



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PALOMA KÊNIA DE MORAES BERENGUEL LOSSAVARO

**PROPRIEDADES ANTIARTRÍTICA E ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE YLANG-YLANG (*Cananga odorata*) EM MODELOS
EXPERIMENTAIS**

CAMPO GRANDE

2022

PALOMA KÊNIA DE MORAES BERENGUEL LOSSAVARO

**PROPRIEDADES ANTIARTRÍTICA E ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE YLANG-YLANG (*Cananga odorata*) EM MODELOS
EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho

**CAMPO GRANDE
2022**

FOLHA DE APROVAÇÃO

PROPRIEDADES ANTIARTRÍTICA E ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE YLANG-YLANG (*Cananga odorata*) EM MODELOS EXPERIMENTAIS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, com requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

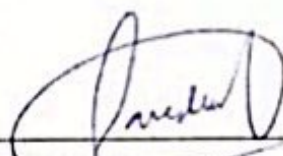
Aprovada em 16 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA



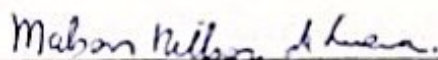
Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Wanderley e Luciane, por me permitir que esse sonho torne-se realidade. Minhas irmãs Pâmela e Paola, que me apoiaram e estiveram comigo desde sempre. Minha afilhada Helena, que veio para dar mais brilho em minha vida tornando tudo mais alegre, por quem tudo sempre valerá a pena lutar e conquistar.

Aos meus amigos, que me incentivaram e não me deixaram desistir. Me aconselharam e me alegraram em dias difíceis.

A todos os professores, com quem tive a oportunidade de aprender. Com eles tudo é possível. Dedico, principalmente, a minha professora e avó Arbanizia Moraes de Souza.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me manter confiante e esperançosa, me abençoando nos dias difíceis e nos dias alegres, não permitindo que eu desistisse. Me manteve em pé, saudável e forte para enfrentar as lutas do dia a dia. Agradeço a sua fiel proteção e ao seu amor inigualável. “Aquietai-vos, e sabeí que sou Deus” (Salmo 46:10).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Saulo Euclides Silva Filho, pela competente orientação e empenho, que com muita paciência me ensinou, aperfeiçoou e orientou para que pudesse me tornar uma profissional mais capacitada. Obrigada por me aceitar como sua orientanda, foi um privilégio aprender com você.

A minha mãe Luciane Moraes de Souza Lossavaro e ao meu pai Wanderley Berenguel Lossavaro, pelo apoio e motivação, pois sempre estiveram comigo, mesmo que de longe, me acolhendo e protegendo com muito amor e companheirismo.

As minhas irmãs, Pâmela Késsia e Paola Keila, pelo companheirismo, amizade, força, e um amor incomparável. A minha sobrinha e afilhada Helena Gomes de Moraes Berenguel, por ser minha maior alegria e motivação. Sem vocês a vida não seria a mesma.

Aos meus amigos, em especial a Natalia Prates e Thais Mariquito, que estiveram comigo no dia a dia, passando por todas as dificuldades e presenciando todos os momentos. Agradeço por sempre estarem comigo, e acreditarem no meu potencial. Por me ouvirem diversas vezes falar sobre meu trabalho e fazerem da dificuldade algo divertido e leve.

Ao meu namorado, Luiz Pael, pela paciência, carinho e companheirismo. Por me motivar a estudar e correr atrás dos meus sonhos.

A Dr.^a Catarina Akiko Miyamoto, minha eterna professora de Bioquímica e da vida, que me incentivou para o mundo acadêmico e me ajudou a conquistar esse sonho.

Aos integrantes do Laboratório de Farmacologia e Inflamação (LABFAR/UFMS), Dr.^a Mônica Cristina Toffoli Kadri, professora e mulher inspiradora, um exemplo de humanidade, amor, alegria e confiança. Sou grata pelos ensinamentos e paciência. A técnica Iluska Senna Bonfá, que é mais que uma técnica para mim, é uma grande amiga que o mestrado me presenteou. Uma companheira de laboratório e café, parceira, conselheira e que diverte todos os meus dias. A Joyce Lencina, com seu jeito meigo, me abraçou como amiga e me ajudou nos momentos que mais precisei, sou eternamente grata a você e por ter sua amizade. A Josylen Lousada Felipe, além da ajuda com experimentos, se tornou uma amiga muito especial. Ao Robson A. F. Junior, pela amizade e apoio nos experimentos iniciais. Ao técnico Valter José da Silva, pela ajuda no cuidado dos animais, manutenção dos equipamentos e do laboratório. A

todos que citei anteriormente, faltariam palavras para expressar a imensa gratidão que sinto por trabalhar com vocês.

A todos que contribuíram com seus respectivos laboratórios em parceria para a finalização deste trabalho, em especial aos Professores Dr.^a Luciane Candeloro e Dr. Edgar Julian Paredes Gamero.

Aos alunos de iniciação científica (PIBIC), Amanda, João Victor e Gustavo, pelo auxílio na realização dos experimentos designados a cada um.

As minhas amigas de mestrado Giovanna Azevedo e Larissa Figueira pelas risadas, desabafos, trabalhos realizados juntas e palavras de incentivo, que me fizeram sentir amparada e contribuíram para essa conquista.

A Banca Examinadora por compartilhar, por meio da avaliação desta dissertação, seus conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que forneceu suporte financeiro para a execução desse trabalho.

Por fim, a todos que não citei, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja financeiramente ou por orações.

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

Conforme as normas fixadas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, esta dissertação é composta por introdução geral sobre o trabalho, uma revisão de literatura sobre o tema abordado, justificativa para realização da pesquisa, objetivos da pesquisa e um artigo científico a ser submetido ao periódico *Inflammopharmacology* (Fator de impacto JCR 5,093 - Qualis/CAPES A2).

LOSSAVARO, Paloma Kênia de Moraes Berenguel. Propriedades antiartrítica e antinociceptiva do óleo essencial de Ylang-ylang (*Cananga odorata*) em modelos experimentais. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica, caracterizada por um processo inflamatório crônico nas articulações. O tratamento envolve o uso de muitas classes de fármacos, como por exemplo os anti-inflamatórios, porém o uso de anti-inflamatórios torna-se limitado devido aos efeitos colaterais que estes fármacos provocam. O Ylang-ylang (*Cananga odorata*) é uma planta medicinal da família Annonaceae, com atividade anti-inflamatória já descrita na literatura, em modelos de inflamação aguda. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade do óleo essencial de ylang-ylang (*Cananga odorata*) (OEY) em modelo experimental de artrite, inflamação persistente e nocicepção em roedores. O tratamento por via oral com OEY nas doses de 100 e 200 mg/kg promoveu a redução da infiltração leucocitária na cavidade articular de camundongos submetidos à artrite induzida por zymosan, nos tempos de 6 horas e 7 dias após a indução da artrite. Nestas mesmas doses, o tratamento com OEY reduziu a formação de edema articular nos tempos de 4 e 6 horas após indução da artrite e, apenas na dose de 200 mg/kg, o tratamento com OEY reduziu a hiperalgesia mecânica nos tempos de 3 e 4 horas após a indução da artrite. Na dose de 200 mg/kg, o tratamento com OEY reduziu a produção de interleucina-6 (IL-6), 6 horas após a indução da artrite. Em 7 dias após a indução da artrite, a análise histológica demonstrou que o tratamento com OEY na dose de 200 mg/kg reduziu danos na cartilagem de camundongos artríticos. Na dose 200 mg/kg o tratamento com OEY reduziu a formação de edema e hiperalgesia mecânica em modelo de inflamação persistente induzida por Adjuvante Completo de Freud (CFA) em camundongos. O tratamento com OEY, na dose de 200 mg/kg, reduziu a resposta nociceptiva em modelos experimentais de nocicepção induzida por ácido acético e formalina. Em conclusão, o OEY inibiu parâmetros inflamatórios em modelo de artrite experimental, apresentou atividade em modelo de inflamação persistente induzida por CFA e resposta nociceptiva em roedores. O OEY pode ser um potencial produto natural para o tratamento de lesões decorrentes de doenças inflamatórias crônicas, como a AR.

Palavras-chave: ylang-ylang, artrite, inflamação persistente, produtos naturais.

ABSTRACT

LOSSAVARO, Paloma Kênia de Moraes Berenguel. Antiarthritic and antinociceptive properties of Ylang-ylang (*Cananga odorata*) essential oil in experimental models. Dissertation (Masters in Pharmaceutical Sciences). Federal University of Mato Grosso do Sul.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease, characterized by a chronic inflammatory process in the joints. Treatment involves the use of many classes of drugs, such as anti-inflammatories, but the use of anti-inflammatories becomes limited due to the side effects that these drugs cause. Ylang-ylang (*Cananga odorata*) is a medicinal plant of the Annonaceae family, with anti-inflammatory activity already described in the literature, in models of acute inflammation. The aim of this study was to evaluate the activity of ylang-ylang essential oil (*Cananga odorata*) (YEO) in an arthritis experimental model, persistent inflammation and nociception in rodents. Oral treatment with YEO at doses of 100 and 200 mg/kg reduced leukocyte infiltration in the joint cavity of mice submitted to zymosan-induced arthritis, at 6 hours and 7 days after arthritis induction. At these same doses, treatment with YEO reduced the formation of joint edema at 4 and 6 hours after arthritis induction and, only at a dose of 200 mg/kg, treatment with YEO reduced mechanical hyperalgesia at 3 and 4 hours. hours after arthritis induction. At a dose of 200 mg/kg, treatment with YEO reduced interleukin-6 (IL-6) production 6 hours after arthritis induction. At 7 days after arthritis induction, histological analysis demonstrated that treatment with YEO at a dose of 200 mg/kg reduced cartilage damage in arthritic mice. At a dose of 200 mg/kg, treatment with YEO reduced edema formation and mechanical hyperalgesia in a model of persistent inflammation induced by Complete Freud's Adjuvant (CFA) in mice. Treatment with YEO, at a dose of 200 mg/kg, reduced the nociceptive response in experimental models of nociception induced by acetic acid and formalin. In conclusion, YEO inhibited inflammatory parameters in an experimental arthritis model, showed activity in a model of persistent inflammation induced by CFA and nociceptive response in rodents. YEO may be a potential natural product for the treatment of lesions resulting from chronic inflammatory diseases, such as RA.

Keywords: yland-ylang, arthritis, persistent inflammation, natural products.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 - Estrutura da articulação sinovial.....30

Figura 2 - Morfologia da planta *C. odorata*.....36

Artigo

Figure 1 - Effect of YEO treatment reduced knee joint edema formation.....60

Figure 2 - Effect of YEO treatments on mechanical hyperalgesia in *Swiss* mice.....61

Figure 3 - Effect of YEO treatment on reduce leukocytes recruitment.....62

Figure 4 - Effect of YEO treatment on the reduction of IL-6 levels.....62

Figure 5 - Effect of YEO on cartilage histopathology.....63

Figure 6 - Effect of YEO treatment reduces paw edema and mechanical hyperalgesia
in the CFA-induced persistent inflammation model.....64

Figure 7 - Effect of YEO treatment reduces abdominal writhing induced by acetic acid.....65

Figure 8 - Effect of YEO treatment reduces formalin-induced paw nociception in mice.....66

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1 - Cartilage histopathology.....	58
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais

AR: Artrite reumatoide

AZy: Artrite induzida por zymosan

CFA: adjuvante completo de Freund (do inglês *complete Freund adjuvant*)

COX-1: ciclooxigenase 1

COX-2: ciclooxigenase 2

DAMPs: padrões moleculares associados a danos

DMARDs: drogas antirreumáticas modificadoras de doenças

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)

ERO: espécies reativas de oxigênio

GC/MS: cromatografia gasosa/espectrometria de massa (do inglês *Gas chromatography/Mass Spectrometry*)

i.a.: intra-articular

i.p.: intraperitoneal

IL: interleucina

LD₅₀: dose letal média (do inglês *median lethal dose*)

MNs: leucócitos mononucleares

NO: óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)

OEY: óleo essencial de ylang-ylang

PAMPs: padrões moleculares associados a danos patógenos

PBS: tampão fosfato-salino (do inglês *phosphate buffered saline*)

PGs: Prostaglandinas

PMNs: leucócitos polimorfonucleares

TLR: do inglês *toll like receptor*

TNF: fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1. Resposta Inflamatória	27
2.2. Artrite Reumatoide	28
2.3. Dor	30
2.4. Modelo experimental de artrite induzida por zymosan	32
2.5. Modelo de inflamação persistente induzida por CFA	33
2.6. Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	33
2.7. Teste de nocicepção induzida por formalina	34
2.8. Produtos naturais e óleos essenciais	34
2.9. Ylang-ylang (<i>Cananga odorata</i>)	35
3. JUSTIFICATIVA	38
4. OBJETIVOS	40
4.1. Objetivo geral	41
4.2. Objetivos específicos	41
5. REFERÊNCIAS	42
6. ARTIGO CIENTÍFICO	51
ANEXOS – Aprovação do protocolo experimental pela CEUA/UFMS	76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta de tecidos vivos contra uma lesão ou um patógeno. Essa resposta promove sinais clínicos como calor, rubor, dor, edema e perda da função tecidual (VARELA et al., 2018), podendo ser dividida em duas fases: aguda ou crônica. A inflamação aguda é de curta duração, com infiltrado de células polimorfonucleares, como os neutrófilos, além de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de proteínas plasmáticas (SOUTO et al., 2011; CASTANHEIRA e KUBES 2019). A inflamação crônica se desenvolve ao longo de semanas ou anos e é marcada por destruição tecidual e infiltração de células mononucleares, como monócitos e linfócitos, além de fibrose e angiogênese (ROCK e KONO 2008; YEUNG et al., 2018). Esse processo resulta da persistência do estímulo inflamatório ou da ineficácia da resposta inflamatória aguda, podendo gerar processos patológicos crônicos ou autoimunes, como a doença de Alzheimer, esclerose múltipla e artrite reumatoide (AR) (YEUNG et al., 2019).

A AR é uma doença autoimune caracterizada por um processo inflamatório crônico nas articulações. Vários sintomas são descritos para a AR, tais como: edema e dor articular, deformidade articular progressiva, destruição da membrana sinovial e remodelação. A AR é uma doença multifatorial, que afeta principalmente as mulheres. Dudics et al. (2018) mostraram que a taxa mundial de prevalência de AR foi de 0,5% a 1%. Pacientes com AR têm expectativa de vida reduzida, devido a morbidade e complicações decorrentes da doença. O tratamento para melhorar a qualidade de vida, reduzir sintomas e retardar a progressão da doença envolve o uso de muitas classes de medicamentos, como por exemplo anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), corticosteroides e drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs) (PANDOLFI et al., 2020; LI et al., 2022).

Os anti-inflamatórios hormonais ou não hormonais, são usados para tratar doenças inflamatórias agudas ou crônicas. No entanto, o uso repetido desses medicamentos está associado a vários efeitos adversos, como toxicidade renal, hepática e cardiovascular (DUDICS et al., 2018). Por outro lado, plantas aromáticas e produtos naturais com propriedades anti-inflamatórias são utilizados há anos pela população, como alternativa terapêutica para as mais diversas doenças (NUNES et al., 2020).

A *Cananga odorata* Hook. F. & Thomson, popularmente conhecida como Ylang-ylang, é uma planta aromática. Esta espécie é nativa da Ásia e pode ser encontrada em países tropicais úmidos (TAN et al., 2015). O óleo essencial de ylang-ylang (OEY) é obtido das flores de *C. odorata* e é usado em cosméticos e aromaterapia (TAN et al., 2015; SHAHBAZI,

2016). Vários constituintes do OEY, como álcoois, ésteres, cetonas e aldeídos alifáticos, são responsáveis pela fragrância (ASTANI et al., 2010; TAN et al., 2015; AZIZ et al., 2018). Algumas propriedades biológicas do OEY são descritas na literatura, como atividades antimicrobiana (INDRAKUMAR et al., 2012; KUSUMA et al., 2014), antioxidante (SACCHETTI et al., 2005), sedativa (PUJIART et al., 2012), anti-inflamatória (FREITAS JUNIOR et al., 2022) e antirreumáticas (CHOI e HWAN 2005; WE e SHIBAMOTO, 2010; TAN et al., 2015). E em um trabalho recente, o OEY demonstrou ter atividade no alívio da dor neuropática e na melhora da ansiedade associada à dor (BORGONETTI et al., 2022). A toxicidade do OEY em camundongos não é considerada alta ($LD_{50} > 2 \text{ g/kg}$), sugerindo um bom perfil de segurança (FREITAS JUNIOR et al., 2022).

Portanto, devido aos efeitos nocivos decorrentes do uso de anti-inflamatórios clássicos, é relevante a pesquisa de produtos naturais com atividade anti-inflamatória e menos efeitos adversos. Ainda não há trabalhos que demonstrem o efeito do OEY em modelos experimentais de artrite e dor inflamatória. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do OEY em modelo experimental de artrite, bem como avaliar o efeito deste óleo essencial na inflamação persistente e nocicepção em roedores.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Resposta inflamatória

O processo inflamatório é uma resposta de tecidos vivos vascularizados frente a uma lesão tecidual ou agente infeccioso, envolvendo uma ação coordenada do sistema imune e do tecido lesionado (SING et al., 2019). A inflamação é um dos processos mais importantes contra lesões ou infecções microbianas (ABDULKHALEQ et al., 2018) e envolve a participação de componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis (mediadores inflamatórios), levando ao desenvolvimento de sinais clínicos característicos, como: rubor, calor, edema e dor. Ainda, a perda da função foi posteriormente incluída como um quinto sinal, que pode surgir em decorrência da não resolução do processo inflamatório (RUDOLPH, 1858). Além disso, a inflamação tem como finalidade a eliminação do agente agressor e das consequências vindas desta agressão (ROCHA; SILVA, 1978).

A resposta inflamatória envolve a participação de indutores, sensores e mediadores. Os indutores podem ser microrganismos infecciosos ou estímulos não infecciosos, como toxinas, corpos estranhos, sinais de células necrosas e tecidos danificados. Os sensores são moléculas especializadas que são ativadas pelos indutores desencadeando a liberação de mediadores. Esses mediadores são produtos químicos endógenos que podem induzir a sensação de dor, promover ou inibir inflamação e reparação tecidual e ativar os efeitos em tecidos ou células (MEDZHITOV, 2008). O grau desta resposta vai depender dos estímulos iniciantes ou da sua persistência do processo, tendo como objetivo prevenir o agravamento da infecção do tecido atingido e promover reparo (VARELA; MOGILDA et al., 2018).

Assim, a resposta inflamatória é classificada em aguda e crônica. Em geral, a fase aguda dessa resposta pode durar poucas horas ou até algumas semanas. A inflamação aguda caracteriza-se pela expansão dos vasos sanguíneos (vasodilatação), aumento no fluxo sanguíneo, aumento de permeabilidade capilar e migração/infiltração de células polimorfonucleares (PMN) para o tecido inflamado, através da parede capilar (diapedese) (RANKIN, 2004; YEUNG et al., 2018). Estas células são ativadas pelos chamados padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou a patógenos (PAMPs) e iniciam o recrutamento, aumentando o número de células de defesa para resolução da inflamação (CASTANHEIRA; KUBES, 2019; MEDZHITOV, 2010; YEUNG et al., 2018).

Já na inflamação crônica, temos como características uma longa duração do processo, além da infiltração das células do tipo mononucleares, produzindo citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, enzimas e, conseqüentemente, contribuindo para a

progressão de danos teciduais e reparação secundária, incluindo fibrose e formação de granuloma. Portanto, a inflamação crônica é conhecida por se desenvolver em um período prolongado e indeterminado, podendo persistir por meses ou até mesmo anos (PAHWA; GOYAL; JIALAL, 2022).

O processo inflamatório e as tentativas de reparação tecidual ocorrem simultaneamente (WATSON et al., 2017). Além de patógenos persistentes, agentes físicos ou químicos, suscetibilidade genética, persistência de corpos estranhos, exposições químicas contínuas, infecções crônicas, danos aos tecidos que não foram reparados, alérgenos persistentes, entre outros. São razões cruciais para o estabelecimento de uma inflamação crônica, caracterizada por infiltração de células mononucleares (MN), como monócitos, linfócitos e plasmócitos, além de estar relacionada com a fagocitose deficiente de células apoptóticas presentes na resolução da inflamação (SERHAN; SAVILL, 2005; NATHAN, 2006; SERHAN, 2017; GERMOLÉC et al., 2018; YEUNG et al., 2018).

O número de doenças relacionadas a mediadores moleculares da inflamação é grande e crescente e por isso mais estudos as doenças inflamatórias crônicas são necessários e de extrema importância para melhor compreensão das condições clínicas relacionadas, como por exemplo a AR (MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV, 2010; ARULSELVAN, 2016; CERVERA et al., 2022). A interação entre células do sistema imune inato, sistema imune adaptativo e mediadores inflamatórios orquestram aspectos da inflamação aguda e crônica, que são a base de diversas doenças, contribuindo para o dano tecidual, estresse oxidativo, remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e fibrose em diversos tecidos (LIBBY, 2007).

2.2. Artrite Reumatoide

A AR é uma doença autoimune inflamatória crônica, que provoca danos articulares, incapacidade dos movimentos e mortalidade (TANG et al., 2022). Esta doença é mais comum entre as mulheres, com prevalência mundial de 0,5% à 1,0% (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). O início e o desenvolvimento da AR estão ligados a diversas variáveis hereditárias, ecológicas e socioeconômicas. Vários estados inflamatórios e desfechos em AR são causados por má alimentação, tabagismo, alteração da microbiota intestinal, distúrbios periodontais e infecções bacterianas ou virais, que contribuem para sua patogênese. Além disso, pacientes com AR têm expectativa de vida reduzida, devido à morbidade e complicações decorrentes da doença (BUNGAU et al., 2021).

Ainda, a AR é caracterizada por uma falha de resolução espontânea da inflamação, com o desenvolvimento de poliartrite crônica que atinge uma ou mais articulações, principalmente articulações das mãos, pés e joelhos. A fisiopatologia da AR é resultante da ação das células T e B autorreativas, que levam à infiltração celular e a um processo desorganizado de destruição e remodelação óssea, destruição progressiva da cartilagem, membrana sinovial hiperplásica invasiva (formação de *pannus*) e dor nas articulações. Consequentemente, há uma limitação funcional para o paciente, o que leva ao aumento da incapacidade e mortalidade devido ao processo inflamatório intenso (GOELDNER et al., 2011; SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

A membrana sinovial é a principal fonte proeminentes de citocinas e proteases, como também as integrinas, selectinas e membros da superfamília das imunoglobulinas. As células presentes no líquido sinovial produzem uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF). Citocinas pró-inflamatórias e proteases, em conjunto com osteoclastos e condrócitos, promovem a destruição articular. Projeções de tecido proliferativo penetram na cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo, com infiltração de células imunes, levando a formação do *pannus*, característico da AR (ZAISS et al., 2021). O *pannus* pode ser composto de macrófagos, fibroblastos, células dendríticas ou plasmáticas e células inflamatórias, causando danos e formação de erosão nas articulações atingidas (Figura 1) (KAUR et al., 2020; JANG; KWON; LEE, 2022).

Muitas opções terapêuticas estão disponíveis para a AR, que ajudam a mudar o prognóstico da doença. As DMARDs, como o metotrexato, que são utilizados como tratamento para permitirem que os pacientes mantenham a doença sob controle e levem uma vida normal, no entanto, muitos pacientes com AR não foram capazes de completar o tratamento, pois nem todos os pacientes respondem a esses medicamentos e sua qualidade de vida é severamente prejudicada (PANDOLFI et al., 2020). Além dos antirreumáticos, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são atualmente usados no tratamento farmacológico da AR, pois limitam a síntese de prostaglandina suprimindo as enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e, portanto, reduzem sinais e sintomas da doença. Fármacos como meloxicam, diclofenaco, indometacina, cetoprofeno, naproxeno ibuprofeno e outros se enquadram nessa categoria (BUNGAU et al., 2021). Entre os efeitos adversos mais prevalentes dos anti-inflamatórios clássicos, estão os danos gástricos, lesão renal e hepática, além de problemas cardiovasculares (BANGAU et al., 2021).

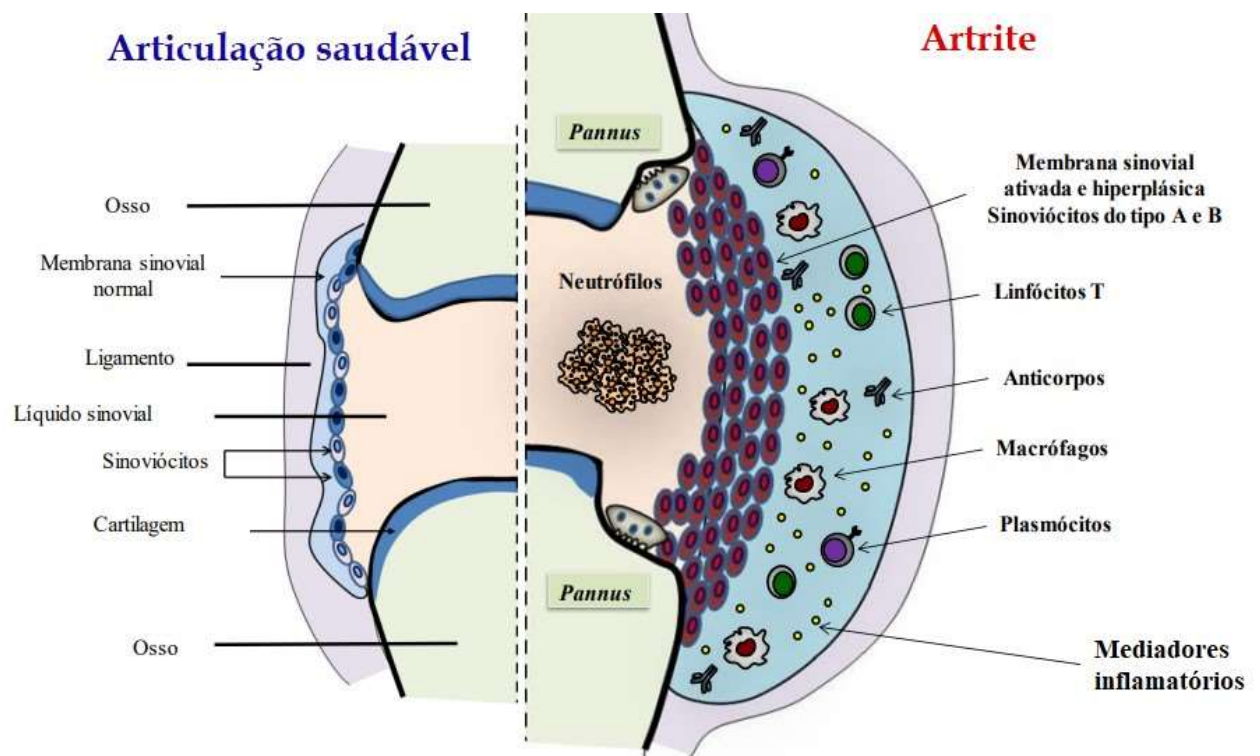


Figura 1. Estrutura da articulação sinovial de um indivíduo saudável e um indivíduo com artrite reumatoide (Adaptado de Patakas, 2011).

Mesmo que o avanço e as opções terapêuticas estejam sendo ampliados e resultem em melhora do prognóstico da AR, a prevenção da progressão da AR ainda é inadequada e, portanto, novas terapias antiartríticas e anti-inflamatórias são necessárias, principalmente para aliviar a dor e a progressão da AR em pacientes artríticos.

2.3. Dor

As vias da dor formam um sistema complexo, dinâmico, sensorial e comportamental que evoluíram para detectar, integrar e coordenar uma resposta protetora aos estímulos nocivos recebidos que ameaçam a lesão tecidual ou a sobrevivência do organismo, ou seja, a dor é um mecanismo de proteção fisiológica e tem impacto em relação a aspectos psicológicos, sociais, culturais, ambientais e emocionais (LOESER; TREED, 2008; BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014).

A dor pode ser classificada em nociceptiva, inflamatória e patológica. A dor nociceptiva representa a sensação associada à detecção de estímulos nocivos potencialmente danosos ao tecido e é protetora. A nociceção está relacionada a processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos (BARROT, 2012; LOESER; TREED, 2008). O termo nociceção refere-se ao estímulo doloroso e não leva em consideração a resposta emocional, apenas mecanismos neurológicos e as vias neuroanatômicas, além da

percepção do sinal que o estímulo lesivo causa em receptores específicos. Os nociceptores são fibras Aδ e fibras C, capazes de receber, codificar e traduzir o estímulo nocivo que causa lesão tecidual (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014; ST. JOHN SMITH, 2018). Tais receptores são polimodais, pois respondem a diferentes estímulos de natureza heterogênea, como mecânicos (por exemplo, alta pressão), térmicos (temperaturas muito altas ou muito baixas) e químicos (como mediadores inflamatórios) (RADU et al., 2013; FRIAS; MERIGHI, 2016; CATA et al., 2022). A dor patológica é um estado de doença causado por dano ao sistema nervoso (neuropático) ou por sua função anormal (disfuncional) (WOOLF, 2010).

A dor inflamatória está associada ao dano tecidual e à infiltração de células imunes e pode auxiliar no reparo por causar hipersensibilidade à dor até que ocorra a cicatrização. A dor inflamatória é um dos sinais cardinais da inflamação e é tipicamente o sintoma mais persistente. Quando a dor se estende, deixa de oferecer um papel de proteção ao organismo e passa a causar sofrimento, podendo evoluir de dor aguda para dor crônica (JULIUS; BASBAUM, 2001; MACINTYRE et al., 2010; MILLS, NICOLSON e SMITH, 2019). Ainda, a dor inflamatória é causada por sensibilização dos nociceptores, podendo ser uma lesão tecidual causada por queimaduras, traumas, infecção, resposta imune exacerbada, tumores (SCHAIBLE, 2006; 2007; WOOLF, 2010) ou pela liberação de mediadores inflamatórios (histamina, serotonina, citocinas e prostaglandinas (PGs) (MILLAN, 2002). Esses mediadores inflamatórios alteram o limiar nociceptivo, causando mudanças no tecido inflamado e no sistema nervoso, sensibilizando diretamente o neurônio nociceptivo periférico e desencadeando um processo conhecido como hiperalgesia (CUNHA et al., 2008).

A dor gera um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes com AR. É um dos problemas mais relatados, identificado como uma das piores consequências da doença e estão relacionadas à fadiga e ao sofrimento psicológico, impactando na diminuição da produtividade, problemas psicológicos, incapacidade de se movimentar, perturbação no sono e utilizações constantes de medicamentos (MCWILLIAMS e WALSH, 2017). Entre as causas deste processo doloroso estão a inflamação nas articulações e destruição da cartilagem. As características da dor na AR geralmente estão associadas com a dor neuropática, pois o processamento da dor pelo sistema nervoso central pode contribuir para aumentar a dor da AR (SOMMER; LEINDERS; ÜÇEYLER, 2018; HART e NIELSON, 2018). Além disso, mediadores inflamatórios, como citocinas, podem provocar sensibilização central da dor em modelos animais e tanto a inflamação local quanto a sistêmica podem contribuir para o aumento da dor central na AR.

Para avaliar a hiperalgesia em modelos experimentais, observa-se a redução do limiar nociceptivo, a partir de um estímulo inflamatório ou por administração de agentes flogísticos como zymosan, adjuvante completo de Freund (CFA), ácido acético e formalina, que permitem relacionar o processo inflamatório com a hipernocicepção (LAM, 1996; CHU et al., 2005; GUERRERO et al., 2011). Esses modelos demonstram comportamentos que ocorrem quando os estímulos nociceptivos estão ativados ou quando há a produção rápida de mediadores endógenos que sensibilizam nociceptores e reproduzem efeitos que se assemelham a certas doenças (VERRI et al., 2006; MACINTYRE et al., 2010).

2.4. Modelo experimental de Artrite Induzida por Zymosan (AZy)

A artrite induzida por zymosan (AZy) em camundongos foi escrita pela primeira vez por Keystone (1977). A AZy é um modelo experimental muito utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório de diversos compostos, devido ao baixo custo operacional e reprodução das lesões em tempo reduzido. Neste modelo, inicialmente é observado um aumento da permeabilidade vascular, com consequente edema local e acentuado influxo leucocitário com predominância de células PMN. Posteriormente em fase tardia, ocorre sinovite progressiva com hiperplasia sinovial, infiltrado MN e ativação de fibroblastos, assemelhando-se ao *pannus* reumatoide (BEZERRA et al., 2004).

O zymosan promove o surgimento de parâmetros inflamatórios semelhantes a AR e por esse motivo é um modelo muito utilizado em animais para estudar novas abordagens terapêuticas para esta doença (GUAZELLI et al., 2018). O zymosan é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* e tem a propriedade de induzir uma resposta inflamatória quando injetado na cavidade articular de ratos, camundongos e coelhos, com persistente proliferação do líquido sinovial e degradação da cartilagem, reproduzindo a maioria dos achados da AR (GEGOUT et al., 1995).

A injeção intra-articular (i.a.) de zymosan induz periartrite com um pico de hipernocicepção entre a terceira e quarta hora, acompanhado de edema local. Na segunda hora após a injeção i.a. de zymosan os animais desenvolvem incapacidade articular progressiva, caracterizada pela dificuldade de andar, atingindo o pico entre a terceira e quarta hora. Na sexta hora após a injeção i.a. de zymosan acontece o pico de influxo de células PMN na cavidade articular e no 7º dia após a injeção i.a. de zymosan acontece influxo de células MN, hiperplasia sinovial com formação de *pannus* e degradação da cartilagem articular (DA ROCHA et al., 2004). O processo inflamatório induzido por zymosan é resultado da ativação de *toll-like receptor 2* (TLR-2) e *toll-like receptor 6* (TLR-6). No processo inflamatório

induzido por zymosan, o fator de transcrição NF- κ B é ativado, sendo um regulador chave na expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF, IL-1 β , IL-6, quimiocinas e óxido nítrico (NO) (GUERRERO et al., 2012).

2.5. Modelo de inflamação persistente induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA)

O adjuvante completo de Freund (CFA) consiste em suspensão de *Mycobacterium tuberculosis*, inativadas pelo calor, em óleo. O CFA tem sido usado para induzir inflamação e estudar a dor inflamatória em vários modelos animais (FEHRENBACHER et al., 2012; NAVARRO-ALVAREZ et al., 2018).

A atividade inflamatória do CFA resulta da liberação sustentada de antígenos depositados no veículo oleoso e estimulação de uma resposta imune inata local, provocando uma reação de hipersensibilidade tardia com intensa reação inflamatória e hiperalgesia no local da injeção. A reação inflamatória que ocorre nesse modelo não é infecciosa, mas sim, uma resposta imunomediada contra alguns constituintes da bactéria injetada. A indução da artrite induzida por CFA pode resultar em monoartrite ou poliartrite. A poliartrite é desenvolvida quando o adjuvante é administrado na superfície intraplantar. Uma vez que o CFA é administrado por via intraplantar, há uma indução de inflamação periférica, com consequente aumento na liberação de TNF, IL-1 β e outros mediadores, 3 horas após a sua aplicação (NEUGEBAUER et al., 2007).

Esse modelo é amplamente empregado na pesquisa de novas alternativas terapêuticas para o controle da dor e inflamação, estabelecendo um modelo de grande similaridade com doenças crônicas humanas, como a AR, visto que a injeção intraplantar de CFA produz hiperalgesia intensa, poliartrite, edema e inflamação persistente, gerando dor e desconforto (WOOLF; COSTIGAN, 1999; STILLS, 2005; ALMARESTANI et al., 2011).

2.6. Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético

A administração intraperitoneal (i.p) de solução de ácido acético produz uma resposta nociceptiva, provocando reações de contorções característica em animais de experimentação. O modelo de contorções induzidas por ácido acético é um método químico utilizado para induzir a dor inflamatória para a nocicepção aguda (SATYANARAYANAA et al., 2014)

Neste teste, a injeção i.p de ácido acético promove contorções abdominais, causa lesões teciduais e libera substâncias que sensibilizam os nociceptores causando dor, incluindo

PGs, mediadores inflamatórios e aminas vasoativas, como serotonina e bradicinina. Portanto, esses estímulos dolorosos causados pelo ácido acético vão ativar nociceptores nos terminais das fibras nervosas sensoriais. Desta forma, o teste nociceptivo é usado para determinar a analgesia central e periférica (BALLOU et al., 2000; RIBEIRO et al., 2000; MUHAMMAD et al., 2014; NAGHIZADEH; MANSOURI; GHORBANZADEH, 2016). Portanto, o método de contorção abdominal é muito utilizado na pesquisa para obtenção de moléculas com atividade analgésica (SATYANARAYANAA et al., 2014).

2.7. Teste de nocicepção induzida por formalina

O teste da formalina é amplamente utilizado em estudos de dor (nocicepção) e alguns de seus mecanismos se assemelham àqueles subjacentes à dor clínica em humanos. Após a injeção intraplantar de formalina, são desencadeadas duas fases. A fase inicial, é de comportamento nociceptivo forte, caracterizado por lamber, morder, levantar e sacudir a pata. Essa fase dura 5 minutos e ocorre através da sensibilização direta aos nociceptores pelo estímulo nocivo, ou seja, está diretamente ligada à estimulação dos neurônios sensoriais primários com ativação direta da fibra C devido ao estímulo periférico. A segunda fase ou fase tardia, dura em média de 15 à 30 minutos, onde é reproduzida uma reação inflamatória, ativando a liberação e a produção de vários mediadores inflamatórios que causam uma resposta inflamatória dolorosa, incluindo PGs, que reduzem o limiar de dor (ROSLAND et al., 1990; DUAN et al., 2019; NORIEGA et al. 2020).

2.8. Produtos naturais e óleos essenciais

Os produtos naturais são utilizados desde a antiguidade, antes mesmo da introdução de drogas sintéticos. O homem primitivo contava com as propriedades curativas das plantas medicinais e até hoje recorre ao uso destas plantas, devido ao fácil acesso e ao baixo custo. As crenças diziam que as plantas supriam os homens com alimentos e tratamento médico, devido a suas propriedades observadas como conservantes de alimentos e medicinais. Assim como as plantas aromáticas, que são muito utilizadas para produtos de cosméticos e utilizadas também na culinária, seu uso para fins terapêuticos tem aumentado muito devido às suas propriedades biológicas. Essas propriedades são, em parte, atribuídas aos óleos essenciais e seus constituintes, que são muito utilizados como aromatizantes para bebidas alcoólicas, refrigerantes e alimentos e na indústria farmacêutica. Os óleos essenciais são utilizados como agentes flavorizantes para mascarar o sabor desagradável dos medicamentos e, na perfumaria,

formam a base de muitas fragrâncias (AHVAZI et al., 2012; ZAGO et al., 2020; AHMADI et al., 2022).

Entretanto, os óleos essenciais (OEs) são compostos voláteis, naturais, complexos, caracterizados pelo forte odor e são produzidos por plantas aromáticas, como metabólitos secundários, essas plantas geralmente são localizadas em países mais quentes, como países mediterrâneos e tropicais, onde representam uma grande parte na farmacopeia tradicional. Os OEs, tem características específicas por serem líquidos, voláteis, límpidos, lipossolúveis e com baixa coloração, mas muita das vezes amarelado e podem ser extraídos por todas as partes da planta, ou seja, flores, folhas, caules, galhos, sementes, madeira, casca, raízes ou frutos (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES et al., 2016; THOMFORD et al., 2018).

Fatores ambientais, como sazonalidade, mudanças climáticas, tipos de solos e idade da planta, por exemplo, podem exercer uma grande influência na composição, produção e concentração dos constituintes presentes nos OEs. Para determinar os compostos químicos presentes nos OEs, são utilizadas técnicas cromatográficas, como por exemplo, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa ou cromatografia líquida de alta eficiência. Portanto os OEs são recomendados para tratar diversas doenças devido às suas propriedades antimicrobiana, antivirais, antimutagênicas, anticancerígenas, antioxidantes, imunomoduladoras, antiprotozoárias e anti-inflamatórias (NIKSIC et al., 2017; MA; SHI e ZHANG, 2019; CARDIA et al., 2021; AHMADI et al., 2022; BORGONETTI et al., 2022). Devido seu baixo custo e poucos efeitos adversos, estudos utilizando produtos naturais como os OES tem aumentado.

2.9. Ylang-ylang (*Cananga odorata*)

A *Cananga odorata* Hook. F. & Thomson, conhecida popularmente como ylang-ylang (Figura 2), é uma planta de médio porte, pertencente à família Annonaceae, nativamente encontrada na Ásia tropical, como Filipinas, Malásia, Indonésia e algumas outras ilhas do Oceano Índico, principalmente as ilhas Comoro e Madagascar. Muitos produtos já são comercializados com a *C. odorata*, como sabonetes, incensos, velas aromáticas, óleos massageadores, entre outros. A flor de *C. odorata* é frequentemente usada para produzir óleos essenciais devido ao seu aroma característico, que é comumente aplicado na aromaterapia, indústria de perfumes, indústria de alimentos ou indústria farmacêutica (LEUNG E FOSTER 2003; TAN et al., 2015; PAVELA et al., 2020)

O óleo essencial de ylang-ylang (OEY) é obtido das flores da planta *C. odorata* por hidrodestilação, maceração, ou extração por solvente. Na indústria alimentícia, o OEY é utilizado como aromatizante em bebidas alcoólicas e não alcoólicas, doces, bolos e geleias. Na indústria cosmética, o OEY é utilizado para fragrâncias em sabonetes, perfumes, cremes e loções (LEUNG E FOSTER 2003). Na indústria farmacêutica, o OEY pode ser utilizado para mascarar sabores de xaropes e em aromaterapia (sendo utilizado em de massagem ou inalação, por suas propriedades sedativas). O uso medicinal do OEY pela população local onde essa planta é encontrada, se torna um dos principais fatores que contribuem para o aumento da popularidade e utilização deste óleo essencial no campo da aromaterapia (TAN et al., 2015; ZHANG et al., 2016; BORGONETTI, et al., 2022). O OEY é utilizado também na medicina tradicional em países asiáticos, para o tratamento de malária, doenças estomacais, asma e gota (HOLDSWORTH, 1990; BAMPIDIS et al., 2022).

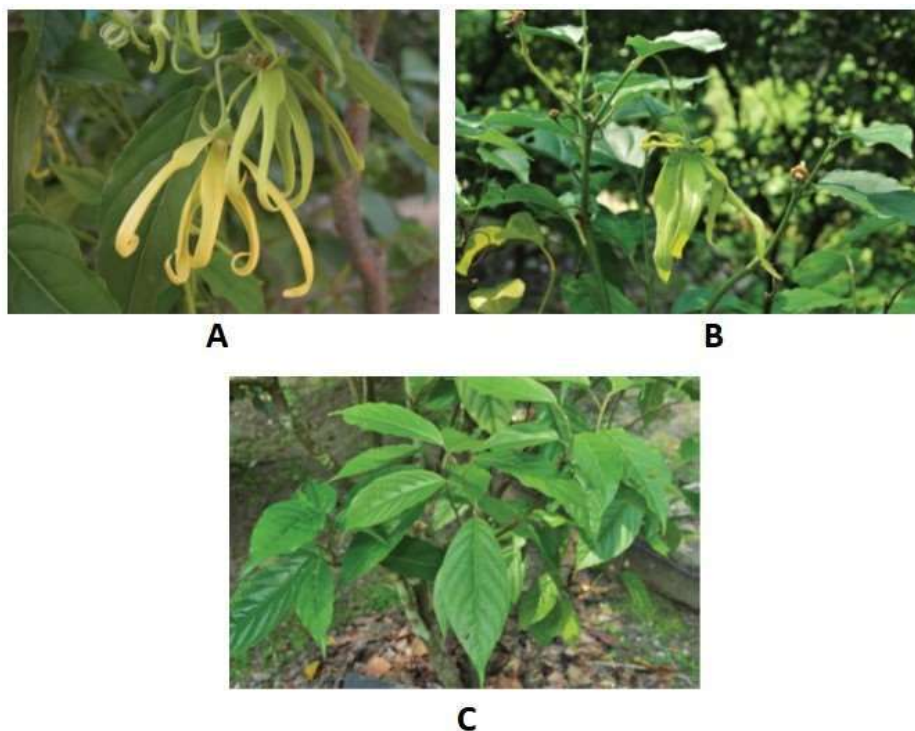


Figura 2. Morfologia da planta *C. odorata*. (A) Flor madura de *C. odorata* com pétalas amarelas, (B) flor jovem de *C. odorata* verde-amarelado, (C) folhas da planta *C. odorata* (TAN et al, 2015).

O OEY é constituído principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides e entre os consituientes majoritários deste óleo essencial estão acetato de benzila, linalol, benzoato de benzila e benzoato de metila (FREITAS JUNIOR et al., 2022). O OEY mostrou atividade inseticida (PAVELA et al., 2020), antimicrobiana (MA et al., 2019), anti-inflamatória (FREITAS JUNIOR et al., 2022), reduziu a dor neuropática

(BORGONETTI et al., 2022) e demonstrou efeito ansiolítico (HOLT, 1999; ZHANG et al., 2016).

Freitas Junior e colaboradores (2022) demonstraram que OEY foi eficaz na redução da inflamação aguda, pois apresentou atividade antiematogênica e reduziu o recrutamento de leucócitos em modelo experimental de peritonite em camundongos. Além disso, o OEY não se mostrou tóxico, uma vez que DL_{50} em camundongos foi superior a 2000 mg/kg. Nesse sentido, no presente trabalho, avaliamos o efeito do OEY sobre a inflamação persistente, artrite experimental e nocicepção.

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

O uso de fármacos para doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide, se torna limitado na terapêutica devido aos efeitos adversos que podem ocasionar como, problemas gastrointestinais, cardiovasculares e insuficiência renal. Sendo assim, a busca de produtos naturais com atividade antiartrítica, antinociceptiva e anti-inflamatória, com menor incidência de reações adversas, se torna relevante. Esta pesquisa contribui para a validação de alternativas terapêuticas para o tratamento de dor e inflamação crônica. Estudos anteriores demonstraram o efeito do OEY e seus principais constituintes sobre a resposta inflamatória aguda, portanto o presente estudo demonstrou o efeito do OEY sobre a inflamação persistente e nocicepção.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar as propriedades antiartrítica, antinociceptiva e anti-inflamatória do OEY em modelos experimentais.

4.2. Objetivos específicos

Especificamente foram avaliados os efeitos do OEY sobre:

- O modelo de artrite induzida por zymosan (AZy);
 - a formação de edema articular de joelho e hiperalgesia mecânica;
 - a infiltração leucocitária na cavidade articular;
 - os níveis de interleucina-6 no lavado articular;
 - as alterações histopatológicas;
- A inflamação persistente induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA);
- A nocicepção induzida por ácido acético e por formalina.

REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

- ABDULKHALEQ, L. A.; ASSI, M. A.; ABDULLAH, Rasedee; ZAMRI-SAAD, M.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; HEZMEE, M. N.M. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 627–635, 2018.
- AHMADI, Hosein; MORSHEDLOO, Mohammad Reza; EMRAHI, Roya; JAVANMARD, Abdollah; RASOULI, Farzad; MAGGI, Filippo; KUMAR, Manoj; LORENZO, Jose Manuel. Introducing Three New Fruit-Scented Mints to Farmlands: Insights on Drug Yield, Essential-Oil Quality, and Antioxidant Properties. **Antioxidants**, v. 11, n. 5, 2022.
- AHVAZI, M.; KHALIGHI-SIGAROODI, F.; CHARKHCHIYAN, M. M.; MOJAB, F.; MOZAFFARIAN, V.-A.; ZAKERI, H. Introduction of Medicinal Plants Species with the Most Traditional Usage in Alamut Region. **Pharmaceutical research**, V. 11, n. 1, p. 185-94, 2012.
- ALMARESTANI, L.; FITZCHARLES, M. A.; BENNETT, G. J.; RIBEIRO-DA-SILVA, A. Imaging studies in Freund's complete adjuvant model of regional polyarthritis, a model suitable for the study of pain mechanisms, in the rat. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 6, p. 1573–1581, 2011.
- ARULSELVAN, P.; FARD, M. T.; TAN, W. S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S. S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Hindawi Limited**, v. 2016, p. 15, 2016.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46 n. 2, p. 446-475, 2008.
- BAMPIDIS, V. *et al.* Safety and efficacy of a feed additive consisting of an essential oil from the flowers of *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thomson (ylang ylang oil) for use in all animal species (FEFANA asbl). **EFSA Journal**, v. 20, n. 2, 2022.
- BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39-50, 2012.
- BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GREENACRE, S.; BEZERRA JERÔNIMO, S. M.; DE MELO, L. B.; KEEBLE, J.; CASTRO DA ROCHA, F. A. Reactive nitrogen species

scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 172–182, 2004.

BORGONETTI, V.; LÓPEZ, V.; GALEOTTI, N. Ylang-ylang (*Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson) essential oil reduced neuropathic-pain and associated anxiety symptoms in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 294, 2022.

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, p. 629-638, 2014.

BUNGAU, S. G.; BEHL, T.; SINGH, A.; SEHGAL, A.; SINGH, S.; CHIGURUPATI, S.; VIJAYABALAN, S.; DAS, S.; PALANIMUTHU, V. R. Targeting probiotics in rheumatoid arthritis. **Nutrients MDPI**, v. 13, 2021.

CARDIA, G. F. E.; SILVA-COMAR, F. M. de S.; ROCHA, E. M. T. da; SILVA-FILHO, S. E.; ZAGOTTO, M.; UCHIDA, N. S.; AMARAL, V. do; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Pharmacological, medicinal and toxicological properties of lavender essential oil: A review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e23310514933, 2021.

CASTANHEIRA, F. V. S.; KUBES, P. Review. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 20, p. 2178-2185, 2019.

CATA, J. P.; UHELSKI, M. L.; GORUR, A.; DOUGHERTY, P. M. Nociception and Pain: New Roles for Exosomes. **Neuroscientist SAGE Publications Inc.**, v. 28, p. 349-362, 2022.

CHU, Y. C.; GUAN, Y.; SKINNER, J.; RAJA, S. N.; JOHNS, R. A.; TAO, Y.X. Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant-induced persistent pain. **Pain**, v. 119, n. 1-3, p. 113-123, 2005.

CONTE, F. de P.; BARJA-FIDALGO, C.; VERRI, W. A.; CUNHA, F. Q.; RAE, G. A.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M. das G. M. O. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 3, p. 652–660, 2008.

CUNHA, T. M.; JR VERRI, W. A.; VALÉRIO, D. A.; GUERRERO, A. T.; NOGUEIRA, L. G.; VIEIRA, S. M.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.;

- CUNHA, F. Q. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. **Eur J Pain**, v. 12, n. 8, p. 1059-68, 2008.
- FEHRENBACHER, J. C.; VASKO, M. R.; DUARTE, D. B. Models of inflammation: Carrageenan- or unit 5.4 complete Freund's adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. **Current Protocols in Pharmacology**, n. SUPPL.56, 2012.
- FISCHER, M.; CARLI, G.; RABOISSON, P.; REEH, P. The interphase of the formalin test. **Pain**, v. 155, n. 3, p. 511–521, 2014.
- FRASNELLI, M. E.; TARUSSIO, D.; CHOBASZ-PÉCLAT, V.; BUSO, N.; SO. Open Access TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Research article**, v. 7, 2005.
- FREITAS JUNIOR, R. A.; LOSSAVARO, P. K. M. B.; KASSUYA, C. A. L.; PAREDES-GAMERO, E. J.; FARIAS JÚNIOR, N. C.; SOUZA, M. I. L.; SILVA-COMAR, F. M. S.; CUMAN, R. K. N.; SILVA, D. B.; TOFFOLI-KADRI, M. C.; SILVA-FILHO, S. E. Effect of Ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook. F. & Thomson) Essential Oil on Acute Inflammatory Response *In Vitro* and *In Vivo*. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3666, 2022.
- FREUND J CASAIS J HOSMER EP. Sensibilização e formação de anticorpos após injeção de bacilos da tuberculose e óleo de parafina. **Proc Soc Exp Biol Med** 37: 509 – 513. 1937.
- FREUND J. O modo de ação dos adjuvantes imunológicos. **Res. Adv Tuberc**. 1956.
- FRIAS, B.; MERIGHI, A. Capsaicin, nociception and pain. **Molecules MDPI**, v. 21, n. 6, p. 797, 2016.
- GEGOUT, P.; GILLET, P.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sciences**, v. 56, n. 20, p. 389–94, 1995.
- GERMOLEC, D. R.; SHIPKOWSKI, K. A.; FRAWLEY, R. P.; EVANS, E. "Markers of inflammation". **Methods in Molecular Biology**, v. 1803. p. 57–79, 2018.
- GUAZELLI, C. F. S. et al. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, p. 175–184, 2018.
- GUERRERO, A. T. G.; CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates

zymosan-induced joint hypernociception in mice: Participation of TNF- α , IL-1 β and CXCL1/KC. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 1, p. 51–57, 2011.

HARTH, M.; NIELSON, W. R. Pain and affective distress in arthritis: relationship to immunity and inflammation. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 15, n. 5, 2019.

HERRERO-CERVERA, A., SOEHNLEIN, O., KENNE, E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 19, p. 177-191, 2022.

HOLT, S. Part 2: Stimulants and Sietary Supplements. **Alternative and Complementary Therapies**, v. 5, n. 5, p. 279-285, 1999.

JANG, S.; KWON, E. J.; LEE, J. J. Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 2022.

JARLBORG, M.; GABAY, C. Systemic effects of IL-6 blockade in rheumatoid arthritis beyond the joints. **Cytokine**, v. 149, 2022.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, 2001.

KAUR, S.; BANSAL, Y.; KUMAR, R.; BANSAL, G. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 5, 2020.

KEYSTONE, E. C.; SCHORLEMMER, H. U.; POPE, C.; ALLISON, A. C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis and Rheumatism**, v. 20, n. 7, p. 1396–1401, 1977.

LAM, H. H. Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. **Neurosci Lett**, v. 210, n. 3, p. 201-204, 1996.

LEUNG AY, FOSTER S. Encyclopedia of common natural ingredients (used in food, drugs, and cosmetics). **Hoboken, New Jersey: Wiley**; p. 210–212, 2003.

LIBBY, P. **Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease**. p. 140–146, 2007.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, 2008.

- LOPES, D. M.; CATER, H. L.; THAKUR, M.; WELLS, S.; MCMAHON, S. B. A refinement to the formalin test in mice. **F1000Research**, v. 8, p. 891, 2019.
- MCWILLIAMS, D F; WALSH, D. A. Pain mechanisms in rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 107, n. 5, p. 94-101, 2017.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 3474-3555, 2002.
- MILLS, S. E. E.; NICOLSON, K. P.; SMITH, B. H. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. **British Journal of Anesthesia**, v. 123, n. 2, p. e273–e283, 2019.
- MUHAMMAD, S.; SHAH, M.; SADIQ, A.; SHAH, H.; ULLAH, F. Antioxidant, total phenolic contents and antinociceptive potential of *Teucrium stocksianum* methanolic extract in different animal models. **BMC Complement Altern Med**, v.3, n. 14, p. 181, 2014.
- NAGHIZADEH, B.; MANSOURI, M. T.; GHORBANZADEH, B. Ellagic acid enhances the antinociceptive action of carbamazepine in the acetic acid writhing test with mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 157–161, 2016.
- NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. The two-faced cytokine IL-6 in host defense and diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3528, 2018.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 173-182, 2006.
- NAVARRO-ALVAREZ, N.; GONÇALVES, B. M. M.; ANDREWS, A. R.; SACHS, D. H.; HUANG, C. A. A CFA-Induced model of inflammatory skin disease in miniature swine. **International Journal of Inflammation**, v. 2018, 2018.
- NEUGEBAUER, V.; HAN, J. S.; ADWANIKAR, H.; FU, Y.; JI, G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. **Molecular Pain**, v.3, n. 8, p. 1-13, 2007.
- NIKSIC, H. et al. Atividade antiproliferativa, antimicrobiana e antioxidante de *Lavandula angustifolia* Mill. óleo essencial. **Jornal de Ciências da Saúde**, v.7, n. 1, p. 35-43, 2017.

NORIEGA V, MIRANDA HF, PRIETO JC, SOTOMAYOR-ZÁRATE R, SIERRALTA F. Involvement of NO in Antinociception of NSAIDS in Murine Formalin Hind Paw Assay. **Drug Res**, v.70 n.4, p. 145-150, 2020.

PAHWA, R., GOYAL, A., & JIALAL, I. Chronic inflammation. **StatPearls**, 2022.

PANDOLFI, F.; FRANZA, L.; CARUSI, V.; ALTAMURA, S.; ANDRIOLLO, G.; NUCERA, E. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5238, 2020.

PATAKAS, A. The role of TH17 cells in a model of rheumatoid arthritis (Tese de Doutorado). **University of Glasgow**, 2011.

PAVELA, R.; MAGGI, F.; GIORDANI, C.; CAPPELLACCI, L.; PETRELLI, R.; CANALE, A. Insecticidal activity of two essential oils used in perfumery (ylang ylang and frankincense). **Natural Product Research**, v. 35, n. 22, p. 4746–4752, 2021.

RADU, B. M.; BRAMANTI, P.; OSCULATI, F.; FLONTA, M-L.; RADU, M.; BERTINI, G.; FABENE, P. F. Neurovascular Unit in Chronic Pain. **Mediators Inflamm**, 2013.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents and actions**, v. 8, n. 1-2, p. 45-49, 1978.

ROCHA, F. A. C.; TEIXEIRA, M. M.; ROCHA, J. C. S.; GIRÃO, V. C. C.; BEZERRA, M. M.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 497, n. 1, p. 81–86, 2004.

SÁNCHEZ-RAMÓN, S.; LÓPEZ-LONGO, F. J.; CARREÑO, L. Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. **Reumatología Clínica**, v. 6, n. SUPPL. 3, p. 20-24, 2010.

SATYANARAYANA, P. S. V.; JAIN, N. K.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 4, p. 641–649, 2004.

SCHUG, S. A.; PALMER, G. M.; SCOTT, D. A.; ALCOCK, M.; HALLIWELL, R.; MOTT, J. F. Acute pain management: scientific evidence. **Australian and New Zealand College of Anesthetists and Faculty of Pain Medicine**. n. 3, p. 1-533, 2010.

- SCHAIBLE, H. G. Pathophysiology of pain. **Orthopade**, v. 36, n. 1, p. 8-16, 2006.
- SCHAIBLE, H.G. Peripheral and central mechanisms of pain generation. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.177, n.3, p.28, 2007.
- SERHAN, C. N. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 4, p. 1273-1288, 2017.
- SERHAN, C. N., SAVILL, J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. **Nature Immunology**, v.6, p. 1191-1197, dez. 2005.
- SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. **Artmed Editora**, 2016.
- SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **The Lancet Publishing Group**, v. 338, n. 10055, p. 2023-2038, 2016.
- SOMMER, C.; LEINDERS, M.; ÜÇEYLER, N. Inflammation in the pathophysiology of neuropathic pain. **Pain**, v. 159, n. 3, p. 595–602, 2018.
- ST. JOHN SMITH, E. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. **Journal of Neurology**, v. 265, p. 231-238, 2018.
- STILLS, H. F. Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 280-293, 2005.
- TAKEUCHI, T.; YOSHIDA, H.; TANAKA, S. Role of interleukin-6 in bone destruction and bone repair in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 20, n. 9, 2021.
- TAN, L. T. H.; LEE, L. H.; YIN, W. F.; CHAN, C. K.; ABDUL KADIR, H.; CHAN, K. G.; GOH, B. H. Traditional uses, phytochemistry, and bioactivities of *Cananga odorata* (ylang-ylang). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015, ID art. 896314, 2015.
- TANG, M.; ZENG, Y.; PENG, W.; XIE, X.; YANG, Y.; JI, B.; LI, F. Pharmacological Aspects of Natural Quercetin in Rheumatoid Arthritis. **Drug Design, Development and Therapy**, V. 16, P. 2043-2053, 2022.
- VARELA, M. L.; MOGILDEA, M.; MORENO, I.; LOPES, A. Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1115-1127, 2018.

VERRI JR, W. A., CUNHA, T. M., Parada, C. A., Poole, F. Q. C., Ferreira, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 116-138, 2006.

WOOLF, C. J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hiperalgesia: the contribution of tumor necrosis factor alpha. **Br J Pharmacol**, v. 121, n. 3, p. 417-24, 1997.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **Journal of Clinical Investigation**, 2010.

WOOLF, C. J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci**, v. 96, n. 14, p. 7723-30, 1999.

YEUNG, Y. T., AZIZ, F., GUERRERO-CASTILLA, A., ARGUELLES, S. Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 14, p. 1449–1484, 2018.

ZAGO, P. M. J. J., MEOTTI, F. L., IUKAVA, L. K., CORADETTE, C. D. D. S., OTERIO, J., ZARDETO-SABEC, G., BOLETA-CERANTO, D. D. C. F. Percepção dos pacientes de um consultório de cardiologia acerca da utilização de plantas medicinais no tratamento da hipertensão arterial. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e78791110312-e78791110312, 2020.

ZARPELON, A. C.; PINTO, L. G.; CUNHA, T. M.; VIEIRA, S. M.; CARREGARO, V.; SOUZA, G. R.; SILVA, J. S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A. Endothelin-1 induces neutrophil recruitment in adaptive inflammation via TNF α and CXCL1/CXCR2 in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 90, n. 2, p. 187–199, 2012.

ZAISS, M. M.; JOYCE WU, H. J.; MAURO, D.; SCHETT, G.; CICCIA, F. The gut–joint axis in rheumatoid arthritis. **Nature reviews rheumatology**, v. 17, p. 224-237, 2021.

ZHANG N, ZHANG L, FENG L, YAO L. The anxiolytic effect of essential oil of *Cananga odorata* exposure on mice and determination of its major active constituents. **Phytomedicine**. v. 23 n.14, p. 1727–1734, 2016.

**ARTIGO: PROPRIEDADES ANTIARTRÍTICA E
ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
YLANG-YLANG EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

6. Antiarthritic and antinociceptive properties of Ylang-ylang (*Cananga odorata*) essential oil in experimental models

Paloma Kênia de Moraes Berenguel Lossavaro¹, Saulo Euclides Silva-Filho^{1*}

¹Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition College, Federal University of Mato Grosso do Sul,
Campo Grande, MS, Brazil

***Address for correspondence:** Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition College, Federal University of Mato Grosso do Sul, Costa e Silva Avenue, s/n, Campo Grande-MS, Zip code: 79070900, Brazil

E-mail addresses: saulo.e@ufms.com

Phone: +55 67 3345-3176

Abstract

Purpose The aim of this study was to evaluate the effect of ylang-ylang (*Cananga odorata*) essential oil (YEO) on experimental arthritis, persistent inflammation and nociception models in mice.

Method and Results The YEO treatment at doses of 100 and 200 mg/kg reduced the leukocyte infiltration into joint cavity of mice submitted to zymosan-induced arthritis, at 6 hours and 7 days after arthritis induction. In these doses, the YEO treatment reduced the joint edema formation at times of 4 and 6 hours after arthritis induction and, at dose of 200 mg/kg, the YEO treatment reduced mechanical hyperalgesia at times of 3 and 4 hours after arthritis induction. At dose of 200 mg/kg, the YEO treatment reduced interleukin-6 (IL-6) levels, cartilage destruction in zymosan-induced arthritis model, and edema formation and mechanical hyperalgesia in persistent inflammation model (21 days) induced by Freud's Complete Adjuvant (CFA) in mice. YEO treatment, at a dose of 200 mg/kg, reduced the nociceptive response in experimental models of nociception induced by acetic acid and formalin.

Conclusion YEO reduces inflammatory parameters in experimental arthritis model, reduces inflammatory response in CFA-induced persistent inflammation model and reduces nociceptive response in experimental nociception models. The OEY may be a potential natural product for treatment of injuries resulting from chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis.

Keywords: ylang-ylang, arthritis, persistent inflammation, natural products.

6.1. Introduction

Inflammation is a biological response against injury or a pathogen, this response promotes clinical signs such as heat, redness, pain, swelling, and loss of tissue function (Varela et al. 2018), and it can be divided into two phases: acute or chronic. The acute inflammation is of short duration and neutrophils are the predominant leukocyte and among the first cells recruited to an inflammatory site, in addition to vasodilation, increased vascular permeability, and extravasation of plasma proteins (Souto et al. 2011; Castanheira and Kubes 2019). Chronic inflammation develops over weeks or years and is marked by tissue destruction, and infiltration of mononuclear cells, such as monocytes and lymphocytes, in addition to fibrosis and angiogenesis (Rock and Kono 2008; Yeung et al. 2018). This process results from the persistence of the inflammatory stimulus or the ineffectiveness of the acute inflammatory response, which can generate chronic or autoimmune pathological processes, such as Alzheimer's, multiple sclerosis, and rheumatoid arthritis (RA) (Yeung et al. 2020).

RA is an autoimmune disease that causes joint chronic inflammation. Several symptoms are described for RA, such as: swelling and joint pain, progressive joint deformity, synovial membrane destruction, and remodeling. It is a multifactorial disease, which mainly affects women. Dudics et al. (2018) showed that the overall RA prevalence rate was 0.5% to 1%. Patients with RA have a reduced life expectancy, due to morbidity and complications resulting from the disease. Treatment for quality of life depends on many drug classes, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), corticosteroids, and disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) to control the symptoms and course of RA (Li et al. 2022).

Anti-inflammatory drugs hormonal or non-hormonal, are drugs used to treat acute or chronic inflammatory diseases, however, the prolonged use of these drugs is associated with adverse effects, such as renal, hepatic, and cardiovascular toxicity (Dudics et al. 2018). Therefore, aromatic plants and natural products with anti-inflammatory properties have been used for years by the population as a therapeutic alternative for the most diverse diseases (Nunes et al. 2020).

Cananga odorata Hook. F. & Thomson, popularly known as ylang-ylang, is a aromatic plant. This species is native to Asia and can be found in humid tropical countries (Tan et al. 2015). Ylang-ylang essential oil (YEO) is obtained from *C. odorata* flowers and is used in cosmetics and aromatherapy (Tan et al. 2015; Shahbazi 2016). Several constituents of YEO, such as alcohols, esters, ketones, and aliphatic aldehydes, are responsible for fragrance (Astani et al. 2010; Tan et al. 2015; Aziz et al. 2018). Some biological properties of YEO are

described in the literature, such as antimicrobial (Indrakumar et al. 2012; Kusuma et al. 2014), antioxidant (Sacchetti et al. 2005), sedative (Pujiart et al. 2012), anti-inflammatory (Freitas Junior et al. 2022) and antirheumatic (Choi and Hwan 2005; Wei; Shibamoto 2010; Tan et al. 2015) activities. And recently, YEO has been shown to have activity in relieving neuropathic pain and improving pain-associated anxiety (Borgonetti et al. 2022). The toxicity of YEO in mice is not considered to be higher ($LD_{50} > 2$ g/kg) (Freitas Junior et al. 2022).

Therefore, due to the limited use of anti-inflammatory drugs, the research for natural products with anti-inflammatory activity and less harmful effects is relevant. Thus, this work aimed to evaluate the effect of YEO on the experimental arthritis model, as well as to evaluate the effect of this essential oil on persistent inflammation and nociception.

6.2. Material and Methods

6.2.1. Chemicals and YEO obtention

YEO, zymosan, complete Freund's adjuvant (CFA), indomethacin, dexamethasone, and morphine were obtained commercially from Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA). All other chemicals used were analytical grade.

The YEO phytochemical analysis was previously described in a study carried out by our group, in which the presence of benzyl acetate (18.21%), linalool (15.23%), benzyl benzoate (11.39%), geranyl acetate (9.46%), methyl benzoate (7.64%), *p*-methyl anisole (7.38%), *trans*-caryophyllene (5.42%), germacrene D (4.61%), and benzyl salicylate (4.47%) (Freitas Junior et al. 2022).

6.2.2. Animals

Male *Swiss* mice (weighing 18-30 g) were provided by the Central Animal House of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS). The animals were housed at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ under a 12/12 h light/dark cycle. Before the experiments, the animals were fasted overnight, with water provided *ad libitum*. The experimental protocols were approved by Ethical Committee in Animal Experimentation of the UFMS (protocol number: 1.182/2021).

6.2.3. Zymosan-induced arthritis model

Male Swiss mice ($n = 5-7$ animals/group) were intra-articularly injected with 10 μL of zymosan solution (200 $\mu\text{g}/\text{knee joint}$). Zymosan was injected in the right knee joint of animals, and saline solution 0.9% was injected into the naive group, with the same volume. One hour before zymosan injection, the animals were treated with YEO (50, 100, and 200 mg/kg), dexamethasone (1 mg/kg , reference drug,) or vehicle (saline 0.9% containing 1% of tween 80) by oral route. Six hours or 7 days after zymosan induced-arthritis, mice were euthanatized. For the analyzes in which the animals were euthanized after 7 days of arthritis induction, the mice were treated with YEO, dexamethasone or vehicle, 1 hour before the zymosan intra-articular injection, and daily, once a day, for 7 days.

6.2.4. Knee joint edema and mechanical hyperalgesia in animals submitted to zymosan-induced arthritis model

Mechanical hyperalgesia was evaluated at 3 and 4 hours after arthritis induction. The evaluation of mechanical hyperalgesia was performed after the animals were placed in a containment box with support for the analgesimeter test. The animals were allocated for 30 minutes to adapt to decrease exploratory behavior and support the four paws on the base. To measure the nociceptive mechanical sensitivity threshold (g) of the joint that received the zymosan injection, a digital analgesimeter (Von Frey, Insight[®]) (Moller et al. 1998) was used as a pressure transducer, which records the applied force (in grams) until the moment of paw withdrawal.

The knee joint edema was evaluated at 4 and 6 hours after arthritis induction. The evolution of edema formation was made using a micrometer, which measured in millimeters (mm). Edema was determined by the size between knees. The knee evaluation edema was made by a comparison of the difference between the right and left sides with a digital micrometer Insize at 4 and 6 hours after zymosan injection.

6.2.5. Leukocyte infiltration into articular cavity analysis in animals submitted to zymosan induced arthritis model

Six hours or seven days after the arthritis induction, the mice were euthanized, and the knee joint was exposed by surgical incision and washed twice with 5 μL of

phosphatebuffered saline (PBS) that contained ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The supernatant was diluted to a final volume of 50 μ L with PBS/EDTA to determine the total cell counts. The total number of leukocytes, diluted in Turk's solution, was determined in a Neubauer chamber under a light microscope. The results were expressed as the number of leukocytes per cavity.

6.2.6. Interleukin-6 levels determination in articular cavity of the animals submitted to zymosan-induced arthritis model

Interleukin-6 (IL-6) dosage was performed in samples of femur–tibial joints collected 6 hours after zymosan injection. The knee joint was centrifuged, and the supernatants were collected. IL-6 in supernatants were determined using ELISA kits. Data are expressed as picograms pg/mL.

6.2.7. Histological analysis

Histological analysis was performed 7 days after zymosan-induced arthritis. The right knee joint was subsequently demineralized in a 10% formaldehyde solution for 3 days, and formaldehyde was then replaced with EDTA dissolved in saline (3 g EDTA/30 mL). The joints were stored in 70% ethanol. The samples were then subjected to dehydration process using an increasing series of ethanol (70, 80, 90, and 100 GL) diaphanized in xylol, and embedded in paraffin. The samples were then serially sectioned (4 μ m thickness) using a rotary microtome (Leica RM2245). All of the sections were stained with Harris' hematoxylin and eosin (H&E) and examined under a microscope (Olympus BX41; original magnification, 400x). The histological sections from each group were examined using a gradient scale of 0-2 according to the cartilage degrading (Table 1).

Table 1 - A cartilage histopathology grade assessment degrading methodology (Adapted from Pritzker et al. 2006).

Grade	Key feature	Associated criteria (tissue reaction)
0	surface intact, cartilage morphology intact	Matrix: normal architecture Cells: intact, appropriate orientation
1	surface intact	Matrix: superficial cartilage intact, few edema and/or fibrillation (abrasion), focal superficial matrix condensation. Cells: proliferation (clusters) and hypertrophy.
2	surface discontinuity	Matrix discontinuity at superficial (erosion). Deep fibrillation near the bone. Cell: disorientation of chondrocytes columns, death, proliferation (clusters) and hypertrophy of chondrocytes.

6.2.8. Model of persistent inflammation induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA)

The persistent edema and mechanical hyperalgesia model induced by complete Freund's adjuvant (CFA) was performed to study the analgesic and anti-inflammatory properties of prolonged p.o treatment with YEO. At time zero, 20 μ L of CFA (suspension of killed *Mycobacterium tuberculosis* in oil) was injected into the mice right hind paw (intraplantar), and 20 μ L of saline was injected into the left hind paw, while mice in the naive group had 20 μ L of saline injected into both paws. The animals were treated with YEO (200 mg/kg), dexamethasone, or vehicle (n = 5-7 animals/group) by oral route 24 hours after the injection of CFA, and for 21 days, once a day. The mechanical hyperalgesia and paw edema were measured 6, 11, 16 and 21 days after the CFA injection. The evaluation of mechanical hyperalgesia was performed using a digital analgesimeter (Von Frey, Insight[®]), as described earlier. The edema formation was measured with a plethysmometer (Insight[®]), expressed as the percentage of reduction in edema in treated mice compared to that in the control mice (Kassuya et al. 2021).

6.2.9. Acetic acid-induced abdominal writhing model

The assay was performed according to previously described (Koster et al. 1959). The animals were treated with YEO (200 mg/kg), indomethacin (15 mg/kg) or vehicle (n = 5-7 animals/group), 60 minutes before 0.6% (v/v) acetic acid solution injection, diluted in

distilled water, was administered intraperitoneally (i.p.) in a volume 10 mL/kg. The number of abdominal contortions presented by the animals was recorded 30 minutes (min) after the stimulus injection. Results were expressed in numbers of writhing.

6.2.10. Formalin-induced nociception test

The method utilized in this assay was adapted from Hunskaar et al. (1987). The animals were treated with vehicle p.o (saline), indomethacin (15 mg/kg), morphine (5 mg/kg) or YEO (200 mg/Kg) (n = 5-7 animals/group). Thirty minutes after morphine treatment and 60 minutes after other treatment groups, the animals were given a 40 μ L intraplantar injection of 1.2% formalin, diluted in saline solution, into the right hind paw. The time that the animal spent licking or biting its paws was measured during the first (0 – 5 min) and the second (15– 30 min) phases of the test. The results were expressed in seconds.

6.2.11. Statistical Analysis

Data are expressed as the mean $\pm$ SEM for each experimental group. The results were statistically analyzed by using a one-way variance analysis (ANOVA), followed by the Newman-Keuls test. The percentage of inhibition was calculated about the control group. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

6.3. Results

6.3.1. YEO treatment reduced knee joint edema formation and mechanical hyperalgesia induced by zymosan

The zymosan injection into the knee cavity of mice induced mechanical hyperalgesia at 3 and 4 hours, compared to control group (Figure 1). At the time of 3 hours after arthritis induction, the YEO treatment at dose of 200 mg/kg reduced mechanical hyperalgesia in 52.38% (Figure 1A), compared to control group. At time of 4 hours after arthritis induction, the YEO treatment at dose of 200 mg/kg reduced mechanical hyperalgesia in 81.75% (Figure 1B), compared to control group. Dexamethasone (reference drug) treatment also reduced mechanical hyperalgesia at the time points of 3 and 4 hours after arthritis induction, compared

to the control group. The YEO treatment at doses of 50 and 100 mg/kg did not significantly reduce the mechanical hyperalgesia in any tested times.

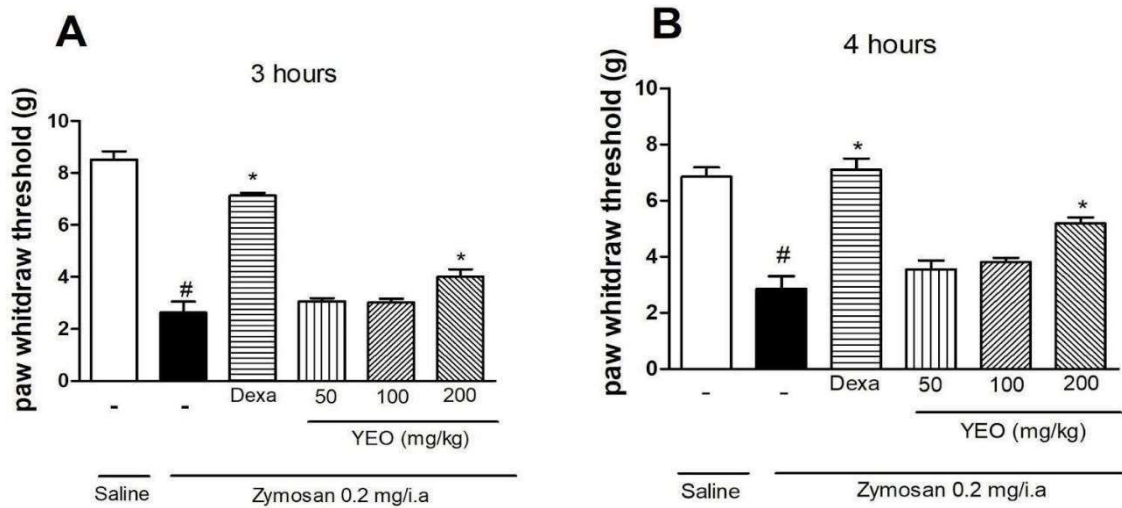


Figure 1. Effect of the YEO treatment on mechanical hyperalgesia in Swiss mice submitted at zymosan-induced arthritis model. The figure shows the values at 3 hours (A) and 4 hours (B) after arthritis induction in the control (vehicle, p.o.), YEO (50, 100, and 200 mg/kg, p.o.), and dexamethasone (1 mg/kg, p.o.) groups. Results were expressed as mean $\pm$ SEM. # P < 0.05 compared to saline (vehicle). * P < 0.05 compared to the control group (ANOVA, Newman–Keuls test).

The zymosan injection into the knee cavity of mice induced the formation of edema at 4 hours (1.00 ± 0.13 mm, figure 2A) and 6 hours (1.08 ± 0.16 mm, figure 2B) after arthritis induction, compared to the group that received saline solution (0.09 ± 0.03 mm and 0.23 ± 0.03 mm, 4 and 6 hours after arthritis induction, respectively). YEO treatment showed anti-inflammatory activity, promoting a significant reduction in knee edema formation at doses of 100 and 200 mg/kg (Figure 2). YEO treatment at the dose of 100 mg/kg promoted a reduction in edema formation at all tested times, inhibiting the edema formation at 4 (Figure 2A) and 6 hours (Figure 2B), in 73.91% and 72.89%, respectively, compared to the control group. At the dose of 200 mg/kg, YEO treatment promoted a reduction in edema formation at all times after zymosan injection, reducing the edema formation at 4 (Figure 2A) and 6 hours (Figure 2B), in 77.5% and 66%, respectively, compared to the control group. The dexamethasone treatment promoted a reduction in knee edema formation in all-time points tested (Figures 2A and 2B). The YEO treatment at a dose of 50 mg/kg did not significantly reduce the edema formation in any tested times.

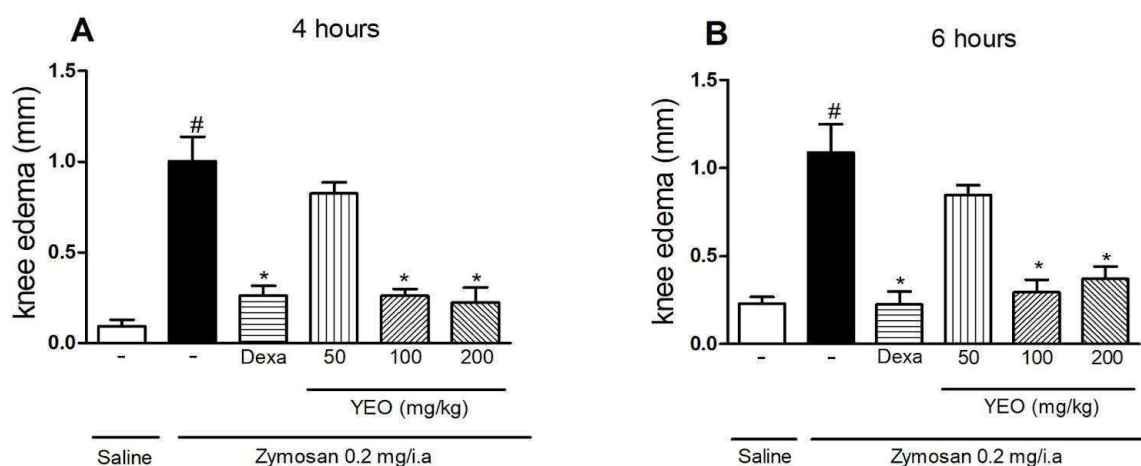


Figure 2. Effect of the YEO treatment on edema formation in Swiss mice submitted at zymosan-induced arthritis model. The figure shows the values of knee edema formation at 4 (A) and 6 (B) hours after arthritis induction in the control (vehicle, p.o.), YEO (50, 100, and 200 mg/kg, p.o.), and dexamethasone (1 mg/kg, p.o.) groups. Results were expressed as mean $\pm$ SEM. $^{\#}P < 0.05$ compared to saline (vehicle). $^*P < 0.05$ compared to the control group (ANOVA, Newman–Keuls test).

6.3.2. YEO treatment reduced leukocytes recruitment in the zymosan-induced arthritis model

Six hours after arthritis induction, we observed an increase in the number of leukocytes in the mice knee joint cavity ($73.25 \pm 11.24 \times 10^3$ cells/cavity) compared with the group that received only saline injection ($16.00 \pm 1.47 \times 10^3$ cells/cavity). YEO treatment at the doses of 100 and 200 mg/kg significantly reduced total leukocytes number (43.68% and 45.39%, respectively) in the knee joint cavity of mice in the arthritis model (Figure 3A).

Seven days after arthritis induction, we also observed an increase in the number of leukocytes in the mice knee joint cavity ($44.75 \pm 6.32 \times 10^3$ cells/cavity) compared with the group that received an only saline injection ($10.80 \pm 2.03 \times 10^3$ cells/cavity). YEO treatment at the doses of 100 and 200 mg/kg significantly reduced total leukocytes number (59.21% and 63.68%, respectively) in the mice knee joint cavity (Figure 3B).

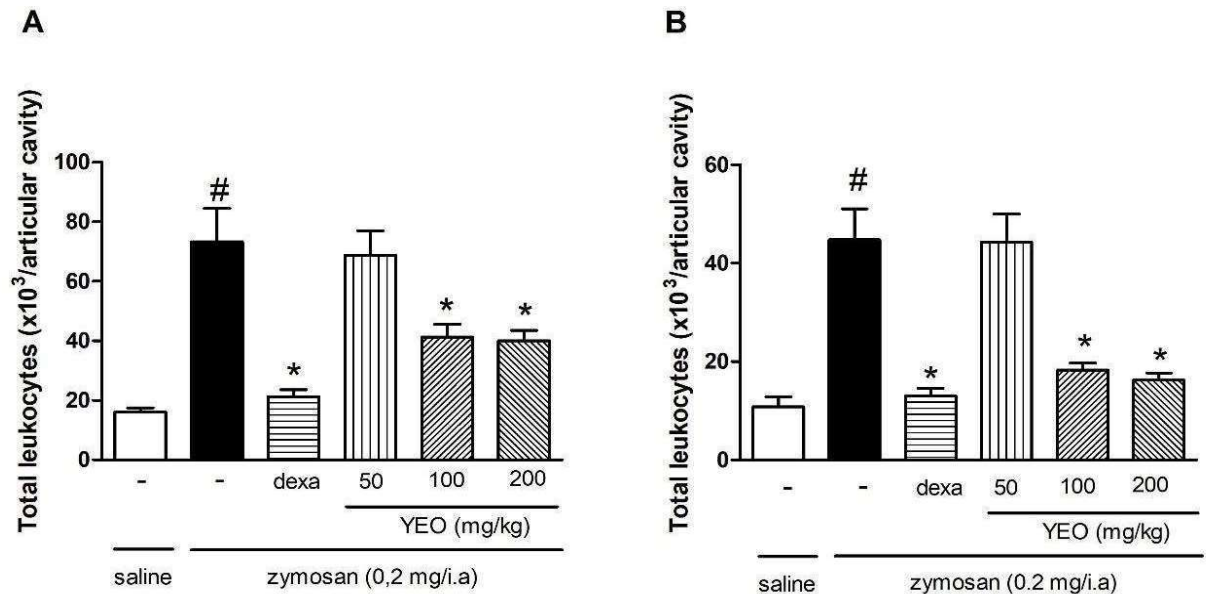


Figure 3. Effect of YEO treatment on migrated leukocyte number in knee joint cavity of Swiss mice 6 hours (A), and 7 days (B) after zymosan-induced arthritis in the control (vehicle, p.o.), YEO (50, 100, and 200 mg/kg, p.o.) and dexamethasone (1 mg/kg, p.o.) groups. [#] $P < 0.05$ compared to saline (vehicle). ^{*} $P < 0.05$ compared to the control group (ANOVA, Newman–Keul test).

6.3.3. YEO treatment reduces IL-6 levels in the zymosan-induced arthritis model

Synovial fluid collected 6 hours after zymosan-induced arthritis were subjected to ELISA assay for determining levels of IL-6. Our results were demonstrated that the IL-6 levels was increased in animals that received zymosan injection, compared to the animals that the received saline injection. The YEO treatment, at dose of 200 mg/kg, reduced the IL-6 levels in 69.67%. The dexamethasone (reference drug) reduced the IL-6 levels in 61.33% (Figure 4).

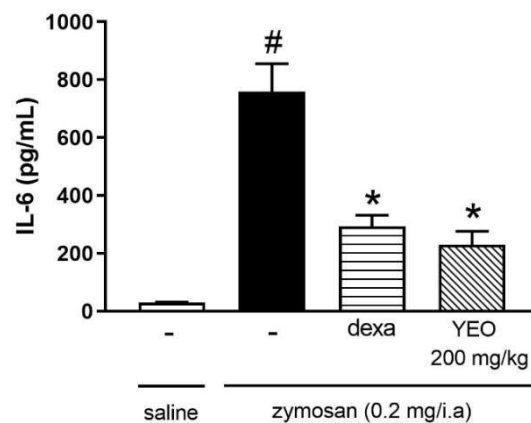


Figure 4. Effect of YEO treatment on IL-6 levels in synovial fluid of Swiss mice 6 hours after zymosan-induced arthritis in the control (vehicle, p.o.), YEO (200 mg/kg, p.o.) and dexamethasone (1 mg/kg, p.o.) groups. [#] $P < 0.05$ compared to saline (vehicle). ^{*} $P < 0.05$ compared to the control group (ANOVA, Newman–Keul test).

6.3.4. YEO reduced cartilage damage in mice submitted to zymosan-induced arthritis model

In histological analysis, discontinuity the surface the synovial membrane, fibrillation (arrow), disorientation of chondrocytes columns, cells death, proliferation (clusters) and hypertrophy (Fig. 5B) were observed in the arthritic animals, compared to the animals that received only saline injection (Fig. 5A), where it was observed surface and cartilage morphology intact. Furthermore, it is noted that in the group treated with YEO (200 mg/kg) and dexamethasone, for 7 days, a reduction of cartilage damage to grade 1 (Fig. 5C and 5D), where the cartilaginous surface is intact, with a homogeneous matrix, despite still observe proliferation (clusters) and chondrocytes hypertrophy. In the dexamethasone group it is observed the major organization of chondrocytes in columns, compared to the YEO group.

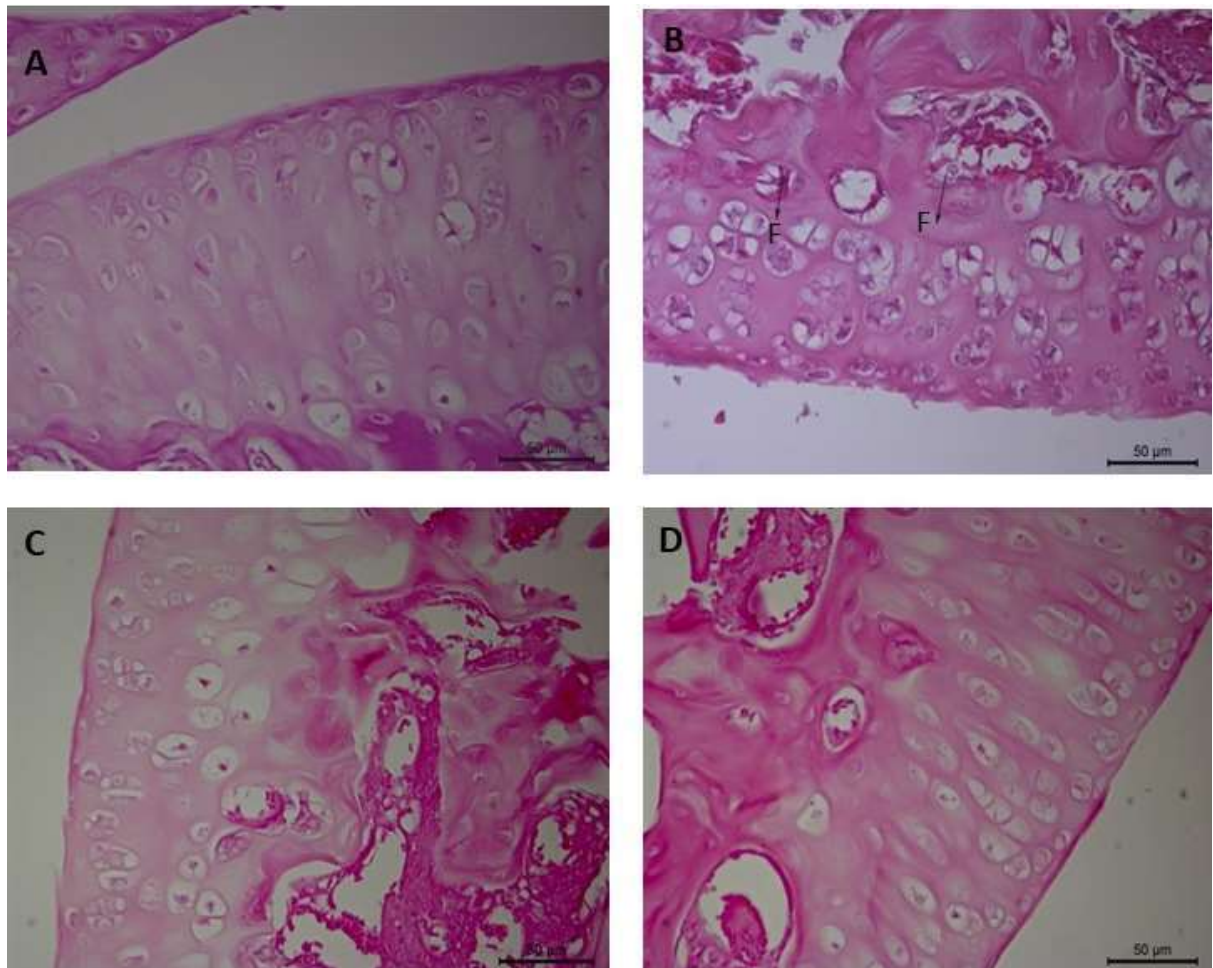


Figure 5. A cartilage histopathology grade assessment knee joint cavity of *Swiss* mice 7 days after zymosan-induced arthritis. saline (vehicle) (A), Control (vehicle, p.o.), fibrillation (arrow) (B), YEO (200 mg/kg, p.o.) (C), and dexamethasone (1 mg/kg, p.o.) (D) groups.

6.3.5. YEO treatment reduces paw edema and mechanical hyperalgesia in the CFA-induced persistent inflammation model

The YEO treatment (200 mg/kg) reduced edema formation and mechanical hyperalgesia after CFA-induced persistent inflammation. The effects of YEO were observed in mechanical hyperalgesia and paw edema for 21 days in the time of 6, 11, 16, and 21 days in this model. On day 16, were observed highest peak hyperalgesia (Figure 6A) and edema formation (Figure 6B), compared with the naive group. The YEO treatment at a dose of 200 mg/kg decreased the mechanical hyperalgesia on day 11 (reduction of 83.87%), and on days 16 and 21, the YEO treatment blocked the development of mechanical hyperalgesia induced by CFA. As expected, the dexamethasone decreased mechanical hyperalgesia in all-time points tested (Figure 6A). The YEO and dexamethasone treatment did not reduce edema formation on day 6 days, and on day 11, only dexamethasone reduced the edema formation. On days 16 and 21, the YEO treatment reduced the edema formation by 10 and 20%, respectively, and dexamethasone treatment reduced edema formation by 60 and 70%, respectively (Figure 6B).

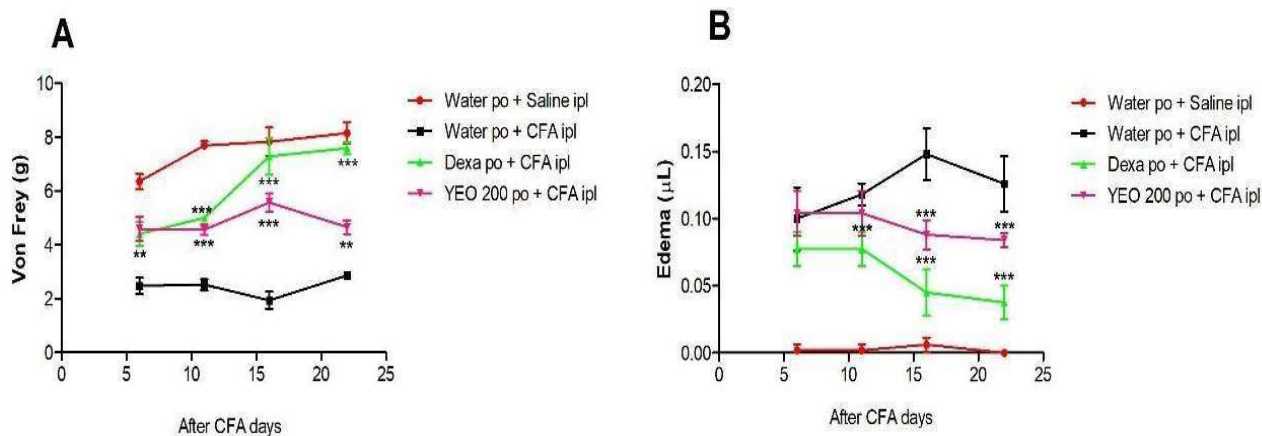


Figure 6. Effects of chronic oral administration of YEO (200 mg/kg) on CFA induced mechanical hyperalgesia (A) and edema formation (B) 6, 11, 16, and 21 days after CFA injection. The animals received a single oral administration of YEO (200 mg/kg) once a day for 21 days in the CFA model. Each bar represents the mean $\pm$ SEM of 4 animals. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with the control group. Two-way ANOVA was followed by the Newman–Keuls test.

6.3.6. YEO treatment reduces abdominal contortions induced by acetic acid

In the abdominal writhing induced by the acetic acid test, we evaluate the antinociceptive activity of YEO. The acetic acid injection promoted the increase of abdominal writhing (77.00 ± 4.88) in animals that received the vehicle, compared to the saline group.

The indomethacin (reference drug) treatment promotes significantly reduction (49.20 ± 3.59 , reduction of 36.10%) of writhes, compared to the control group. The YEO treatment (200 mg/kg) significantly reduced acetic acid-induced writhing by 29.35% (54.4 ± 5.34 writhing), compared to the control group (Figure 7).

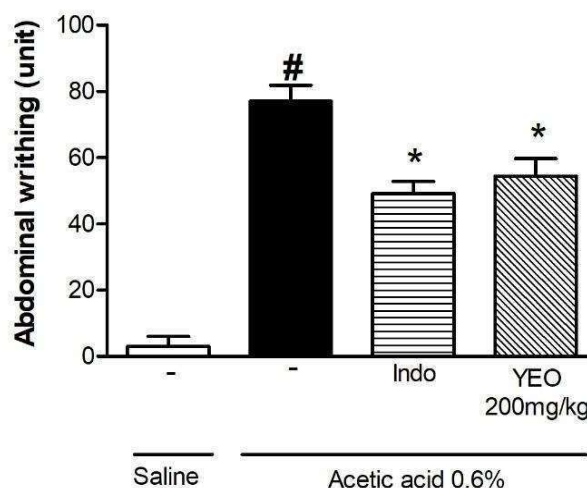


Figure 7. Effect of YEO treatment on acetic acid-induced abdominal writhing. Animals were pre-treated 60 min before the challenge, p.o. with the YEO (200 mg/kg), and the animals in the control group received water or indomethacin, mice ($n = 5-7$ animals/group), stimulus - injection via i.p. 0.6% acetic acid (10 mL/kg), and the number writhing recorded during 30 min. Results were expressed as mean $\pm$ SEM. # $P < 0.05$ compared to saline (vehicle). * $P < 0.05$ compared to the control group (ANOVA, Newman–Keul test).

6.3.7. YEO treatment reduces formalin-induced paw nociception in mice

The paw licking time in phase I was 103.8 ± 15.18 s (Figure 8A) and in phase II 217.3 ± 20.12 s (Figure 8B) in control animals. Oral administration of YEO reduced paw licking time in both phases. In phase I, YEO at a dose of 200 mg/kg reduced the paw licking time by 39.88%, compared to the control group (Figure 8A). In phase II, YEO treatment reduced the paw licking time by 69.44% (66.40 ± 18.22 s), compared to the control group (Figure 8B). The morphine group showed a reduction in paw licking time of the animals by 95.95% (4.20 ± 1.98 s) and 96.96% (6.60 ± 3.44 s) in phase I and phase II, respectively. The indomethacin group exhibited inhibition of paw licking time only in phase II by 66.99% (71.73 ± 3.91 s).

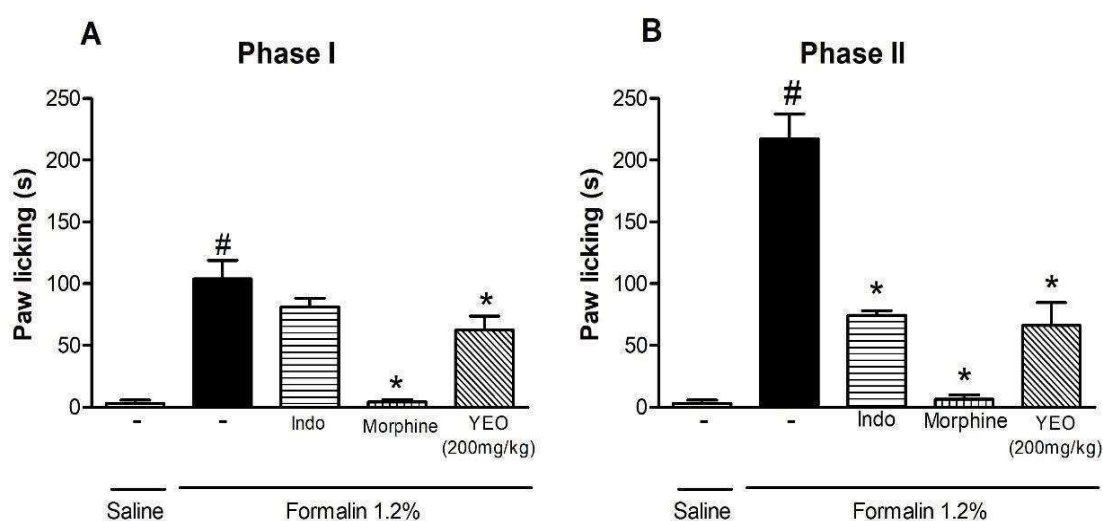


Figure 8. Effect of YEO treatment (200mg/kg) on formalin-induced paw licking time. Animals were pretreated 60 min before the challenge, p.o. with YEO (200 mg/kg) and the animals in the control group received water, indomethacin, or morphine. Paw licking time was timed in the 1st phase (0 – 5min, A) and the 2nd phase (15 – 30 min, B) after intraplantar injection of 1.2% formalin in the hind paw of the mice. Results were expressed as mean $\pm$ SEM. [#] $P < 0.05$ compared to saline (vehicle). ^{*} $P < 0.05$ compared to the control group (ANOVA, Newman–Keuls test).

6.4. Discussion

The results obtained in the present study showed the anti-inflammatory, anti-arthritic, anti-nociceptive, and anti-hyperalgesic action of YEO in experimental models. Recently, a study carried out by our research group have demonstrated that YEO presented activity on the acute inflammatory response in *in vitro* and *in vivo* experimental models, and such activities may be related with the presence of the major constituents found in this essential oil, such as benzyl acetate (18, 21%), linalool (15.23%) and benzyl benzoate (11.39%) (Freitas Júnior et al. 2022). Several studies have demonstrated the effect of natural products, essential oils, and terpenes in experimental arthritis model (Yamada et al. 2013; Kuraoka Oliveira et al. 2020). However, this is the first work that demonstrates the effect of YEO in a model of experimental arthritis and persistent inflammation.

Zymosan, an insoluble polysaccharide derived from the cell wall of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Bellavita et al. 2020), is commonly used to induce inflammatory response in mice. It is an agonist of Toll-like receptors (TLR), present on the cell surface, such as TLR-1, TLR-2, and TLR-6, with this, there is an activation of the NF- κ B transcription factor (Drexler et al. 2008; Sharif et al. 2007). The zymosan-induced arthritis model is characterized by the release of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor

(TNF), interleukin (IL)-18, IL-1 β , and IL-6, synovial joint hypertrophy, and leukocyte recruitment. These inflammatory conditions are similarly observed in the rheumatoid arthritis (Carvalho et al. 2019).

Therefore, in this model, zymosan is administered intra-articularly in mice knee, promoting hyperalgesia, joint swelling, leukocyte recruitment, and histopathological changes, similar lesions to those found in RA (Gegout et al. 1994; Rocha et al. 2008; Guazelli et al. 2018). For this reason, it is considered a suitable animal model to study of new therapeutic approaches for RA treatment (Guerreiro et al. 2011). This model allows the reproduction of lesions to begin within 6 hours, initially developing an increase in vascular permeability, causing local edema and an influx of leukocytes (Kumar and Sharma 2010), and these cells, when arriving at the injury site, contribute to the formation of inflammatory lesions with joint damage (Elshabrawy et al. 2015). Subsequently, 7 days after the induction of arthritis, occurs progressive synovitis with synovial hyperplasia, mononuclear cells influx, fibroblasts activation, and articular cartilage and subchondral bone degradation, similar to the chronic synovitis, which characterizes the rheumatoid *pannus* (Gegout et al. 1994; Da Silva et al. 2006; Cross et al. 2010).

Our results showed treatment with YEO at doses of 100 and 200 mg/kg reduced the leukocyte infiltration into the joint cavity at times of 6 hours and 7 days after arthritis induction. Corroborating our results, treatment with YEO was shown to reduce leukocyte recruitment in zymosan-induced peritonitis model, and this effect was related to reduce of nitric oxide production (Freitas Júnior et al. 2022). We also demonstrated that the YEO treatment reduced IL-6 levels in synovial fluid of the mice submitted to zymosan-induced arthritis. Probably, the reduction in the production of the pro-inflammatory cytokine contributes to the anti-inflammatory activity of YEO. One study showed that linalool, present in the YEO composition, presented in vitro anti-inflammatory activity on macrophage, this terpene promotes the reduction of NF- κ B and COX- 2 expression, and prostaglandin production (Long et al. 2021). Huo et al (2013) were demonstrated that the linalool inhibits the expression of TNF and IL-6 in LPS-stimulated macrophages and LPS-treated mice. Therefore, the presence of linalool in the YEO composition may be related to the reduction of leukocyte recruitment in our study. In addition to the influx of cells into the joint cavity, the zymosan-induced arthritis also promotes the joint edema formation and nociception, due to tissue compression in the nociceptive fibers, which in the presence of pro-inflammatory mediators, such as prostaglandins, cause hyperalgesia (Sherwood and Toliver- Kinsky 2004).

Other mediators release in this model, such as TNF, IL-1 β , and IL-6, for example, are also responsible for triggering nociception and hyperalgesia (Yang et al. 2021; Li et al. 2013; Seno et al. 2017). YEO treatment inhibited the edema formation and mechanical hyperalgesia in animals submitted to zymosan-induced arthritis. The YEO treatment at doses of 100 and 200 mg/kg was able to reduce the edema formation, but only at dose of 200 mg/kg, YEO treatment significantly reduced hyperalgesia in arthritic mice. For this reason, the dose of 200 mg/kg was utilized for evaluation of the YEO effect on histological changes, CFA-induced persistent inflammation and nociception models.

To verify changes in articular cartilage, histological analysis was performed 7 days after zymosan-induced arthritis. We observed that experimental arthritis promoted a surface discontinuity, matrix destruction, proliferation and chondrocytes hypertrophy, causing cartilage destruction, a characteristic present in patients with RA. Our results showed that the daily treatment for 7 days with YEO and dexamethasone was able to reduce the influx of leukocytes in the joint cavity and reduced the cartilage damage after the induction of arthritis, which can be evidenced in the cell count and histological analysis.

CFA is widely used to induce experimental inflammation. This agent produces polyarthritis and persistent inflammation. In this model, the five cardinal signs of inflammation (hypersensitivity, redness, swelling, heat, and loss of function) are observed. The CFA injection promote chronic inflammation, with predominance of mononuclear cells (Mccarson 2015; Yang et al. 2020). Zaringhalam (2008) et al. showed that the inflammation induced by CFA is a biphasic response, where the first phase (acute phase) it was associated with increase of pain and hyperalgesia due to pro-inflammatory cytokines production, such as TNF and IL-1 β , and COX-2 expression (Li et al., 2022), while in the second phase (chronic phase) the hyperalgesia decreased substantially compared to previous days, due to the presence of opioid receptors (Nazemian et al. 2016). Thus, the difference between the peaks in hyperalgesia and edema is explained. The maximum inhibition of hyperalgesia promoted by YEO treatment was on day 16 and edema formation was on day 21 after CFA injection.

To evaluate the antinociceptive activity of YEO, experimental models of abdominal writhing induced by acetic acid and paw licking time induced by formalin were used. Pain is the predominant problem in patients with RA. Pain in RA is distressing right and affects disability and psychosocial outcomes (Walsh and McWilliams 2012). RA pain may be due to joint inflammation and also augmented by central sensitization and joint destruction. Noninflammatory pain mechanisms may confound the assessment of disease activity in RA,

and treatment should aim to both suppress inflammatory disease and relieve pain symptoms (Scherer Hu et al. 2020).

Acetic acid, when administered into peritoneal cavity, promotes abdominal writhing by primary afferent nociceptors activation (Julius and Basbaum 2001), and inflammatory mediators production, such as prostaglandins (PGE₂, PGF_{2α}), vasoactive amines, such as serotonin and bradykinin (Shah et al. 2014) and pro-inflammatory cytokines, promoting nociceptive response (Ballou et al. 2000; Ribeiro et al. 2000). The YEO treatment significantly reduced the number of acetic acid-induced abdominal writhes.

Formalin mice paw injection result in a reproducible biphasic response that can lead to an inflammatory reaction by activating the release and production of various inflammatory mediators (Duan et al. 2019). These mediators cause a painful inflammatory response. Phase I (0-5min) occurs through direct sensitization to nociceptors by the noxious stimulus, and phase II (15-30min) occurs through the inflammatory mediator production, including prostaglandins, that reduce the threshold for pain, causing inflammatory pain (Noriega et al. 2020).

In the present study, the YEO treatment reduced phase I and phase II of the formalin test, thus proving an anti-nociceptive and anti-hyperalgesic activity. Morphine, a opioid analgesic, inhibited both phases of the test. As a centrally acting analgesic, morphine inhibited the first phase, preventing direct chemical stimulation of nociceptors of type C afferent fibers and type Aδ fibers (Silva et al. 2013) and showed peripheral action by acting directly on neurons. Corroborating the obtained results with YEO treatment in the formalin phase I test, Borgonetti et al. (2022) were demonstrated that YEO reduces neuropathic pain.

6.5. Conclusion

YEO reduced the inflammatory parameters in arthritis experimental model, and showed antinociceptive and anti-hyperalgesic activity in mice submitted to zymosan-induced arthritis model. YEO treatment reduced the cartilage damage in arthritic mice. The anti-inflammatory mechanism of YEO is involved, in part, with the reduction of IL-6 production. YEO attenuates inflammatory parameters in chronic inflammatory diseases model, such as RA.

6.6. Declarations

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this manuscript.

Financial support

This study was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brazil.

6.7. References

- Bas DB, Su J, Wigerblad G, Svensson CI (2016) Pain in rheumatoid arthritis: models and mechanisms. *Pain Management* 6:265–284. <https://doi.org/10.2217/pmt.16.4>
- Ballou LR, Botting RM, Goorha S, et al (2000) Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice Prostaglandins formed by cyclooxygenase-1 (COX-1) or COX-2 produce hyperalgesia in sensory nerve endings. To assess the relative roles of the two enzymes in pain processing, we compared responses of COX-1-or COX-2-deficient homozygous and heterozygous mice with wild-type controls in the 97(18): 10272–10276. <https://doi.org/10.1073/pnas.180319297>
- Bellavita R, Raucci F, Merlino F, et al (2020) Temporin L-derived peptide as a regulator of the acute inflammatory response in zymosan-induced peritonitis. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 123:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109788>
- Borgonetti V, López V, Galeotti N (2022) Ylang-ylang (*Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson) essential oil reduced neuropathic pain and associated anxiety symptoms in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 294. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115362>

- Carvalho AMS, Heimfarth L, Santos KA, et al (2019) Terpenes as possible drugs for the mitigation of arthritic symptoms –A systematic review. *Phytomedicine* 57:137–147. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.10.028>
- Castanheira FVS, Kubes P (2019) Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Human neutrophils*. 133:2178-2185. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844530>
- Choi EM, Hwang JK (2005) Screening of Indonesian medicinal plants for inhibitor activity on nitric oxide production of RAW264.7 cells and antioxidant activity. *Fitoterapia* 76:194–203. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.11.010>
- Cross M, Smith E, Hoy D, et al (2014) The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 73:1316–1322. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204627>
- Cunha TM, Souza GR, Domingues AC, et al (2012) Stimulation of peripheral Kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3Kg/AKT/nNOS/NO signaling pathway 8: 10. <https://doi.org/10.1186%2F1744-8069-8-10>
- Drexler SK, Kong PL, Wales J, Foxwell BM (2008) Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy* 10:216 doi:10.1186/ar2481
- Duan J, Xie J, Deng T, et al (2020) Exposure to both formaldehyde and high relative humidity exacerbates allergic asthma by activating the TRPV4-p38 MAPK pathway in Balb/c mice. *Environmental Pollution* 256. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113375>
- Dudics S, Langan D, Meka RR, et al (2018) Natural products for the treatment of autoimmune arthritis: Their mechanisms of action, targeted delivery, and interplay with the host microbiome. *International Journal of Molecular Sciences* 19:08-25. <https://doi.org/10.3390/ijms19092508>
- Elshabrawy HA, Chen Z, Volin M v., et al (2015) The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis* 18:433–448. <https://doi.org/10.1007/s10456-015-9477-2>

- Freitas Junior RA, Lossavaro PKMB, Kassuya CAL, et al (2022) Effect of Ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook. F. & Thomson) Essential Oil on Acute Inflammatory Response In Vitro and In Vivo. *Molecules* 27:1-15. <https://doi.org/10.3390/molecules27123666>
- Gegout P, Gillet P, Chevrier D, et al (1994) Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Pharmacology letters*. <https://doi.org/10.1007/s10456-015-9477-2>
- Guazelli CFS, Staurengo-Ferrari L, Zarpelon AC, et al (2018) Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 102:175–184. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.057>
- Guerrero ATG, Cunha TM, Verri WA, et al (2011) Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: Participation of TNF- α , IL-1 β , and CXCL1/KC. *European Journal of Pharmacology* 674:51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.10.023>
- He Y, Long H, Zou C, et al (2021) Anti-nociceptive effect of *Portulaca oleracea* L. ethanol extracts attenuated zymosan-induced mouse joint inflammation via inhibition of Nrf2 expression. *Innate Immunity* 27:230–239. <https://doi.org/10.1177/1753425921994190>
- Huo M, Cui X, Xue J et al (2013) Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *Journal of Surgical Research* 180:47-54. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.10.050>
- Kassuya RM, dos Santos E, Bosso FH, et al (2021) Anti-inflammatory Properties of Ethanolic Extract and 2''-O- β -d-Glucopyranosyl-vitexin Obtained from *Alternanthera tenella* Colla Whole Plant. *Inflammation* 44:1540–1552. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01438-7>
- Kuraoka-Oliveira ÂM, Radai JAS, Leitão MM, et al (2020) Anti-inflammatory and anti-arthritic activity in extract from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Journal of Ethnopharmacology* 249. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112418>
- Kumar V, Sharma A (2010) Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology* 10:1325–1334. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.012>

- Li C, Zhu H, Zhao K, et al (2022) Chemical constituents, biological activities and anti-rheumatoid arthritic properties of four citrus essential oils. *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.7484>
- Long L, Yang H, Gao Y, et al The composition of (-)-Linalool, (-)-Borneol and Trans Caryophyllene inhibits inflammation and apoptosis through suppression of NF- κ B and activation of Nrf2/HO-1 signaling pathways in RAW264.7 Macrophages. <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3923545>
- McCarson KE (2015) Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)–Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. *Current Protocols in Pharmacology* 70:5.4.1–5.4.9. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0504s70>
- Mills SEE, Nicolson KP, Smith BH (2019) Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *British Journal of Anaesthesia* 123:273–283. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.023>
- Möller, K. Ä., Bo J., Odd-Geir B. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer (1998). *Journal of neuroscience methods* 84:1–2. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(98\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(98)00083-1)
- Nunes C dos R, Arantes MB, de Faria Pereira SM, et al (2020) Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents 25, 26–37. *Molecules* <https://doi.org/10.3390/molecules25163726>
- Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, et al (2000) Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00790-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00790-6)
- Rocha FAC, Leite AKRM, Pompeu MML, et al (2008) Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models. *Infection and Immunity* 76:2736–2745. <https://doi.org/10.1128/IAI.01085-07>
- Rock KL, Kono H (2008) The inflammatory response to cell death. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 3:99–126. <https://doi.org/10.1146%2Fannurev.pathmechdis.3.121806.151456>

- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, et al (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91:621–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>
- Scherer HU, Häupl T, Burmester GR (2020) The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity* 110. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102400>
- Shahbazi Y (2016) Variation in chemical composition of essential oil of *Ferulago angulata* collected from west parts of Iran. *Pharmaceutical Sciences* 22:16–21. <https://doi.org/10.15171/PS.2016.04>
- Shah SMM, Sadiq A, Shah SMH, Ullah F (2014) Antioxidant, total phenolic contents and antinociceptive potential of *Teucrium stocksianum* methanolic extract in different animal models. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14. <https://doi.org/10.1186/14726882-14-181>
- Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, et al (2007) Transcriptional profiling of the LPS induced NFκB response in macrophages. *BMC Immunology* 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-1>
- Sherwood ER, Toliver-Kinsky T (2004) Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology* 18:385–405. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2003.12.002>
- Tan LTH, Lee LH, Yin WF, et al (2015) Traditional uses, phytochemistry, and bioactivities of *Cananga odorata* (ylang-ylang). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/896314>
- Varela ML, Mogildea M, Moreno I, Lopes A (2018) Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation* 41:1115–1127. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0739-1>
- Wei A, Shibamoto T (2010) Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:7218–7225. <https://doi.org/10.1021/jf101077s>
- Yamada AN, Grespan R, Yamada ÁT, et al (2013) Anti-inflammatory activity of *Ocimum americanum* L. essential oil in experimental model of zymosan-induced arthritis. *American Journal of Chinese Medicine* 41:913–926. <https://doi.org/10.1142/S0192415X13500614>

- Yang R, Liu C, Yu D, et al (2021) Correlation between Hyperalgesia and Upregulation of TNF- α and IL-1 β in Aqueous Humor and Blood in Second Eye Phacoemulsification: Clinical and Experimental Investigation. *Journal of Immunology Research*. <https://doi.org/10.1155/2021/7377685>
- Yang R, Wang X, Xi D, et al (2020) Cordycepin Attenuates IFN- γ -Induced Macrophage IP-10 and Mig Expressions by Inhibiting STAT1 Activity in CFA-Induced Inflammation Mice Model. *Inflammation* 43:752–764. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01162-3>
- Yeung YT, Aziz F, Guerrero-Castilla A, Arguelles S (2018) Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. *Current Pharmaceutical Design* 24:1449–1484. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180327165604>
- Zaringhalem J, Manaheji H, Mghsoodi N, et al (2008) Spinal μ -opioid receptor expression and hyperalgesia with dexamethasone in chronic adjuvant-induced arthritis in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35:1309–1315. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05009.x>

ANEXO



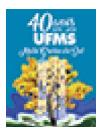
Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito do óleo essencial de Ylang-ylang (*Cananga odorata*) sobre a resposta inflamatória crônica em modelo de artrite experimental", registrada com o nº 1.182/2021, sob a responsabilidade de Saulo Euclides Silva Filho - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, em reunião de 23/09/2021.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2021 a 20/03/2023
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / Camundongo Swiss
Nº de animais	240
Peso/Idade	18-25g / 4-6 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria, Presidente de Comissão**, em 01/10/2021, às 09:06, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2828681** e o código CRC **E6849059**.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Referência: Processo nº 23104.015092/2021-01

SEI nº 2828681