



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CHRISTIANE AGUIAR NOBRE

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DE *Chresta martii* (DC.) H. Rob. NA
HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA DA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS**

SOBRAL- CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Campus de Sobral

-
- N672e Nobre, Christiane Aguiar.
Eficácia e segurança de *chresta martii* (dc.) H. Rob. na hipernocicepção inflamatória da articulação temporomandibular induzida por zymosan em ratos.. – 2013.
87 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, *Campus* de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2013.
Área de Concentração: Biotecnologia.
Orientação: Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho.
Co-orientação: Prof^ª. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves.
1. Biotecnologia. 2. Articulação Temporomandibular. I. Título.

CHRISTIANE AGUIAR NOBRE

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DE *Chresta martii* (DC.) H. Rob. NA
HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA DA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^ª. Dr. Gerardo Cristino Filho

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves

SOBRAL- CE

CHRISTIANE AGUIAR NOBRE

**EFICÁCIA E SEGURANÇA DE *Chresta martii* (DC.) H. Rob. NA
HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA DA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^ª. Dr. Gerardo Cristino Filho

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves

Aprovada em: 28/02/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^º. Dr. Gerardo Cristino Filho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Sobral

Prof^ª. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves (Co-orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* Sobral

Prof^ª. Dra. Mirna Marques Bezerra

Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Sobral

À minha família, meu equilíbrio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Gerardo Cristino Filho pela confiança.

À Prof^a Mirna Marques Bezerra, pela amizade e exemplo a ser seguido.

À Prof^a Hellíada Vasconcelos Chaves, pela orientação e energia repassada.

Ao Prof^o Antonio Alfredo Rodrigues e Silva pela valorosa colaboração.

À Profa. Karuza Maria Alves Pereira, pela realização das análises histopatológicas.

À Doutoranda Danielle Rocha do Val pelo companheirismo e apoio imprescindível.

Aos queridos alunos Jonas Cavalcante, Lívia Cunha Rios, Natacha Arriaga e Suzana Capistrano pela ajuda na realização dos experimentos.

Ao técnico de Laboratório de Patologia, Adalberto Júnior pelo trabalho e disponibilidade.

À minha família, sempre.

“Nossa ignorância nesses terrenos obscuros da Arte é total e só comparável à leviandade, à tolice com que os médicos de tanto ignorarem, passam a considerar irrelevantes os fatores - que não conseguem penetrar.”

Pedro Nava

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo investigar a eficácia e segurança do extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob.(EHA) na hipernocicepção inflamatória da articulação temporomandibular (ATM) induzida por Zymosan em ratos, avaliando o possível papel do óxido nítrico (NO) e hemeoxigenase-1 (HO-1). Protocolo1: Ratos Wistar machos (160-220 g) foram pré-tratados com EHA (100, 200 ou 400 mg/kg; per os) 60 min antes da injeção (intra-articular (i.art.) de Zymosan (2 mg) na ATM esquerda. O grupo Zymosan (Zy) recebeu salina (per os) 60 min antes da indução da artrite. O grupo Sham recebeu solução salina (i.art.) ; Indometacina (5 mg/ kg) foi usada como controle positivo. Teste do Von Frey foi utilizado para avaliar a hipernocicepção articular (g) na 4ª hora após injeção (i.art.) de Zy. Na 6ª hora após injeção (i.art.) Zy os animais foram eutanasiados, sob anestesia, e coletou-se o lavado sinovial para contagem total de células e dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO) e coletou-se o tecido articular para análise histopatológica (H&E). Em outra série de experimentos os animais foram pré tratados com L-NAME (30 mg/kg; i.p.) e ZnPP-IX (3 mg/kg, s.c.). Protocolo 2: Para avaliar a segurança da administração de EHA camundongos Swiss (25-30 g) receberam diariamente, uma vez ao dia, 400 mg/kg (per os) durante 14 dias. Variação ponderal, peso úmido do fígado, leucograma, parâmetros bioquímicos, e alterações comportamentais foram determinados. Controles receberam solução salina (per os). Resultados EHA (400 mg/kg; per os) aumentou ($p < 0.05$) o limiar de hipernocicepção articular, reduziu o influxo celular e a atividade de MPO, quando comparado ao grupo Zy. EHA (400 mg/kg; per os) reduziu o influxo celular nas membranas sinoviais. Esses resultados foram similares ao obtido com os compostos testados em ambas as doses. O efeito antinociceptivo de EHA ocorreu na presença de L-NAME, porém não foi observado quando se administrou ou ZnPP-IX. EHA 400 mg/kg durante 14 dias não alterou a variação ponderal, o peso úmido do fígado. EHA 400 mg/kg não modificou os parâmetros bioquímicos e hematológicos .O efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de EHA é multimodal, não atuando pela via do NO, porém dependendo da integridade das vias do HO-1.

Palavras chave: *Chresta martii* (DC.) H. Rob.; articulação temporomandibular; artrite

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the efficacy and safety of *Chresta martii* (DC.) H. Rob.(EHA) in the temporomandibular joint arthritis (TMJ) induced by Zymosan in rats by evaluating the possible role of nitric oxide and hemeoxygenase-1 (HO-1). **Protocol 1:** Male Wistar rats (160-220 g) were pretreated with EHA (100, 200 ou 400 mg/kg; per os) before the intra-articular injection (i.art.) of zymosan (2 mg) in the left TMJ. The Zymosan group (Zy) received saline (*per os*) 60 min prior to induction of arthritis. The Sham group received saline (i.art.). Indomethacin (5 mg/kg) was used as positive control. Von Frey test was used to evaluate the joint hypernociception (g) at 4 h after injection of Zy. At 6 hours after Zy injection, the animals were euthanized under anesthesia, and collected the joint lavage for total cell count, myeloperoxidase activity (MPO) and joint tissue for histopathological analysis (H&E). In another series of experiments the animals were pretreated with L-NAME (30 mg/kg; i.p.) or ZnPP-IX (3 mg/kg, s.c.). **Protocol 2:** To evaluate the systemic effects of chronic administration of EHA, Swiss mice (25-30 g) received once a day, 400 mg/kg (per os) for 14 days. Changes in body weight, wet weight of o liver , white blood cell count, biochemical parameters, and behavioral changes were determined. Controls received saline (*per os*). EHA 400 mg/kg (per os) increased ($p < 0.05$) joint hypernociception threshold, reduced the cell influx and MPO activity, when compared to Zy. EHA (400 mg/kg) reduced the cell influx in the synovial membranes. The analgesic effect of EHA occurred in the presence of L-NAME, but was not observed when administered r ZnPP-IX. EHA (400 mg/kg) for 14 days did not alter the weight change, wet weight of liver. EHA (400 mg/kg) did not affect the biochemical and hematological parameters in relation to the saline group. The anti-inflammatory and analgesic effect of EHA is multimodal, which do not act via NO, however depending on the integrity of the paths of HO-1.

Keywords: *Chresta martii*; temporomandibular joint; arthritis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mesorregião do Xingó.....	26
Figura 2 - Chapadas areníticas no vale do rio São Francisco, região do Xingó.....	27
Figura 3 - Espécime de <i>Chresta martii</i>	28
Figura 4 - Ilustração da migração de leucócitos através do endotélio Vascular.....	31
Figura 5 - Ilustração da articulação temporomandibular.....	36
Figura 6 - Fotografia ilustrativa da articulação temporomandibular (ATM).....	36
Figura 7 - Esquema ilustrativo da administração de <i>Chresta martii</i> no modelo de hipernocicepção inflamatória na articulação temporomandibular induzida por Zymosan.....	52
Figura 8 - Esquema ilustrativo dos mecanismos de ação associados ao extrato hidroalcolico de <i>Chresta martii</i> no modelo de hipernocicepção inflamatória na articulação temporomandibular por Zymosan.....	53
Figura 9 - Efeito da administração <i>Chresta martii</i> na hipernocicepção articular em ratos submetidos à indução da artrite por Zymosan na articulação temporomandibular (ATM).....	55
Figura 10 - Efeito da administração <i>Chresta martii</i> sobre o número total de leucócitos no lavado sinovial na artrite induzida por Zymosan (Zy) na articulação temporomandibular (ATM) de ratos.....	56
Figura 11 - Efeito da administração de <i>Chresta martii</i> sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) no lavado sinovial na artrite induzida por Zymosan (Zy) na articulação temporomandibular (ATM) de ratos.....	57

Figura 12 - Fotomicrografias ilustrativas das articulações temporomandibulares (ATMs) de ratos submetidos à indução da artrite por Zymosan (Zy).....	60
Figura 13 - Fotomicrografias ilustrativas das articulações temporomandibulares (ATMs) de ratos submetidos à indução da artrite por Zymosan (Zy) e pré-tratados com a dose de (400 mg/kg) de <i>Chresta martii</i>	61
Figura 14 - Efeito do Zinco Protoporfirina IX – ZnPP-IX (inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 – HO-1) (3 mg/kg) sobre a eficácia de <i>Chresta martii</i> no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por Zymosan na articulação temporomandibular.....	63
Figura 15 - Efeito da coadministração do Zinco Protoporfirina IX – ZnPP-IX (inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 – HO-1) e <i>Chresta martii</i> (DC.) H. Rob. sobre a celularidade no lavado sinovial no modelo hipernocicepção inflamatória da ATM por Zymosan	64
Figura 16 - Variação ponderal em camundongos tratados com <i>Chresta martii</i> durante 14 dias.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise histopatológica das ATMs de ratos submetidos à indução da artrite na ATM esquerda tratados com extrato hidro alcoólico de <i>Chresta martii</i> (DC.) <i>H. Rob.</i>	59
Tabela 2 - Efeito do extrato hidro alcoólico de <i>Chresta martii</i> (DC.) <i>H. Rob.</i> sobre os parâmetros sanguíneos (AST, ALT, amilase, lipase e contagem de células) e massa do fígado após tratamento diário em dose única durante 14 dias consecutivos.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ATM	Articulação temporomandibular
AVDs	Atividades de Vida Diárias
CE	Ceará
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DTM	Disfunções temporomandibulares
EDTA	Ácido etilenoaminotetracético
E.P.M	Erro padrão da média
EHA	Extrato hidroalcoólico de <i>Chresta martii</i>
HEP	Heparina
HO-1	Heme-oxigenase 1
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor (International Association for the Study of Pain)
IL-1 a IL-17	Interleucinas
IL-1 β	Interleucina 1-beta
i.art.	Intra-articular
i.p.	Intraperitoneal
L-NAME	Éster metílico de nitroarginina
Min	Minuto
MPO	Mieloperoxidase
NO	Óxido nítrico

NOS	Óxido nítrico sintase
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
per. Os	Via oral
$P < 0.05$	Probabilidade de erro menor do que 5%
$P > 0.05$	Probabilidade de erro maior do que 5%
PBS	Tampão fosfato
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2
s.c.	Subcutânea
K+ATP	Canais de potássio sensíveis ao ATP
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Zy	Zymosan
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
\pm SD	Mais ou menos o desvio padrão
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Plantas Medicinais.....	21
2.2 A família Asteraceae no Brasil.....	23
2.3 Chresta martii (DC.) H. Rob.....	24
2.4 Inflamação e Dor Inflamatória.....	28
2.4.1 Inflamação.....	28
2.4.2 Dor Inflamatória.....	31
2.5 Dor orofacial.....	33
2.5.1 Articulação Temporomandibular.....	35
2.5.2 Disfunção Temporomandibular.....	38
2.5.3 Mediadores inflamatórios e dor orofacial.....	40
3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	43
4 OBJETIVOS.....	45
4.1 Geral.....	45
4.2 Específicos.....	45
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
5.1 Material Botânico (Chresta martii (DC.) H. Rob.).....	46
5.2 Animais.....	46
5.3 Drogas, reagentes e soluções.....	46
5.3.1 Soluções.....	47

5.4. Protocolo experimental.....	48
5.4.1 Indução da artrite na articulação temporomandibular (ATM) de ratos e avaliação da hipernocicepção articular.....	48
5.4.2 Contagem do influxo celular no lavado sinovial.....	49
5.4.3 Avaliação da atividade de mieloperoxidase.....	49
5.4.4 Análise histopatológica da articulação temporomandibular (ATM).....	49
5.5 Avaliação da segurança.....	50
5.5.1 Estudo de toxicidade aguda.....	50
5.5.2 Estudo de segurança.....	50
5.6 Modulação Farmacológica.....	51
5.6.1 Administração de <i>Chresta martii</i> (DC.) <i>H. Rob.</i> no modelo de artrite na articulação temporomandibular por Zymosan.....	51
5.6.2 Investigação do mecanismo de ação de <i>Chresta martii</i> (DC.) <i>H. Rob.</i>	51
5.7 Análise Estatística.....	51
6 RESULTADOS.....	54
6.1 Efeitos do extrato hidroalcolico de <i>Chresta martii</i> (DC.) <i>H. Rob</i> no modelo da artrite induzida por Zymosan na articulação temporomandibular de ratos.....	54
6.1.1 Avaliação dos efeitos do extrato hidro alcoólico de <i>Chresta martii</i> (DC.) <i>H. Rob.</i> na hipernocicepção articular.....	54
6.1.2 Efeitos do extrato hidro alcoólico <i>Chresta martii</i> (DC.) <i>H. Rob.</i> sobre a celularidade no lavado sinovial.....	54
6.1.3 Efeitos do extrato hidro alcoólico de <i>Chresta martii</i> (DC.) <i>H. Rob.</i> sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO).....	54
6.1.4 Análise histopatológica das ATMs de ratos submetidos à indução da artrite na ATM esquerda tratados com extrato hidro alcoólico de <i>Chresta martii</i>	58

6.2	Investigação do possível mecanismo de ação de <i>Chresta martii</i> (DC.) H. Rob. no modelo de artrite induzida por Zymosan na articulação temporomandibular: análise do envolvimento da Hemeoxigenase-1	62
6.2.1	Efeito de Zinco Protoporfirina IX – ZnPP-IX (inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 – HO-1) sobre a eficácia de <i>Chresta martii</i> (DC.) H. Rob. no modelo de artrite induzida por Zymosan na articulação temporomandibular.....	62
6.2.2	Efeito da coadministração do Zinco Protoporfirina IX – ZnPP-IX (inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 – HO-1) e <i>Chresta martii</i> (DC.) H. Rob. sobre a celularidade no lavado sinovial no modelo hipernocicepção inflamatória da ATM por Zymosan	62
6.3	Avaliação sistêmica do extrato hidro alcóolico de <i>Chresta martii</i>	65
6.3.1	Ensaio de toxicidade aguda.....	65
6.3.2	Ensaio de segurança.....	65
7	DISCUSSÃO.....	68
8	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

A busca e a utilização de plantas com propriedades medicinais é uma prática milenar, atestada em vários tratados de fitoterapia de grandes civilizações há muito tempo desaparecidas. Estas, ao longo do curso da história da humanidade, desenvolveram maneiras particulares de explorá-las para distintas finalidades, usando-as como alternativa de sobrevivência.

Estima-se que cerca de 25 % dos fármacos empregados atualmente nos países industrializados advém, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de vegetais superiores. É lícito enfatizar que embora grande parte do potencial da biodiversidade ainda permaneça inexplorada (PIETERS; VLIETINCK, 2005), o comércio de matérias-primas, plantas medicinais e medicamentos à base de vegetais apresenta um crescimento anual de 5 a 15 %, movimentando US\$ 2,17 bilhões (PATWARDHAN *et al.*, 2005; WHO, 2005; ALVES *et al.*, 2008). No Brasil, o setor fitoterápico conta com duzentas empresas movimentando em torno de US\$ 400 milhões, o que representa 6,7 % das vendas de medicamentos em toda sua cadeia produtiva, e emprega mais de cem mil pessoas no país (MARRONE; MACEDO, 2007; CARVALHO, 2011).

Diferentes estudos farmacológicos com produtos obtidos de plantas da flora brasileira revelam o potencial terapêutico destas espécies em modelos que amenizam o dano inflamatório e a dor por diferentes estímulos (AGRA *et al.*, 2008).

A inflamação representa uma reação protetora, essencial para a sobrevivência do indivíduo. Entretanto, quando acontece de maneira inapropriada, pode tornar-se prejudicial, passando a fazer parte do processo patológico de algumas doenças (DALE *et al.*, 2007).

Considerando-se os processos inflamatórios dolorosos que afetam o aparelho estomatognático, a artrite na articulação temporomandibular (ATM) apresenta-se como um dos diagnósticos diferenciais nas disfunções temporomandibulares (DTM) que, por sua vez, engloba um grupo de condições musculoesqueléticas e neuromusculares envolvendo as ATMs, os músculos mastigatórios e todos os tecidos associados. Os sinais e sintomas associados com essas disfunções são diversos, e podem incluir dificuldade em mastigar, falar, e/ou

em outras funções orofaciais, estando frequentemente associadas com dor aguda ou persistente. As formas crônicas das DTMs são incapacitantes, podendo acarretar dificuldades nas atividades laborais, exclusão social, com grandes prejuízos para os sistemas de saúde e para a vida desses doentes (GREENE; KLASSER; EPSTEIN 2010).

O tratamento inicial das DTMs é baseado no uso de modalidades terapêuticas conservadoras e reversíveis. Apesar de nenhuma terapia específica ser uniformemente efetiva, muitas das terapias conservadoras provaram ser no mínimo tão efetivas em proporcionar alívio sintomatológico quanto às formas de tratamento invasivas. Pelo fato de essas modalidades terapêuticas não produzirem modificações irreversíveis, elas apresentam menor risco de causar dano. As modalidades de tratamento conservadoras incluem terapias com placas oclusais, terapias físicas (termoterapia, terapia de resfriamento, laser, ultra-som, estimulação elétrica neural transcutânea-TENS), fisioterapia, terapia com exercícios e terapia farmacológica (OKESON, 2003; DE LEEW, 2010).

Pensando nas terapias conservadoras para as dores orofaciais e na utilização de produtos naturais para tal fim, é relevante desenvolver estudos que mostrem sua eficácia. Sabe-se que a flora brasileira representa mais de 20% das espécies vegetais conhecidas no mundo, embora se observe uma subutilização deste potencial como fonte de novas moléculas e se constate que seu consumo está normalmente associado com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, tendo seu uso e indicação respaldados apenas pela própria comunidade. Tais práticas trouxeram à tona a discussão o problema do uso indiscriminado de produtos de origem natural, que pode trazer consequências desastrosas à saúde da comunidade (VEIGA JÚNIOR, 2005).

Diante desse cenário, muitas têm sido as iniciativas do Ministério da Saúde, em parceria com órgãos do governo e sociedade civil, para viabilizar a utilização racional de plantas medicinais e fitoterápicos, tendo como linhas condutoras a preservação da biodiversidade, o desenvolvimento sustentável de uma terapêutica complementar, além do benefício à população brasileira.

De fato, a identificação de novas fontes naturais de compostos químicos visando o desenvolvimento de fitofármacos beneficiará a economia de países em desenvolvimento, possibilitando uma maior autonomia no gerenciamento de políticas de saúde pública, contribuindo para o acesso da população a medicamentos seguros e de baixo custo com embasamento científico mediante a realização de pesquisas que comprovem as atividades farmacológicas e/ou toxicológicas (CALIXTO *et al.*, 2000).

Alguns estudos etnofarmacológicos têm demonstrado a utilização popular da *Chresta martii* no tratamento de doenças do trato gastrointestinal (ALMEIDA *et al.*, 2005, 2006; AGRA *et al.*, 2008). Trabalhos realizados pelo nosso grupo mostraram seu efeito gastroprotetor em modelos de lesão gástrica, apresentando atividade antioxidante e efeito anti-quimiotáxico (SILVA *et al.*, 2012, 2013), vislumbrando assim, um potencial efeito anti-inflamatório. O uso dessa terapêutica na inflamação articular é inédito, sendo necessário avaliar seu potencial benefício. Neste sentido, este estudo propôs investigar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da *Chresta martii* (DC.) H. Rob. em um modelo de hipernocicepção inflamatória na ATM em ratos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas Medicinais

Ao longo dos anos o homem vem buscando na natureza, principalmente nas plantas, a cura para os diversos tipos de doenças. Numerosas etapas marcaram a evolução da arte de curar, porém, torna-se difícil delimitá-las com exatidão, já que a medicina esteve longamente associada a práticas mágicas, místicas e ritualísticas. No entanto, é provável que ainda na pré-história, ao observarem o hábito dos animais, os humanos começaram a manipular e usar plantas para aliviar os sintomas de moléstias e ferimentos (LI; BROWN, 2009). As receitas mais antigas sobre o uso de plantas para fins medicinais datam aproximadamente 3700 anos a.C. e foram encontradas nas pirâmides do faraó Quéops, no Egito (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; BENT, 2008). As primeiras descobertas foram feitas por estudos arqueológicos em ruínas do Irã. Também na China, em 3.000 a.C., já existiam farmacopeias que compilavam as ervas e as suas indicações terapêuticas. Estas civilizações notaram que alguns vegetais experimentados no combate às doenças revelavam um potencial curativo. Toda essa informação foi transmitida às gerações posteriores, que as compilou e documentou através da escrita. Atualmente, mesmo com grande quantidade de drogas sintéticas no mercado farmacêutico, as plantas continuam a desempenhar um papel de destaque na saúde pública.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80 % da população mundial dependem da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde, e que quase 85 % da medicina tradicional envolve o uso de plantas medicinais, seus extratos vegetais e seus princípios ativos (CALIXTO, 2000).

Muitos fármacos comercializados apresentam estruturas químicas relacionadas a uma substância extraída de alguma espécie botânica de uso consagrado na medicina popular. O interesse em medicamentos derivados de plantas superiores aumentou expressivamente na última década. Estimativas atuais evidenciam que mais de 80 % da população dos países em desenvolvimento dependem da medicina popular ou de medicamentos à base de plantas como fonte primária de cuidados à saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Entretanto, a despeito dessa observação, muitas das plantas usadas pelas comunidades ainda não foram objeto de estudos de toxicidade e eficácia, para permitir sua utilização segura. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico, o que demonstra que, apesar da enorme biodiversidade, existe uma lacuna entre a oferta de plantas e sua real capacidade terapêutica. Como qualquer outro medicamento, os fitoterápicos ou fitomedicamentos, devem ter a sua eficácia e segurança comprovadas, bem como a reprodutibilidade de sua ação (BATEMAN *et al.*, 1998; STEDMAN, 2002; ERNST, 2003). Nesse contexto, a importância da investigação de plantas medicinais reside principalmente na identificação de protótipos, cuja atividade farmacológica permita o desenvolvimento de novos fármacos isentos de efeitos adversos.

No Brasil, mesmo com o incentivo da indústria farmacêutica para a utilização de medicamentos industrializados, grande parte da população utiliza práticas complementares para cuidar da saúde. Cabe ressaltar que em algumas regiões brasileiras, em especial no Nordeste, o uso de preparações caseiras com plantas medicinais possui grande importância, sendo este fato influenciado pela deficiência na assistência médica, como pela influência dos hábitos culturais e pela disponibilidade da flora (MATOS *et al.*, 1989).

O Brasil ocupa o primeiro lugar dentre os 17 países mais ricos do mundo em biodiversidade, possuindo em torno de 15 a 20 % do total mundial de espécies, com destaque para as plantas superiores, a qual detém aproximadamente 24 % desta biodiversidade. Além desse acervo genético, o Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo de conhecimentos e tecnologias, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas com fins terapêuticos (POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, 2006).

Indubitavelmente, a imensa variedade de espécies vegetais existentes no Brasil apresenta um importante diferencial para o desenvolvimento de medicamentos (KATO *et al.*, 2001), o que se constitui em inestimável valor para a sobrevivência do ser humano, proporcionando a manutenção do equilíbrio dinâmico dos ecossistemas.

Diante desse cenário, esse estudo se propôs a avaliar, em um modelo de hipernocicepção inflamatória na ATM de ratos, a eficácia e segurança de *Chresta martii* (DC.) H. Rob.

2.2 A família Asteraceae no Brasil

A vegetação da caatinga, no semiárido nordestino, compõe um bioma largamente ameaçado que cobre vasta área do nordeste do Brasil, sendo fonte de muitos recursos naturais ainda pouco estudados. A flora medicinal da caatinga é predominantemente composta por plantas herbáceas (169 espécies) seguida por arbustos e subarbustos (130 espécies), e vegetação arbórea. Muitas espécies de plantas medicinais são conhecidas e utilizadas na medicina popular e na fabricação comercial de produtos fitoterapêuticos, embora raros estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos sejam desenvolvidos na região nordeste, a despeito da sua diversidade cultural e biológica (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Na região nordestina do Xingó (**Figura 1**), localizada numa área que abrange parte dos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, são encontradas muitas espécies típicas da caatinga, tanto arbóreas, nas regiões de platô, quanto arbustivas nos cânions, compreendendo também espécies endêmicas. Na região, ocorrem extensas áreas areníticas formando desfiladeiros com flora própria (**Figura 2**), bastante diferentes das demais áreas, principalmente com populações de Bignoniaceae e Asteraceae, não encontradas em outras áreas (GIULIETTI et al., 2003).

A família Asteraceae (Compositae), maior ramo filogenético das Eudicotiledôneas, com 1600 a 1700 gêneros, fazendo parte da ordem Asterales, subordem Asteridae, é um grupo natural e uniforme altamente evoluído (DEL VITTO & PETENATTI, 2009). Esta família é constituída por ervas, subarbustos e arbustos e, menos frequentemente, árvores ou lianas (com ou sem látex), com espinhos presentes em algumas espécies. De acordo com a descrição de Souza e Lorenzi (2008), as asteráceas:

...normalmente possuem folhas alternas ou opostas, menos frequentemente verticiladas, simples ou raramente compostas, sem estípulas, com margem inteira ou mais frequentemente serreadas. Inflorescência do tipo capítulo envolvido por brácteas formando um involúcro

e flores dispostas sobre um receptáculo geralmente discoide. As flores podem ser todas iguais entre si ou diferenciadas em flores do raio (as mais externas) e flores do disco (as mais internas); cálice geralmente transformado em papilho cerdoso ou plumoso; corola geralmente pentâmera, gamopétala, prefloração geralmente valvar; estames, sinateros, epipétalos, anteras rimosas; ovário ínfero, bicarpelar, unilocular, com único óvulo de placentação ereta. O fruto normalmente é cipsela, com papilho persistente, auxiliando na dispersão do fruto. No Brasil, as Asteraceae estão bem representadas, ocorrendo aproximadamente 250 gêneros e 2000 espécies. Muitas são cultivadas como plantas ornamentais, como a margarida (*Leucanthemum vulgare*), os crisântemos (*Chrysanthemum spp.*) e a dália (*Dahlia X hybrida*). Entretanto, diversas plantas medicinais estão também incluídas, destacando-se a carqueja (*Baccharis trimera*), a camomila (*Matricaria recutita*) e o guaco (*Mikania spp.*). São particularmente comuns nas formações abertas do Brasil, principalmente no cerrado (*Calea* e *Aspilia*) e nos campos (*Vernonia*, *Baccharis* e *Senecio*) e nos campos rupestres (*Lychnophora*) sendo pouco comuns no interior de florestas densas (*V. polyantes*).

Asteráceas estão presentes em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Na grande maioria, estão representadas por espécies herbáceas, anuais ou perenes, subarbustivas ou arbustivas, trepadeiras e por poucas espécies arbóreas (BARROSO *et al.*, 1986). Do ponto de vista fotoquímico, a família é conhecida por produzir principalmente poliacetilenos, sesquiterpenoides, diterpenoides, triterpenoides, flavonoides, cumarinas, benzofuranos e benzopiranos (EMERENCIANO *et al.*, 1998; SAKAMOTO, 2005). Diferentes estudos mostraram a presença, em seus extratos alcoólicos ou hidroalcoólicos, de polifenóis (PETACCI *et al.*, 2012), carboidratos, aminoácidos, taninos, glicosídeos cardiotônicos, carotenoides, esteroides e triterpenoides, depsídeos e depsidonas, saponinas espumídicas, alcaloides, purinas, polissacarídeos e antraquinonas (HEEMANN *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2010). Estudos com espécies desta família revelam uma extensa lista de efeitos farmacológicos, com utilização por diferentes populações no tratamento de afecções como inflamação, hipertensão, cálculo renal (ALMEIDA *et al.*, 2006), gastrite, úlcera gástrica (GONZALES *et al.*, 2000; BAGGIO *et al.*, 2003; BIGHETTI *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2009), úlcera duodenal (TOMA *et al.*, 2004), além de atividade bactericida, espasmolítica, antileucêmica, antifúngica (VERDI *et al.*, 2005).

2.3 *Chresta martii* (DC.) H. Rob.

A família Asteraceae é subdividida em 12 subfamílias, contendo 43 tribos (FUNK *et al.*, 2009). Vernoniae é uma das mais importantes tribos de Asteraceae

(subfamília Cichorioideae) com aproximadamente 1100 espécies agrupadas em 129 gêneros, entre eles o gênero *Chresta* (KEELEY *et al.*, 2007; KEELEY & ROBINSON, 2009), objeto de estudo deste trabalho.

Atualmente, considera-se que o gênero *Chresta* é composto por 12 espécies (*Chresta amplexifolia*, *Chresta harleyi*, *Chresta martii*, *Chresta pinnatifida*, *Chresta curumbensis*, *Chresta speciosa*, *Chresta scapigera*, *Chresta angustifolia*, *Chresta plantaginifolia*, *Chresta sphaerocephala*, *Chresta exsucca* e *Chresta pycnocephala*) que ocorrem no cerrado, caatinga e campos rupestres no planalto brasileiro. É caracterizado genericamente como composto por ervas perenes ou arbustos, contendo de 2 a 12 floretes por cabeça e capítulos densamente congestos, arranjados em glomérulos solitários ou corimbosos (ROBINSON, 1999; ROQUE *et al.*, 2008). A espécie *Chresta martii* (**Figuras 3**) foi objeto de poucos estudos e existe ainda uma polêmica sobre sua real denominação e posição no cladograma das alguns autores a consideram um ramo extra e , outros, sinonímia de *Argyrovernonia harleyi*. Entretanto, esta última denominação já não consta na Lista de Espécies da Flora do Brasil (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2012). A planta é caracterizada por conter glomérulos cônicos a campanulados, folhas pecioladas de formato ovalado-romboide, com 30 a 40 cabeças, 12 a 13 floretes e uma corola medindo de 12 a 15 mm, com plumagem (indumentum) prateada-acinzentada (ROBINSON, 1999; ROQUE *et al.*, 2008). A espécie foi pouco estudada do ponto de vista farmacológico ou fitoquímico, apesar alguns estudos demonstrarem sua utilização no tratamento de doenças do trato gastrointestinal (ALMEIDA *et al.*, 2005, 2006; AGRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012, 2013).



Figura 1- Mesorregião do **Xingó**: abrange parte dos estados de Alagoas, Sergipe, Pernambuco e Bahia sendo constituída por 79 municípios, totalizando uma área de 78.622,2 km², com uma população de 1.806.155 habitantes.

Fonte: <http://www.mi.gov.br/programas/programasregionais/xingo/abrangencia.asp>
Acesso em: 11/07/2012.



Figura 2 - Chapadas areníticas no vale do rio São Francisco, região do Xingó. Destacam-se os paredões, ora nus, ora cobertos com vegetações arbustivas típicas da caatinga. Fotografia: Antonio Alfredo Rodrigues e Silva



Figura 3 - Espécime de *Chresta martii* fotografado na região do Xingó [longitude - 37.940 (37° 56' 24" Oeste) e latitude variando de - 9.5563 (9° 33' 22" Sul) a - 9.5548 (9° 33' 17" Sul), altitude 130 metros], durante expedição empreendida em agosto de 2010. Fotografia realizada por Quelciane Regina Magalhães de Carvalho.

2.4. Inflamação e Dor Inflamatória

2.4.1 Inflamação

A inflamação pode ser definida como um conjunto de alterações bioquímicas e celulares que ocorre em resposta a estímulos inespecíficos com propósito de erradicar o agente agressor e proporcionar o reparo tecidual (HENSSON, 2005). É a primeira resposta à infecção ou lesão ocasionada por uma injúria (física ou química), isquemia do tecido, doenças autoimunes ou agentes infecciosos (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006; FOX *et al.*, 2010). Vários são os componentes envolvidos nesta resposta inflamatória, tais como proteínas plasmáticas, células circulantes (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas), vasos sanguíneos e componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo (mastócitos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, proteínas fibrosas estruturais, glicoproteínas de adesão e proteoglicanos) (KUMAR; SHARMA, 2010).

As reações inflamatórias podem ser caracterizadas por aumento do fluxo sanguíneo e aumento na permeabilidade vascular, seguida de dilatação venular e acúmulo de células do processo inflamatório, caracterizando os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. O quinto sinal da inflamação, que é a perda da função do tecido ou órgão lesado, foi descrito posteriormente por Virchow no século XIX (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A inflamação é essencial para a manutenção da saúde dos indivíduos, pois é a maneira pela qual o organismo reage contra agentes potencialmente danosos. De fato, o reconhecimento do agente lesivo desencadeia a ativação do sistema imune resultando na ativação de células e liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória. No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrerem de maneira eficiente e sincronizada, a resposta perde seu caráter protetor, podendo levar a uma lesão tecidual persistente, com acúmulo de leucócitos e colágeno, dentre outras substâncias, que podem prejudicar a função dos tecidos envolvidos (NATHAN, 2002; ROBBINS; COTRAN, 2005). De fato, esses achados formam a base da fisiopatologia de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide. Em linhas gerais, a resposta

inflamatória pode ser classificada em aguda e crônica levando-se em conta o período de duração e características patológicas do sítio inflamado. A inflamação aguda estende-se de horas a dias e é caracterizada pela alteração no calibre vascular levando a um aumento do fluxo sanguíneo local, mudanças estruturais na microvasculatura que permite a saída de proteínas plasmáticas e de leucócitos, formando o exsudato, e migração de leucócitos da microcirculação (primariamente neutrófilos) e seu acúmulo no foco da lesão. As respostas vascular e celular da inflamação aguda são mediadas por fatores químicos provenientes do plasma ou das células, e desencadeados pelo estímulo inflamatório. A inflamação é terminada quando o estímulo lesivo é removido, e os mediadores são dissipados ou inibidos (SMITH *et al.*, 1996, LEES *et al.*, 2004).

Por outro lado, a inflamação crônica é caracterizada por longa duração (semanas, meses ou anos), destruição tecidual e tentativa de reparo ocorrendo simultaneamente. Infiltração de células mononucleares e fibrose são características histológicas típicas de inflamação crônica (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Esta fase envolve processos inflamatórios que são coordenados por linfócitos T CD4+ denominados de células T que perduram por um período indeterminado. No local inflamado, os linfócitos T produzem interferon gama (IFN- γ), interleucinas (IL), como IL-12 e IL-17, que têm a função de ativar os efeitos bactericidas das células fagocitárias, prolongando seus efeitos inflamatórios (BÄCKDAHL; BUSHELL; BECK, 2009; ETHUIN *et al.*, 2004; GEISSMANN *et al.*, 2010).

O processo inflamatório envolve eventos vasculares e celulares que ocorrem simultaneamente (MCEVER, 1992; MALIK; LO, 1996; LEES *et al.*, 2004). Os eventos celulares são marcados pela saída dos leucócitos da luz do vaso e a sua migração para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases típicas como: rolamento, adesão firme e transmigração dos leucócitos (NOURSHARGH; MARELLI-BERG, 2005) (**Figura 4**). Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de estruturas denominadas moléculas de adesão e de mediadores quimiotáticos (TNF- α , IL-1, IL-8, IL-12, IFN- γ), que ativam e atraem macrófagos, monócitos, células dendríticas e células natural killer (NK) para o local da infecção (SPRINGER, 1994; BENNOUNA *et al.*, 2003; KUMAR; SHARMA, 2010). A

mobilização adequada dos leucócitos circulantes para o sítio inflamado é fundamental para a defesa do organismo, já que estas células podem desenvolver suas ações de fagocitose e destruição dos agentes patogênicos, levando à resolução do processo.

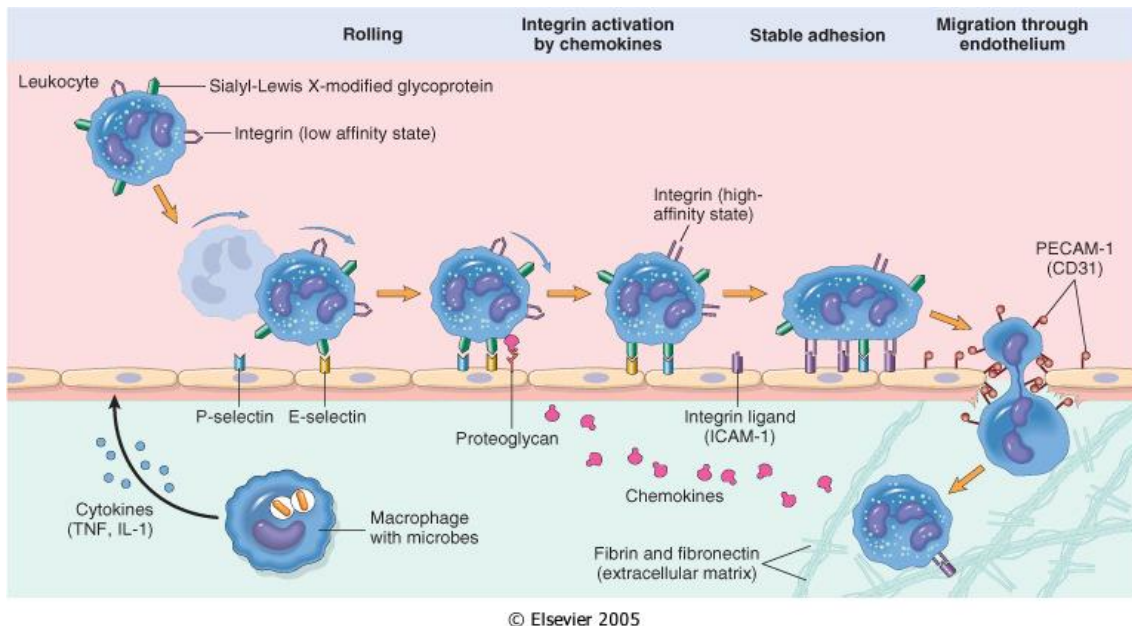


Figura 4 - Migração de leucócitos através do endotélio vascular.
Fonte: PETRI E BIXEL, 2005.

2.4.2 Dor Inflamatória

A injúria tecidual, com a consequente resposta inflamatória, está comumente associada com a hipersensibilidade dolorosa, de modo que a área inflamada torna-se fonte de dor notável. Observa-se na área inflamada uma redução do limiar doloroso a estímulos térmicos, mecânicos ou químicos (RIEDEL; NEECK, 2001). A dor é definida pela International Association for the Study of Pain (IASP) como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos deste dano (LOESER; MELZACK, 1999). Está presente no processo inflamatório e exerce também papel de defesa e alerta do organismo. Sua cronificação, porém, pode comprometer a qualidade de vida dos pacientes, limitando suas atividades profissionais, afetando suas relações sociais e familiares, com danos emocionais, implicando ainda aumento dos gastos financeiros para os serviços públicos de saúde (ANDRADE FILHO, 2001). Portanto,

a percepção da dor é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos em nosso cérebro (JULIUS E BASBAUM, 2001). A dor afeta pelo menos 30 % dos indivíduos durante algum momento da sua vida e, em 10 a 40 % deles, tem duração superior a um dia, tornando-se assim a principal causa de sofrimento, incapacitação para o trabalho, gerando graves consequências psicossociais e econômicas. De fato, muitos dias de trabalho são perdidos por aproximadamente 40 % dos indivíduos que sofrem de algum distúrbio doloroso (SBED, 2009).

Por outro lado, a palavra nocicepção deriva do latim (nocere: nocivo; capere: captar, receber), ou seja, captação do nocivo. Portanto, o termo nocicepção se refere aos mecanismos pelos quais os estímulos periféricos nocivos são transmitidos ao sistema nervoso central (SNC), sem, no entanto, apresentar o componente subjetivo que é característico da dor (OLIVEIRA, 2001). Desta forma, enquanto termo dor deve ser utilizado quando se refere aos animais humanos, que possuem capacidade integrativa do fenômeno doloroso, o termo nocicepção fica reservado para animais não humanos, que são destituídos dessa capacidade.

A redução do limiar doloroso observado na região inflamada é devido a uma sensibilização dos nociceptores, que são terminações nervosas livres presentes em fibras aferentes sensitivas, principalmente as fibras C e A-delta. As fibras aferentes primárias cutâneas sensitivas podem ser classificadas em: fibras C finas, amielínicas e de condução lenta; fibras A-delta, médias, pouco mielinizadas e de condução intermediária; e as fibras A-beta que são calibrosas, mielinizadas e de condução rápida. Cada uma dessas fibras codifica informações sensoriais, mas diferem na sensibilidade a estímulos nocivos ou não nocivos, de modo que apenas as fibras C e A-delta são capazes de transmitir informação nociceptiva (HWANG; OH, 2007). Desta forma, diante de estímulos nocivos as fibras mielinizadas A-delta iniciam uma fase rápida da dor (aguda), enquanto que, as fibras C invocam a segunda fase (dor lenta).

Alguns tecidos, tais como na pele, músculos, articulações, vasos sanguíneos e vísceras (MELZACK; KATZ, 1999; WOOLF; MA, 2007), possuem nociceptores térmicos, ou seja, que podem ser ativados por temperaturas extremas;

nociceptores mecânicos que são ativados por intensa pressão; e os nociceptores ditos polimodais, que são abundantes e podem ser ativados por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos (PINTO, 2000).

A sensibilização dos nociceptores ou hipernocicepção é um achado comum em todos os tipos de dor inflamatória e se deve, pelo menos em parte, à ação de mediadores inflamatórios (FERREIRA, LORENZETTI E CORREA, 1978). Durante a resposta inflamatória, mediadores proteicos (citocinas) e lipídicos (prostaglandinas (PG)), juntamente com substâncias liberadas localmente (histamina, bradicinina, substância P), tanto por células residentes e células que migram para o tecido, como pelas terminações nervosas dos tecidos, são responsáveis pela manutenção e amplificação do processo inflamatório. Enquanto algumas dessas substâncias (histamina (5-HT) e bradicinina) são capazes de estimular diretamente os nociceptores, outras, como as PGs, são capazes apenas de sensibilizar esses receptores.

Portanto, a alodínia (reposta dolorosa a estímulos mecânicos ou frios normalmente inócuos) e a hipernocicepção (aumento da sensibilidade a estímulo nocivo) inflamatória resultam da atuação de mediadores liberados pelo endotélio vascular, por fibras nervosas sensoriais e autonômicas, por células inflamatórias locais e migratórias, de precursores plasmáticos, entre outros. O primeiro mediador para o qual se descreveu esta função foi a bradicinina. Desde então, foram identificados vários outros, de ação direta ou indireta, dentre os quais estão a PGE₂, prostaciclina (PGI₂), LTB₄, ácido (8R,15S)-dihidroxiicoxa-(5E-9,11,13Z) tetraenóico (8R,15S-diHETE), serotonina, 5-HT, adenosina, histamina, interleucina (IL)-1 e IL-8, fator de crescimento do nervo (NGF), fator de necrose tumoral (TNF) (LEVINE; REICHLING, 1999) , mediadores derivados de fibras sensoriais (substância P e outras) (DRAY, 1997; JULIUS; BASBAUM, 2001; SAWYNOK, 2003).

A dor inflamatória é um evento multimediado, de modo que ensaios pré-clínicos que busquem compreender a complexa rede de mecanismos envolvidos na fisiopatologia dos processos dolorosos poderão fomentar o desenvolvimento de opções terapêuticas que possam alterar o curso evolutivo desses eventos,

contribuindo para uma melhor qualidade de vida dos pacientes portadores destes processos crônicos dolorosos.

2. 5 Dor orofacial

Por definição, a dor orofacial é qualquer dor associada com os tecidos moles (pele, vasos sanguíneos, glândulas ou músculos) e mineralizados (ossos e dentes) da cavidade oral e face. Esta dor pode normalmente ser referida na cabeça e/ou na região do pescoço ou podendo ainda estar associada à cervicalgia, cefaleias primárias e doenças reumáticas tais como fibromialgia e artrite reumatoide (LEEuw, 2010).

As dores orofaciais representam um grave problema de saúde pública, apresentando etiologia diversa como certos hábitos de mastigar ou morder, tensão muscular excessiva, tratamento cirúrgico ou dentário, traumas, hábitos parafuncionais, uso de aparelhos ortodônticos, próteses mal adaptadas, estresse, ansiedade, doenças osteoarticulares (OKESON, 1998; HARGREAVES, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2011).

A OMS reconhece que as doenças bucais representam uma importante causa de processos dolorosos, estando associadas com dor e sofrimento, com consequentes comprometimentos emocionais e sociais, acarretando prejuízos individuais e coletivos (WHO, 2003). De fato, a dor tem um imediato e profundo impacto nas atividades de vida diárias, reduzindo a qualidade da vida, prejudicando o sono, o trabalho, o lazer e o relacionamento com as pessoas (LOCKER; CLARKE; PAYNE, 2000). Além disso, a dor tem um elevado custo financeiro em virtude do elevado número de horas perdidas no processo produtivo (MACFARLANE, 2002).

Dentre os diversos tipos de dores, a proveniente da região orofacial corresponde a mais de 25 % dos casos de queixas de dor (SESSLE, 1995). Sabe-se hoje que existe uma correlação entre dor orofacial e estados de estresse, ansiedade e depressão (OKESON, 1992; BONJARDIM *et al.*, 2005).

Assim como a dor em outras partes do corpo, a dor orofacial é geralmente resultado de dano tecidual e ativação de nociceptores (VICKERS; COUSINS, 2000). A ativação dos nociceptores pode resultar na excitação da fibra nervosa aferente

com a qual estão associados, e na transmissão de um estímulo nocivo ao SNC e aos centros superiores do tronco encefálico, através das fibras aferentes (A δ e C), enviando informações para o complexo trigeminal do tronco encefálico (SESSLE, 2000).

O nervo trigêmeo, principal responsável pelas informações nociceptivas da região orofacial, apresenta três ramos: oftálmico, maxilar e mandibular. A divisão oftálmica é predominantemente sensorial e inerva a superfície das partes superiores da face e partes da mucosa nasal e paranasal. A divisão maxilar que é principalmente sensorial também e inerva dentes, mucosa da maxila, lábio superior, área lateral do nariz, seio maxilar e nasofaringe. A divisão mandibular é mista (com função sensitiva e motora) inerva os dentes, a mucosa da mandíbula, articulação temporomandibular, a pele que reveste a mandíbula e os músculos que estão envolvidos na mastigação. A maior parte dos neurônios sensoriais do trigêmeo tem seus corpos celulares localizados no gânglio trigeminal. No homem, o gânglio trigeminal está localizado na superfície cerebral do osso temporal, mas alguns aferentes têm seus corpos celulares localizados no núcleo trigeminal mesencefálico (MATTHEWS; SESSLE, 2002). Em ratos encontram-se as mesmas ramificações observadas em seres humanos, sendo que o maior feixe derivado da divisão maxilar é o infra-orbital, composto praticamente de fibras sensoriais. (BENOLIEL; ELIAV; IADAROLA, 2001).

2.5.1 Articulação Temporomandibular

A Articulação Temporomandibular (ATM) é um elemento do sistema estomatognático formada por diversas estruturas incluindo tecidos ósseos, disco articular, ligamentos, cápsula articular, apresentando um denso suprimento sanguíneo e nervoso, capaz de realizar movimentos complexos. A mastigação, a deglutição e a fonação dependem da função, saúde e estabilidade desta articulação (PIOZZI; LOPES, 2002; FLORIAN; MEIRELLES; SOUSA, 2011).

A ATM é dividida por um disco articular em duas cavidades, uma supra-discal e outra infra-discal. Esta característica anatômica permite as ATMs realizarem movimentos de rotação e de translação simultaneamente, dotando a mandíbula de capacidade única de movimentos combinados. A ATM está localizada à frente do

ouvido e formada anatomicamente a partir de superfícies articulares do osso temporal e cabeça da mandíbula. Ambas as superfícies são cobertas por uma fibrocartilagem articular densa (OKESON, 2000; HERB; STILE; CHO, 2006). As duas ATM, direita e esquerda, formam uma articulação bicondilar e uma variedade elipsóide de articulações sinoviais semelhantes à articulação do joelho (ALOMAR et al., 2007). A mandíbula é o único osso humano que possui duas articulações interdependentes, em que os movimentos de uma afetam a outra (CARDOSO; TAVARES, 2007).

As ATMs trabalham em conjunto com os músculos mastigatórios, e estes diligenciam em harmonia para realizar todos os movimentos da mandíbula. O masseter, temporal e pterigóideo medial são os músculos adutores, enquanto que supra e infra-hióideos e o pterigóideo lateral é o músculo abductor das articulações. O músculo principal e mais forte da mastigação é o masseter, fixando-se do osso temporal e estendendo-se abaixo até o ângulo da mandíbula (ALOMAR et al., 2007) **(Figuras 5 e 6).**

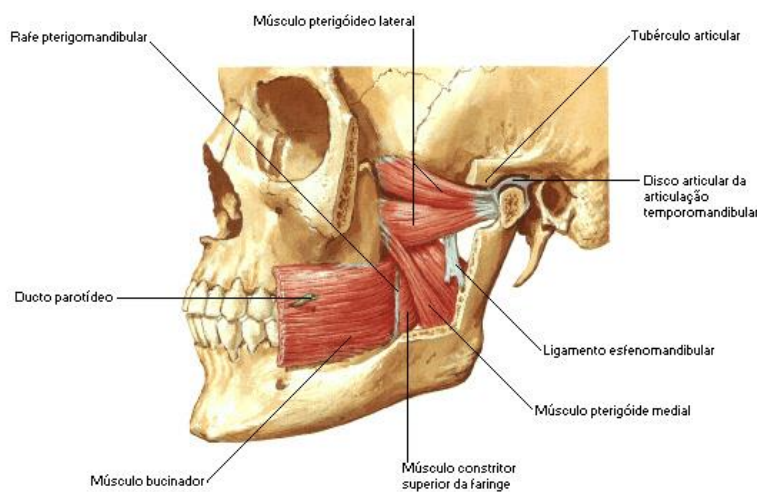


Figura 5- Ilustração da articulação temporomandibular e músculos mastigatórios. Fonte: NETTER, 2000.

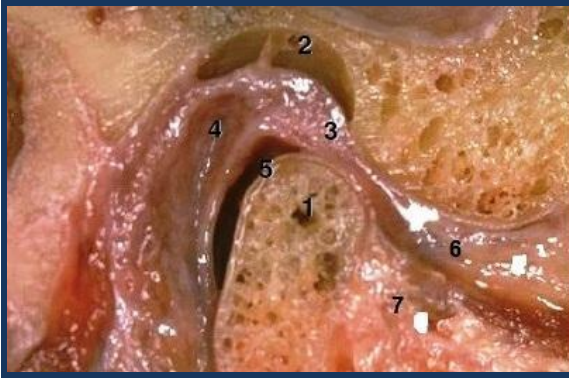


Figura 6: Fotografia ilustrativa da articulação temporomandibular. 1.Côndilo mandibular; 2.Fossa mandibular do osso temporal; 3.Disco articular; 4.Zona retrodiscal; 5.Cartilagem articular; 6. Músculo pterigóideo lateral superior; 7. Músculo pterigóideo lateral inferior. Fonte: CHAVES, 2006.

O disco articular, avascular e sem inervação, se encontra interposto entre as duas estruturas ósseas com as funções de amortecer e distribuir pressões durante os movimentos; preencher os espaços intra-articulares, compensando as irregularidades ósseas; estabilizar os côndilos nas suas posições e movimentos funcionais e proteger a cartilagem articular e o osso subcondral. O disco articular é constituído por uma matriz fundamental composta de fibras colágenas e proteoglicanos, com as glicosaminoglicanas principalmente alocadas na porção central, com condrócitos em sua intimidade. Insere-se na cápsula articular anterior e posteriormente, sendo a região posterior denominada zona bilaminar ou retrodiscal. Essa região apresenta dois estratos, o superior, composto de fibras elásticas, e o inferior, composto de fibras colágenas, sendo a única estrutura capaz de tracionar posteriormente o disco articular, caracterizando-se por ser ricamente inervada e vascularizada e, portanto, fonte importante de dor nas disfunções temporomandibulares (DTM) que envolvam a ATM (FUJITA; HOSHINO, 1989; ALOMAR et al., 2007; WILLARD et al., 2012).

A cartilagem hialina desempenha um papel crucial na função da ATM, facilitando a articulação com o disco da ATM e reduzindo cargas pontuais sobre o osso subjacente, sendo constituída de fibras de colágeno (tipo II, IX e XI) e condrócitos (TANAKA *et al.*, 2008; KURODA *et al.*, 2009).

A ATM é envolta por cápsula fibrosa frouxa, insere-se superiormente nos limites da face articular do temporal e abaixo no colo do côndilo da mandíbula. Uma das funções da membrana sinovial é a produção do líquido sinovial. Este é composto por solução aquosa de sais minerais retirados do sangue, glicose e pequenas quantidades de proteína que penetram e nutrem as fibrocartilagens. O líquido sinovial é responsável pela diminuição da fricção entre as superfícies articulares, nutrindo as células do disco articular e da cartilagem articular atuando ainda na defesa local uma vez que possui células como linfócitos e macrófagos (MACIEL, 1996; OKESON, 2000; MADEIRA, 2003).

Geralmente, as superfícies articulares não são inervadas e, conseqüentemente, incapazes de iniciar uma resposta sensitiva de qualquer tipo, incluindo nocicepção. Portanto, a dor oriunda das ATMs pode emanar das estruturas de tecidos moles associadas à articulação ou dos tecidos ósseos propriamente ditos. A dor que emana das estruturas ósseas, em geral, ocorre somente após a perda da superfície articular fibrosa da articulação. Quando isto ocorre, é comumente chamado de artrite (OKESON, 1998).

Alguns mecanismos já foram propostos na perspectiva de elucidar os mecanismos associados com a fisiopatologia da dor advinda da ATM. Desta forma, alguns autores demonstraram a participação de mediadores inflamatórios como citocinas (IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), substâncias P, prostaglandinas e óxido nítrico, na gênese da dor advinda da ATM (NOZAWA-INOUE *et al.*, 2003; TAKEUCHI *et al.*, 2004; TAKEDA *et al.*, 2006; MORGAN; GEBHART, 2008).

2.5.2 Disfunção Temporomandibular

Segundo a Academia Americana de Dor Orofacial (AAOP, 2010), as disfunções temporomandibulares (DTM) englobam um grupo de condições musculoesqueléticas e neuromusculares que envolvem as ATMs, os músculos mastigatórios e todos os tecidos associados, podendo desencadear sinais e sintomas como dores na região da ATM, cefaleia secundária, dor nos músculos da mastigação, otalgia, dor facial, limitação de abertura de boca, dor cervical, cansaço, dor durante a mastigação, zumbido, dor na mandíbula, dentre outros. A somatória ou a exacerbação desses sinais e sintomas podem levar à ausência ou insuficiência de

trabalho ou interações sociais, resultando em uma redução na qualidade de vida (GREENE *et al.*, 2010).

As DTMs apresentam etiologia multifatorial tendo como fatores de risco traumas na região de face e pescoço; hábitos parafuncionais como mascar chicletes, onicofagia, hábito de morder objetos e bruxismo; hábitos posturais e hábitos ocupacionais como o uso contínuo do telefone por telefonistas e músicos com instrumento de sopro ou instrumento com apoio na mandíbula (ISRAEL *et al.*, 1999; MANFREDINI *et al.*, 2003). Problemas psicológicos, ansiedade, depressão e estresse também têm grande correlação. Envolvimento de alterações sistêmicas relacionadas primariamente com doenças reumatológicas, como esclerose sistêmica, polimiosite, dermatomiosite, espondilite anquilosante, gota, condrocalcinose e desordens autoimunes (síndrome de Sjögren), artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico, assim como fibromialgia, são importantes de serem investigadas durante anamnese dos pacientes (FREDRIKSSON *et al.*, 2003; MERIGHI *et al.*, 2007; SMYTHE, 2005).

Estudos epidemiológicos estimam que 40 % a 75 % da população apresente ao menos um sinal de DTM, como ruídos na ATM, e 33 % pelo menos um sintoma, como dor na face ou na ATM (LEEUEW, 2010). Segundo Nilsson *et al.* (2007) a prevalência de DTM é maior no sexo feminino e na faixa etária entre 21 e 40 anos.

A Academia Americana de Dor Orofacial (AAOP) estabeleceu uma nova classificação das diferentes formas de DTM, que são divididas em dois grandes grupos, a saber: DTM muscular e DTM articular (LEEUEW, 2010). As primeiras incluem mialgia local, miosite, mioespaço, mialgia centralmente mediada, contratura miofibrótica e dor miofascial. Por outro lado, as DTM articulares incluem desordens congênitas ou de desenvolvimento, fratura do côndilo, anquilose, deslocamento da ATM, condições não inflamatórias como osteoartrites, condições inflamatórias como sinovite/capsulite e poliartrites, e deslocamento do disco com e sem redução (LEEUEW, 2010).

Alguns estudos relatam o controle de sinais e sintomas em mais de 90 % dos pacientes que receberam tratamentos conservadores. Educação do paciente,

automanejo, intervenção comportamental, terapias físicas (termoterapia, terapia de resfriamento, laser, estimulação elétrica neural transcutâneas-TENS), acupuntura, utilização de fármacos, placas interoclusais, treinamento postural e exercícios compõem a lista de opções aplicáveis (OKESON, 2000; YUASA; KURITA, 2001; DE LAAT, 2003).

Apesar do curso incapacitante das DTM, nenhuma das intervenções terapêuticas disponíveis na atualidade é curativa, (OKESON, 2000; YUASA; KURITA, 2001; DE LAAT, 2003), limitando-se, portanto, a aliviar os sinais e sintomas da doença. A compreensão da fisiopatologia da dor orofacial advinda da ATM, elucidando os mediadores inflamatórios envolvidos no surgimento de suas alterações inflamatórias poderá contribuir para a introdução de novas abordagens terapêuticas mais específicas, trazendo benefícios superiores a um tratamento paliativo.

2.5.3 Mediadores inflamatórios na Dor orofacial

Estudos pré-clínicos e clínicos desenvolvidos nas últimas décadas sugerem que na fisiopatologia das DTMs vários mediadores inflamatórios têm sido associados, tais como: citocinas, produtos derivados do ácido arquidônico (prostaglandinas), óxido nítrico (NO), dentre outros. O NO é produzido pela oxidação do aminoácido L-arginina, sendo essa reação catalizada pelas isoenzimas óxido nítrico sintase (NOS) (MONCADA; PALMER, 1990). Essa reação tem também como produto L-citrulina e necessita da participação de cofatores como o NADPH e FAD (KWON; NATHAN.; STUEHR, 1989). Esta conversão é estereoespecífica, uma vez que D-arginina não funciona como substrato para a produção de NO. Uma vez produzido, a maioria das ações do NO se devem à ativação da guanilato ciclase, resultando na formação do segundo mensageiro intracelular GMPc (IGNARRO; BYRNS; WOOD, 1988; MURAD *et al.*, 1990).

Uma grande variedade de células é capaz de produzir NO, dentre as quais destacam-se células endoteliais, neutrófilos (REES *et al.*, 1990; McCALL *et al.*, 1991), macrófagos (STUEHR; MARLETTA, 1987) sinoviócitos e condrócitos (BEZERRA *et al.*, 2004). Com relação a essas últimas, foi demonstrado que o NO derivado dos condrócitos contribui de forma significativa para a quantidade total de

NO produzido na cavidade articular durante artropatias inflamatórias (BEZERRA *et al.*, 2004).

Foram descritas três isoformas da NOS, a saber: NOS endotelial (NOS₁) e neuronal (NOS₃), ambas expressas constitutivamente (NOS_c) e a NOS₂ (NOS induzida-NOS_i), que tem sido detectada em algumas células após exposição a agentes inflamatórios (FUKUTO; CHAUDHURI, 1995). As isoformas constitutivas levam à produção de pequenas quantidades de NO (picomoles), por curtos períodos de tempo, são cálcio-calmodulina-NADPH dependentes e estão presentes no endotélio vascular, plaquetas e cérebro. Além disso, essas isoformas estão envolvidas primariamente na modulação de processos fisiológicos associados à homeostase, tais como, relaxamento vascular, agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea e neurotransmissão. Por outro lado, a NOS₂ pode ter sua expressão induzida em uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, células endoteliais, hepatócitos e células da glia, por estímulos inflamatórios como citocinas (IL-1, IL-2, TNF- α) e LPS, produzindo grandes quantidades de NO (nanomoles), por longos períodos de tempo. Essa isoforma é cálcio independente e sua expressão é inibida por algumas citocinas (IL-4, IL-8, IL-10) (OSWALD *et al.*, 1992; McCALL *et al.*, 1991) e glicocorticóides (GC) (KENGATHARAN, De KIMPE; THIEMERMANN, 1996). A inibição da NOS_i pode explicar alguns dos efeitos benéficos dos GC sobre o choque séptico, asma e artrite reumatoide, em que a liberação excessiva de NO pode ser responsável pela vasodilatação e dano tissular (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). A rigor, considera-se que o NO gerado após a indução da NOS_i está envolvido em fenômenos fisiopatológicos (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Ademais, esses mediadores produzidos durante a resposta inflamatória também podem ativar sistemas de defesa em células expostas ao estresse, promovendo um feedback negativo na ativação celular e geração de mediadores inflamatórios. Neste sentido, a via da hemeoxigenase (HO) mostra sua relevância. Três isoformas da HO (HO-1, HO-2 e HO-3) foram identificadas (MCCOUBREY; HUANG; MAINES, 1997). HO-1, a forma induzida da HO, é geralmente expressa em condições de estresse oxidativo, isquemia e reperfusão e é estimulada por citocinas pró-inflamatórias, NO, endotoxinas e heme, o seu substrato, representando um

mecanismo de defesa celular que pode modular a resposta inflamatória (FUJITA *et al.*, 2001; YACHIE *et al.*, 2003). A ativação de HO-1 resulta em redução do dano oxidativo e apoptose, reduzindo eventos inflamatórios como edema, migração celular e produção de citocinas pró-inflamatórias (ALCARAZ; FERNÁNDEZ; GUILLÉN, 2003). HO-2 e HO-3 são as formas constitutivas expressas na maioria dos tecidos (MCCOUBREY; EWING; MAINES, 1992; MCCOUBREY; HUANG; MAINES, 1997).

A expressão aumentada da HO-1 em uma variedade de condições patológicas (asma, rejeição ao enxerto, pancreatite, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, sepse, aterosclerose) e a associação entre esse aumento e efeitos protetores sobre os tecidos sugere que a atividade da HO-1 pode desempenhar um importante papel durante o curso desses eventos (WUNDER; POTTER, 2003). Embora os eventos bioquímicos através dos quais a HO module essa proteção ainda careça de maiores elucidações, indubitavelmente, os produtos da ativação da HO-1, que incluem monóxido de carbono (CO), biliverdina (BVD) e ferro, estão envolvidos nessa mediação. Neste sentido, nos últimos anos, vários estudos vêm demonstrando que a HO-1, seu substrato heme e seus produtos, CO e BVD, são capazes de modular o processo inflamatório. Foi demonstrado que o grupo heme é capaz de estimular produção de radicais livres, aumento de permeabilidade vascular, expressão de moléculas de adesão e infiltração de neutrófilos para o sítio inflamatório (SHONO *et al.*, 1996). Entretanto, pequenas concentrações de heme podem possuir efeito anti-inflamatório e citoprotetor através do aumento da expressão da HO-1 e da estimulação da formação de HO-1 e seus produtos, como o CO e BVD. A biliverdina é capaz de reduzir a migração de neutrófilos, exsudação e liberação de mediadores pró-inflamatórios e a expressão de proteínas de adesão (HAYASHI *et al.*, 1999; VICENTE *et al.*, 2003), sugerindo que a expressão de HO-1 possui efeito anti-inflamatório. De fato, o aumento da atividade da HO-1 reduz a migração de neutrófilos, exsudação e liberação de mediadores pró-inflamatórios e a expressão de moléculas de adesão (ALCARAZ; FERNÁNDEZ; GUILLÉN, 2003). Por outro lado, a inibição da HO-1 pelo Zinco protoporfirina-IX (ZnPP-IX), um inibidor específico da HO-1, aumenta a expressão das moléculas de adesão e a liberação de mediadores pró-inflamatórios (BELCHER *et al.*, 2006), sugerindo um possível efeito anti-inflamatório da via da HO-1/BVD/CO.

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

As condições inflamatórias e a dor oriunda da articulação temporomandibular (ATM) apresentam etiologia multifatorial, com grande comprometimento funcional, reduzindo a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. ((LEEuw, 2010))Apesar de seu potencial destrutivo e incapacitante, nenhuma das intervenções terapêuticas disponíveis na atualidade é curativa, limitando-se a aliviar os sinais e sintomas da doença. (OKESON, 2000; YUASA; KURITA, 2001; DE LAAT, 2003) A compreensão da fisiopatologia das condições inflamatórias e da dor oriunda da ATM, elucidando os mediadores inflamatórios envolvidos no surgimento das alterações destrutivas desse processo nosológico, pode contribuir para a introdução de novas abordagens terapêuticas.

As plantas medicinais simbolizam, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. O semi-árido nordestino é considerado uma área com características sociais, econômicas e ecológicas bem particulares, uma vez que o sertanejo sobrevive, muitas vezes, à custa dos recursos bióticos para suprir suas necessidades, inclusive de medicamentos. A OMS recomenda a prática do uso de plantas medicinais nos programas de atenção primária à saúde como forma de diminuir os custos destes programas e ampliar o número de beneficiados, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento onde persistem os grandes bolsões de pobreza (BIESKI, 2011).

A identificação de novas fontes naturais visando o desenvolvimento de fitofármacos beneficiará a economia de países em desenvolvimento, possibilitando uma maior autonomia no gerenciamento de políticas de saúde pública, contribuindo para o acesso da população a medicamentos seguros e de baixo custo.

A espécie *Chresta martii* (DC.) H. Rob. é uma planta pertencente à família Asteraceae, com características de Caatinga, sendo geralmente encontrada entre rochas às margens do Rio São Francisco, principalmente na região do Xingó, no

Nordeste do Brasil, conhecida pela população local por suas propriedades no combate a doenças do trato gastrointestinal (ROBINSON 1980; AGRA *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2006; ROQUE *et al.*, 2008). Trabalhos realizados pelo nosso grupo (SILVA *et al.*, 2012, 2013) mostraram efeito gastroprotetor em modelos de lesão gástrica induzidos por álcool e indometacina, apresentando atividade antioxidante e efeito anti-quimiotáxico, vislumbrando, assim, um potencial efeito anti-inflamatório.

O estudo dos efeitos da *Chresta martii* (DC.) H. Rob. na modulação da nocicepção e da inflamação observado no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan na ATM poderá contribuir para a identificação de uma nova abordagem terapêutica dos processos dolorosos e inflamatórios, desenvolvendo opções que proporcionem uma melhora da qualidade de vida desses pacientes.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar eficácia e segurança do extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* no modelo de hipernocicepção inflamatória ATM induzida por Zymosan em ratos.

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar a eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* no modelo de hipernocicepção inflamatória na ATM induzida por Zymosan em ratos;
- ✓ Investigar o envolvimento do óxido nítrico (NO) e da via da hemeoxigenase-1 (HO-1) no mecanismo de ação antinociceptivo e anti-inflamatório *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* no modelo de hipernocicepção inflamatória na ATM induzida por Zymosan em ratos;
- ✓ Identificar a segurança do extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* em camundongos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Material Botânico (*Chresta martii* (DC.) H. Rob.)

Partes aéreas (folhas e flores) de *C. martii* foram coletadas em 31 de julho de 2010 na região do Xingó, Sergipe, Brasil (longitude -37,940 e latitude variando de -9,5563 a -9,5548, altitude 130 m). Após autenticação dos espécimes, feita pela Dr^a. Nádia Roque (Departamento de Botânica do Instituto de Biologia – Universidade Federal da Bahia, Brasil), uma exsicata (protocolo nº 14602) foi depositada no Herbário da Universidade do Vale do Acaraú (Sobral, Ceará, Brasil).

O pó seco das partes aéreas da planta (100 g) foi extraído usando-se uma solução de etanol 50 % em temperatura ambiente (28 ± 3 °C) durante 48 h. Depois de filtrada, a solução verde-escuro foi concentrada a 50 °C, sob pressão reduzida, até a secagem, e mantida em freezer. Uma diluição fresca do extrato seco em solução salina (0,9 % NaCl) foi preparada no dia dos experimentos, e administrada via oral ou intraperitoneal, em diferentes doses.

5.2 Animais

Foram utilizados 160 ratos Wistar machos (180-250 g) e 10 camundongos Swiss machos (25-30 g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC e alojados no Centro de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Sobral e Biotério Setorial da UFC – Campus de Sobral. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h, em temperatura 25 ± 2 °C, com água e ração ad libitum.

Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. O protocolo experimental estava de acordo com “Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório” da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Ceará, recebendo o nº 57/ 10.

5.3 Drogas, reagentes e soluções

Os reagentes utilizados nesse estudo apresentaram grau de pureza e propriedades analíticas adequadas. As drogas e reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram: acetato de sódio, ácido acético glacial P.A.

(MERCK), ácido clorídrico P.A (HCl), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), água deionizada Milli-Q (q.s.p.), álcool comercial, álcool etílico P.A, azul de Evans 2,5 %, Carbonato de Sódio (MERCK), cloreto de sódio (NaCl), eosina, fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico, formaldeído P.A., Glibenclamida (Sigma Chemical Company), hematoxilina, hidrato de cloral (Vetec), hidróxido de sódio (NaOH), Indometacina (SAL-Sigma), N(ω)-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), o-dianosidina (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), solução salina 0,9 % (estéril e apirogênica), Tampão Carbonato de Sódio (50 mM), tribromoetanol, Tween 80 (UBS), violeta de genciana (Reagen), Zinco Protoporfirina-IX (ZnPP-IX) (Sigma), Zymosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

As drogas e reagentes foram solubilizadas em salina estéril (0,9 %, NaCl), água destilada ou ultra-pura.

5.3.1 Soluções

Líquido de Turk:

Ácido acético glacial P.A. (MERCK).....20 ml

Violeta de genciana2,0 ml

Água destilada1,0 litro

Tampão Carbonato de Sódio (50 mM) para diluição de Zinco Protoporfirina-IX (ZnPP-IX) (Sigma):

Carbonato de Sódio (MERCK)0,53 g

Água deionizada Milli-Q (q.s.p.)100 ml

Tampão Citrato 0.1M pH 6.0:

Citrato de sódio monohidratado.....21 g

H₂O destilada.....1 litro

A solução mãe (1 M) foi diluída 10 vezes (concentração final 0.1 M)

5.4. Protocolo experimental

5.4.1 Indução e avaliação da hipernocicepção inflamatória articular temporomandibular (ATM) de ratos

Foi realizado treinamento para que os animais permitissem a aferição da hipernocicepção inflamatória articular. Primeiramente foi realizada tricotomia na região da ATM esquerda de ratos Wistar. Durante o treinamento, os animais eram transferidos para gaiolas individuais onde foram mantidos previamente por trinta minutos e condicionados a receber estímulos mecânicos na ATM esquerda durante quatro dias que antecedem ao dia de indução da hipernocicepção inflamatória e aferição da nocicepção. No quinto dia, foi obtido o valor basal (média de três medidas) da ATM esquerda (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009). Neste dia, procedeu-se a indução da hipernocicepção inflamatória. Para tanto, os animais foram anestesiados com tribromoetanol a 10 % (1 mL/100 g; i.p.) para proceder à injeção intra-articular (i.art.) de Zymosan (2 mg/articulação; 40 µL), dissolvido em solução salina estéril na ATM esquerda dos animais, utilizando agulha de insulina com calibre de 29 G em seringa de 0,5 mL (CHAVES *et al.*, 2011). Um grupo controle recebeu solução salina estéril 0,9 % no mesmo volume na ATM esquerda. A agulha foi inserida no ponto imediatamente inferior à borda posterior do arco zigomático e avançada em direção medial e anterior até contato com o côndilo. Esse contato foi verificado movimentando a mandíbula, e a punção da agulha no espaço articular foi confirmada pela perda de resistência, quando se injetou o Zymosan.

Na 4^a hora após a indução da hipernocicepção, a hipernocicepção inflamatória articular foi registrada através do comportamento de retirada da cabeça do animal (head-withdrawal threshold) em resposta à aplicação de uma força (g) de intensidade crescente à articulação temporomandibular (ATM) (CHAVES *et al.*, 2011). Classicamente, um dos métodos utilizados para avaliar a presença de alodínia é através do emprego de filamentos de von-Frey. Em nosso estudo, utilizamos um equipamento desenvolvido pela Insight (Ribeirão Preto, SP, Brasil), o qual é baseado em um sistema de transdução digital que registra a força máxima aplicada ao animal até o momento de sua resposta de retirada (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009). Na 6^a hora após a indução da hipernocicepção inflamatória foram

coletadas as amostras para avaliação dos parâmetros: (1) influxo celular no lavado sinovial; (2) dosagem de mieloperoxidase (MPO) no lavado sinovial e (3) análise histopatológica da ATM, como detalhado a seguir.

5.4.2 Contagem do influxo celular no lavado sinovial

Na 6^a hora após a indução da artrite, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10 % (0,1 mL/35 g) e eutanasiados por exsanguinação. Procedeu-se dissecação dos tecidos superficiais até atingir a ATM para coleta do lavado sinovial. A seguir, as ATMs esquerdas foram lavadas com volumes de 0,05 mL (2 x) de solução com tampão fosfato de potássio (PBS) e EDTA. Dos lavados articulares obtidos, retiramos uma alíquota (10 µL) que, após coloração em solução de Turk (90 µL), foi utilizada para contagem total do número de leucócitos utilizando câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 20 x. O restante do lavado foi armazenado a – 80 °C em tubos eppendorfs para posterior dosagem de mieloperoxidase.

5.4.3 Avaliação da atividade de mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Utilizando a técnica descrita por Bradley *et al.* (1982), a atividade da MPO por mL de lavado articular foi aferida utilizando 0,0005 % de peróxido de nitrogênio como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 µmol de peróxido de nitrogênio em água em 1 minuto.

5.4.4 Análise histopatológica da articulação temporomandibular (ATM)

Na 6a hora, após a indução da artrite, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10 % (0,1 mL/35 g), eutanasiados por exsanguinação e suas ATM removidas. As articulações foram fixadas em formol 10 % por 24 h. Em seguida, as ATM foram descalcificadas com EDTA 10 %, embebidos em parafina e seccionados no longo eixo da ATM, em secções de 4 µm, que incluíam côndilo, cartilagem articular, tecido periarticular e disco articular para coloração pelos métodos de hematoxilina-eosina (H&E). As articulações foram analisadas em microscópio óptico

Leica acoplado a computador. Foi realizada análise semi-quantitativa das lâminas, avaliando-se os critérios histopatológicos de Chaves *et al.* (2011), que incluíram: influxo celular inflamatório na membrana sinovial . Atribuíram escores de 0 a 4, sendo 0 quando os critérios avaliados estavam ausentes; e 1, 2, 3 ou 4 quando esses critérios foram discretos, leves, moderados ou intensos, respectivamente.

5.5 Avaliação da segurança

5.5.1 Estudo de toxicidade aguda

A toxicidade aguda (DL50) após administração oral ou intraperitoneal do EHA de *C. martii* foi avaliada em camundongos (n = 10)]. Doses variadas (10–2000 mg/kg, i.p. ou 50–3000 mg/kg, p.o.) ou solução salina (5 mL/kg p.o.) foram administradas aos animais em dose única. Os animais foram observados por um período de 48 h para o registro de sinais de toxicidade e mortalidade.

5.5.2 Estudo de segurança

Perda de massa corporal e dosagem de massa hepática, alterações na contagem de células sanguíneas e os parâmetros bioquímicos aspartato aminotransferase e (AST), alanina aminotransferase (ALT), amilase e lipase foram avaliados após tratamento subcrônico com dose única diária de EHA (400 mg/kg, p.o.) ou solução salina (5 mL/kg p.o.), durante 14 dias consecutivos. No 15º dia, todos os animais foram anestesiados com tribromoetanol (200 mg/kg, i.p.), e amostras de sangue foram coletadas a partir do plexo retro orbitário. A análise hematológica foi realizada através de analisador automático (Pentra 80, Horiba ABX, Montpellier, França). As amostras sanguíneas foram analisadas para mensuração dos seguintes parâmetros: contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de plaquetas, contagem total e diferencial de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos). Para análise bioquímica do soro, o sangue foi centrifugado a 3000 g, durante 15 min após coleta. As amostras de soro foram estocadas a -80°C até as análises. Os parâmetros bioquímicos que seguem foram determinados por testes enzimáticos e colorimétricos da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa/MG, Brasil): AST, ALT, amilase e lipase. Após a eutanásia, o fígado foi removido e pesado. Baço, rins e coração foram avaliados macroscopicamente para possíveis alterações de coloração.

5.6 Modulação Farmacológica

5.6.1 Administração de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* no modelo de hipernocicepção inflamatória na articulação temporomandibular por Zymosan

Ratos Wistar receberam (per os) 1 hora antes da indução da hipernocicepção inflamatória o extrato hidroalcolólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* nas doses 100, 200 ou 400 mg/kg dissolvido em solução salina estéril. O grupo Sham recebeu (per os) o veículo (salina 0,9 %) 1 h antes da injeção intra-articular de salina estéril 0,9 %. Indometacina (5 mg/kg; s.c.), dissolvida em salina estéril, foi utilizada como controle positivo. O grupo Zymosan (Zy) representa animais que receberam (per os) o veículo (salina 0,9 %), seguido 1 h após da injeção (i.art) de Zymosan (2 mg; 40 µl). **(Figura 7)**

5.6.2 Investigação do mecanismo de ação de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.*

Na perspectiva de identificar o possível mecanismo de ação de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.*, grupos de animais foram pré-tratados com L-NAME (30 mg/kg; i.p.), inibidor não-seletivo da NO sintetase; ou ZnPP-IX (3 mg/kg; s.c.), inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 – HO-1. Após 30 minutos, para os tratamentos por via s.c., ou após 1 h para os tratamentos por via i.p., os grupos receberam (per os) *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* na dose de 400 mg/kg. Todas as drogas foram dissolvidas, ao abrigo da luz, em salina estéril 0,9 %, exceto o ZnPP-IX que foi dissolvido em tampão Na₂CO₃. **(Figura 8)**

5.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As médias dos vários procedimentos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido do teste Bonferroni, adotando-se o nível de significância de 5 % (p < 0,05). Para análise histopatológica, os dados foram expressos em mediana, e foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e Dunn's para diferenciação estatística. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism (versão 5.0)

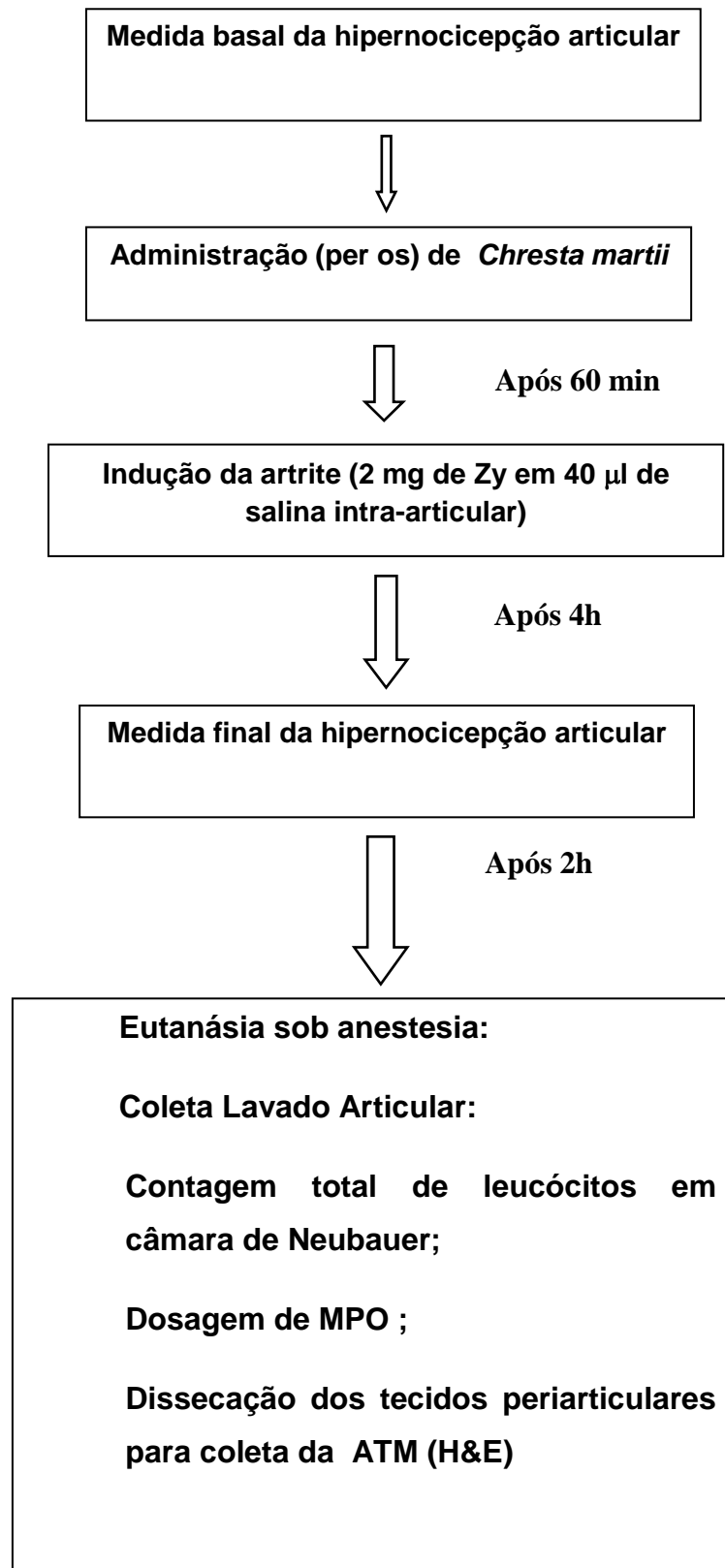


Figura 7- Esquema ilustrativo da administração de *Chresta martii* no modelo de hipernocicepção inflamatória na articulação temporomandibular induzida por zymosan

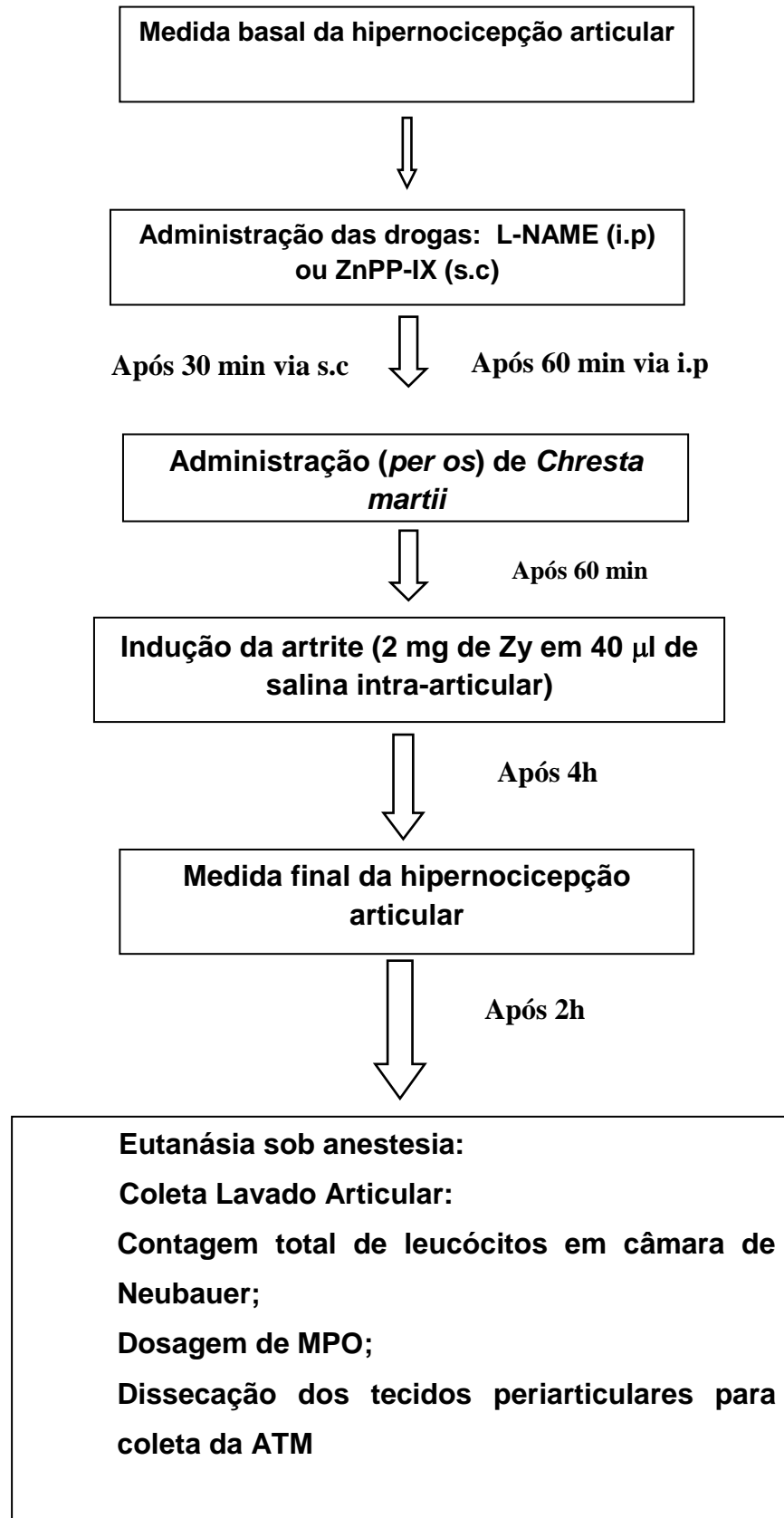


Figura 8- Esquema ilustrativo dos mecanismos de ação associado ao extrato hidroalcolico *Chresta martii* no modelo de hipernocicepção inflamatória na articulação temporomandibular por zymosan.

6 RESULTADOS

6.1 Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob* no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por Zymosan na articulação temporomandibular de ratos

6.1.1 Avaliação dos efeitos do extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob* na hipernocicepção articular

Na **Figura 9**, observa-se que a administração (per os) do extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob* (400 mg/kg) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a hipernocicepção articular, quando comparado ao grupo Zy. Estes resultados foram similares ao observado com o grupo tratado previamente com Indometacina (5 mg/kg; s.c.), anti-inflamatório não esteroidal usado como controle positivo.

6.1.2 Efeitos do extrato hidro alcoólico *Chresta martii* (DC.) *H. Rob* sobre a celularidade no lavado sinovial

O pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob* (400 mg/kg; per os) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o influxo celular na 6ª hora, em relação ao grupo Zy (**Figura 10**). Estes resultados foram similares ao observado com o grupo tratado previamente com Indometacina (5 mg/kg; s.c.), anti-inflamatório não esteroidal usado como controle positivo.

6.1.3 Efeitos do extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob* sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO)

A **Figura 11** ilustra que a administração (per os) do hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob* (100, 200 ou 400 mg/kg) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a atividade de MPO, em relação ao grupo Zy. Estes resultados foram similares ao observado com o grupo tratado previamente com Indometacina (5 mg/kg; s.c.), anti-inflamatório não esteroidal usado como controle positivo.

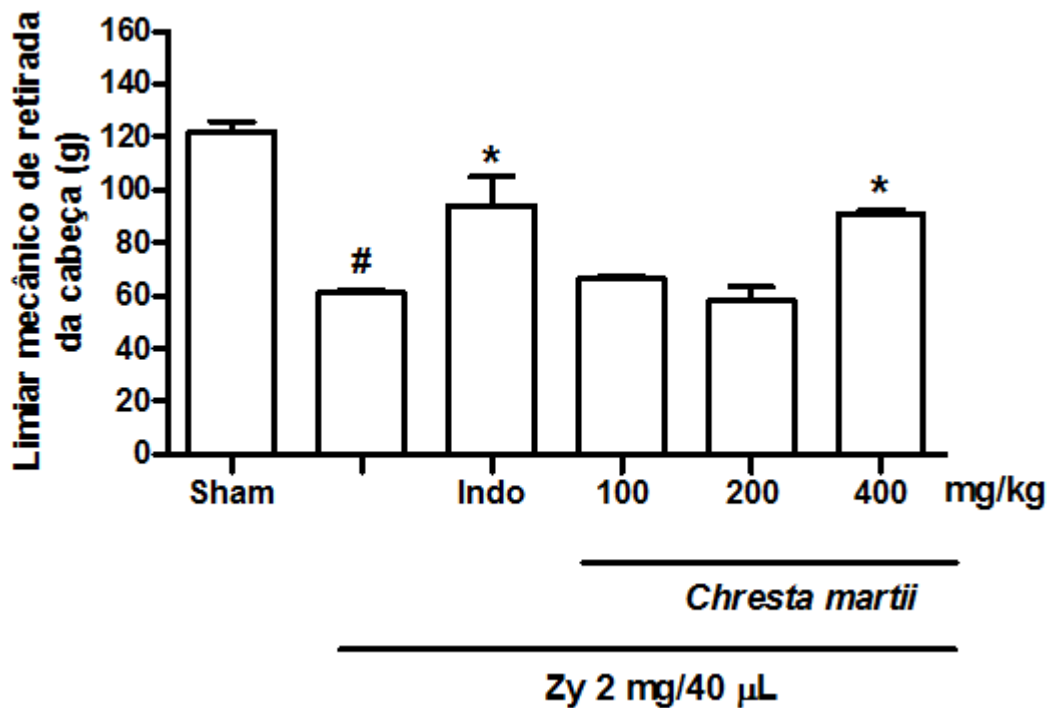


Figura 9 - Efeito da administração do extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* na hipernocicepção articular em ratos submetidos à indução da artrite por Zymosan na articulação temporomandibular (ATM). Ratos *Wistar* receberam injeção intra-articular (i.art.) de Zy (2 mg; 40 μ L) na ATM esquerda. O grupo Sham recebeu 40 μ L de solução salina (i.art.). A hipernocicepção articular foi avaliada na 4^a h após injeção (i.art.) de Zy ou de solução salina. O extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (100, 200 ou 400 mg/kg) foi administrada (*per os*) 1 h antes da indução da artrite. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n = 6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham (ANOVA, Bonferroni).

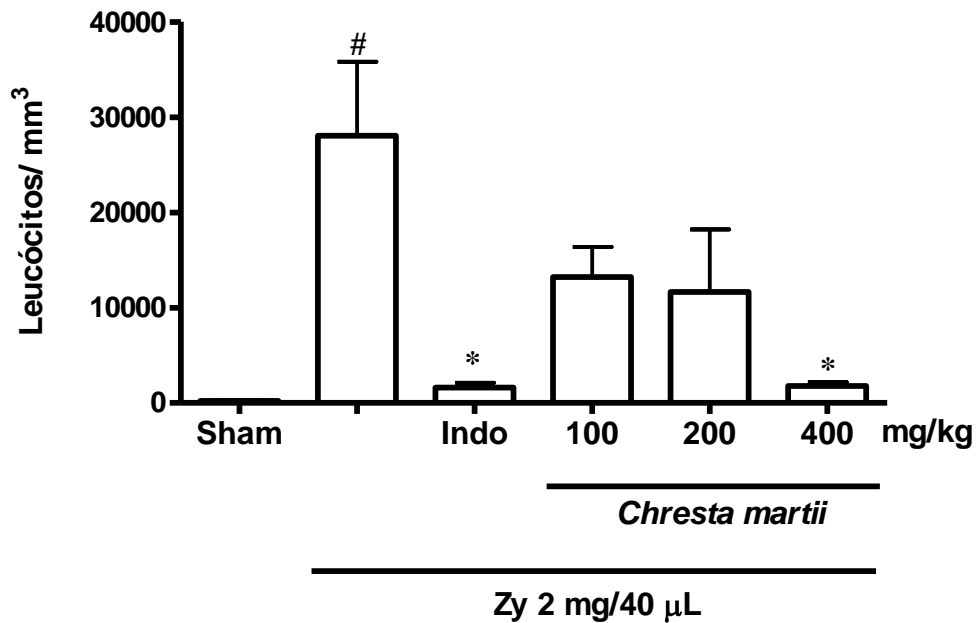


Figura 10 - Efeito da administração do extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* sobre o número total de leucócitos no lavado sinovial na artrite induzida por Zymosan (Zy) na articulação temporomandibular (ATM) de ratos. Ratos *Wistar* receberam injeção intra-articular (i.art.) de Zy (2 mg; 40 µL) na ATM esquerda. O grupo Sham recebeu 40 µL de solução salina (i.art.). A contagem do número total de leucócitos foi realizada na 6^a h após injeção (i.art.) de Zy ou de solução salina. O extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* (100, 200 ou 400 mg/kg) foi administrada (*per os*) 1 h antes da indução da artrite. Os dados representam média ± E.P.M. (n = 6). **p* < 0,05 em relação ao grupo Zy; # *p* < 0,05 em relação ao grupo Sham (ANOVA, Bonferroni).

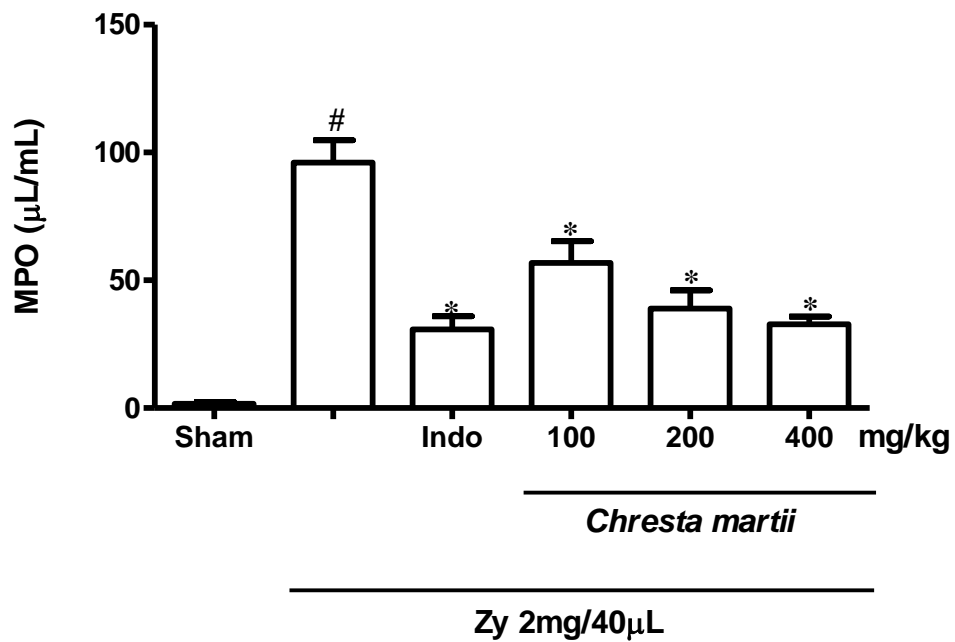


Figura 11 - Efeito da administração do extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) no lavado sinovial na artrite induzida por Zymosan (Zy) na articulação temporomandibular (ATM) de ratos. Ratos *Wistar* receberam injeção intra-articular (i.art.) de Zy (2 mg; 40 µL) na ATM esquerda. O grupo Sham recebeu 40 µL de solução salina (i.art.). A coleta do lavado sinovial foi realizada na 6ª h após injeção (i.art.) de Zy ou de solução salina. O do extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* (100,200, ou 400 mg/kg) foi administrada (*per os*) 1 h antes da indução da artrite. Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 6). **p* < 0,05 em relação ao grupo Zy; # *p* < 0,05 em relação ao grupo Sham (ANOVA, Bonferroni).

6.1.4 Análise histopatológica das ATMs de ratos submetidos à indução da artrite na ATM esquerda tratados com extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob.

A **Tabela1** ilustra os escores atribuídos às alterações histopatológicas na ATM de ratos submetidos à indução da artrite na ATM esquerda pela injeção intra-articular (i.art) de Zymosan (Zy) e tratados com extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob. (400 mg/kg; per os) ou Indometacina (5 mg/kg; s.c.). O grupo Sham recebeu (i.art.) apenas solução salina. Na 6ª hora após indução da artrite foi observado processo inflamatório moderado, com infiltrado celular inflamatório na membrana sinovial (MS) (**Figura 12**). A administração de extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob. (400 mg/kg; per os) reduziu ($p < 0,05$) infiltrado celular e edema na MS. Esses achados podem ser vistos através de fotomicrografias da ATM e de tecidos periarticulares (**Figura 13**).

Tabela 1- Análise histopatológica das ATMs de ratos submetidos à indução da artrite na ATM esquerda tratados com extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob.

Grupos	Influxo Celular na Membrana Sinovial
Sham	0 (0-0)*
Indometacina	0 (0-1)*
Zymosan	3 (1-4)
<i>Chresta martii</i> (400mg/kg)	1,5 (1-2)*

Dados representam mediana e variação de pelo menos 5 ATMs por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy (Kruskal-Wallis; Dunn's).

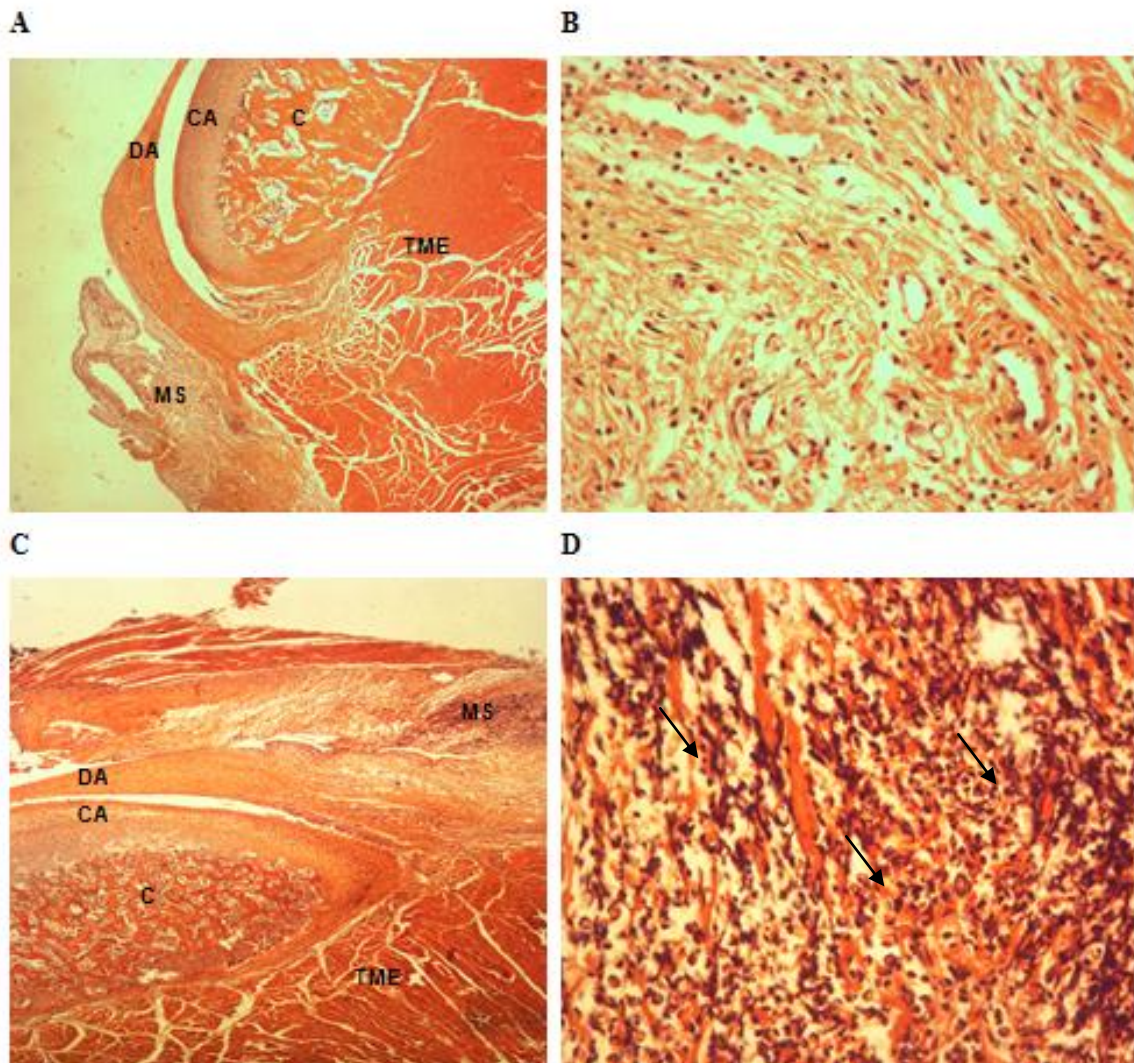


Figura 12 - Fotomicrografias ilustrativas das articulações temporomandibulares (ATMs) de ratos submetidos à indução da artrite por Zymosan (Zy). (A) e (B): animais que receberam injeção intra-articular (i.art.) de solução salina (aumento de 40 x e 400 x, respectivamente) sem infiltração celular na membrana sinovial; (C) e (D): animais submetidos à indução da artrite pela injeção (i.art.) de Zy (aumento de 40 x e 400 x, respectivamente) mostrando infiltrado celular na MS. Aumento de 40x e 400x. **C:** côndilo; **CA:** cartilagem articular; **DA:** disco articular; **MS:** membrana sinovial; **TME:** tecido muscular estriado esquelético. Setas ilustrando infiltrado celular inflamatório.

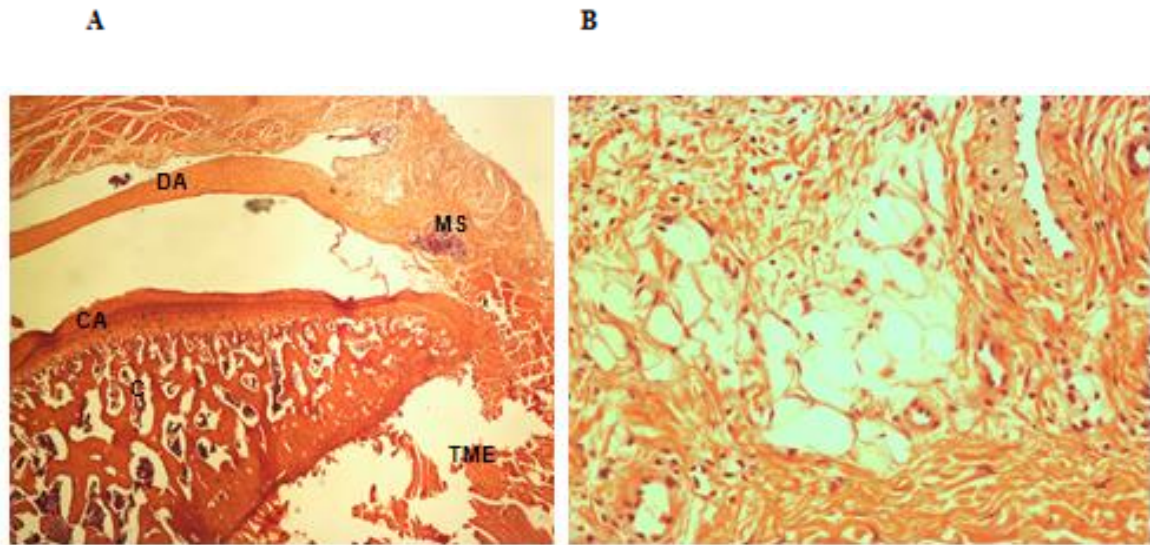


Figura 13-Fotomicrografias ilustrativas das articulações temporomandibulares (ATMs) de ratos submetidos à indução da artrite por Zymosan (Zy) e pré-tratados com a dose de (400 mg/kg) do extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (400mg/kg). (A) ATM de animais tratados com *Chresta martii* (400mg/kg); (B) ATM de animais tratados com o extrato O extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (400mg/kg) mostrando leve infiltrado celular na membrana sinovial. Aumento de 40 x (A) e 400 x (B). **C**: côndilo; **CA**: cartilagem articular; **DA**: disco articular; **MS**: membrana sinovial; **TME**: tecido muscular estriado esquelético.

6.2 Investigação do possível mecanismo de ação de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por Zymosan na articulação temporomandibular: análise do envolvimento da Hemeoxigenase-1

6.2.1 Efeito do Zinco Protoporfirina IX – ZnPP-IX (inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 – HO-1) sobre a eficácia de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* no modelo hipernocicepção inflamatória da ATM por Zymosan

A fim de avaliar o envolvimento da via da HO-1 outro grupo foi pré-tratado (s.c.) com ZnPP-IX (3 mg/kg). Após 1 h os animais receberam (*per os*) o extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* O efeito analgésico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* foi revertido pelo pré-tratamento com ZnPP-IX (**Figura 14**)

6.2.2 Efeito da coadministração do Zinco Protoporfirina IX – ZnPP-IX (inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 – HO-1) e *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* sobre a celularidade no lavado sinovial no modelo hipernocicepção inflamatória da ATM por Zymosan .

A fim de avaliar o envolvimento da via da HO-1 outro grupo foi pré-tratado (s.c.) com ZnPP-IX (3 mg/kg). Após 1 h os animais receberam (*per os*) o extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* Não houve diferença estatística entre os grupos analisados. (**Figura 15**)

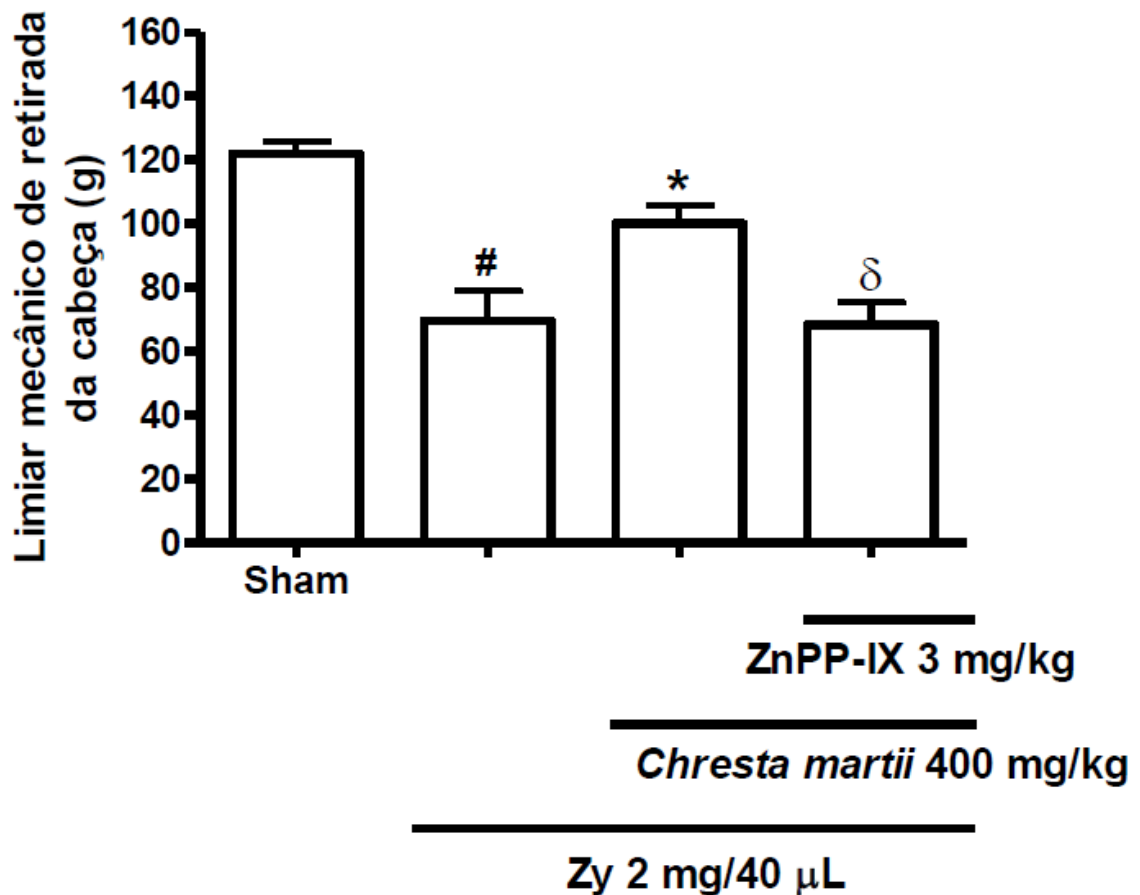


Figura 14 - Efeito de Zinco Protoporfirina IX – ZnPP-IX (inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 – HO-1) (3 mg/kg) sobre a eficácia do extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob.* na hipernocicepção articular no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por Zymosan na articulação temporomandibular. Ratos *Wistar* foram pré-tratados (s.c.) com ZnPP-IX (3 mg/kg) e após 30 min receberam (*per os*) o o extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) Após 1 h os animais receberam injeção intra-articular (i.art.) de Zy (2 mg; 40 µL) na ATM esquerda. O grupo Sham recebeu 40 µL de solução salina (i.art.). A hipernocicepção articular foi avaliada na 4ª h após injeção (i.art.) de Zy ou de solução salina. Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 6). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Zy; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham; $\delta p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com *Chresta martii* (DC.) e Zy (ANOVA, Bonferroni).

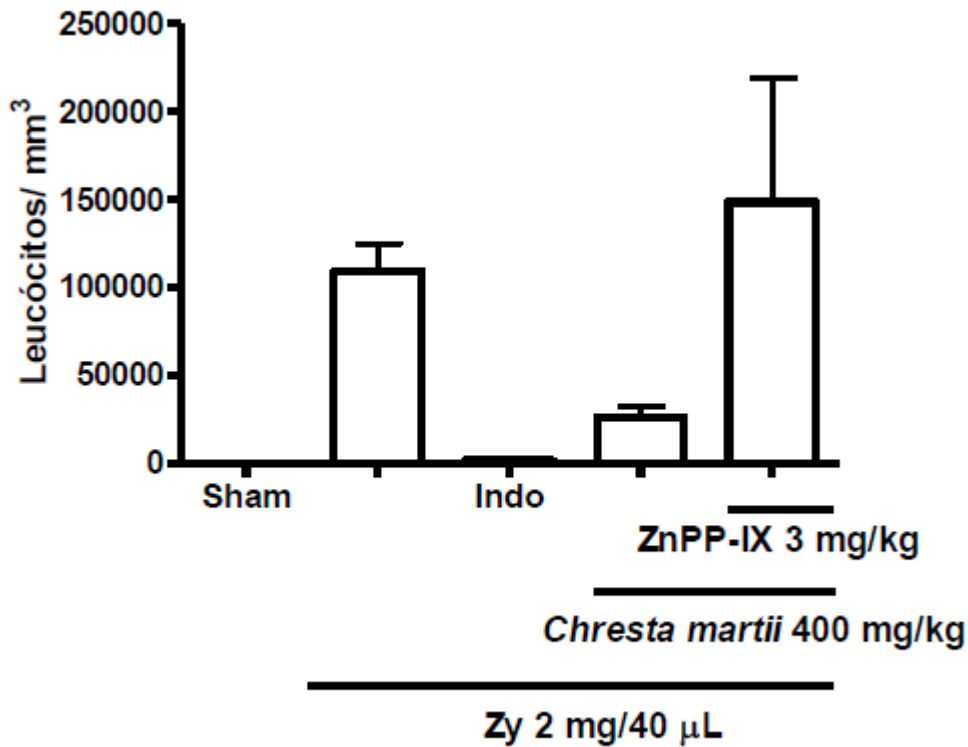


Figura 15 - Efeito da coadministração do Zinco Protoporfirina IX – ZnPP-IX (inibidor seletivo da hemoxygenase 1 – HO-1) e Chresta martii (DC.) H. Rob. sobre a celularidade no lavado sinovial no modelo hipernocicepção inflamatória da ATM por Zymosan . Ratos Wistar foram pré-tratados (s.c.) com ZnPP-IX (3 mg/kg) e após 30 min receberam (*per os*) o extrato hidro alcoólico de Chresta martii (400 mg/kg) . Após 1 h os animais receberam injeção intra-articular (i.art.) de Zy (2 mg; 40 μ L) na ATM esquerda. O grupo Sham recebeu 40 μ L de solução salina (i.art.). O infiltrado leucocitário foi avaliada na 6^a h após injeção (i.art.) de Zy ou de solução salina. Os dados representam média \pm E.P.M. (n = 6). (ANOVA, Bonferroni).

6.3 Avaliação sistêmica do extrato hidroalcólico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob.

6.3.1 Ensaio de toxicidade aguda

O EHA (50, 100, 2000 ou 3000 mg/kg) administrado oralmente (p.o.) não resultou em mortalidade ou sinais comportamentais de alteração neurológica. Similarmente, baixas doses do EHA (10 ou 100 mg/kg) injetados via intraperitoneal (i.p.) não produziram modificações no comportamento dos animais. Entretanto, o EHA (1000 mg/kg, i.p.) causou 2 mortes até 6 horas após o tratamento. Além disso, a dose de 2000 mg/kg, i.p. causou mais de 50 % de mortalidade em 6 h após o tratamento, seguidas por 2 e 1 mortes até as 24 e 36 h, respectivamente, a partir do início do ensaio. Todas as mortes foram precedidas de redução da locomoção e ptose palpebral.

6.3.2 Ensaio de segurança

O tratamento com EHA (400 mg/kg, p.o.) durante 14 dias não causou alterações na contagem de células sanguíneas, hemoglobina, hematócrito ou massa do fígado. Não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos internos. Os indicadores da função pancreática (amilase e lipase) também não foram alterados. Os valores de ALT e AST foram significativamente diferentes dos valores do grupo salina (Tabela 1). A curva da massa corporal do grupo tratado com EHA não foi estatisticamente diferente do grupo tratado com salina (**Figura 16**)

Tabela 2- Efeito do extrato hidro alcoólico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob. sobre os parâmetros sanguíneos (AST, ALT, amilase, lipase e contagem de células) e massa do fígado após tratamento diário em dose única durante 14 dias consecutivos.

Parâmetro sanguíneo/Tratamento	Salina (5mL/kg p.o.)	EHA (400mg/kg, p.o.)
AST (U/L)	80,69 ± 4,33	110,30 ± 7,24 [#]
ALT (U/L)	51,36 ± 5,54	91,79 ± 8,43 [#]
Amilase (U/dL)	733,20 ± 11,48	683,50 ± 17,92
Lipase (U/dL)	276,00 ± 5,86	268,50 ± 13,73
Eritrócitos (milhões/mm ³)	7,67 ± 0,17	7,79 ± 0,17
Hemoglobina (g/dL)	12,84 ± 0,34	13,14 ± 0,30
Hematócrito (%)	38,67 ± 1,11	40,26 ± 1,05
Leucócitos totais (células/mm ³)	2.080,00 ± 196,00	2.471,00 ± 259,80
Neutrófilos (células/mm ³)	211,90 ± 45,35	181,30 ± 66,89
Linfócitos (células/mm ³)	1.431,00 ± 86,20	1.974,00 ± 212,10
Monócitos (células/mm ³)	437,30 ± 95,71	316,40 ± 72,83
Plaquetas/mm ³	601.300,00 ± 43.376,00	514.857,00 ± 56.340,00
Massa do fígado (g)	2,12 ± 0,07	1,92 ± 0,07

Dados apresentados com média ± EPM. Teste t de Student

EHA extrato hidro alcoólico de *Chresta martii*

[#] p < 0,05 versus grupo salina

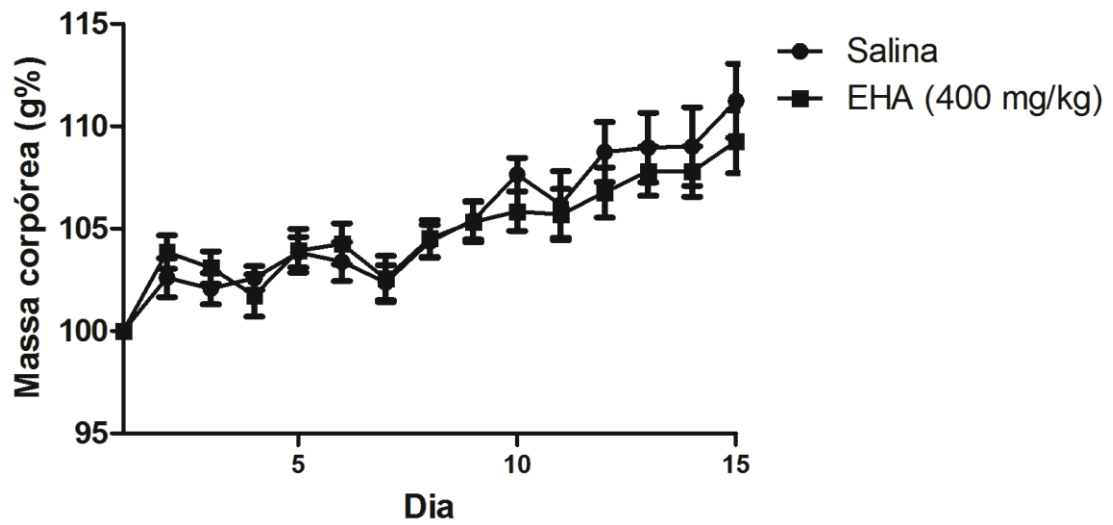


Figura 16- Evolução da massa corporal de camundongos tratados com dose única diária de EHA (400 mg /kg) durante 14 dias consecutivos. Os resultados estão expressos como porcentagem da massa média inicial. Não houve diferenças significativas do ponto de vista estatístico entre grupos salina e EHA neste experimento

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho propomo-nos a investigar a segurança e a eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcólico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob. no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan (Zy) na articulação têmporomandibular (ATM) de ratos.

O modelo experimental de hipernocicepção inflamatória na ATM de ratos induzida por Zy foi padronizado pelo nosso grupo, reproduzindo as principais condições encontradas clinicamente (CHAVES *et al.*, 2011). A ATM de ratos apresenta semelhanças com a articulação de humanos, comprovada através de análises histopatológica e imunohistoquímica, podendo, portanto, ser utilizada em estudos experimentais (FURSTMAN, 1964; FUJITA; HOSHINO, 1989; NOZAWA-INOUE *et al.*, 2003).

O zymosan tem sido usado como um agente pró-inflamatório já há alguns anos (GADO; GIGLER, 1991). De fato, a artrite aguda induzida por Zy, inicialmente proposta em joelho de ratos (ROCHA *et al.*, 1999), é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, migração celular e dor. Posteriormente se caracteriza por uma progressiva sinovite com células mononucleares, ativação de fibroblastos e formação do pannus (KEYSTONE *et al.*, 1977; GEGOUT *et al.*, 1994). Há ainda estudos sugerindo degradação da cartilagem articular e do osso subcondral na fase crônica da artrite por zymozan (GEGOUT *et al.*, 1995; BEZERRA *et al.*, 2004).

Clinicamente, as drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (DAINES) são os fármacos de escolha no tratamento da artrite devido à sua capacidade de melhorar os sinais e sintomas como dor e edema (SIQUEIRA, TEIXEIRA, 2012). De forma semelhante, alguns autores demonstraram a eficácia dos DAINES no modelo de artrite por carragenina na ATM (DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009). Em nosso estudo, indometacina, DAINE usada como controle positivo, reduziu a hipernocicepção articular, assim como os parâmetros inflamatórios de infiltração leucocitária e atividade de MPO. No entanto, existe uma busca crescente por novas drogas analgésicas e anti-inflamatórias, motivada por distorções na efetividade do arsenal atualmente empregado, pelos seus efeitos colaterais e altos custos (YUNES ; CALIXTO, 2001; SIMÕES *et al.*, 2003). A pesquisa por tais drogas pode

representar grandes avanços nos estudos da dor e inflamação (CAPASSO; LOIZZO, 2001; IDE; SUZUKI, 2001; DE CONNO; RIPAMONTI; BRUNELLI, 2001). Neste sentido, esse estudo avaliou o possível efeito analgésico e anti-inflamatório de *Chresta martii* (DC.) H. Rob, uma Asterácea encontrada na região do Xingó e conhecida na comunidade pelo nome de Muricica. Nossos resultados revelaram que *Chresta martii* (DC.) H. Rob foi capaz de exercer ação antinociceptiva e anti-inflamatória no modelo de hipernocicepção inflamatória da ATM induzida por Zymosan em ratos ao aumentar o limiar de hipernocicepção, reduzir o infiltrado celular no lavado sinovial bem como a atividade de mieloperoxidases (MPO). Esses achados foram confirmados pela análise histopatológica (H&E) das membranas sinoviais das ATM onde *Chresta martii* (DC.) H. Rob reduziu o infiltrado celular inflamatório. Ademais, a administração de *Chresta martii* (DC.) H. Rob diariamente durante 14 dias não revelou sinais de toxicidade.

A medida da dor facial é um parâmetro importante, pois as DTMs estão frequentemente associadas à dor e seus efeitos subsequentes, tais como hiperalgesia secundária, alodinia e dor referida (CHAVES *et al.*, 2011; TAKEUCHI *et al.*, 2004; TAKEDA *et al.*, 2006). Nesse estudo avaliamos a resposta mecânica à nocicepção gerada pelo zymosan na ATM de ratos utilizando um analgesímetro digital, previamente testado e validado, baseado nos mesmos princípios dos filamentos de von Frey, já utilizado anteriormente na ATM de ratos, superando-os em relação à precisão na medida do limiar de nocicepção (REN, 1999; PARADA *et al.*, 2003; DENADAI-SOUZA *et al.*, 2009). Neste sentido, a hipernocicepção analisada no presente estudo corresponde a uma dor articular real, embora seja aferida na pele do animal. Observou-se que o extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob (400 mg/kg) aumentou de forma significativa o limiar de hipernocicepção nesse modelo. De forma semelhante, nosso grupo demonstrou, no mesmo modelo, a eficácia antinociceptiva de outros produtos naturais como a alga marinha *S. filiformis* e *Tephrosia toxicaria* (ARAÚJO, 2012; VAL, 2012).

A migração celular até o tecido lesado ocorre por um complexo ciclo de eventos que permite às células se locomoverem do espaço vascular para o extravascular, exercendo suas funções de defesa (DRUBIN; NELSON, 1996; LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996; MITCHISON; CRAMER, 1996; ASSOIAN,

1997; BRITO *et al.*, 1998; CATÃO-DIAS; SINHORINI, 1999; CUMMINGS, 1999; GAHMBERG *et al.*, 1999; HYNES; BADER; HODIVALA-DILKE, 1999; BOROJEVIC, 1999; SMILENOV *et al.*, 1999; JIN *et al.*, 2000). No presente estudo observou-se que o extrato hidroalcoólico de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob* (400 mg/kg) reduziu de forma significativa a migração de leucócitos totais e a atividade da enzima MPO no lavado sinovial. Nos estágios iniciais de diversos processos inflamatórios, a célula predominante e primeiramente recrutada para o foco inflamatório é o neutrófilo (KUBES, 1993; ROSSI; HELLEWELL; 1994), sendo a MPO uma enzima marcadora de neutrófilos (KLEBANOFF *et al.*, 1999; WINTERBOURN; VISSERS; KETLE, 2000; GASSER *et al.*, 2003).

Nossos resultados revelaram ainda que histologicamente *Chresta martii* (DC.) *H. Rob* (400 mg/kg) reduziu o infiltrado celular na membrana sinovial da ATM, quando comparada ao grupo Zy. De forma semelhante, nosso grupo demonstrou que *Chresta martii* diminui a quimiotaxia de leucócitos, apresentou atividade antioxidante, além de efeito gastroprotetor no modelo de gastropatia induzida por etanol e indometacina em camundongos. (SILVA *et al.*, 2012).

Na perspectiva de investigar o possível mecanismo de ação de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob* no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por Zy na ATM, os animais foram pré-tratados com Zinco Protoporfirina IX – ZnPP-IX (inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 – HO-1), seguido da administração de *Chresta martii* (DC.) *H. Rob*.

A HO-1 pode ter sua expressão induzida em várias células (células endoteliais, células da musculatura lisa, basófilos, monócitos/macrófagos, neutrófilos e fibroblastos) por diferentes estímulos, como estresse oxidativo, citocinas, NO, endotoxinas, heme, gerados durante a resposta inflamatória, modulando a resposta inflamatória (TENHUNEN; MARVER; SCMID, 1969; WILLIS *et al.*, 1996; TERRY *et al.*, 1998; DATTA; LIANOS, 1999; OSHIRO *et al.*, 1999; ALCARAZ; FERNÁNDEZ; GUILLÉN, 2003; VICENTE *et al.*, 2003). Apesar de ter sido descoberta há mais de 40 anos (TENHUNEN *et al.*, 1969), o enfoque da via da HO-1/BVD/CO na dor e na inflamação tem sido dado nos últimos 20 anos. De fato, a atividade da HO-1 resulta na inibição do dano oxidativo e apoptose, reduzindo eventos clássicos da

inflamação, como edema, adesão e migração de leucócitos, e produção de citocinas inflamatórias (ALCARAZ; FERNÁNDEZ; GUILLÉN, 2003).

O efeito antinociceptivo de *Chresta martii* (DC.) H. Rob foi revertido pela administração prévia de ZnPP-IX (inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 – HO-1). Logo, sua ação antinociceptiva parece depender da integridade da via da HO-1. Nosso grupo demonstrou que o pré-tratamento com ZnPP-IX, inibidor específico da HO-1, potencializa o efeito algíco do ácido acético na contorção, bem como o edema de pata induzido pela carragenina na 3^a h, diminuindo ainda os níveis de bilirrubina no lavado peritoneal (GRANGEIRO *et al.*, 2011). Esses achados corroboram com dados encontrados na literatura de que o pré-tratamento com ZnPP-IX amplifica a resposta inflamatória, em razão da consequente falta dos produtos derivados da via da HO-1 (GRANGEIRO *et al.*, 2011). Vanderlei *et al.* (2011) também demonstraram que o pré-tratamento com ZnPP-IX potencializou o efeito algíco da carragenina no edema de pata induzido por carragenina, revertendo a atividade anti-inflamatória do polissacarídeo sulfatado da alga *Gracilaria birdiae* SP-Gb (10 mg/kg). De forma semelhante do Val (2012) demonstrou que o pré- tratamento com ZnPP-IX reverteu a atividade antinociceptiva da *Tephrosia toxicaria* no modelo de hipernocicepção inflamatória da ATM em ratos induzida por zymosan.

A despeito da grande importância dos fitoterápicos e da ampla diversidade de espécies vegetais largamente utilizadas no nosso país, poucos estudos foram realizados no que concerne à segurança. Neste aspecto, foram avaliados parâmetros de toxicidade utilizando camundongos, em uso de extrato hidroalcóolico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob Pers.

O teste de segurança deve priorizar a mesma via utilizada em humanos. A resposta dos animais frente à administração por gavagem não será a mesma daquela observada quando utilizada a via intraperitoneal, devido às diferenças existentes entre os perfis de absorção estomacal e intestinal como pH, superfície de absorção, motilidade intestinal, irrigação sanguínea (KLASSEN; WATKINS, 2001).

A variação da massa corpórea é um dos parâmetros empregados para indicar o surgimento precoce de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal. Quanto ao peso corporal dos animais tratados com *Chresta martii*

(DC.) *H. Rob* (400 mg/kg) não houve qualquer alteração ponderal em relação ao grupo que recebeu apenas solução salina.

As análises das enzimas aminotransferases séricas (ALT e AST) e da fosfatase alcalina são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas (MARTIN; MAYES; RODWELL, 1981; SILVA *et al.*, 2005). Uma droga não provoca dano ao fígado sem interferir com a atividade normal dessas enzimas (VIJAYALAKSHMI; MUTHULAKSHMI; SACHDANANDAM, 2000; SILVA *et al.*, 2005). A atividade das transaminases séricas (ALT e AST) é utilizada como indicadora de lesões hepáticas quimicamente induzidas (DROTMAN; LAWHORN, 1978). Os valores de ALT e AST do nosso grupo controle (salina) foram similares aos de outros trabalhos (DINIZ *et al.*, 2006; MAZZACCARA *et al.*, 2008). Os resultados do estudo subcrônico revelaram um aumento significativo ($p < 0,05$) das médias dos níveis séricos de ALT e AST do grupo tratado com *Chresta martii* (DC.) *H. Rob* (400 mg/kg), quando comparado ao grupo salina. A literatura mostra que aumentos de 2 a 3 vezes nos níveis de ALT acima do limite superior normal são necessários para serem considerados indicativos de dano hepato-celular (BOONE *et al.*, 2005). Nosso estudo não alcançou estes valores (1,78 e 1,36 vezes os valores de ALT e AST do grupo salina, respectivamente), e nós comparamos apenas à média, não os limites superiores. Estes parâmetros não podem ser avaliados de forma isolada, de modo que a determinação deste tipo de efeito tóxico induzido por drogas precisa ser baseada em várias outras observações (BOONE *et al.*, 2005). Ademais, os parâmetros hematológicos não sofreram alteração significativa quando comparados ao grupo controle.

Em conclusão, no modelo de hipernocicepção inflamatória na ATM por Zymosan, *Chresta martii* (DC.) *H. Rob*. apresentou eficácia e segurança. Em conjunto, os dados apresentados neste trabalho podem fornecer subsídios para ensaios clínicos controlados envolvendo pacientes portadores de DTMs, podendo contribuir para a instituição de uma nova abordagem terapêutica.

8 CONCLUSÃO

No modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por Zymosan na ATM de ratos, o extrato hidroalcólico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob. (400 mg/kg) reduziu a hipernocicepção articular, o infiltrado celular inflamatório no lavado sinovial e na membrana sinovial , além da atividade de MPO no lavado sinovial.

A administração do extrato hidroalcólico de *Chresta martii* (DC.) H. Rob (400 mg/kg) não apresentou sinais de toxicidade em todos os parâmetros avaliados, sendo uma opção terapêutica segura nesse modelo animal.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn** , v. 18,p. 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.S.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology** , v. 114,p. 325–354, 2007.
- ALCARAZ, M. J.; FERNÁNDEZ, P.; GUILLÉN, M. I. Anti-Inflammatory Actions of the Heme Oxygenase-1 Pathway. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 2541-51, 2003.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R.; DE AMORIM, E.L.C. ; ALBUQUERQUE, U.P.; MAIA, M.B.S. Medicinal plants popularly used in the Xingo region—a semi-arid location in Northeastern Brazil. **J Ethnobiol Ethnomed** , v.2,p.1–7,2006.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R.; SILVA, T.C.; AMORIM, E.L.C.; MAIA, M.B.S.; ALBUQUERQUE, U.P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **J Arid Environ** , v.62,p.127–142, 2005.
- ALOMAR, X.; MEDRANO, J.; CABRATOSA, J.; CLAVERO, J.A.; LORENTE, M.; SERRA, I.; MONILL, SALVADOR, A. Anatomy of the temporomandibular Joint. **Seminars in ULTRASOUND, CT and MRI**, v. 28, n. 3, p.170-183, 2007.
- ALVES, N. D. C.; SANTOS, T. C.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C.; LIRA, L. M.; DORNELAS, C. B. Avaliação da adequação técnica de indústria de medicamentos fitoterápicos e officinais do Estado do Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**; v.13 (suppl), p. 745-753, 2008.
- AMERICAN ASSOCIATION FOR DENTAL RESEARCH. Temporomandibular disorders. Acesso em 24 de junho de 2010.
<http://www.aadronline.org/i4a/pages/index.cfm?pageid=3465followedby>.
- ANDEL, T. V. The Diverse uses of Fish-Poison Plants in Northwest Guyana. **Economic Botany**, v. 54, p. 500-512, 2000.
- ANDRADE FILHO, A.C.C. **Dor: diagnóstico e tratamento** . 1 ed. São Paulo: Roca; 2001. Cap. 1, p.1-6.
- ARAÚJO, I. W. F., **Estudo dos efeitos de um polissacarídeo sulfatado isolado da alga marinha *Solieria filiformis* sobre os modelos de nocicepção e inflamação**. Fortaleza [Tese de Doutorado] - CENTRO DE CIÊNCIAS, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ASSOIAN, R. K. Anchorage-dependent cell cycle progression. **Journal of Cell Biology**, v. 136, n. 1, p. 1-4, 1997.

BÄCKDAHL, L.; BUSHELL, A.; BECK, S. Review - Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 176–184, 2009.

BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacol Res**, v.4, 7, p.93–98, 2003.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da Toxicidade. In: S. Oga. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu. p. 57-67, 2003.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil** v. 3. Viçosa: Imprensa Universitária, 1986.

BATEMAN, J.; CHAPMAN, R. D.; SIMPSON, D. Possible toxicity of herbal remedies. **Scottish Medical Journal**, v. 43, p. 7-15, 1998.

BENNOUNA, S.; BLISS, S.K.; CURIEL, T.J.; DENKERS, E.Y. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 6052–6058, 2003.

BELCHER, J. D.; MAHASETH, H.; WELCH, T. E.; OTTERBEIN, L. E.; HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 808-816, 2006.

BENOLIEL, R.; ELIAV, E.; IADAROLA, M. J. Neuropeptide Y in trigeminal ganglion following chronic constriction injury of the rat infraorbital nerve: is there correlation to somatosensory parameters? **Pain**, v. 91, p. 111-121, 2001.

BENT, S. Herbal Medicine in the United States: Review of Efficacy, Safety, and Regulation. **Journal of General Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 854-859, 2008.

BEZERRA, M. M., BRAIN, S. D.; GREENACRE, S.; JERONIMO, S. M. B.; MELO, L. B.; KEEBLE, J.; ROCHA, F. A. C. 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, p. 172–182, 2004.

BIESKI, Isanete Geraldini Costa. Marketing das Plantas Mediciniais na Saúde Pública .Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/marketing.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2011.

BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; KOHN, L.K.; REHDER, V.L.G.; FOGGIO, M.A.; POSSENTI, A.; VILELA, L.; CARVALHO J.E. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, p. 72-77, 2005.

BOONE L.; MEYER D.; CUSICK P.; ENNULAT D.; BOLLIGER A.P.; EVERDS N.; MEADOR V.; ELLIOTT G.; HONOR D.; BOUNOUS D.; JORDAN H. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. **Vet Clin Pathol.** v. 34(3), p.182–188, 2005.

BONJARDIM, L. R.; GAVIÃO, M. B.; PEREIRA, L. J.; CASTELO, P. M. Anxiety and depression in adolescents and their relationship with signs and symptoms of temporomandibular disorder. **International Journal of Prosthodontics**, v. 18, n. 4, p. 347-352, 2005.

BOROJEVIC, R. Extracellular matrix: understanding the complexity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 497-499, 1999.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-622, 1982.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRITO, G. A. C.; FALCAO, J. L. A. A.; SARAIVA, S. R. N.; LIMA, A. A. M.; FLORES, C. A.; RIBEIRO, R. A. Histopathological analysis of rat mesentery as a method for evaluating neutrophil migration: differential effects of dexamethasone and pertussis toxin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1319-1327, 1998.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J., SANTOS, A. R., FILHO, V. C., YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 401-18, 2000.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAPASSO, A.; LOIZZO, A. Clonidine-induced antinociception and locomotor hypoactivity are reduced by dexamethasone in mice. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 3. p. 351-360, 2001.

CARDOSO, A. C.; TAVARES, R. **Oclusão para você e para mim**. 2. ed. São Paulo: Ed. Santos, cap. 6, p. 166-187, 2007.

CARVALHO, A. C. B. **Plantas medicinais e fitoterápicos: Regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. 2011.

CATÃO-DIAS, L. J.; SINHORINI, I. L. Influence of low environmental temperature on inflammation in Bullfrog (*Rana catesbeiana*): qualitative and quantitative evaluation. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, p. 75-81, 1999.

- CHAVES, H.V. **Padronização de modelo experimental de artrite na articulação temporomandibular de ratos induzida por zymosan e estudo do papel do óxido nítrico**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- CHAVES, H. V.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, A. M. B de.; SILVA, A. A. R.; GOMES, A. S.; VALE, M. L.; BEZERRA, M. M.; BRITO, G. A. C. Experimental modelo f zymosan-induced arthritis in the rats temporomandibular joint: Role of nitric oxide and neutrophils. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p.1-11, 2011.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia estrutural e funcional. 6ª edição, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.
- CUMMINGS, R. D. Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 5, p. 519-28, 1999.
- CUNHA, F. Q.; FREITAS, A.; FILHO, J. C. A.; SECCO, D. D.; NETO, A. F.; FERREIRA, S. H.; FIDALGO, C. B. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, p. 345–354, 2006.
- DALE, M.M.; RANG, H.P.;RITTER, J. M.;FLOWER, R.J. Farmacologia. 6a edição - Editora Elsevier – 2007.
- DATTA, P. K.; LIANOS, E. A.: Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression in mesangial cells. **Kidney International**, v. 55, p. 1734–1739, 1999.
- DE CONNO, F.; RIPAMONTI, C.; BRUNELLI, C. Opioid purchases and expenditure in nine western European countries: Are we killing off morphine? Palliative medicine, derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint with experimental traction of the mandibular ramus in rabbit. **Oral Diseases**, v. 7, p. 185-191, 2001.
- DE LAAT, A.; STAPPAERTS, K.; PAPY, S. Counseling and physical therapy as treatment for myofascial pain of the masticatory system. **Journal of Orofacial Pain**, v. 17, n. 1, p. 42-49, 2003.
- DIAS, L.F.T.; MELO, E.S.; HERNANDES, L.S.; BACCHI, E.M. Atividades antiúlcera e antioxidante Baccharis trimera (Less) DC (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 309-314, 2009.
- DINIZ M.F.F.M.; MEDEIROS I.A.; SANTOS H.B.; OLIVEIRA K.M.; VASCONCELOS T.H.C.; AGUIAR F.B.; TOSCANO M.G.; RIBEIRO E.A.N. Haematological and biochemical parameter standardization of Swiss mice and Wistar rats. **Rev Bras Ciências da Saúde** v.10(2), p.171–176, 2006.
- DROTMAN R.B.; LAWHORN G.T. Serum enzymes as indicators of chemical induced liver damage. **Drug Chem Toxicol**. V.1,p.163–171, 1978.
- DEL VITTO L.A.; PETENATTI Y E. M. Asteráceas de importancia económica y ambiental. primeira parte. sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés. **Multequina**, v. 18, p. 87-115, 2009.

DENADAI-SOUZA, A.; CAMARGO, L. L.; RIBELA, M. T. C. P.; KEEBLE, J. E.; COSTA, S. K. P.; MUSCARÁ, M. N. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. **European Journal of Pain**, v.13, p.812–819, 2009.

DRAY, A. **Peripheral mediator of pain**. In: *The Pharmacology of Pain*, p. 21-41, 1997.

DRUBIN, D. G.; NELSON, W. J. Origins of cell polarity. **Cell**, v. 84, n. 3, p.335-344, 1996.

EMERENCIANO, V.P.; RODRIGUES, G.V.; ALVARENGA, S.A.V.; MACARI, P.A.T.; KAPLAN, M.A.C. Um novo método para agrupar parâmetros quimiotaxonômicos. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p.125-129, 1998.

ERNST, E.. Serious psychiatric and neurological adverse effects of herbal medicines - a systematic review. **Chemical Research in Toxicology**, v. 108, p. 83-91, 2003.

ETHUIN, F.; GÉRARD, B.; BENNA, J.E.; BOUTTEN, A.; GOUGEREOT-POCIDALO, M. A.; JACOB, L.; CHOLLET-MARTIN. Human neutrophils produce interferon- γ upon stimulation by interleukin-12. **Laboratory Investigation.**, v. 84, p. 1363–71, 2004.

EVANS, D. E.; RALSTON, S. H. Nitric oxid and bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, p. 300-305, 1996.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CORREA,, F. M. . Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. . **Eur J Pharmacol**, v. 53, p. 39-48, 1978.

FLORIAN, M. R.; MEIRELLES, M. P. M. R.; SOUSA, M. L. R de. Disfunção temporomandibular e acupuntura: uma terapia integrativa e complementar. **Odontologia Clínico-Científica**, v. 10, n. 2, p. 189-192, 2011.

FOX, L.; HEGDE, S.; GUMPERZ, J. E. Review - Natural killer T cells: innate lymphocytes positioned as a bridge between acute and chronic inflammation? **Microbes and Infection**, v. 12, p. 1125-1133, 2010.

FREDRIKSSON, L.; ALSTERGREN, P.; KOPP, S. Pressure pain thresholds in the craniofacial region of female patients with rheumatoid arthritis. **J. Orofac. Pain**, v. 17, n. 4, p. 326-332, 2003.

FUJITA, S.; HOSHINO, K. Histochemical and immunohistochemical studies on the articular disk of the temporomandibular joint in rats. **Acta Anat.**, v. 134, n. 1, p. 26-30, 1989.

FUJITA, T.; TODA, K.; KARIMOVA, A.; YAN, S. F.; NAKA, Y.; YET, S. F.; PINSKY, D. J. Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis. **Nature Medicine**, v. 7, p. 598-604, 2001.

FUKUTO, J. M.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potencil selective inhibition. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 165-194, 1995.

FUNK, V.A.; SUZANNA, A.; STUESSY, T.F.; BAYER, R.J. **Systematics, evolution and biogeography of Compositae**. Vienna: IAPT. 2009.

FURSTMAN, L. L. Normal age changes in the rat mandibular joint. **J. Dent. Res.**, v. 45, n. 2, p. 291-296, 1966.

GADO K.; GIGLER G. Zymosan inflammation: a new method suitable for evaluating new antiinflammatory drugs. **Agents and Actions**, v. 32, n. 1-2, p. 119–121, 1991.

GAHMBERG, C. G.; VALMU, L.; TIAN, L.; KOTOVUORI, P.; FAGERHOLM, S.; KOTOVUORI, A.; KANTOR, C.; HILDEN, T. Leukocyte adhesion - a fundamental process in leukocyte physiology. **Brazilian Journal Medical and biological Research**, v. 32, p. 511-517, 1999.

GASSER, O.; HESS, C.; MIOT, S.; DEON, C.; SANCHEZ, J.C.; SCHIFFERLI, J.A.. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. **Experimental Cell Research**, v. 285, p. 243-257, 2003.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUINGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Characterization of zymosan-induced arthritis in rats: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life. Sci.**, v. 55, n. 17, p. 321-326, 1994.

GEISSMANN, F; MANZ, M. G; JUNG, S; SIEWEKE, M. H; MERAD, M; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327 p. 656-661, 2010.

GIULIETTI, A.M. (Comp.). Biodiversidade da CAATINGA: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2003.

GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 329–333, 2000.

GRANGEIRO, N. M. G.; AGUIAR, J. A.; CHAVES, H. V.; SILVA, A. A. R.; LIMA, V.; BENEVIDES, N. M. B.; BRITO, G. A. C.; DA GRAÇA, J. R. V.; BEZERRA, M. M. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway may be involved in the antinociceptive activity of etoricoxib, a selective COX 2 inhibitor. **Pharmacological Reports**, v. 63, p. 112–119, 2011.

GREENE, C. S.; KLASSER, G. D.; EPSTEIN, J. B. Revision of the American Association of Dental Research's Science Information Statement about Temporomandibular Disorders. **J.Can Dent Assoc.**, v.76, p, 115, 2010.

HARGREAVES, K. M. Review - Orofacial pain. **Pain**, v. 152, p. 25-32, 2011.

HAYASHI, S.; TAKAMIYA, R.; YAMAGUCHI, T.; MATSUMOTO, K.; TOJO, S. J.; TAMATANI, T.; KITAJIMA, M.; MAKINO, N.; ISHIMURA, Y.;SUEMATSU, M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. **Circulation Research**, v. 85, p. 663-71, 1999.

HEEMANN, A.C.; WINKLER, M.; GOMES, M.O.; DALLARMI, M.M.; SASAKI, C.M.; FRANCO, D.M. Estudo fitoquímico da espécie *Pterocaulon interruptum* DC.

(Asteraceae) / Phytochemical study of *Pterocaulon interruptum* DC., Asteraceae. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 585-588, 2006.

HENSSON, P. M. Dampening inflammation. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1179-1181, 2005.

HERB, K.; CHO, S.; STILE, M. A. Temporomandibular joint pain and dysfunction. **Current Pain and Headache Reports**, v.10, p. 408-414, 2006.

HWANG, S. W.; OH, U. Current concepts of nociception: nociceptive molecular sensors in sensory neurons. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 20, n. 5, p. 427-34, 2007.

HYNES, R. O.; BADER, B. L.; HODIVALA-DILKE, K. Integrins in vascular development. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 501-510, 1999.

IDE, M.; SUZUKI, Y. [Drug therapy for osteoporosis associated with rheumatoid arthritis (calcitonin)]. v. 11, n. 5, p. 638-942, 2001.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; WOOD, K. S. **Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical**. In: Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium. Raven Press, New York, p. 427-436, 1988.

JIN, T.; ZHANG, N.; LONG, Y.; PARENT, C. A.; DEVREOTES, P. N. Localization of the G protein betagamma complex in living cells during chemotaxis. **Science**, v. 11, p. 287, n. 5455, p. 1034-1036, 2000.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413 n. 6852, p. 203-210, 2001.

KATO T, INUZUKA L, KONDO M, MATSUDA T. Growth of nisin-producing lactococci in cooked rice supplemented with soybean extract and its application to inhibition of *Bacillus subtilis* in rice miso. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, p. 330-337, 2001.

KEELEY, S.C.; FORZMAN, H.Z.; CHAN, R. A phylogeny of 'evil tribe' (Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: support from separate and combined congruent data sets (trnL-F, ndhF, ITS). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 89-103, 2007.

KEELEY, S.C.; ROBINSON, H. Vernonieae. In: FUNK, V.A.; SUZANNA, A.; STUESSY, T.F.; BAYER, R.J. **Systematics, evolution and biogeography of Compositae**. Vienna: IAPT, 2009. cap. 28, p. 438-471.

KENGATHARAN, K. M., De KIMPE, S. J.; THIEMERMANN, C. Role of nitric oxide in the circulation failure and organ injury in a rodent model of Gram-positive shock. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, p. 1411-1421, 1996.

KEYSTONE, E.C.; SCHORLEMMER, H.U.; POPE, C.; ALLISON, A.C. Zymozan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the

alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum.**, v. 20, n. 7, p. 1396-1401, 1977.

KLASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Toxicologia: A ciência básica dos tóxicos** (5ª Ed.) Compêndio. McGraw Hill – Tradução em Português, 2001.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, p. 383-389, 1999.

KOCH, A. E.; STEVEN, L. K.; SHAH, M. R.; HOSAKA, S.; HALLORAN, M. M.; HAINES, G. K.; BURDICK, M. D.; POPE, R. M.; STRIETER, R. M. Growth-related gene product α - A chemotactic cytokine for neutrophils in rheumatoid arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 155, p. 3660-3666, 1995.

KUBES, P. Polymorphonuclear leukocyte-endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 7, p. 88-97, 1993.

KUMAR. V.; SHARMA, A. Review - Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 1325–1334, 2010.

KURODA, S.; TANIMOTOZ, K.; IZAWAY, T.; FUJIHARAY, S.; KOOLSTRAX, J.H.; TANAKA, E. Review - Biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, p. 1408-1415, 2009.

KWON, N. S., NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 20496-20501, 1989.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 359-369, 1996.

LEES, P.; LANDONI, M. F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P. L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, p. 479-490, 2004.

LEEuw, R. Dor orofacial: guia de avaliação, diagnóstico e tratamento. 4ª ed. São Paulo: Quintessence, 2010.

LEVINE, J. D.; REICHLING, D. B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. In: WALL, P. D, MELZACK, R. (eds) *Textbook of Pain*. New York, Churchill Livingstone, p. 59-84, 1999.

LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL 2012 in <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012> Acesso em: 22/03/2012.

LI, X. M.; BROWN, L. Efficacy and mechanisms of action of traditional Chinese medicine for treating asthma and allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 2, p. 297-308, 2009.

LOCKER, D.; CLARKE, M.; PAYNE, B. Self-perceived oral health status, psychological well-being and life satisfaction in a older adult population. **Journal Dental Research**, Washington, v. 79, p. 970-975, 2000.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: An overview. **The Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 232–240, 2006.

MACFARLANE, T. V. Orofacial pain in the community: prevalence and associated impact. **Community Dentistry Oral Epidemiology**, Copenhagen, v. 30, n. 1, p. 56-60, 2002.

MACIEL, R. N. Oclusão e ATM: procedimentos clínicos. São Paulo: Santos, 1996.

MADEIRA, C. M. **Articulação temporomandibular**. In: Anatomia da face: bases anatomo-funcionais para a prática odontológica. 5. ed. São Paulo: Sarvier, p. 103-117. 2003.

MAINES, M. D.; TRAKSHEL, G. M. Purification and characterization of human biliverdin reductase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, p. 320–326, 1993.

MALIK, A. B.; LO, S. K. Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. **Pharmacological Reviews**, v. 48, p. 213–229, 1996. 115

MANFREDINI, D.; CANTINI, E.; ROMAGNOLI, M.; BOSCO, M. Prevalence of bruxism in patients with different research diagnostic criteria for temporomandibular disorders (RDC/TMD) diagnoses. **Cranio**, v. 21, n. 4, p. 279-285, 2003.

MARRONE, P; MACEDO, R. Panorama econômico dos principais segmentos do setor farmacêutico brasileiro: uma análise por meio de nova metodologia de classificação, segundo classes terapêuticas, incluindo comparações intern. Brasília: 86p. Febráfarma, 2007.

MARTIN, D. W.; MAYES, P. A.; RODWELL, Y. W. In: Harper's Review of Biochemistry. California: Lange Medical. Biochemistry. 1981.

MATOS, M. E.; ALMEIDA, F. R.; RAO, V. S. Inhibition of formaldehyde-induced arthritis by a purified fraction prepared from *Wilbrandia (cf) verticillata* which contains novel norcucurbitacin glucosides. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p. 1397-1399, 1989.

MATTHEWS, B.; SESSLE, B. J. **Mecanismos periféricos da dor orofacial**. In: Dor orofacial – Da ciência Básica à Conduta Clínica. 1ª ed. Quintessence Editora, p. 37-46, 2002.

MAZZACCARA C.; LABRUNA G.; CITO G.; SCARFO M.; FELICE M.; PASTORE L.; SACCHETTI L.; Age-related reference intervals of the main biochemical and hematological parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ mouse strains. **PLoS ONE**. v.3(11),p.3772, 2008.

McCALL, T. B.; FEELISCH, M.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 102, p. 234-238, 1991.

McINNES, I. B.; LEUNG, B.P.; FIELD, M.; WEI, X.Q.; HUANG, F.P.; STURROCK, R.D.; KINNINMONTH, A.; WEIDNER, J.; MUMFORD, R.; LIEW, F.Y. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. **J Exp Med**, v.184,p. 1519-1524, 1996.

MCCOUBREY, W. K., HUANG, T. J., MAINES, M. D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur J Biochem**. v. 247, p. 725-32, 1997.

MCCOUBREY, W. K.; EWING, J. F.; MAINES, M. D. Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 295, p. 13-20, 1992.

MCEVER, R. P. **Leukocyte-endothelial cell interactions**. Current Opinion in Cell Biology, v. 4, p. 840–849, 1992.

MELZACK, R.; KATZ, J. **Pain measurement in persons in pain**. In: WALL, P. D.MELZACK, R.; Textbook of Pain, 4. ed. Churchill Livingstone, p. 409- 426, 1999.

MERIGHI, Luciana Biral Mendes et al. Ocorrência de disfunção temporomandibular (DTM) e sua relação com hábitos orais deletérios em crianças do município de Monte Negro – RO. **Revista CEFAC**, São Paulo, v. 9, n. 4, Out./Dez. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>. Acessado em 2011.

MITCHISON, T. J.; CRAMER, L. P. Actin-based cell motility and cell locomotion. molecular process. **Cell**, v. 84, n. 3, p.359-69, 1996.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J. **The L-arginine:nitric oxide pathway in the vessel wall. Nitric oxide from L-arginine**. Ed. by Moncada, S. and Higgs, E. A., p. 19-33, Elsevier, Amsterdam, 1990.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONTEIRO, D. R.; ZUIM, P. R. J.; PESQUEIRA, A. A.; RIBEIRO, P. P; GARCIA, A. R. Relationship between anxiety and chronic orofacial pain of temporomandibular disorder in a group of university students. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 55, p. 154–158, 2011.

MORGAN, J, R.; GEBHART, G. F. Characterization of a Model of Chronic Orofacial Hyperalgesia in the Rat: Contribution of NAV 1.8. **The Journal of Pain**, v. 9, n. 6, p. 522-531, 2008.

- MURAD, F.; ISHII, K.; FORSTERMANN, U. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. **Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research**, v. 24, p. 441-448, 1990.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.
- NILSSON, I. M., LIST, T.; DRAGSHOLT, M. Incidence and Temporal Patterns of Temporomandibular Disorder Pain Among Swedish Adolescents. **Journal Orofacial Pain**, v. 21, n. 2, p. 127-132, 2007.
- NOURSHARGH, S, MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends in Immunology**, v. 26, p. 157-165, 2005.
- NOZAWA-INOUE, K.; AMIZUKA, N.; IKEDA, N.; SUZUKI, A.; KAWANO, Y.; MAEDA, T. Sinovial membrane in the temporomandibular joint – Its morphology, function and development. **Archives of Histology and Cytology**, v. 66, n. 4, p. 289-306, 2003.
- OKESON, J. P. Dor orofacial: guia para avaliação, diagnóstico e tratamento. São Paulo (SP): Santos Livraria, 1998.
- OKESON, J. P. Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão. 4. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000.
- OKESON, J. P. Dores Bucofaciais de Bell. 5ª ed. São Paulo: Quintessence, 2003.
- OKESON, J. P. Fundamentos de oclusão e desordens temporomandibulares. São Paulo: Artes Médicas, p. 168-169, 1992.
- OLIVEIRA, L. F.. **Atualização em mecanismos e fisiopatologia da dor**. In: PRIMER SIMPOSIO VIRTUAL DE DOLOR. Medicina Paliativa y Avances en Farmacologia Del Dolor, nov./ dez. 2001. Anais... [S. l.]: [S. n.], 2001
- OSHIRO, S.; TAKEUCHI, H.; MATSUMOTO, M.; KURATA, S. Transcriptional activation of heme oxygenase-1 gene in mouse spleen, liver and kidney cells after treatment with lipopolysaccharide or hemoglobin. **Cell Biology International**, v. 23, p. 465–474, 1999.
- OSWALD, I. P., GAZZINELI, R. T., SHER, A.; JAMES, S. L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 3578-3582, 1992.
- PARADA, C.A.; VIVANCOS, G.G.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S. H. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA v.100, n.5, p.2923–2928, 2003.
- PATWARDHAN, B.; WARUDE, D.; PUSHPANGADAN, P.; BHATT, N. Ayurveda and traditional Chinese medicine: a comparative overview. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 465–473, 2005.
- PETACCI, F.; TAVARES, W.S.; FREITAS, S.S.; TELES, A.M.; SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO, J.C. Phytochemistry and quantification of polyphenols in extracts of the

Asteraceae weeds from Diamantina, Minas Gerais state, Brazil/ Fitoquímica e quantificação de polifenóis em extratos de plantas daninhas Asteraceae de Diamantina, Minas Gerais, Brasil. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, 9-15, 2012.

PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, 100:57-60, 2005.

PIETROVSKI, E. F. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos das flores de Combretum Leprosium Mart. Curitiba.** [Dissertação] - Porto Alegre: UFRGS, 2004.

PINTO, M. S. C. T. A percepção da dor receptores envolvidos. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, v. 5, p. 253-262, 2000.

PIOZZI, R.; LOPES, F. C. Desordens temporomandibulares: aspectos clínicos e guia para a odontologia e fisioterapia. **Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial**, v. 2, n. 5, p. 43-47, 2002.

REES, D. D.; CELLEK, S.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Dexamethsone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone. An insight into endotoxin shock. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.173, p. 541-547, 1990.

REN, K. An improved method for assessing mechanical allodynia in the rat. **Physiol. Behav.**, v. 67, n. 5, p. 711-716, 1999.

RIBEIRO, W. H. F.; VASCONCELOS, J. N.; ARRIAGA, A. M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; ANDRADE-NETO, M.; LEMOS, T. L. G.; SANTIAGO, G. M. P.; NASCIMENTO, R. F.; MAFEZOLI, J.; **Natural Product Communications**, v. 1, p. 391, 2006.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol.** v. 60, n. 6, p. 404-15, 2001.

ROBBINS E COTRAN: **Patologia: Bases Patológicas das Doenças** - Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto. Editora: ELSEVIER, 1504 páginas, 2005.

ROBINSON, H. **Generic and Subtribal Classification of American Vernoniaeae.** Washington: Smithsonian Institution Press, 1999.

ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E. B.; JANCAR, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. C.; Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymozan-induced arthritis in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, p. 588-596, 2002.

ROQUE, N.; GONÇALVES, J.M.; DEMATTEIS, M. A new species of the Brazilian genus *Chresta* (Asteraceae, Vernoniaeae) from Bahia. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 157, p. 587–590, 2008.

ROSSI, A. G.; HELLEWELL, P. G. Mechanisms of neutrophil accumulation in tissues. In: HELLEWELL, P. G.; WILLIAMS, T. J. (Eds.). **Immunopharmacology of neutrophils: the handbook of immunopharmacology.** Academic Press, v. 10, p. 223, 1994.

- SAKAMOTO, HT.; GOBBO-NETO, L.; CAVALHEIRO, A.J.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Quantitative HPLC analysis of sesquiterpene lactones and determination of chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6b, p. 1396-1401, 2005.
- SAWYNOK, L. Gabaergic mechanisms in antinociception. **Program of Neuropsychopharmacology and Biology Psychiatry**, v. 8, p. 581 – 586, 2003.
- SBED - Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor, 2009. <http://www.dor.org.br> acesso em 10 set. 2011.
- SESSLE, B. J. Acute and Chronic craniofacial pain: Brainstem Mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 57-91, 2000.
- SESSLE, B. J. Brainstem mechanisms underlying craniofacial pain and its modulation. **Advances in Pain Research and Therapy**, v. 22, p. 413-421, 1995.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.
- SHONO, T.; ONO, M.; IZUMI, H.; JIMI, S. I.; MATSUSHIMA, K.; OKAMOTO, T., KOHNO, K.; KUWANO, M. Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. **Molecular and Cell Biology**, v. 16, p. 4231-4239, 1996.
- SILVA, A. A. R.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V.; PEREIRA, K. M. A; AGUIAR, J. A.; PINTO, V. P. T. ; ABBET, C. ;C. SIMÕES-PIRES, A.; FRANCO, E. S.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN, K. ; MAIA, M. B. S. Protective effect of *Chresta martii* extract against indomethacin-induced gastric lesions in mice. **Journal Natural Medicine**, v.67, p.143–151, 2013.
- SILVA, A.A..R ; BEZERRA, M. M. ; CHAVES, H. V. ; PINTO, V. P. T. ; VIEIRA, A.M. ; RIOS, L.C. ; ARAÚJO, E.B. ; FRANCO, E.S. ; RESENDE, A.C.L.; MAIA, M.B.S . Protective effect of *Chresta martii* extract on ethanol-induced gastropathy depends on alpha-2 adrenoceptors pathways but not on nitric oxide, prostaglandins or opioids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 206-212, 2012.
- SILVA, E. J. R.; AGUIAR, F. J. S.; GONÇALVES E. S.; SOUSA I. M. V.; DIMECH, G. S.; FRAGA, M. C. C. A.; COELHO, M. C. O. C.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos Wistar. **Rev. bras. Farmacogn**, .vol. 15 n.2 João Pessoa Apr./June, 2005.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1002 p., 2003.
- SIQUEIRA, JTT; TEIXEIRA, MJ. **Dores orofaciais - diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Artes Médicas, 2012.

SMILENOV, L. B.; MIKHAILOV, A.; PELHAM, R. J.; MARCANTONIO, E. E.; GUNDERSEN, G. G. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. **Science**, v. 286, n. 5442, p. 1172-1174, 1999.

SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M., DEWITT, D.L. Prostaglandin Endoperoxide H Synthase (Cyclooxygenases)-1 and 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, 52, p.33157-33160, 1996.

SMYTHE, H. A. Temporomandibular joint disorder and other medically unexplained symptoms in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and fibromyalgia. **J. Rheumatol.**, v. 32, n; 12, p. 2288-2290, 2005.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG II. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, p. 301-314, 1994.

STADLER, J.; STEFANOVIC-RACIC, M.; BILLIAR, T. R.; CURRAN, R. D.; MCINTYRE, L. A.; GEORGESCU, H. I.; SIMMONS, R. L.; EVANS, C.M. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 11, p. 3915-3920, 1991.

STEDMAN, C.. Herbal hepatotoxicity, **Seminars in Liver Disease**, v. 22, p. 195-206, 2002.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. **Cancer Research**, v. 47, p. 5590-5594, 1987.

TAKEDA, M.; TANIMOTO, T.; IKEDA, M.; MASU, M.; KADOI, J.; YOSHIDA, S.; MATSUMOTO, S. Enhanced excitability of rat trigeminal root ganglion neurons via decrease in A-type potassium currents following temporomandibular joint inflammation. **Neuroscience**, v. 138, n. 2, p. 621-630, 2006.

TAKEUCHI, Y.; ZEREDO, L.; FUJIYAMA, R.; AMAGASA, T.; TODA, K. Effects of experimentally induced inflammation on temporomandibular joint nociception in rats. **Neuroscience Letters**, v. 354, n. 2, p. 172-174, 2004.

TANAKA, E.; DETAMORE, M.S.; TANIMOTO, K.; KAWAI, N. Lubrication of the temporomandibular joint. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n. 1, p. 14-29, 2008.

TENHUNEN, R.; MARVER, H. S.; SCMID, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America**, v. 61, n. 2, p. 748-55, 1969.

TERRY, C. M.; CLIKEMAN, J. A.; HOIDAL, J. R.; CALLAHAN, K. S. Effect of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 α on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 274, p. 883–891, 1998.

TOMA, W.; TRIGO, J.R.; DE PAULA, A.C.B.; BRITO, A.R.M.S. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v 95, p. 345-351, 2004.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 282-306, 2006.

VAL, D.R. **Eficácia e Segurança de *Tephrosia toxicaria* Pers. na Artrite da Articulação Temporomandibular induzida por Zymosan em Ratos: Envolvimento do Óxido Nítrico, Hemeoxigenase-1 e Canais de Potássio ATP-dependentes**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2012.

VANDERLEI, E. S. O.; ARAÚJO, I.W.F.A.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; ELOY, Y. R. G.; RODRIGUES, J. A. G.; SILVA, A. A. R. S.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; MENEZES, D. B. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflammation Research**, v. 60, n. 12, p. 1121-1130, 2011.

VANE JR, BAKHLE YS, BOTTING RM. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 38:97-120, 1998.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? *Quím. Nova* [online]. 2005, v. 28, n. 3, pp. 519-528.

VERDI, L.G., BRIGHENTE, I.M.C., PIZZOLATTI, M.G., Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. **Química Nova**, v.28 (1), p.85-94, 2005.

VICENTE, A. M.; GUILLEN, M. I.; HABIB, A.; ALCARAZ, M. J. Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, p. 1030-1037, 2003.

VICKERS, E. R.; COUSINS, M. J. Neuropathic orofacial pain part 1—prevalence and pathophysiology. **Australian Endodontic Journal**, v 26, n. 1, p. 19-26, 2000.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 9-15, 2000.

WILLIS, D.; MOORE, A. R.; FREDERICK, R.; WILLOUGHBY, D. A. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. **Nature Medicine**, v. 2, p. 87-90, 1996.

WINTERBOURN, C. C.; VISSERS, M. C. M.; KETLE, A. J. Myeloperoxidase. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, p. 53-58, 2000.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION; FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva, 2003. (WHO Technical Report Series, 916).

WHO Traditional Medicine Strategy (2002–2005). Available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1.pdf (acesso fevereiro 2011).

WILLARD VP, KALPAKCI KN, REIMER AJ, ATHANASIOU KA. The regional contribution of glycosaminoglycans to temporomandibular joint disc compressive properties. **J. Biomech. Eng.**, v. 134, n. 1, p. 1-8, 2012.

WOOLF, C. J; MA, Q. Review – Nociceptors - Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v. 55, p. 353-364, 2007.

WUNDER, C.; POTTER, R. F. The Heme Oxygenase System: Its Role in Liver Inflammation. **Current Drug Targets - Cardiovascular & Haematological Disorders**. v. 3, p. 199-208, 2003.

YACHIE, A.; TOMA, T.; MIZUNO, K.; OKAMOTO, H.; SHIMURA, S.; OHTA, K.; KASAHARA, Y.; KOIZUMI, S. Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. **Experimental Biology and Medicine**, v 228, p. 550-556, 2003.

YUASA, H.; KURITA, K. Treatment group on temporomandibular disorders randomized clinical trial of primary treatment for temporomandibular joint disk displacement without reduction and without osseous changes: a combination of NSAIDs and mouth-opening exercise versus no treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 91, n. 6, p. 671-675, 2001.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Eds.; Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna, Ed. Argos: Chapecó, 2001.