n=5; CON+OELa= 0,3434 ± 0,031, n=8; CCNC = - n=7; CCNC + OELa= 0,3126 ± 0,033 n=6; NE CCNC= 0,417 ± 0,035, n=7.

6. DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o tratamento com OELa nos animais submetidos a CCNC, diminuiu a hipersensibilidade da neuropatia periférica e também evidenciou um potencial efeito neuroprotetor ao preservar fibras que constituem o PAC. Tais constatações resultaram de medidas de sensibilidade mecânica e térmica (*in vivo*), bem como de medidas de funcionamento elétrico (*in vitro*) das fibras do nervo ciático de ratos.

A análise fitoquímica do OELa utilizado nesse estudo identificou uma variação quantitativa de substâncias, cujo composto majoritário foi o citral (geranial com 42,59% e neral com 28,21%), seguido pelo limoneno com 12,54%. Isso indica que a planta utilizada nesse estudo pertence ao quimiotipo “citral”, composto pelos monoterpenoides neral e geraniol. Estudos anteriores que relatam os mesmos componentes principais como majoritário, indicando, portanto, ser o mesmo quimiotipo, demonstraram que o OELa possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas e bactericidas (Espina et al., 2015; Stashenko et al., 2014). Adicionalmente, Sousa e colaboradores (2015) demonstraram que o OELa e seu principal constituinte, citral, bloqueiam a excitabilidade de nervos ciáticos de ratos.

Entretanto, esta espécie apresenta grande diversidade em seus compostos majoritários, gerando diferentes quimiotipos, tais como: carvona, germacreno D-limoneno, piperitona, γ -terpineno, linalol e, 1,8-cineol (Zoghbi et al., 1998; Senatore e Rigano, 2001; Atti-Serafini et al., 2002; Stashenko et al., 2004; Tavares et al., 2008). Os compostos majoritários do óleo essencial de *L. alba* mais citados na literatura científica são citral, linalol e carvona (Julião et al., 2003). Essa variedade de quimiotipos justifica as diferentes atividades farmacológicas do óleo essencial da *L. alba* (Matos, 1996) e está intimamente relacionada com o local e a estação da coleta, até mesmo o horário da coleta do material de extração do óleo pode diferir na composição (Retamar, 1994; Zoghbi et al., 1998).

A lesão do nervo periférico como resultado de doença ou dano é uma causa frequente de DN, que afeta fibras somatossensoriais levando ao processamento sensorial anormal (Colloca et al., 2017). Para estudar os mecanismos da DN, um grande número de modelos de lesão animal tem sido desenvolvido. O modelo de CCNC é amplamente empregado para indução de DN em animais experimentais devido à similaridade de DN em humanos. Neste modelo, o animal manifesta hipernocicepção e alodinia, em resposta a estímulos térmicos ou mecânicos, após 1 a 5 dias da indução da lesão, com respostas máximas ao final da segunda semana, se estendendo por 2 meses (Bennett e Xie, 1988). O modelo de CCNC produz ainda sensibilização central em resposta à liberação de vários mediadores inflamatórios, que aumentam a sensibilidade dos aferentes sensoriais periféricos no local da lesão e no SNC (Zimmermann, 2001). A interrupção

de uma continuidade nervosa periférica aciona uma sequência complexa de eventos químicos, elétricos e morfológicos referidos como "Degeneração Walleriana" DW (Waller, 1850).

Após lesão neuronal, ocorre o processo de neuroinflamação mediado pelas células do sistema imunológico que liberam mediadores da inflamação, tais como citocinas e quimiocinas. A migração inicial de células, especialmente de neutrófilos e macrófagos, é uma etapa fundamental que promove a sensibilização periférica e contribui para a atividade neuronal anormal (Scholz e Woolf, 2007), desencadeando hipersensibilidade da DN (Perkins e Tracey, 2000).

De acordo com os resultados aqui apresentados, a CCNC alterou o limiar nociceptivo da sensibilidade mecânica, acarretando hiperalgesia mecânica, após 5 dias da lesão e se manteve até o 14º dia do pós-operatório. No entanto, associando a CCNC com uma dose diária de 100 mg/kg do OELa durante 14 dias, demonstrou redução duradoura da alodínia mecânica, com pico de efeito após sete dias da lesão. Esse período de atividade máxima do efeito do OELa, foi evidente também na avaliação da sensibilidade térmica, pelo teste de placa quente, que apesar da CCNC não alterar esta, o grupo CON+OELa demonstrou aumento do tempo de resposta ao estímulo de temperatura em relação ao grupo CON. Essa maior resposta do OELa nesse período de tempo do tratamento pode estar relacionado a uma faixa de tempo de maior atividade do OELa e/ou ao aumento da disponibilidade de atuação do OELa dada a maior permeabilidade perineural e vascular endoneural, que ocorre dentro de 4-7 dias após lesão, período no qual ocorre o pico da resposta inflamatória aguda (Mizisin e Weerasuriya, 2011).

Uma vez que o modelo de placa quente investiga atuação de compostos nos níveis da medula espinhal e/ou na região central superior do sistema nervoso, a atuação do OELa demonstra modulação também em mecanismos diretos. Esse dado corrobora com Viana et al., (1998) que relata aumento da latência de resposta no teste de placa quente pelo citral, efeito revertido pelo antagonista opióide naloxona, sugerindo um mecanismo de ação morfínico. Enquanto, o efeito do quimiótipo carvona não foi revertido pela naloxona. Este dado é interessante, pois ambos os constituintes estão presentes no OELa e os diferentes quimiótipos podem colaborar sinergicamente para uma atividade antinociceptiva, atuando em vias distintas.

Além disso, Quintans-Junior et al. (2011) relatam em seu estudo o efeito analgésico do citral envolvendo o sistema GABAérgico. Foi demonstrado que o citral é um composto sedativo e anticonvulsivo produzindo seus efeitos através do envolvimento do sistema GABAérgico, mas seu efeito na estabilização da membrana neuronal e no bloqueio de famílias de canais iônicos potencializa o efeito antinociceptivo (Stotz et al., 2008; Quintans-Júnior et al., 2010).

A persistência das dores crônicas é atribuída aos mecanismos periféricos. Fibras de pequeno e médio diâmetro, que correspondem às fibras C e A δ , as quais detectam estímulos ambientais e transduzem essa informação através de potenciais elétricos (Basbaum et al., 2009). Essas fibras expressam receptores ionotrópicos de potencial transitório (TRPs) que tem sido identificado como o maior grupo de detectores de estímulos nocivos (Cheng et al., 2008; Patapoutian, Tate, Woolf, 2009). Os dois principais representantes desta categoria de TRPs são o TRPV1 e TRPA1, que medeiam estímulos térmicos e químicos em resposta a lesão tecidual, inflamação ou estresse oxidativo. A ativação destes produz o 4-Hidroxinonenal (HNE), um aldeído endógeno (Macpherson et al., 2007; Trevisani et al., 2007), envolvido em um grande número de patologias, como doenças metabólicas, neurodegenerativas e cânceres (S Dalleau et al., 2013).

No estudo de Stotz (2008), mostra que o citral tem como alvo os TRPs em neurônios sensoriais, produzindo inibição de longa duração de TRPV1-3 e TRPM8 e inibição transitória de TRPV4 e TRPA. Portanto, é possível que o efeito do OELa em ambos os modelos de sensibilidade avaliados (mecânica e térmica), esteja relacionado a atuação deste em estruturas que compartilham vias de mecanismos da sensibilidade mecânica e térmica.

Os dados eletrofisiológicos do PAC corroboram com os dados da sensibilidade mecânica, visto que os animais que foram tratados com OELa (CON+OELa; CCNC+OELa) mostraram aumento da reobase, que reflete diminuição da excitabilidade. Este dado é interessante, pois mostra a consonância dos dados eletrofisiológicos e os obtidos na avaliação de sensibilidade mecânica, sugerindo um efeito anestésico do OELa.

Vários constituintes de plantas medicinais atuam para reduzir a excitabilidade nervosa, tais como carvacrol, linalool e estragol (Silva-Alves et al., 2013; Leal-Cardoso et al., 2004). O estudo de Sousa et al., (2015) mostrou que o OE de *L. alba* e o citral administrado de forma tópica no nervo ciático também reduziu a excitabilidade.

A alteração na excitabilidade causada pela CCNC no presente estudo corrobora com estudos de excitabilidade que revelam anormalidades funcionais em um amplo espectro de neuropatias com grau variável de degeneração axonal (Kanai et al., 2006; Tamura et al., 2006). A sensibilização periférica está associada ao aumento da excitabilidade axonal das fibras nociceptivas. Após lesão do nervo, ocorre alteração na distribuição e conformação de canais iônicos (especialmente canais de sódio), que desencadeia a geração intensa, repetida ou prolongada de potencial de ação nos aferentes sensoriais primários (Scholz, 2002). A condução de potenciais de ação nos axônios mielinizados depende principalmente dos canais de Na⁺ e da propriedade passiva da membrana (Chiu et al., 1979). No estudo de Alves et al., (2013), relata

que se a diminuição da reobase ocorrer devido alterações primárias da corrente interna de Na^+ , então a diminuição na voltagem do limiar de disparo de potencial de ação poderia implicar em diminuição da cronaxia, ou seja, diminuiria reobase e cronaxia. Porém nossos resultados mostram aumento da cronaxia no grupo CCNC.

A cronaxia é determinada pelo o produto da capacitância e resistência da membrana (Holsheimer et al., 2000; Ashley et al., 2005). Sabe-se que a mielinização axonal diminui a capacitância de membrana (Ashley et al., 2005) e nas primeiras 24 horas após lesão do nervo ocorre degeneração axonal com desintegração da bainha de mielina (Gaudet et al., 2011). Assim, o adelgaçamento das fibras do nervo nesta região reflete o grau de mielinização e com essa diminuição da espessura da bainha de mielina, ocorre aumento da capacitância da membrana, causa perda ou diminuição de corrente local (Kimura, 1984). Portanto, é possível que o aumento da cronaxia no grupo CCNC, esteja relacionado ao aumento da capacitância da membrana, decorrente do processo de degeneração axonal referente à fragmentação da mielina pela CCNC. Outros fatores podem estar envolvidos, como à maior resistência da membrana internodal exposta pela retração da mielina (Brismar, 1981). Nos grupos tratados com OELa (CCNC+OELa e CON+OELa), não houve alteração da cronaxia. Sugerindo um efeito neuroprotetor do OELa mediante lesão neuronal.

A APP e amplitude positiva da primeira componente do PAC no grupo CCNC diminuíram significativamente. A segunda componente do PAC desse grupo, não foi evidenciada. A amplitude relaciona-se ao número de fibras ativadas, que contribuem na amplitude do PAC. O nervo ciático é classificado como nervo misto, contendo fibras motoras e sensitivas (Navarro e Verdú, 2004), constituído em sua maior parte por fibras do tipo A, apresentando os subtipos $A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$, $A\delta$ e fibras do tipo C (Erlanger e Gasser, 1930). Com base na velocidade de condução destas fibras, sugeriu-se que a primeira componente do PAC consiste em contribuições de fibras mielinizadas $A\alpha$ (50-120 m/s), portanto fibras motoras mais calibrosas, e a segunda e terceira componentes são constituídas por respostas de fibras $A\beta$, $A\gamma$, $A\delta$, fibras sensitivas, mais delgadas (Hayami et al., 2007; Catterall e Mackie, 1996, apud Alves, 2013). Isso sugere a hipótese de que é possível que as fibras sensitivas por serem de menor diâmetro sejam acometidas mais precocemente nas neuropatias, e assim iniciando a degeneração axonal mais cedo, implicando no desaparecimento da segunda componente do PAC no grupo CCNC. Considerando quantitativamente, as fibras sensitivas correspondem a maior porcentagem da constituição do nervo ciático, dados mostram que 23 e 48% são axônios sensitivos mielínicos e amielínicos, respectivamente (Schmalbruch, 1986), isto pode ter implicado na diminuição da amplitude do PAC, e mais especificamente no maior comprometimento da segunda componente.

Entretanto, o grupo de fibras que mais colabora para o PAC, são as fibras mais calibrosas (Best e Taylor, 1990). De modo geral, ambos os tipos de fibras foram comprometidas pela CCNC, perdendo contribuição de seus axônios na amplitude do PAC, como evidenciado pela diminuição na APP.

Estudo histopatológico a partir da lesão por CCNC mostrou lesão em fibras mielinizadas, fibras A δ e fibras C não mielinizadas (Bennett e Xie, 1988). De acordo com Nuytten (1992), após duas semanas de constrição do nervo, ocorre alodínea e degeneração de fibras mielinizadas e redução no número de fibras mielinizadas de menor diâmetro. Redução similar em fibras mielinizadas e não mielinizadas também foi documentada por Gabay e Tal (2004). Portanto, esses dados se correlacionam com os resultados obtidos no presente estudo, no qual as fibras sensitivas foram mais comprometidas pela CCNC. No entanto, Alves (2013) mostrou que a degeneração axonal, causada por imobilização da pata direita de ratos, afetou com maior prevalência os axônios com maior diâmetro. Isso pode estar relacionado às diferenças metodológicas quanto à técnica de lesão do nervo, pois, espera-se que a imobilização leve a atrofia do músculo e conseqüente perda de fibras motores A α de maior diâmetro.

Embora, o tratamento com o OELa, promova uma maior diminuição da APP e da amplitude das componentes do PAC, a preservação das fibras que compõem a segunda componente do PAC é um dado importante, pois, é outra evidencia do efeito neuroprotetor do OELa, tendo em vista que no grupo CCNC não se obteve registro desta. Provavelmente esse fenômeno esteja relacionado à redução da neuroinflamação e dano neuronal.

A maior diminuição da APP e da amplitude das componentes do PAC mostrada nos grupos tratados com o OELa (CON+OELa; CCNC+OELa), corrobora com os achados de Sousa et al. (2015), que mostrou diminuição da APP e da excitabilidade nervosa, realizando tratamento tópico com o OE de *L. alba*. O estudo de Mendes (2012) com o óleo de *L. sidoides* e seu constituinte majoritário o timol, também revelou uma redução significativa da APP.

Estudos com produtos naturais demonstraram ações neuroprotetoras e regenerativas após lesão do nervo periférico (Kou et al., 2013; Thiagarajan et al., 2012), intimamente relacionadas ao progresso dinâmico e complexo após lesão, que envolve alterações moleculares e fisiopatológicas, que por sua vez estão sob o controle de outros fatores. Por exemplo, os fatores de crescimento secretados pelas células de Schwann, importantes para o crescimento axonal e maturação da mielina (Zhu et al., 2014).

Logo após lesão neuronal, ocorrem alterações relacionadas à peroxidação lipídica na membrana celular, antes das alterações eletrofisiológicas, causando sobrecarga das enzimas e perda do controle do canal iônico, como o canal de Ca²⁺, induzindo um desequilíbrio da

homeostase do Ca^{2+} (Wang et al., 2005). Foi identificado que os produtos naturais podem modular periféricamente canais iônicos, como TRPV1, reduzindo a excitabilidade do neurônio (Menéndez et al., 2006). E como já anteriormente citado, Stotz et al. (2008) e Quintans-Júnior et al. (2010) mostraram que o citral possui efeito na estabilização da membrana neuronal, atuando no bloqueio de famílias de canais iônicos, entre estes TRPV1-3, TRPV4 e TRPA1 (Stotz et al., 2008). Somando-se a isso, a ação antioxidante do óleo essencial de *L. alba* (Viana, 1998; Zétola et al., 2002; Hennebelle et al., 2008; Haldar et al., 2012; Hatano et al., 2012), que pode estar contribuindo na modulação do processo inflamatório, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL1- β , TNF- α) (Leyva-López et al., 2016; Siqueira-Lima et al., 2014, 2017). Estas desempenham papel central em desordens inflamatórias e doenças crônicas, tais como DN (Zanotti et al., 2002; Gabay, 2002). Estudos mostram a inibição da produção de citocinas pelo citral em macrófagos estimulados por LPS (Bachiega e Sforzin, 2011) e também da expressão da COX-2 (Katsukawa et al., 2010). Lin et al. (2008) revelaram a inibição do TNF- α nas células RAW 264.7 estimuladas pelo LPS.

Os dados de velocidade de condução e duração do PAC mostram uma redução e aumento, respectivamente apenas no grupo CCNC. Estes dados apontam, mais uma vez para o potencial efeito neuroprotetor do OELa, ao proteger as fibras do nervo da desintegração da mielina no grupo CCNC+OELa, preserva as fibras do nervo, e assim estas mantêm a velocidade de condução do PAC e contribuem para colaboração da sincronia das fibras individuais para disparo dos potenciais de ação que se somam na formação do PAC, mantendo a duração do PAC normal.

Portanto, estes estudos tomados em conjunto demonstram que o óleo essencial de *L. alba*, além de sua atuação nos TRPs, sua atividade antioxidante modula a ativação da sinalização mediada por citocinas, diminuindo a produção de fatores inflamatórios e consequentemente do comportamento hiperalgésico. Dessa forma a ação neuroprotetora do OELa na redução do dano neuronal causado pela CCNC, contribui para a preservação da estrutura e função da bainha e axônios mielinizados.

Os mecanismos pelos quais o OELa exerce potencial efeito neuroprotetor frente a lesão do nervo periférico ainda precisa ser elucidado. No entanto, nossos resultados representam evidências de que a suplementação oral com o OELa promove a diminuição da hipersensibilidade após lesão neuronal que apontam para uma combinação de múltiplos alvos, envolvendo componentes neuronais e imunológicos, que desencadeia efeitos na modulação da sensibilidade neuropática.

O tratamento que bloqueia as vias de sinalização mediadas por citocinas pode ser uma abordagem eficaz para o tratamento de doenças inflamatórias e crônicas. Assim, nossos achados podem ter relevância clínica e devem ser levados em consideração na compreensão de aspectos de anormalidades de excitabilidade em distúrbios caracterizados por degeneração axonal. No entanto, estudos adicionais serão necessários para caracterizar ainda mais o potencial do OELa e seus constituintes como uma molécula anti-inflamatória com propriedades farmacológicas de anestésico local no tratamento de doenças inflamatórias.

7. CONCLUSÃO

No presente trabalho, mostramos que o OELa produziu uma redução na hiperalgesia mecânica em um modelo de dor inflamatória. Além disso, reduziu a hipersensibilidade eletrofisiológica da DN, com possível envolvimento na sensibilização periférica. Portanto, OELa tem grande potencial para uso futuro na farmacoterapia da DN.

- O CCNC reduz significativamente o limiar mecânico de retirada da pata e apresenta tendência de redução do tempo de retirada da pata a estímulo térmico;
- A CCNC aumentou a excitabilidade das fibras do Nervo Ciático;
- O tratamento com OELa sobre a neuropatia causada por CCNC em ratos mostrou diminuição da hipersensibilidade e preservou fibras que constituem o PAC do nervo ciático;
- O OELa apresentou maior atividade na diminuição da hipersensibilidade e alodínea mecânica, comparada a atividade do OELa na sensibilidade térmica;
- O efeito do OELa na diminuição da excitabilidade do nervo ciático, avaliada através dos testes comportamentais foram corroborados com a avaliação eletrofisiológica, através do parâmetro da reobase, demonstrando um potencial efeito anestésico e neuroprotetor do OELa, provavelmente devido sua atividade antiinflamatória;
- O OELa mostrou efeito neuroprotetor ao preservar as fibras que constituem a 2ª componente do PAC do nervo ciático, possivelmente devido atividade antioxidante do OELa.

REFERÊNCIAS

- Abramov, R. (2014). Lumbar sympathetic treatment in the management of lower limb pain. *Curr Pain Headache, Rep.* 18, 403.
- Adalbert, R., Morreale, G., Paizs, M., Conforti, L., Walker, S. A., Roderick, H. L. (2012). Intra-axonal calcium changes after axotomy in wild-type and slow Wallerian degeneration axons. *In Neurosci*, 225(44), 54.
- Adam, K. P., Zapp, J. (1998). Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. *Phytochemistry*, 48(6), 953-959.
- Agarwal-Kozlowski, K. (2011). Interventional management of intractable sympathetically mediated pain by computed tomography-guided catheter implantation for block and neuroablation of the thoracic sympathetic chain: technical approach and review of 322 procedures. *Anaesthesia* 66, 699–70.
- Allodi, I, Udina. E., Navarro. X. (2012). Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol*, 98:1, 16-37.
- Almeida, M. D., Botura, M. B., Santos, M. M., Almeida, G. N., Luciana, F. D., Costa, S. L. (2003). Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Capim-santo) e de *Digitaria insularis* (L.) Fedde (Capimaçu) sobre cultivos de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 12(3), 125-129.
- Almeida, R. N., Agra, M. F. A., Maior, F. N. S., Sousa, D. P., (2011). Essential Oils and Their Constituents: Anticonvulsant Activity. *Molecules*, 16, 2726-2742.
doi:10.3390/molecules16032726.
- Alves, J. S. M., Leal-Cardoso, J. H., Santos-Júnior, F. F. U., Carlos P. S., Silva, R. C., Lucci C. M., Bão, S. N., Ceccatto V. M., Barbosa R. (2013).
- Alves, K. S. da Silva (2009). Estudo das alterações eletrofisiológicas produzidas pelo estragol sobre os axônios do nervo ciático e os neurosomatos do gânglio da raiz dorsal de ratos. (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual do Ceará-UECE, Fortaleza-CE.
- Alvim, N. A. T., Ferreira, M. A., Cabral, I. V., Almeida. F. A. J. (2006). O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. *Revista Latino americano de Enfermagem*, 14(3), 316-323.
- Amir, R., Liu, C. N., Kocsis, J. D., Devor, M. (2002). Oscillatory mechanism in primary sensory neurones. *Brain, Oxford*, 125, 421-435.
- Andreghetti-Fröhner, C. R., Sincero, T. C. M., Silva, A.C. (2005). Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Phytotherapy*, 76, 374-378.

- Aquino, C. F., Sales, N. D. L. P., Soares, E. P. S., Martins, E. R. (2012). Chemical characterization and action of essential oils in the management of anthracnose on passion fruits. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(4) 1059-1067.
- Aquino, L.C.L., Santos, G.G., Trindade, R.C., Alves, J.A.B., Santos, P.O., Alves, P.B., Balnk, A.F., Carvalho, L.M. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of cidreira-herb and basil against bacteria from bovine meat. *Alim. Nutr., Araquara*, 21(4), 529-535.
- Ashley, Z., Sutherland. H., Lanmuller. H., Unger. E., Li. F., Mayr. W. (2005). Determination of the chronaxy and rheobase of denervated limb muscles in conscious rabbits. *Artif Organs*, 29, 212-215.
- Backonja, M. (2000). Anticonvulsants (antineuropathics) for neuropathic pain syndromes. *Clin. J. Pain*, 16, S67-S72.
- Backonja, M. M. (2003). Defining neuropathic pain. *Anesthesia & Analgesia, Baltimore*, 97, 785-790.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils- a review. *Food Chem Toxicol*, 46, 446-475.
- Barocelli, E., Calcina, F., Chiavarini, M., Impicciatore, M., Bruni, R., Bianchi, A. (2004). Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered Lavandula hybrida Reverchon "Grosso" essential oil. *Life Science*, 76 (2) 213-223.
- Barocelli, E., Calcina, F., Chiavarini, M. (2004). Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered Lavandula hybrida Reverchon "Grosso" essential oil. *Life Science*, 76 (2), 213-223.
- Baron, R. (2006). Mechanisms of disease: neuropathic pain – a clinical perspective. *Nature Clinical Practice Neurology, New York*, 2 (2), 95-106, 2105-2114, 2001.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267–284.
- Baser, K.H.C. and Buchbauer, G. (2010) *Handbook of essential oils: Science, technology and applications*. CRC Press, Boca Raton/London/New York.
- Beirowski, B., Adalbert, R., Wagner, D., Grumme, D. S., Addicks, K., Ribchester, R. R. (2005). The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves. *BMC Neurosci.* 6, 6.
- Bennett, G. J.(2003). Neuropathic pain: a crises of definition? *Anesth Analg*, 97(3), 619-20.
- Bennett, G. J.(2006). Can we distinguish between inflammatory and neuropathic pain? *Pain Res Manag*, 11,11A–5A.
- Bennett, G. J., Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33(1), 87-107.

- Best, C.; Taylor, N. (1990). *Physiological basis of medical practice*. Baltimore: Wilians e Wilkins.
- Biasi, L.A., Costa, G. (2003). Vegetative propagation of *Lippia alba*. *Ciência Rural, Santa Maria*, 33(3), 455-459.
- Bisby, M.A., Chen, S.(1990). Delayed wallerian degeneration in sciatic nerves of C57BL/Ola mice is associated with impaired regeneration of sensory axons. *Brain Res*, 530,117-120.
- Bizzo, H. R., Hovell., Ana, M. C., Rezende, C. M.(2009). Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Quimica Nova*, 32(3), 588-594.
- Black, J. A., Nikolajsen, L., Kroner, K., Jensen, T. S., Waxman, S. G. (2008). Multiple sodium channel isoforms and mitogen-activated protein kinases are present in painful human neuromas. *Annalsof Neurology, New York*, 64, 644-653.
- Boivin, A. (2007). Toll-like receptor signaling is critical for Wallerian degeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 27, 12565–76.
- Borchers, A.T., Gershwin, M.E. (2014). Complex regional pain syndrome: a comprehensive and critical review. *Autoimmun Rev*, 13, 242–26.
- Boyce-Rustay, J. M., Jarvis, M. F. (2009). Neuropathic Pain: Models and Mechanisms Current. *Pharmaceutical Design*, 15, 1711-1716.
- Bunnett, N. W., Julius, D., Geppetti, P. (2007). Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (33),13519-13524.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto nacional de câncer (2001). Cuidados paliativos oncológicos: controle da dor: Manual técnico. Rio de Janeiro, 124.
- Briskin, D. P. (2000). Medical plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, 124, 507-514.
- Brismar, T. (1981). Electrical properties of isolated demyelinated rat nerve fibres. *Acta Physiol Scand*, 113, 161–6.
- Brunn, G. J., Bungum, M. K., Johnson, G. B., Platt, J. L. (2005). Conditional signaling by Tolllike receptor 4. *Faseb J*, 19, 872-874.
- Bryce, T. N. (2012). International spinal cord injury pain classification: part I. Background and description. March 6-7, 2009. *Spinal Cord*, 50,413–417.
- Buss, A., Schwab, M. E. (2003). Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the rat spinal cord. *Glia*. 42, 424–432.
- Cáceres, A., Alvarez, A. V., Ovando, A. E. O., Samayoa, B. E. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1.Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 193-208.

- Calixto, C., Corrêa, M. P., Carvalho, T. T., Zarpelon, A. C., Hohmann, M. S. N., Rossaneis, A. C., Coelho-Silva, L., Pavanelli, W. R., Pinge-Filho, P., Crespigio, J., Bernardy, C. C. F., Casagrande, R., Verri, W.A., (2015). Quercetin Reduces Ehrlich Tumor-Induced Cancer Pain in Mice. *Anal. Cell. Pathol.*, 1–18. doi.org/10.1155/2015/285708.
- Camêlo, L. C. A., Blank, A. F., Ehlert, P. A. D., Carvalho, C. R. D., Arrigoni-Blank, M. F., Mattos, J. (2011). Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. *Scientia Plena*, 7(5), 1-8.
- Câmera, C.C. (2009). Estudo dos efeitos analgésicos, comportamentais e regenerativos do tratamento com gabapentina em modelo experimental de dor neuropática. (Tese de Doutorado) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.
- Campbell, J. N., Meyer, R. A. (2006). Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*, 52, 77-92.
- Campbell, W. W. (2008). Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology*, 119, 1951-1965.
- Carlini, E. A. (2003). Plants and the central nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75, 501-512.
- Carlton, S.M., Du, J., Tan, H.Y., Nesic, O., Hargett, G.L., Bopp, A.C. (2009). Peripheral and central sensitization in remote spinal cord regions contribute to central neuropathic pain after spinal cord injury. *Pain*, 147, 265–276.
- Carvalho, P. M. M., Macêdo, C. A. F., Ribeiro, T. F., Silva, A. A., Da Silva, R. E. R., de Moraes, L. P., Kerntopf, M. R., Menezes, I. R. A., Barbosa, R. (2018). Effect of the *Lippia alba*(Mill.) N.E. Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats. *Biotechnol. Rep*, 17, 31–34.
- Castro, D.M. (2001). Efeito de variação sazonal, colheita selecionada e temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* N. E. Br. ex Britt. & Wilson (Verbenaceae). (Tese de Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Catenaccio, A., Hurtado, M. L., Diaz P., Lamont, D. J., Wishart, T. M., Court, F.A. (2017). Molecular analysis of axonal-intrinsic and glial-associated co-regulation of axon degeneration. *Cell Death and Disease* 8, e3166.
- Catterall W, Mackie K. (1996). *Local anesthetic*. In: Goodman NLS, Gilman A (Editors), *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill Companies, 331-334.
- ChalK, C. H. (2008). Diseases of the peripheral nervous system. *ACP Medicine*, 1-20.
- Chaudhry, V., Cornblath, D. R. (1992). Wallerian degeneration in human nerves: serial electrophysiological studies. *Muscle Nerve*, 15, 687-693.
- Chen, Zu-Lin., Yu, Wei-Ming., Strickland, S. (2007). Peripheral Regeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 209-233.

- Cheng, J. K.; Ji, R. R. (2008). Intracellular Signaling in Primary Sensory Neurons and Persistent Pain. *Neurochem. Res*, 33(10), 1970-8.
- Chiu, S. Y., Ritchie, J. M., Rogart, R. B., Stagg, D. (1979). A quantitative description of membrane currents in rabbit myelinated nerve. *J Physiol*, 292, 149–66.
- Coderre, T. J., Katz, J., Vaccarino, A. L., Melzack, R. (1993). Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain*, 52, 259-285.
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H., & Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17002. doi:10.1038/nrdp.2017.2.
- Conde, J., Correa, V. S., Carmona, F., Contini, S. H., Pereira, A. M. (2011). Chemical composition and therapeutic effects of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown leaves hydro-alcoholic extract in patients with migraine. *Phytomedicine*, 18(14), 1197-1201.
- Costa, C. (2009). Dor neuropática: novos conceitos, expressão clínica e desafios terapêuticos. *Prática Hospitalar*, 11 (66), 109-110.
- Costa, D. C., Vermelho, A. B., Almeida, C. A., Dias E. P., Cedrola, S. M., Arrigoni-Blank, M. D., Blank, A. F., Alviano, C. S., Alviano, D. S. (2013). Inhibitory effect of linalol-rich essential oil from *Lippia alba* on the peptidase and keratinase activities of dermatophytes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*.
- Cunha, M. A., Barros, F. M. C., Garcia, L. O., Veeck, A. P. L., Heinzmann, B. M., Loro, V. L., Emanuelli, T., Baldisserotto, B. (2010). Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, 306, 403-406.
- Dahlin, L. B., Brandt, J. (2004). Basic Science of peripheral nerve repair: Wallerian degeneration/growth cones. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 14, 138-145.
- Dalleau, S., Baradat, M., Guéraud, F. (2013). Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ* 20, 1615–1630. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.138>
- de Cassia da Silveira e Sa, R., Andrade, L.N., de Sousa, D.P., (2013). A review on antiinflammatory activity of monoterpenes. *Mol. Basel Switz*. 18, 1227–1254. <https://doi.org/10.3390/molecules18011227>.
- de Cássia da Silveira e Sá, R., Andrade, L. N., & de Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(1), 1227–1254. <https://doi.org/10.3390/molecules18011227>
- De Sousa, D. P. (2011). Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*, 16, 2233–2252.

- Devor, M., Seltzer, Z. (1999). Pathophysiology of damaged nervos in relation to chronic pain. In: Wall, P. D.; Melzack, R. (Ed.). Textbook of book. 4th ed. London: Churcchill Livingston, 129-164.
- Dias, D. A., Urban, S., Roessner, U., (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites* 2, 303–336. doi:org/10.3390/metabo2020303.
- Drewes, A. M. (2006). The physiology of pain. *Ugeskrift for Laeger*, 168(20), 1941-1943.
- Drummond, P. D. (2013). Sensory-autonomic interactions in health and disease. *Handb Clin Neurol* 117, 309–319.
- Dudai, N., Weinstein, Y., Krup, M., Rabinski, T., Ofir, R. (2005). Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Med*, 71, 484-488.
- Dutra, F. L., Oliveira, M. M., Santos, R. S., Silva, W. S., Alviano, D. S., Vieira, D. P., Lopes, A. H., (2016). Effects of linalool and eugenol on the survival of *Leishmania (L.) infantum* chagasi within macrophages. *Acta Trop*. 164, 69–76. doi:org/10.1016/j.actatropica.2016.08.026.
- Dourado, M. (2007). *Fisiopatologia da Dor*. In: Pinto, A. (Ed.). *Fisiopatologia: Fundamentos e aplicações*. Lisboa, Lidel edições, 261-279.
- Dworkin, R. H. (2013). Interventional management of neuropathic pain: NeuPSIG recommendations. *Pain* 154, 2249–2261.
- Ekinci, F. J., Shea, T. B. (199). Free PKC catalytic subunits (PKM) phosphorylate tau via a pathway distinct from that utilized by intact PKC. *Brain Res*, 850, 207–216.
- Elshafie, H. S., Mancini E., Sakr, S., De Martino, L., Mattia C. A, De Feo, V., Camele, I. (2015). Antifungal Activity of Some Constituents of *Origanum vulgare* L. Essential Oil Against Postharvest Disease of Peach Fruit, *Journal of Medicinal Food*, 18(8), 929–934.
- Erlanger, J., Gasser, H. S. (1930). The action potential in fibers of slow conduction in spinal roots and somatic nerves. *Am J Physiol*, 92, 43-82.
- Espina, L., Pagán, R., López, D., García, D. (2015). Individual Constituents from essential oils inhibit biofilm mass production by multi-drug resistant staphylococcus aureus. *Molecules*, 20, 11357–11372.
- Fabri R.L, Nogueira M.S., Moreira J.R., Bouzada M.L.(2011). SCIO E.dentification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. *J Med Food*. p. 840-6.
- Fancy, S. P., Harrington, E. P., Yuen, T. J., Silbereis, J. C., Zhao, C., Baranzini, S. E., Bruce, C. C., Otero, J. J., Huang, E. J., Nusse, R., Franklin, R. J., Rowitch, D. H. (2011). Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nat Neurosci*. 14(8),1009-16.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O.H., Andersen, P.S., Girardin, S.E., (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin. Exp. Immunol*. 147, 227–235. doi:org/10.1111/j.1365-2249.2006.03261.x.

- Fischer-Hayes, L. R., Brotherton, T., Glass, J. D. (2013). Axonal degeneration in the peripheral nervous system: implications for the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental neurology*, 246, 6–13.
- Freitas, F. P., Freitas, S. P., Lemos, G., Vieira, I. J., Gravina, G. A., Lemos, F. J. (2010). Comparative larvicidal activity of essential oils from three medicinal plants against *Aedes aegypti* L. *Chemistry & biodiversity*, 7(11), 2801-2807.
- Fukuoka, T., Kondo, E., Dai, Y., Noguchi, K. (2000). The role of neighboring intact DRG neurons in a rat neuropathic pain model. In: World Congress on Pain, 9th, Seattle, Proceedings...Seattle: Seattle: IASP Press., *Progress in Pain Research and Management*, 16,137-146.
- Furtado, R. F., De Lima, M. G., Andrade Neto, M., Bezerra, J. N., Silva, M. G. D. V. (2005). Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, 34(5), 843-847.
- Gabay, C. (2002). Cytokine inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin. Biol. Ther*, 2, 135–149.
- Gabay, E., Tal, M. (2004). Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. *Pain* 110, 354–360.
- Garcia-Larrea, L., Magnin, M. (2008). Physiopathologie de la douleur neuropathique: revue des modèles expérimentaux et des mécanismes proposés. *Presse Med*, 37, 315-140.
- Gaudet, A. D., Popovich, P. G., and Ramer, M. S. (2011). Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J. Neuroinflammation*, 8,110.
- Gazola, R., Machado, D., Ruggiero, C., Singi G, Macedo, A. M. (2004). *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous-extracts on the isolates hearts of rats. *Pharmacological Research*, 50(5), 477-480.
- George, E. B, Glass, J. D, Griffin, J. W. (1995). Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci*, 15,6445-6452.
- Ghosh, A., Sydekum, E., Haiss, F. (2009). Functional and anatomical reorganization of the sensory-motor cortex after incomplete spinal cord injury in adult rats. *J Neurosci*, 29, 12210–12219.
- Goecks, C. S. (2012). Assessment of oxidative parameters in rat spinal cord after chronic constriction of the sciatic nerve. *Neurochem.Res*, 37, 1952–1958.
- Gouveia, D. N., Costa, J. S., Oliveira, M. A., Rabelo, T. K., Silva, A. M. de O. e, Carvalho, A. A., Miguel-dos- Santos, R., Lauton- Santos, S., Scotti, L., Scotti, M. T., Santos, M. R. V. dos, Quintans-Júnior, L. J., Albuquerque Junior, R. L. C. D., Guimarães, A. G. (2018). α -Terpineol reduces cancer pain via modulation of oxidative stress and inhibition of iNOS. *Biomed. Pharmacother*, 105, 652–661. doi:org/10.1016/j.biopha.2018.06.027.
- Grant, G. A., Goodkin, R., Kliot, M. (1999). Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery*, 44(4), 825-39.

Griffin, J. W., George, E. B., Hsieh S-T., Glass, J. D. (1995). Axonal degeneration and disorders of the axonal cytoskeleton. In *The Axon: Structure, Function and Pathophysiology*. Edited by: Waxman SG, Kocsis JD, Stys PK. *New York: Oxford University Press*, 375-390.

Griffin, J. W., McArthur, J. C., Polydefkis, M. (2001). Assessment of cutaneous innervation by skin biopsies. *Curr. Opin. Neurol*, 14, 655-659.

Guertin, A. D., Zhang, D. P., Mak, K. S., Alberta, J. A, Kim, H. A. (2005). Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. *J Neurosci*, 25,3478-3487.

Guimarães, A. G., Quintans, J. S. S., Quintans-Júnior, L. J. (2013). Monoterpenes with analgesic activity – a systematic review. *Phyther. Res*, 27, 1–15.

Guimaraes, A. G., Serafini, M. R., Quintans-Junior, L. J. (2014). Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 24,243–265.

Guimarães, L. G. D. L., Cardoso, M. D. G., De Sousa, P. E., De Andrade, J., Vieira, S. S. (2011). Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. *Revista Ciência Agronômica*, 42(2), 464-472.

Haanpää, M., Attal, N., Backonja, M., Baron, R., Bennett, M., Bouhassira, D. (2011). NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain*, 152 (1), 14–27.

Haborne, J. B., Baxter, H., Moss, G. P. (1999). *Phytochemical dictionary*, 2^a ed, 605 e 611.

Habtemariam, S., (2018). Iridoids and other monoterpenes in the Alzheimer's brain: recent development and future prospects. *Molecules*, 23. doi:org/10.3390/molecules23010117.

Haldar, S., Kar, B., Dolai, N., Kumar, R. B. S., Behera, B., Haldar, P. K., (2012). In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Lippia alba*. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 2, S667–S670.

Hasmeda, M., G., Kweifio-Okai, T., Macrides e G. M., Polya. (1999). Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. *Planta Med*, 65(1), 14-8.

Hatano, V. Y., Torricelli, A. S., Giassi, A. C. C., Coslope, L. A., Viana, M. B., (2012). Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and carvone in the elevated T-maze. *Brazil. J. Med. Biol. Res*, 45, 238–243.

Hayami, T., Iramina, K., Chen, X., Sunagawa, K. (2007). Simulation study on the effect of fiber loss to the compound action potential of a sural nerve. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2396-2399.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Gressier, B., Joseph, H., Bailleul, F. (2008). Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*. *Phytotherapy Research*, 22(2), 256-258.

Herbert, J. M. (1991). Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinase C. *J. Nat. Prod*, 54(6), 1595–1600.

Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P. (2002). *Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases.* 97, 1027-1031.

- Holsheimer, J., Demeulemeester, H., Nuttin, B., de Sutter P. (2000). Identification of the target neuronal elements in electrical deep brain stimulation. *Eur J Neurosci*, 12, 4573-4577.
- Hudson, L. J., Bevan, S., Wotherspoon, G., Gentry, C., Fox, A., Winter, J. (2001). VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *The European Journal of Neuroscience*, 13, 11,2105-14.
- Hung, A. L., Lim, M., & Doshi, T. L. (2017). Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain, *Scandinavian Journal of Pain*, 17(1), 287-293. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2017.08.002>
- Jacob, J.J.C., Ramabadran, K. (1978). Enhancement of a nociceptive reaction by opioid antagonists in mice. *Br. J. Pharmacol.* 64, 91–98. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1978.tb08645.x>.
- Janig, W. (2014). Sympathetic nervous system and inflammation: a conceptual view. *Auton Neurosci* 182, 4–14.
- Jessen, K. R., Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol*, 594,3521–3531.
- Jiang, W., Wang, Y., Sun, W., Zhang, M., (2017). Morin Suppresses Astrocyte Activation and Regulates Cytokine Release in Bone Cancer Pain Rat Models: Antinociceptive Effects of Morin on Bone Cancer Pain. *Phytother.* 31, 1298–1304. doi:org/10.1002/ptr.5849.
- Jiang, Y., Beller DI, Frenzl, G., Graves, D. T. (1992). Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*, 148(8), 2423-8.
- Johnson, G. V., Guttman, R. P. (1997). Calpains: intact and active? *Bioessays*, 19,1011–1018.
- Jones, B. J. (2001). Pathophysiology of acute pain: Implications for clinical management. *Emergency Medicine*, 13, 288-292.
- Jones, E. G., Pons, T. P. (1998). Thalamic and brainstem contributions to large-scale plasticity of primate somatosensory cortex. *Science*, 282, 1121–1125.
- Juergens, U.R., (2014). Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug Res.* 64, 638–646. doi:org/10.1055/s-0034-1372609.
- Julião, L. S., Tavares, E. S., Lage, C. L. S. (2003). Thin layer chromatography three chemotypes of *Lippia alba* extracts (Mill) NE Br . *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 36-38.
- Kamatou, G. P. P., Viljoen, A. M. (2010). A review of the application and pharmacological properties of α - bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 87, 1-7.
- Kanai, K., Kuwabara, S., Misawa, S., Tamura, N., Ogawara, K., Nakata, M. (2006). Altered axonal excitability properties in amyotrophic lateral sclerosis: impaired potassium channel function related to disease stage. *Brain*, 129, 953–62.

- Karanth, S., Yang, G., Yeh, J., Richardson, P. M. (2006). Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves. *Exp Neurol*, 202, 161–166.
- Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., Weissman, D. (2004). mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem*, 279,12542-12550.
- Katsukawa, M., Nakata, R., Takizawa, Y., Hori, K., Takahashi, S., Inoue, H. (2010). Citral, a componente of lemongrass oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. *BBA-Mol. Cell Biol. Lipids*, 1801, 1214-1220.
- Kaur, G. (2016). Anti-hyperalgesic and anti-nociceptive potentials of standardized grape seed proanthocyanidin extract against CCI induced neuropathic pain in rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 27, 9–17.
- Kimura, J. (1984). Principles and pifalls of nerve conduction studies. *Ann. Neurol.* 16, 415-29.
- Kiran, S. R., Devi, P. S., Reddy, K. J. (2008). Evaluation of in vitro antimicrobial activity of leaf and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1909–1914.
- Klaumann, P. R., Wouk, A. F. P. F., Sillas, T. (2008). Patofisiologia da Dor. *Archives of Veterinary Science*, 13(1), 1-12.
- Klusakova i, Dubovy P. (2009). Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. *Ann Anat* 191, 248-59.
- Koltzenburg, M.; Kees, S.; Budweiser, S.; Ochs, G.; Toyka, K. V. (1994). The properties of unmyelinated afferents change in a chronic constriction neuropathy. In: WORLD CONGRESS ON PAIN, 7th, 1994, Seattle. Proceedings. Seattle: IASP Press. *Progress in Pain Reaserch and Management*, .2, 511-522.
- Kou, V., Wang, Z., Wu, Z., Zhang, P., Zhang, Y., Yin, X., Wong, X., Qiu, G., Jiang, B. (2013). Epimedium Extract Promotes Peripheral Nerve Regeneration in Rats Evidence-Based. *Compl and Alt Med Art*, 954798.
- Kraychete, D. C., Gozzani, J. L., Kraychete, A. C. (2008). Dor neuropática: aspectos neuroquímicos. *Rev. Bras. Anestesiol.* 58, 492-505. ISSN 0034-7094. doi:10.1590/S0034-70942008000500008.
- Lagréze, W.A., Müller-Velten, R., Feuerstein, T. J. (2001). The neuroprotectiveproperties of gabapentin-lactam. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*, 239(11), 845-849.
- Lai, J. Hunter, J. C.; Porreca, F. (2003). The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Current Opinion in Neurobiology*, 13, 291-297.
- Lalko, J., Api, A.M. (2006). Investigation of the dermal sensitization potential of various essential oils in the local lymph node assay. *Food and Chemistry Toxicology*, 44, 739-746.
- Lamont, L. A.; Tranquilli, W. J. (2000). Physiology of Pain. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Philadelphia: Saunders,30 (4),703-728.

Leal, Cardoso, J. H., Matos, Brito, B. G., Lopes, Junior, J. E., Viana, Cardoso, K. V., Sampaio, Freitas, A. B., Brasil, R. O. (2004) Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. *Braz J Med Biol Res*, 37, 1193-1198. doi:10.1590/S0100-879X2004000800009.

Leal, Cardoso, J. H., da Silva, Alves, K. S., Ferreira-da-Silva, F. W., dos Santos, N. T., Joca, H. C., de Macedo, F. H. P., de Albuquerque-Neto, P.M., Lebart, M.-C and Benyamin, Y. (2006). Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. *FEBS Journal*, 273, 15,3415-26.

Lee SK, Wolfe SW. (2000). Peripheral nerve injury and repair. *Am Acad Ortho Surg*, 8 (4), 243-52.

Lee, H., Jo, E. K., Choi, S. Y., Oh, S. B, Park, K., Kim, J. S., Lee, S. J. (2006). Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: Implication in Wallerian degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*, 350, 742–747.

Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E.P., Ambriz-Perez, D.L., Basilio Heredia, J., (2016). Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases. *Int. J. Mol. Sci*, 17. Limb immobilization alters functional electrophysiological parameters of sciatic nerve. *Braz J Med Biol Res*. 46,715-721. Epub Aug 16,. ISSN 1414-431X. doi:org/10.1590/1414-431X20132626.

Lin, C.-T., Chen, C.-J., Lin, T.-Y., Tung, J.C., Wang, S.-Y. (2008). Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. *Bioresource Technol*, 99, 8783-8787.

Linde, G. A., Colauto, N. B., Albertó, E., Gazim, Z. C. (2016). Chemotypes, extraction, chemical composition and use of *Lippia alba* essential oil. *Rev. Bras. Plantas Med*, 18, 191–200.

Lubinska, L. (1997). Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve. *Brain Res*, 130, 47–63.

Lundborg G. (1987). Nerve regeneration and repair. *Acta Orthop Scand*, 58,145-69.

Machado, J. L. M., Macedo, A. R., Silva, M. D., Spadella, C. T., Montenegro, M. R. G. (2000). Caracterização de um modelo experimental de neuropatia em ratos diabéticos induzidos pela aloxana. *Acta Cir Bras*, 15(2), Disponível de: URL: <http://www.scielo.br/acb>

Macpherson, L. J., Dubin, A. E, Evans, M. J., Marr, F., Schultz, P. G., Cravatt, B.F., Patapoutian A. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*, 445(7127), 541-545.

Mahanta, J. J., Chutia, M., Bordoloi, M., Pathak, M. G., Adhikary, R. K., Sarma, T. C. (2007). *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. spawns. *Flavour and fragrance journal*, 525-530.

Malcangio , M., Ramer, M. S., Boucher, T. J., McMahan, S. B. (2008). Intrathecally injected neurotrophins and the release of substance P from the rat isolated spinal cord. *European Journal of Neuroscience*. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.00890.

- Mamun-or-rashid, A. N. M., Islam, M. R., Dash, B. K. (2012). In vitro Antibacterial Effect of Bushy Matgrass (*Lippia alba* Mill.) Extracts. *Research Journal of Medicinal Plant*, 334-340.
- Mannion R. J., Woolf, C. J. Pain mechanisms and management: a central perspective. (2000). *Clin J Pain*, 16, 144-156.
- Mantyh, P. W. (2014). The neurobiology of skeletal pain. *Eur J Neurosci*, 39, 508–519.
- Martins, M. B. G., Martins, A. R., Telascrêa, M., Cavalheiro, A. J. (2004). Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (CD) Stapf (Poaceae) e perfil químico do óleo essencial. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, 6(3), 20-29.
- Martins, M. B. G., Martins, A. R., Telascrêa, M., Cavalheiro, A. J. (2004). Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (CD) Stapf (Poaceae) e perfil químico do óleo essencial. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*, 6 (3), 20-29.
- Martins, S. F. (2005). Mecanismos básicos da regeneração de nervos. *Arq. Bras. Neurocir.*, 24 (1), 20-25.
- Martinov, T., Mack, M., Sykes, A., Chatterjea, D. (2013). Measuring changes in tactile sensitivity in the hind paw of mice using an electronic von Frey apparatus. *JoVE*.
<https://doi.org/10.3791/51212>
- Mathews K. A. (2008). Neuropathic pain in dogs and cats: if only they could tell us if they hurt. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 38(6), 1365–viii.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.09.001>
- Matos, F. J. A. (1996). As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae). Parte I Farmacognosia. *Rev Bras Farm*, 72, 65-67.
- Matos, F.J.A. (2000). *Medicinal Plants: Selection chart and employment plants used in phytotherapy in Northeast Brazil*. Fortaleza-CE: University Press.
- Mattar JR., R.; Azze, R. (2000). *Lesão dos nervos periféricos. Atualização em traumatologia do aparelho locomotor*. São Paulo: Instituto de Ortopédia e Traumatologia, 3-27.
- Matzner, O., Devor, M. (1994). Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels. *Journal of neurophysiology*, 72 (1), 349-359.
- Maynard, L .G., Santos, K. C., Cunha, P. S.(2011). Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Verbenaceae) in rat mesenteric artery. *Indian Journal of Pharmacology*, 43(6), 694-698.
- McMAchlan, E. M., Janig, W., Devor, M., Michaelis, M. (1993). Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature*, London, 363, 10, 543-546.
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*,140, 771–776. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>.

- Menéndez, L., Juárez, L., García, E., García-Suárez, O., Hidalgo, A., Baamonde, A., (2006). Analgesic effects of capsazepine and resiniferatoxin on bone cancer pain in mice. *Neurosci. Lett.* 393, 70–73. doi:org/10.1016/j.neulet.2005.09.046.
- Mercadante, S. (2015). Sympathetic blocks for visceral cancer pain management: A systematic review and EAPC recommendations. *Crit Rev Oncol Hematol*, 96, 577–583.
- Min, B.-W, Kim, Y., Cho, H.M, Park, K-S, Yoon, P. W., Nho, J-H, Kim, S-M, Lee, K-J, Moon, K-H. (2016). Perioperative Pain Management in Total Hip Arthroplasty: Korean Hip Society Guidelines. *Hip Pelvis* 28 (1), 15-23.
- Mizisin, A. P., Weerasuriya, A. (2011). Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathol*, 121, 291-312.
- Moffat, R. e Rae, C. (2010). Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anesthesia and Intensive Care Medicine*, 12(1), 12-15.
- Moraes, T. M., Kushima, H., Moleiro, F. C., Santos, R. C., Rocha, L. R., Marques M. O., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C. A. (2009). Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemical-Biological Interactions*, 180, 14, 499-505.
- Murinson, B. B., Archer, D. R., Li, Y., Griffin, J. W. (2005). Degeneration of myelinated efferent fibers prompts mitosis in Remak Schwann cells of uninjured Cfiber afferents. *J Neurosci*, 25, 1179-1187.
- Murray, B. (2005). Trauma of the nervous system: Pheripheral nerve trauma. In: BRADLEY, W. G. et al. (Ed.). *Neurology in Clinical Praticce: Principles of diagnosis and management*. 4. ed. London: Butterworth Heinemann, 1179-1198.
- Navarro, A., Saldaña, M.T., Pérez, C., Torrades, S., and Rejas, J. (2011). A costconsequences analysis of the effect of pregabalin in the treatment of peripheral neuropathic pain in routine medical practice in primary care settings. *BMC Neurol*, 11,7.
- Navarro, X., Vivó, M., Cabré-Valero, A. (2007). Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress in Neurobiology*, 82, 163-201.
- Navarro, X., Vivo, M., Valero-Cabre, A. (2007). Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*, 82, 163-201.
- Navarro, X.; Verdú, E. Brain damage and repair (2004) . From molecular research to clinical therapy. In: HERDEGEN, T.; DELGADO-GARCIA, J.M. eds. *Cell transplants and artificial guides for nerve repair*. Klumer Dordrech/Boston/London Academic Publishers, 451-471.
- Nikolaeva, M. A., Mukherjee, B., Stys, P. K. (2005). Na⁺-dependent sources of intraaxonal Ca²⁺ release in rat optic nerve during in vitro chemical ischemia. *J Neurosci*, 25,9960-9967.
- Ning, Liu., Yu-Xiang Li., Shuai-Shuai Gong., Juan Du., Gang Liu., Shao-Ju Jin., Cheng-Jun Zhao., Yang Niu., Tao Sun., Jian-Qiang Yu. (2016). Antinociceptive effects of gentiopicroside

on neuropathic pain induced by chronic constriction injury in mice: a behavioral and electrophysiological study. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94, 7, 769-778.

Nishijima, C.M., Ganey, E. G., Mazzardo-Martins, L., Martins, D. F., Rocha, L. R. M., Santos, A. R. S., Hiruma-Lima, C. A. (2014). Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. *Eur. J. Pharmacol*, 736, 16–25.

Nuytten, D., Kupers, R., Lammens, M., Dom, R., Van Hees, J., & Gybels, J. (1992). Further evidence for myelinated as well as unmyelinated fibre damage in a rat model of neuropathic pain. *Experimental brain research*, 91(1), 73–78. <https://doi.org/10.1007/BF00230014>

Okeson JP. (2005). Bell's orofacial pain. The clinical management of orofacial pain. Chicago: Quintessence; 592.

Okuse, K. (2006). Pain signaling pathways: From cytokines to ion channels. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*.

Oliveira, C. J., Araujo, T. L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. (2007). *Revista eletrônica de enfermagem*, 09(01), 93–105.

Oliveira, D. R. (2006). Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 103–108.

Oliveira, F. A., Andrade, L. N., de Sousa, E. B., de Sousa, D. P. (2014). Anti-ulcer activity of essential oil constituents. *Molecules*, 19, 5717–5747.

Ortiz, M. I., Ramirez-Montiel, M. L., González-García, M. P., Ponce-Monter, H. A., Castaneda-Hernandez, G., Carino-Cortes, R. (2010). The combination of naproxen and citral reduces nociception and gastric damage in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 10, 33, 1691-1697.

Paccola, C. C. (2008). Avaliação de possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do C-terminal da S100A9 murina sobre a dor neuropática experimental. (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

Palispis, W. A., Gupta, R. (2017). Surgical repair in humans after traumatic nerve injury provides limited functional neural regeneration in adults. *Exp Neurol*, 290, 106 –114.

Paranagama, P. A, Abeysekera, K. H., Abeywickrama, K., Nugaliyadde L. (2003). Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemon grass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Lett Appl Microbiol*, 37, 86-90.

Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E. (2001). *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 201-214.

Passos, C. S., Arbo, M. D., Rates, S. M. K., Von Poser, G. L. (2009). Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Rev. Bras. Farmacogn*, 19, 140–149.

Patapoutian, A., Tate, S., Woolf, C. J. (2009). Transient Receptor Potential Channels: Targeting Pain at the Source. *Nat.Rev.Drug Discov*, 8(1), 55-68.

- Patel, N. B. (2010). Guide to Pain Management in Low-Resource Settings Chapter 3 IASP, Seattle, *Physiology of Pain*.
- Pathak, N. N. (2013). Antihyperalgesic and anti-inflammatory effects of atorvastatin in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Inflam*, 36, 1468–1478.
- Pereira, R. S., Sumita, T. C., Furlan, M. R., Jorge, A. O. C., Ueno, M. (2004). Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Revista de Saúde Pública*, 38 (2), 326-328.
- Perkins, N. M., and Tracey, D. J. (2000). Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience* 101, 745–757. doi:10.1016/S0306-4522(00)00396-1.
- Poser, G.L.V.; Mentz, L.A. (2003). *Diversidade biológica e sistemas de classificação*. In: SIMÕES, C.M.O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 63-74.
- Pina, L. T. S., Gouveia, D. N., Costa, J. S., Quintans, J. S. S., Quintans-Júnior, L. J., Barreto, R. S. S., Guimarães, A. G., (2017). New perspectives for chronic pain treatment: a patent review (2010–2016). *Expert Opin*, 27, 787–796.
- Pisera, D. (2005). Fisiologia da dor. In: Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais. OTERO, P. E. São Paulo: Interbook, 30-74.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., Lamantia, A. S., Mcnamara, J. O.; Williams, S. M. (2005). Dor. In: Neurociência. 2.ed. Porto Alegre: *Artmed*, 10, 209-221.
- Quintans, J. S., Antonioli, A. R., Almeida, J. R., Santana-Filho, V. J., Quintans-Júnior, L. J (2014) Natural products evaluated in neuropathic pain models—a systematic review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 114, 442–450.
- Quintans-Júnior, L. J., Guimarães, A. G., Araújo, B. E. S., Oliveira, G. F., Santana, M. T., Moreira, F. V., Santos, M. R. V., Cavalcanti, S. C. H., Júnior, W. D. L., Botelho, M. A., Ribeiro, L. A. A., Nóbrega, F. F. F., Almeida, R. N. (2010). Carvacrol, borneol and citral reduce convulsant activity in rodents. *African J. Biotechnol*, 9, 6566–6572.
- Quintans-Júnior, L. J., Souza, T. T., Leite, B. S., Lessa, N. M. N., Bonjardim, L. R., Santos, M. R. V., Alves, P. B., Blank, A. F., Antonioli, A. R. (2008). Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine*, 15, 619–624.
- Quintans-Junior, L., Guimarães, A. G., de Santana, M. T., Araújo, B. E. S., Moreira, F. V., Bonjardim, L. R., Araújo, A. A. S., Siqueira, J. S., Ângelo, A. R., Botelho, M. A., Almeida, J. R. G. S., Santos, M. R. V. (2011). Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. *Rev. Bras. Farmacogn*, 21, 497–502.
- Quintans-Júnior, L., Moreira, J. C. F., Pasquali, M. A. B., Rabie, S. M. S., Pires, A. S., Schröder, R., Rabelo, T. K., Santos, J. P., Lima, P. S. S., Cavalcanti, S. C. H., Araújo, A. S., Quintans, J. S. S., Gelain, D. P., (2013). Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes (+)-

camphene, p-cymene, and geranyl acetate in experimental models. *ISRN Toxicol.* doi: 10.1155/2013/459530.

Rambukkana A. (2010). Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. *Prog Neurobiol*, 91(2), 102-7.

Ramos, A., Visozo, A., Piloto, J., Garcia, C.A., Rodriguez, A., Rivero, R. (2003). Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 241-246.

Rao, G. N., Rao, S. J., Ananthanarayanan, K., Shahi, S. K., Patra, M., Shukla, A. C., Dikshit, A. (2005). Antifungal activity of some chemicals against human pathogenic fungi (dermatophytes). *Proceedings of the National Academy of Sciences India, section B: Biological Sciences*, 288-293.

Retamar, J. A. (1994). Variaciones fitoquímicas de la especie *Lippia alba* (salvia morada) y sus aplicaciones en la química fina. *Essenze Derivati Agrumari*, 16, 55-60.

Rojas, J., Ronceros, S., Palacios, O., Sevilla, C. *Efecto anti-Trypanosoma cruzi del aceite esencial de Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (hierba luisa) en ratones Balb/c. *Anales de la Facultad de Medicina, San Marcos Lima*, 73, 2012, Perú .

Rollins B. J., Morrison, E. D, Stiles, C. D. (1988). Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokinelike properties. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85(11).

Rozwalka, L. C., Lima, M., Mio, L. D., Nakashima, T. (2008). Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. *Ciência Rural*, 38(2), 301-307.

Ruffa, M. J., Wagner, M. L., Suriano, M. (2004). Inhibitory effect of medicinal herbs against RNA and DNA viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 15(3), 153-159.

Rygh, L. J., Hole, K., Tjolsen. (2005). A Molecular Mechanisms in Acute and Chronic Pain States. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening*, 125(17), 2374-2377.

Salimena, F. R. G. (2002). News synonyms and typifications in *Lippia* sect *Rhodolippia* (Verbenaceae). *Darwiniana*, 40, 1-4, 121-125.

Santos, F. A., Rao, V. S. (2001). 1,8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 46(2), 331-337.

Santos, R. I. (2007). *Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários*. In: Simões, C. M. O., Shenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L.A., Petrovick, P. R. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFSC.

Sato, J., Perl, E. R. (1991). Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science*, Washington, 251, 1608-1610.

- Sawada, T., Sano, M., Omura, T., Omura, K., Hasegawa, T., Funahashi, S., Nagano, A. (2007). Spatiotemporal quantification of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 after crush injury in rat sciatic nerve utilizing immunohistochemistry. *Neurosci Lett*, 417,55–60.
- Schaible, H. G., Richter, F. (2004). Pathophysiology of pain. *Langenbeck's Archive Surgery, Berlin*, 389, 237-243.
- Schmidt, B. L., Hamamoto, D.T., Simone, D.A., Wilcox, G.L. (2010). Mechanisms of Cancer. *Pain*, 164–178.
- Schestatsky, P. (2008). Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. *Revista Hospital das Clínicas de Porto Alegre*, 28(3), 177-187.
- Schmalbruch, H. (1986). Fiber composition of the rat sciatic nerve. *The anatomical Record*, 215,71-81.
- Schmalbruch, H. (1986). Fiber composition of the rat sciatic nerve. *The anatomical Record*, 215,71-81.
- Scholz J, Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci*, 1062-7.
- Scholz, J., Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nat Neurosci*, 1062-7.
- Scholz, J., Woolf, C. J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Neuroscience, New York*, 10(11), 1361-1368.
- Schröder J. M. (1972). Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. *Brain Res*, 45, 49–65.
- Sena Filho, J. G., Melo, J. G. S., Saraiva, A. M., Gonçalves, A. M., Psiottano, M. N. C., Xavier, H. S. (2006). Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16, 506-509.
- Shamash, S., Reichert, F., Rotshenker, S. (2002). The cytokine network of Wallerian degeneration: Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *J Neurosci*, 22, 3052–3060.
- Shannon, H. E., Eberle, E. L., Peters, S. C. (2005). Comparison of the effectus of anticonvulsant drugs with diverse mechanisms of action in the formalina test in rats. *Neuropharmacology* 48,1012-1020.
- Sievers, C., Platt, N., Perry, V. H., (2003). Coleman MP, Conforti L: Neurites undergoing Wallerian degeneration show an apoptotic-like process with Annexin V positive staining and loss of mitochondrial membrane potential. *Neurosci Res*, 46, 161-169.
- Silva, L. R., Pereira, R. C. A., Braga, T. R., Bezerra, F. C., Rodrigues, T. H. S. (2012). Produção e rendimento de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. no Ceará em função da época de corte. *Horticultura Brasileira*, 30, S6075-S6080.

- Silva-Alves, K. S., Ferreira-da-Silva, F. W., Peixoto-Neves D, Viana-Cardoso K. V., Moreira-Junior L, Oquendo M.B. (2013). Estragole blocks neuronal excitability by direct inhibition of Na⁺ channels. *Braz J Med Biol Res*, 46,1056-1063, doi:10.1590/1414-431X20133191.
- Simões, C. M. O, Schenkel, E. P, Gossmann, G., Mello, J. C, Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (2010). *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre: Ed- UFSC.
- Siqueira, R. (2007). Lesões nervosas periféricas: uma revisão. *Rev Neurocienc*, 15(3), 226–233.
- Siqueira-Lima, P. S., Araújo, A. A. S., Lucchese, A. M., Quintans, J. S. S., Menezes, P. P., Alves, P. B., de Lucca Júnior, W., Santos, M. R. V., Bonjardim, L. R., Quintans-Júnior, L. J., (2014). Cyclodextrin complex containing Lippia grata leaf essential oil reduces orofacial nociception in mice – evidence of possible involvement of descending inhibitory pain modulation pathway. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*, 114, 188–196.
- Siqueira-Lima, P. S., Brito, R. G., Araújo-Filho, H. G., Santos, P. L., Lucchesi, A., Araújo, A. A. S., Menezes, P. P., Scotti, L., Scotti, M. T., Menezes, I. R. A., Coutinho, H. D. M., Zengin, G., Aktumsek, A., Antonioli, A. R., Quintans-Júnior, L. J., Quintans, J. S. S. (2017). Anti-hyperalgesic effect of Lippia grata leaf essential oil complexed with β -cyclodextrin in a chronic musculoskeletal pain animal model: complemented with a molecular docking and antioxidant screening. *Biomed. Pharmacother*, 91, 739–747.
- Soares, C. S. A., Silva, M., Costa, M. B., Bezerra, C. E. S. (2011). Ação inseticida de óleos essenciais sobre a lagarta desfolhadora Thyrinteina arnobia (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae). *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 6 (2), 154 – 157.
- Soares, L., (2001). *Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de Lippia alba (Miller) NE Brown ex Britt. & Wils. (Falsa-melissa) Verbenaceae*. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-PR.
- Sousa, D. G., Sousa S. D., Silva R. E., Silva-Alves K. S., Ferreira-Da-Silva, F. W., Kerntopf, M. R., Menezes, I. R., Leal-Cardoso, J.H., Barbosa R. (2005). Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block excitability of rat sciatic nerve. *Braz J Med Biol Res*, 48 (8), 697-702.
- Stacey, B. R. (2005). Management of peripheral neuropathic pain. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, Hagerstown, 84(3), 4-16.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., Martinez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography*, 1025(1), 93-103.
- Stashenko, E., Martínez, J., Durán, D., Córdoba, Y., Caballero, D., (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género Lippia (Verbenaceae) cultivadas em Colombi. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 89–105.
- Steeds, C. E. (2013). The anatomy and physiology of pain. *Surgery (Oxford)*, 31(2), 49-53.

- Stefanini, M. B., Rodrigues, S. D., Ming, L. C. (2001). Phyto regulators action in the growth of the erva-cidreira-brasileira. *Brazilian Horticulture*, 20, 18-23.
- Stirling, D. P., Stys, P. K. (2010). Mechanisms of axonal injury: intermodal nanocomplexes and calcium deregulation. *Trends Mol Med*, 16, 160-170.
- Stotz, S. C., Vriens, J., Martyn, D., Clardy, J., Clapham, D. E. (2008). Citral sensing by Transient receptor potential channels in dorsal root ganglion neurons. *Plos one*, 3, e2082. doi:10.1371/journal.pone.0002082.
- Suroowan, S., Mahomoodally, F. (2018). Herbal products for common auto-inflammatory disorders - novel approaches. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 21, 161–174. doi:10.2174/1386207321666180213093449.
- Tamura, N., Kuwabara, S., Misawa, S., Kanai, K., Nakata, M., Sawai, S. (2006). Increased nodal persistent Na⁺ currents in human neuropathy and motor neuron disease estimated by latent addition. *Clin Neurophysiol*, 117, 2451–8.
- Tavares, I. B., Momenté, V. G., Nascimento, I. R. (2011). *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agrônômicos. *Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, 4(1), 204–220.
- Teixeira, M.J. (2001). Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. *Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacia*, Curitiba, 1 (4), 329-334.
- Thiagarajan, V. R. K., Shanmugam, P., Krishnan, U. M., Muthuraman, A., Singh, N. (2012). Ameliorative potential of butea monosperma on chronic constriction injury of sciatic nerve induced neuropathic pain in rats. *Anais da Acad Bras Ciências*, 84, 1091-1104.
- Trapp, B. D., Hauer, P., Lemke, G. (1988). Axonal regulation of myelin protein mRNA levels in actively myelinating Schwann cells. *J Neurosci*, 8,3515-3521.
- Toth, C. (2011). Substitution of Gabapentin therapy with pregabalin therapy in neuropathic pain due to peripheral neuropathy. *Pain Med*, 11, 456–465.
- Tranquilli, W. J. (2004). Fisiologia da dor aguda. In: GREENE, S. A. Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor. Porto Alegre, *Artmed*, 399-402.
- Treede, R. D. (2016). Gain control mechanisms in the nociceptive system. *Pain*, 157, 1199–1204.
- Treede, R.-D. (2008). Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*, 70, 1630–1635.
- Tremont-Lukats, I. W., Megeff, C., Bakonja, M. M. (2000). Anticonvulsants for neuropathic pain syndromes. *Drugs*, 60, 1029-1052.
- Trevisani, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D. M., Nassini, R., Campi, B., Imamachi, N., Andre, E., Patacchini, R., Cottrell, G. S., Gatti, R., Basbaum, A.I., Bunnett, N. W., Julius, D., Geppetti, P. (2007). Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 104 (33),13519-13524. doi: 10.1073/pnas.0705923104

Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., da CC., Miethke, T., Kirschning, C. J., Hacker, H., Wagner, H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem*, 276, 31332-31339.

Valeriano, C., Piccoli, R. H., Cardoso, M., Alves, E. (2012). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(1), 57-67.

Vargas, F. S., Oliveira, C., F., Giro, E. M., Sacramento, L. V., Spolidorio, D. M., Costa, C. A. S. (2010). Efeito Antimicrobiano e Citotóxico do Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus* sobre Células Odontoblastóides. *Revista Odontológica do Brasil Central*, 19(49), 101-107.

Vargas, M. E., Barres, B. A. (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci*, 30,153-179.

Viana, G. S. B., Do Vale, T. G., Rao, V. S. N., Matos, F. J. A. (1998). Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. *Pharmaceutical Biology*, 36(5), 347-351.

Waller, A. (1850). Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations on the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 140, 423–9.

Walters, E.T. (1994). Injury-related behavior and neuronal plasticity: an evolutionary perspective on sensitization, hyperalgesia, and analgesia. *Int Rev Neurobiol*, 36, 325–427.

Wang, L., and Wang, Z. (2003). Animal and cellular models of chronic pain. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 55, 949–965.

Wang, L., Yuan, D., Zhang, D., Zhang, W., Liu, C., Cheng, H.,Watkins, L. R., Maier, S. F. (2000). The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. *Annu Rev Psychol*, 51, 29–57.

Wang, L., Yuan, D., Zhang, D., Zhang, W., Liu, C., Cheng, H. (2015). Ginsenoside Re promotes nerve regeneration by facilitating the proliferation, differentiation and migration of Schwann cells via the ERK- and JNK-dependent pathway in rat model of sciatic nerve crush injury. *Cell. Mol. Neurobiol*. 35, 827–840. doi: 10.1007/s10571-015-0177-7.

Widerström-Noga, E. G., Felipe-Cuervo, E., Broton, J. G., Duncan, R. C., Yeziarski, R. P. (1999). Perceived difficulty in dealing with consequences of spinal cord injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil*, 80, 580–586.

Woolf, C. J. (2004). Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: Implications for diagnosis and therapy. *Life Sciences*, Oxford, 74, 2605-2610.

- Wood, J. N., Boorman, J. P., Okuse, K., Baker, M. D. (2004). Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *Journal of Neurobiology*, Hoboken, 61(1), 55-71.
- Woolf, C. J., Max, M. B. (2001). Mechanisms-based pain diagnosis. *Anesthesiology*, Philadelphia, 95, 241-249.
- Yanes, C. R. E. (2011). *Evaluación de la actividad repelente e insecticida de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas utilizados contra Tribolium castaneum herbst (coleoptera: tenebrionidae)*. (Tese de Doutorado), Universidade Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Yague, J. G, Foffani, G., Aguilar, J. (2011). Cortical hyperexcitability in response to preserved spinothalamic inputs immediately after spinal cord hemisection. *Exp Neurol*, 227, 252–263.
- Zanotti, S., Kumar, A., Kumar, A., (2002). Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expet Opin. Invest. Drugs*, 11, 1061–1075.
- Zernikow, B. (2015). Invasive treatments for complex regional pain syndrome in children and adolescents: a scoping review. *Anesthesiology*, 122, 699–707.
- Zétola, M., De Lima, T. C. M., Sonaglio, D., González-Ortega, G., Limberger, R. P., Petro-vick, P. R., Bassani, V. L. (2002). CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian false melissa). *J. Ethnopharmacol*, 82, 207–215.
- Zhu, X., Yao, L., Yang, X., Sun, H., Guo, A., Li, A., Yang, H. (2014). Spatiotemporal expression of KHSRP modulates Schwann cells and neuronal differentiation after sciatic nerve injury. *Int J Biochem Cell Biol* 48:1-10.
- Zimmermann M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *European journal of pharmacology*, 429(1-3), 23–37. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01303-6](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01303-6)
- Zoghbi, M. D. G. B., Andrade, E. H. A., Santos, A. S., Silva, M. H. L., Maia, J. G. S. (1998). Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour and Fragrance Journal*, Glasgow, 13(1), 47-48.

APÊNDICE

| Tratamentos | Dias de avaliação | | | | |
|-------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 0 | 5° | 7° | 9° | 14° |
| CON | 22,40 ± 0,92 g | 25,31 ± 1,17 g | 28,80 ± 1,24 g | 27,60 ± 2,04 g | 27,27 ± 1,32 g |
| CON+OELa | 17,15 ± 1,91 g | 61,05 ± 5,67 g | 103,7 ± 6,58 g | 50,56 ± 5,46 g | 52,03 ± 9,92 g |
| CCNC | 19,64 ± 1,98 g | 43,65 ± 4,56 g | 13,06 ± 1,08 g | 11,22 ± 2,19 g | 11,23 ± 1,19 g |
| CCNC+OELa | 23,63 ± 2,99 g | 54,87 ± 6,38 g | 70,68 ± 2,65 g | 42,66 ± 1,02 g | 44,20 ± 3,83 g |

Tabela 05: Médias dos grupos experimentais no teste de von-Frey em ratos (valores expressos em média e EPM; n=5).

| Tratamentos | Dias de avaliação | | | | |
|-------------|-------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| | 0 | 5° | 7° | 9° | 14° |
| CON | 27,40 ± 2,9 s | 23,20 ± 0,9 s | 22,40 ± 2,3 s | 22,80 ± 2,1 s | 23,00 ± 1,6 s |
| CON+OELa | 27,5 ± 0,74 s | 25,5 ± 3,93 s | 35,00 ± 1,84 s | 28,40 ± 2,65 s | 27,6 ± 3,17 s |
| CCNC | 25,6 ± 1,6 s | 20,8 ± 1,82 s | 20,2 ± 1,2s | 17,2 ± 2,26 s | 20,76 ± 3,04 s |
| CCNC+OELa | 26,4 ± 3,01 s | 24,2 ± 1,68 s | 27,2 ± 2,72 s | 18,8 ± 0,8 s | 26,5 ± 2,72 s |

Tabela 06: Médias dos grupos experimentais no teste da Placa quente em ratos (valores expressos em média e EPM; n=5)

ANEXO

Parecer da Comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
Fone: (84) 9229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br



CERTIFICADO

Natal (RN), 28 de agosto de 2017.

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo do tratamento com óleo essencial da *Lippia alba* em ratos com imobilização da pata traseira: avaliação dos parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos do nervo ciático e do gânglio da raiz dorsal**”, **PARECER nº 034.017/2017**, sob a responsabilidade de **Exedito Silva do Nascimento Júnior**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado, após adequações, pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.

| | |
|----------------------------|---|
| Vigência do Projeto | JUNHO 2019 |
| RELATÓRIO | JUNHO 2019 |
| Espécie/Linhagem | Ratos Wistar |
| Número de Animais | 24 |
| Idade/Peso | 8 semanas / 200-250g |
| Sexo | Machos e Fêmeas |
| Origem | Biotério do Centro de Biociências – UFRN |
| Manutenção | Biotério do Centro de Biociências – UFRN |

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a **elaboração de relatório** de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída. **O descumprimento desta norma inviabilizará a submissão de projetos futuros.**


José de Castro Souza Neto Júnior
Coordenador da CEUA-UFRN



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
Fone: (84) 9229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br



CERTIFICADO

Natal (RN), 10 de outubro de 2017.

Certificamos que o ADENDO da proposta intitulada “**Estudo do tratamento com óleo essencial da *Lippia alba* em ratos com imobilização da pata traseira: avaliação dos parâmetros eletrofisiológicos e morfológicos do nervo ciático e do gânglio da raiz dorsal**”, PARECER nº 047.017/2017, sob a responsabilidade de **Exedito Silva do Nascimento Júnior**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.

Motivo do adendo: substituição da técnica de imobilização do membro posterior direito do rato para *o modelo de constrição crônica do nervo ciático*.

| | |
|----------------------------|--|
| Vigência do Projeto | JUNHO 2019 |
| RELATÓRIO | JULHO 2019 |
| Espécie/Linhagem | Ratos Wistar |
| Número de Animais | Aprovado em Agosto 2017: 24 Solicitado em Outubro 2017: 5 Total: 29 |
| Idade/Peso | 8 semanas / 200-250g |
| Sexo | Machos e Fêmeas |
| Origem | Biotério do Centro de Biociências – UFRN |
| Manutenção | Biotério do Centro de Biociências – UFRN |

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a **elaboração de relatório** de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída. **O descumprimento desta norma inviabilizará a submissão de projetos futuros.**


José de Castro Souza Neto Júnior
Coordenador da CEUA-UFRN

Composição química (%) do óleo essencial de *Lippia alba* (OELa)

LAUDO DE ANÁLISE

Nº DO LAUDO: 23.02.2019

INTERESSADO: PEDRO MILITAO-UECE

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA RECEBIDA: OLEO ESSENCIAL DE LIPPIA ALBA

ANÁLISE: DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS.

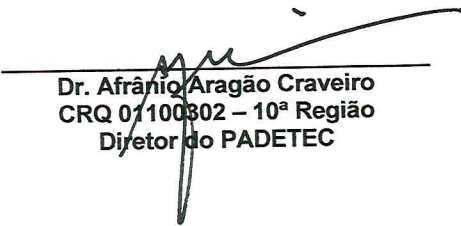
MÉTODO: CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA.

RESULTADOS:

| PICO | R.TIME | TEOR(%) | PROBABILIDADE DE ACERTO(%) | COMPOSTO |
|------|--------|---------|----------------------------|-----------------------|
| 1 | 7.777 | 2.87 | 93 | DIACECTONE ALCOHOL |
| 2 | 15.120 | 1.31 | 91 | METHYL-5-HEPTEN-2-ONE |
| 3 | 17.451 | 4.41 | 94 | PARA CYMENE |
| 4 | 17.709 | 12.54 | 96 | LIMONENE |
| 5 | 30.419 | 28.21 | 85 | NERAL |
| 6 | 30.732 | 6.50 | 97 | CARVONE |
| 7 | 32.121 | 42.59 | 93 | GERANIAL |
| 8 | 47.174 | 1.57 | 90 | BETA-ELEMENE |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

Estes dados referem-se apenas a estas amostras e não tem valor extrapolativo para outras Amostras ou lotes do mesmo produto.

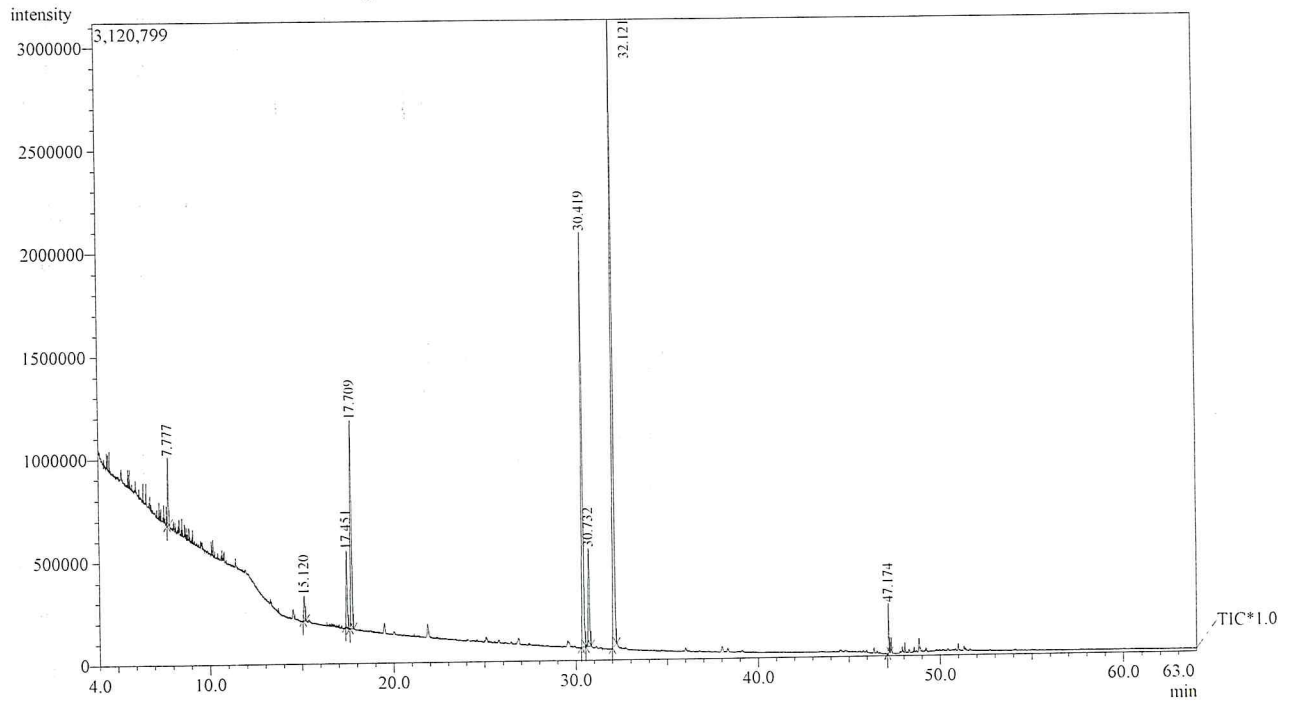
Fortaleza, 25 DE FEVEREIRO de 2019



Dr. Afrânio Aragão Craveiro
CRQ 07100302 – 10ª Região
Diretor do PADETEC

PARQUE DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
CENTRAL ANALÍTICA I - LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA
SISTEMA GC/EM - SHIMADZU GCMS QP2010s

Chromatogram
Chromatogram OEIa C:\GCMSsolution\Data\amostras\UECE\OE Lippia alba Fevereiro 2019.qgd



GCMS Sample Information

OPERADOR: Admin
 CODIGO : OEIa DATA: 22/2/2019 17:01:54
 AMOSTRA - Amostra: Oleo Essencial Lippia alba Fevereiro 2019
 Solicitante: Pedro Militão
 Origem: UECE
 injeção 1 ul
 OPERADOR: Afranio Craveiro
 METODO - C:\GCMSsolution\Data\metodos\oleo-spl.qgm

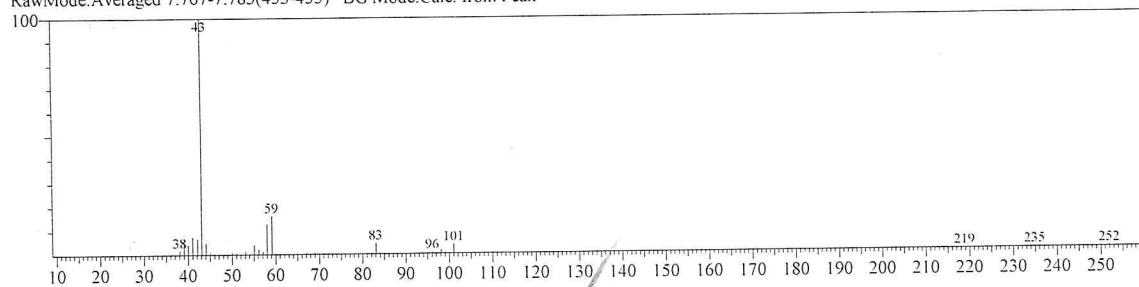
GCMS Peak Report TIC

| Peak# | R.Time | Area | Height | A/H | Mark | Name | Base m/z | Area% |
|-------|--------|----------|---------|------|------|------|----------|--------|
| 1 | 7.777 | 1036561 | 329335 | 3.15 | | | 43.05 | 2.87 |
| 2 | 15.120 | 472795 | 120678 | 3.92 | | | 43.10 | 1.31 |
| 3 | 17.451 | 1592712 | 375317 | 4.24 | | | 119.15 | 4.41 |
| 4 | 17.709 | 4524269 | 1010414 | 4.48 | | | 68.10 | 12.54 |
| 5 | 30.419 | 10179405 | 2017277 | 5.05 | | | 41.10 | 28.21 |
| 6 | 30.732 | 2343718 | 477516 | 4.91 | V | | 82.05 | 6.50 |
| 7 | 32.121 | 15367050 | 3050196 | 5.04 | | | 41.10 | 42.59 |
| 8 | 47.174 | 567038 | 246130 | 2.30 | | | 41.10 | 1.57 |
| | | 36083548 | 7626863 | | | | | 100.00 |

Analisado por

GCMS Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:7.775(Scan#:454) MassPeaks:55 BasePeak:43.05(164860)
RawMode:Averaged 7.767-7.783(453-455) BG Mode:Calc. from Peak

Hit#:1 Entry:10274 Library:Wiley229.lib

SI:93 Formula:C6 H12 O2 CAS:123-42-2 MolWeight:116 RetIndex:0

CompName:2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol SS 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- SS 4-Hydroxy-4-methyl-2-penta

Hit#:2 Entry:10273 Library:Wiley229.lib

SI:93 Formula:C6 H12 O2 CAS:123-42-2 MolWeight:116 RetIndex:0

CompName:2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol SS 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- SS 4-Hydroxy-4-methyl-2-penta

Hit#:3 Entry:10271 Library:Wiley229.lib

SI:93 Formula:C6 H12 O2 CAS:123-42-2 MolWeight:116 RetIndex:0

CompName:2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol SS 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- SS 4-Hydroxy-4-methyl-2-penta

Hit#:4 Entry:10276 Library:Wiley229.lib

SI:92 Formula:C6 H12 O2 CAS:123-42-2 MolWeight:116 RetIndex:0

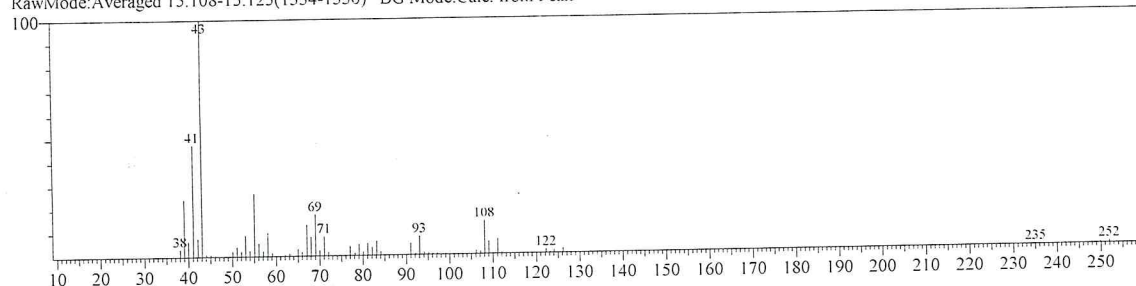
CompName:2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl- (CAS) Diacetone alcohol SS 4-PENTANONE, 2-HYDROXY-2-METHYL- SS 4-Hydroxy-4-methyl-2-penta

Hit#:5 Entry:10432 Library:Wiley229.lib

SI:92 Formula:C6 H12 O2 CAS:0-00-0 MolWeight:116 RetIndex:0

CompName:4-HYDROXY-4-METHYL-2-PENTANONE SS

<< Target >>

Line#:2 R.Time:15.117(Scan#:1335) MassPeaks:59 BasePeak:43.10(28703)
RawMode:Averaged 15.108-15.125(1334-1336) BG Mode:Calc. from Peak

Hit#:1 Entry:13990 Library:Wiley229.lib

SI:91 Formula:C8 H14 O CAS:110-93-0 MolWeight:126 RetIndex:0

CompName:6-Methyl-5-hepten-2-one SS 5-Hepten-2-one, 6-methyl- (CAS) 6-Methyl-5-heptene-2-one SS 6-METHYLHEPT-5-EN-2-ONE SS (6-methyl)-E-

Hit#:2 Entry:13991 Library:Wiley229.lib

SI:91 Formula:C8 H14 O CAS:110-93-0 MolWeight:126 RetIndex:0

CompName:6-Methyl-5-hepten-2-one SS 5-Hepten-2-one, 6-methyl- (CAS) 6-Methyl-5-heptene-2-one SS 6-METHYLHEPT-5-EN-2-ONE SS (6-methyl)-E-

Hit#:3 Entry:13992 Library:Wiley229.lib

SI:91 Formula:C8 H14 O CAS:110-93-0 MolWeight:126 RetIndex:0

CompName:6-Methyl-5-hepten-2-one SS 5-Hepten-2-one, 6-methyl- (CAS) 6-Methyl-5-heptene-2-one SS 6-METHYLHEPT-5-EN-2-ONE SS (6-methyl)-E-

Hit#:4 Entry:14173 Library:Wiley229.lib

SI:90 Formula:C8 H14 O CAS:0-00-0 MolWeight:126 RetIndex:0

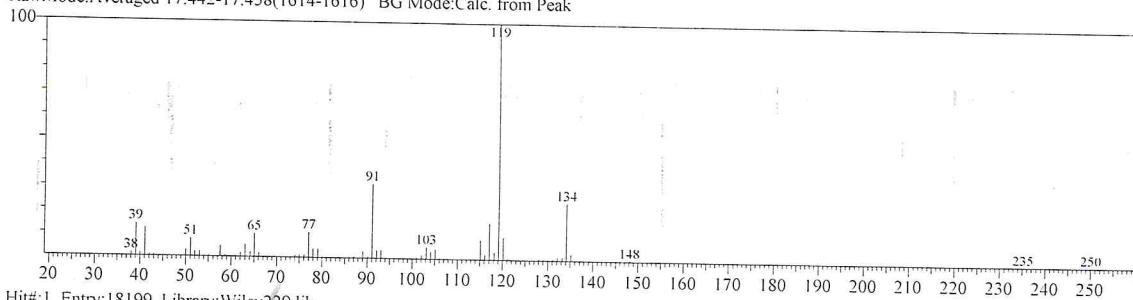
CompName:6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE B SS

Hit#:5 Entry:13988 Library:Wiley229.lib

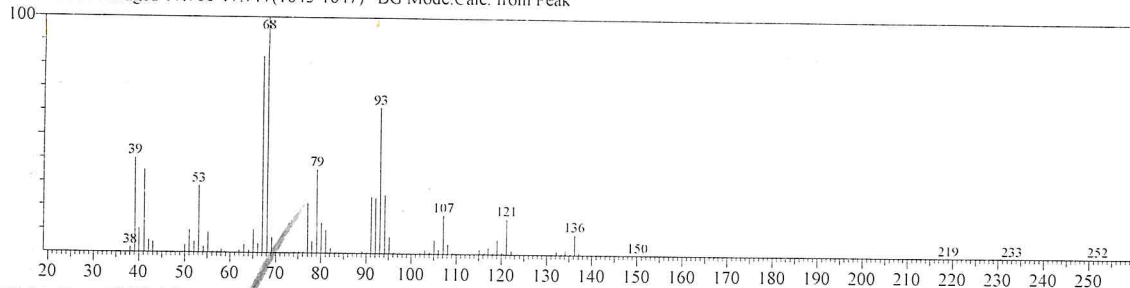
SI:90 Formula:C8 H14 O CAS:110-93-0 MolWeight:126 RetIndex:0

CompName:6-Methyl-5-hepten-2-one SS 5-Hepten-2-one, 6-methyl- (CAS) 6-Methyl-5-heptene-2-one SS 6-METHYLHEPT-5-EN-2-ONE SS (6-methyl)-E-

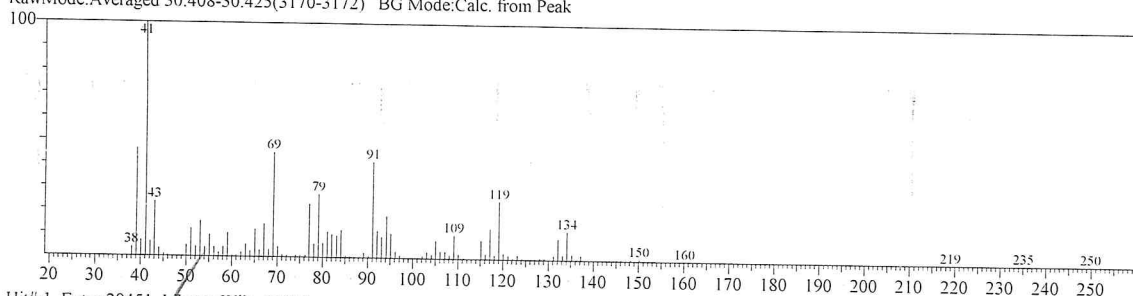
<< Target >>

Line#:3 R.Time:17.450(Scan#:1615) MassPeaks:70 BasePeak:119.15(112548)
RawMode:Averaged 17.442-17.458(1614-1616) BG Mode:Calc. from PeakHit#:1 Entry:18199 Library:Wiley229.lib
SI:94 Formula:C10 H14 CAS:99-87-6 MolWeight:134 RetIndex:0
CompName:PARA CYMENE SSHit#:2 Entry:18183 Library:Wiley229.lib
SI:94 Formula:C10 H14 CAS:99-87-6 MolWeight:134 RetIndex:0
CompName:p-cymene SS 1-methyl-4-isopropylbenzene SSHit#:3 Entry:18076 Library:Wiley229.lib
SI:94 Formula:C10 H14 CAS:99-87-6 MolWeight:134 RetIndex:0
CompName:Benzen, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) p-Cymene SS 1-Methyl-4-isopropylbenzene SS p-Cymol SS p-Cimene SS Camphogen SS DolcymeHit#:4 Entry:18060 Library:Wiley229.lib
SI:94 Formula:C10 H14 CAS:535-77-3 MolWeight:134 RetIndex:0
CompName:Benzen, 1-methyl-3-(1-methylethyl)- (CAS) m-Cymene SS 1-Methyl-3-isopropylbenzene SS m-Cymol SS .beta.-Cymene SS m-IsopropyltoluenHit#:5 Entry:18068 Library:Wiley229.lib
SI:93 Formula:C10 H14 CAS:99-87-6 MolWeight:134 RetIndex:0
CompName:Benzen, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (CAS) p-Cymene SS 1-Methyl-4-isopropylbenzene SS p-Cymol SS p-Cimene SS Camphogen SS Dolcyme

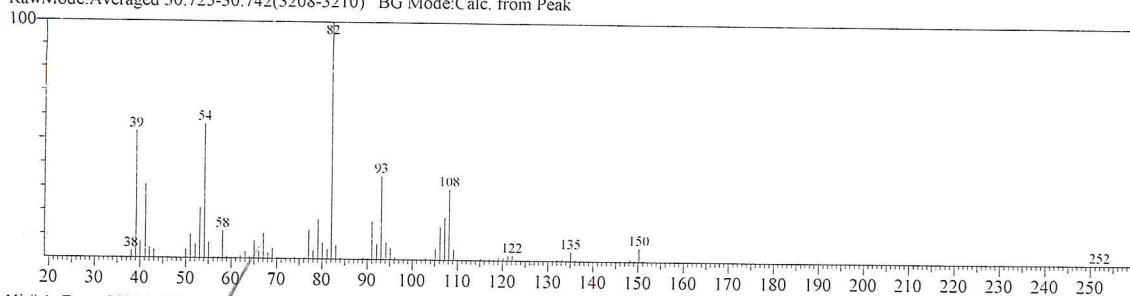
<< Target >>

Line#:4 R.Time:17.708(Scan#:1646) MassPeaks:80 BasePeak:68.10(146740)
RawMode:Averaged 17.700-17.717(1645-1647) BG Mode:Calc. from PeakHit#:1 Entry:19686 Library:Wiley229.lib
SI:96 Formula:C10 H16 CAS:5989-54-8 MolWeight:136 RetIndex:0
CompName:I-LIMONENE SSHit#:2 Entry:19417 Library:Wiley229.lib
SI:94 Formula:C10 H16 CAS:5989-27-5 MolWeight:136 RetIndex:0
CompName:Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (R)- (CAS) D-1,8(9)-P-MENTHADIENE,(D-1-METHYL-4-ISOPROPENYL)CYCLOHEXENE :Hit#:3 Entry:19413 Library:Wiley229.lib
SI:94 Formula:C10 H16 CAS:138-86-3 MolWeight:136 RetIndex:0
CompName:dl-Limonene SS Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)- (CAS) 1-P-MENTHA-1,8-DIENE SS Limonene SCinen SS Nesol SS Cinene SS LiHit#:4 Entry:19345 Library:Wiley229.lib
SI:93 Formula:C10 H16 CAS:22769-00-2 MolWeight:136 RetIndex:0
CompName:TRANS-1,2-DIISOPROPENYL-CYCLOBUTANE SSHit#:5 Entry:19682 Library:Wiley229.lib
SI:93 Formula:C10 H16 CAS:138-86-3 MolWeight:136 RetIndex:0
CompName:LIMONENE SS

<< Target >>

Line#:5 R.Time:30.417(Scan#:3171) MassPeaks:114 BasePeak:41.10(287907)
RawMode:Averaged 30.408-30.425(3170-3172) BG Mode:Calc. from PeakHit#:1 Entry:29451 Library:Wiley229.lib
SI:85 Formula:C10 H16 O CAS:106-26-3 MolWeight:152 RetIndex:0
CompName:neral SSHit#:2 Entry:29301 Library:Wiley229.lib
SI:84 Formula:C10 H16 O CAS:106-26-3 MolWeight:152 RetIndex:0
CompName:Z-Citral SS 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)- (CAS) Neral SS .beta.-Citral SS cis-Citral SS Citral b SS cis-3,7-Dimethyl-2,6-octadienal SS (Z)-:Hit#:3 Entry:29300 Library:Wiley229.lib
SI:82 Formula:C10 H16 O CAS:106-26-3 MolWeight:152 RetIndex:0
CompName:Z-Citral SS 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)- (CAS) Neral SS .beta.-Citral SS cis-Citral SS Citral b SS cis-3,7-Dimethyl-2,6-octadienal SS (Z)-:Hit#:4 Entry:29546 Library:Wiley229.lib
SI:82 Formula:C10 H16 O CAS:106-26-3 MolWeight:152 RetIndex:0
CompName:NERAL SSHit#:5 Entry:31212 Library:Wiley229.lib
SI:82 Formula:C10 H18 O CAS:106-24-1 MolWeight:154 RetIndex:0
CompName:trans-Geraniol SS 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (E)- (CAS) Guaniol SS Lemonol SS Geraniol SS Geranyl alcohol SS 2,6-Dimethyl-2,6-octad

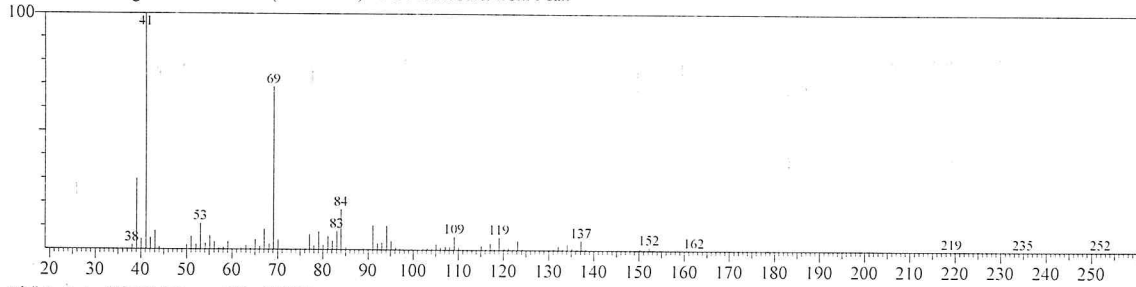
<< Target >>

Line#:6 R.Time:30.733(Scan#:3209) MassPeaks:78 BasePeak:82.05(82159)
RawMode:Averaged 30.725-30.742(3208-3210) BG Mode:Calc. from PeakHit#:1 Entry:28041 Library:Wiley229.lib
SI:97 Formula:C10 H14 O CAS:99-49-0 MolWeight:150 RetIndex:0
CompName:CARVONE SSHit#:2 Entry:27856 Library:Wiley229.lib
SI:95 Formula:C10 H14 O CAS:2244-16-8 MolWeight:150 RetIndex:0
CompName:2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (S)- (CAS) d-Carvone SS (+)-Carvone SS (S)-Carvone SS D(+)-Carvone SS Carvone, (+)-Hit#:3 Entry:28035 Library:Wiley229.lib
SI:95 Formula:C10 H14 O CAS:99-49-0 MolWeight:150 RetIndex:0
CompName:CARVONE SSHit#:4 Entry:27854 Library:Wiley229.lib
SI:94 Formula:C10 H14 O CAS:2244-16-8 MolWeight:150 RetIndex:0
CompName:2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, (S)- (CAS) d-Carvone SS (+)-Carvone SS (S)-Carvone SS D(+)-Carvone SS Carvone, (+)-Hit#:5 Entry:27864 Library:Wiley229.lib
SI:94 Formula:C10 H14 O CAS:99-49-0 MolWeight:150 RetIndex:0
CompName:2-Cyclohexen-1-one, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)- (CAS) 2-METHYL-5-ISOPROPENYL-2-CYCLOHEXENONE SS Carvol SS Karvon SS C

<< Target >>

Line#:7 R.Time:32.125(Scan#:3376) MassPeaks:114 BasePeak:41.10(719693)

RawMode:Averaged 32.117-32.133(3375-3377) BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:29298 Library:Wiley229.lib

SI:94 Formula:C10 H16 O CAS:106-26-3 MolWeight:152 RetIndex:0

CompName:Z-Citral \$\$ 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)- (CAS) Neral \$\$.beta.-Citral \$\$ cis-Citral \$\$ Citral b \$\$ cis-3,7-Dimethyl-2,6-octadienal \$\$ (Z)-

Hit#:2 Entry:29291 Library:Wiley229.lib

SI:94 Formula:C10 H16 O CAS:141-27-5 MolWeight:152 RetIndex:0

CompName:E-Citral \$\$ 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (E)- (CAS) Geranial \$\$ trans-Citral \$\$ Citral a \$\$ Citral-a \$\$ (E)-Citral \$\$ Geranaldehyde \$\$.alpha.-

Hit#:3 Entry:29301 Library:Wiley229.lib

SI:94 Formula:C10 H16 O CAS:106-26-3 MolWeight:152 RetIndex:0

CompName:Z-Citral \$\$ 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)- (CAS) Neral \$\$.beta.-Citral \$\$ cis-Citral \$\$ Citral b \$\$ cis-3,7-Dimethyl-2,6-octadienal \$\$ (Z)-

Hit#:4 Entry:29555 Library:Wiley229.lib

SI:93 Formula:C10 H16 O CAS:141-27-5 MolWeight:152 RetIndex:0

CompName:GERANIAL \$\$

Hit#:5 Entry:29304 Library:Wiley229.lib

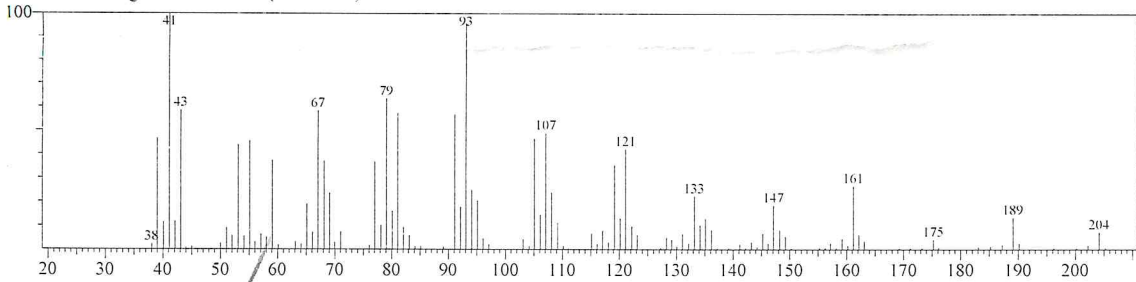
SI:92 Formula:C10 H16 O CAS:5392-40-5 MolWeight:152 RetIndex:0

CompName:Citral \$\$ 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl- (CAS) 3,7-Dimethyl-2,6-octadienal \$\$ 3,7-Dimethyl-1-2,6-octadienal \$\$

<< Target >>

Line#:8 R.Time:47.175(Scan#:5182) MassPeaks:110 BasePeak:41.10(15089)

RawMode:Averaged 47.167-47.183(5181-5183) BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:71116 Library:Wiley229.lib

SI:90 Formula:C15 H24 CAS:515-13-9 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:.beta.-elemene \$\$

Hit#:2 Entry:71191 Library:Wiley229.lib

SI:89 Formula:C15 H24 CAS:515-13-9 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:.BETA. ELEMENE \$\$

Hit#:3 Entry:70800 Library:Wiley229.lib

SI:88 Formula:C15 H24 CAS:15423-57-1 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:Germacrene B (CAS) 1,5-Cyclodecadiene, 1,5-dimethyl-8-(1-methylethylidene)-, (E,E)- \$\$ Germacra-1(10),4,7(11)-triene \$\$ Germacra-1(10),4

Hit#:4 Entry:71105 Library:Wiley229.lib

SI:88 Formula:C15 H24 CAS:489-39-4 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:Aromadendrene \$\$

Hit#:5 Entry:70871 Library:Wiley229.lib

SI:88 Formula:C15 H24 CAS:3691-11-0 MolWeight:204 RetIndex:0

CompName:.delta.-Guaiene \$\$ Azulene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,7.alpha.,8a.beta.)]- (CAS) .alpha.-Buln