



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

JOSÉ LEONALDO MIRANDA AZEVEDO

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA *Stemodia maritima*
Linn. E DO DITERPENO ESTEMODINA EM MODELOS DE
HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

FORTALEZA

2019

JOSÉ LEONALDO MIRANDA AZEVEDO

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA *Stemodia maritima*
Linn. E DO DITERPENO ESTEMODINA EM MODELOS DE
HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Virgínia Cláudia Carneiro Girão

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Hellíada Vasconcelos Chaves

Fortaleza

2019

JOSÉ LEONALDO MIRANDA AZEVEDO

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DA *Stemodia maritima*
Linn. E DO DITERPENO ESTEMODINA EM MODELOS DE
HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA NA ARTICULAÇÃO
TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia celular e tecidual.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Virgínia Cláudia Carneiro Girão(Orientadora)
Universidade Federal do Ceara (UFC)

Prof^a Dr^a.Hellíada Vasconcelos Chaves(Coorientadora)
Universidade Federal do Ceara (UFC)

Prof^a Dr^a Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceara (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À Prof^a Virgínia Girão, por ter aceitado ser a minha orientadora, mesmo sabendo das minhas limitações. Por ter me incentivado a ler artigos, pela ajuda nos procedimentos laboratoriais e extensões do mesmo, pela paciência e, por compartilhar da sua experiência na orientação desse trabalho.

À Prof^a Hellíada Chaves desde a ideia do trabalho à finalização do mesmo. Por ter enfatizado a importância de ler artigos, pela paciência, por ter coordenado os experimentos quando possível, pela disponibilidade de tempo para as sucessivas correções e, pela orientação prestada.

À Prof^a Mirna Bezerra, por ter coordenado os experimentos quando possível, pela paciência, pela disponibilidade de tempo para sanar as diversas dúvidas que surgiram e por suas sugestões.

Ao grupo (Alfredo, Danielle, Felipe e Hermany) que prontamente participou dos experimentos que ocorreram em Sobral, sacrificando os seus finais de semana. Em especial ao Felipe, que ainda auxiliou na realização de algumas análises.

À Josiane e ao Júnior, amigos do NEMPI, e à Nayana, técnica de laboratório (Sobral); pela disponibilidade, auxílio e orientação durante o preparo de soluções, realização da imunohistoquímica, dosagens de citocinas e extensões das mesmas.

Aos amigos do NEMPI: Luciana, Luana, Guilherme e Matheus, por terem me auxiliado em algumas etapas no decorrer da elaboração da minha dissertação. Pelos conselhos e sugestões sempre pontuais e necessários.

À Khetyma, amiga do NEMPI, por ter me auxiliado em muitas etapas no decorrer da elaboração da minha dissertação. Pelos conselhos e sugestões sempre oportunos e pela disponibilidade dedicada a sanar diversos obstáculos.

À técnica de laboratório, Flávia; pela disponibilidade, auxílio e orientação tanto no preparo do material como durante a realização da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

À Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES, pois obtivemos ótimos resultados utilizando suas facilidades e, aos técnicos Kennedy, pelos cortes ultrafinos, e Marcos, pela aquisição das imagens da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

À FUNCAP pelo apoio financeiro necessário para o desenvolvimento desse estudo.

Às minhas amigas e quase irmãs, Karine Leite e Carol Leite, pela disponibilidade, auxílio e orientação durante a seleção para o mestrado. Sem elas, esse sonho não seria possível de ser concretizado.

À minha noiva, Janiquelly de Melo Alves, pelos conselhos e orientações sempre pontuais e extremamente necessários durante a elaboração desse trabalho; pela força, quando às dificuldades me abatiam, e pela compressão quanto a minha ausência, quando em muitos momentos minha presença seria crucial.

Aos meus pais, meus alicerces, minha fonte segura de água potável no deserto, por sempre se fazerem presentes e participativos, seja através do aporte financeiro ou pelas palavras de motivação.

RESUMO

A dor orofacial é descrita como toda dor associada a tecidos moles ou mineralizados da cavidade oral e da face. Engloba um conjunto de condições, dentre elas, a disfunção temporomandibular (DTM). A DTM trata-se de um conjunto de desordens que envolvem os músculos mastigatórios, a articulação temporomandibular (ATM) e estruturas anexas, representando a categoria mais prevalente de dor crônica na região orofacial. Na tentativa de resolução deste quadro algico, há estudos de substâncias com possíveis atividades antinociceptiva e antiinflamatória, como a *Stemodia maritima* Linn (*Sm*) e seu composto isolado estemodina (*Es*). Objetivou-se avaliar o potencial fitoterápico da *Sm* e da *Es*, na hipernocicepção inflamatória aguda na ATM de ratos. Animais foram pré-tratados (v.o.) com *Sm* (0,1; 1 ou 10 µg/kg), *Es* (0,1 ou 1 µg/kg) ou salina 1 h antes da injeção intra-articular de formalina (1,5%/50 µL), Capsaicina (1,5%/20 µL) ou salina na ATM esquerda. O comportamento nociceptivo foi avaliado por 45 min. Avaliou-se a permeabilidade vascular através do extravasamento plasmático do corante Azul de Evans. Para investigar a participação da HO-1 e da via NO, utilizamos os inibidores zinco protoporfirina IX e aminoguanidina respectivamente, 30 min antes da administração de *Sm* ou *Es*. Para estudar a participação dos receptores opioides, ratos foram pré-tratados com injeção intratecal denaloxona e, 15 min depois, foram administrados *Sm* ou *Es*. O gânglio trigeminal foi removido para dosagem de IL-1β por ELISA na hipernocicepção inflamatória na ATM induzida por formalina. A imunohistoquímica foi feita para verificar a expressão do TRPV-1 no gânglio trigeminal de ratos com hipernocicepção inflamatória induzida pela capsaicina. Observou-se que o pré-tratamento com *Sm* e *Es* reduziram ($p < 0,05$): a resposta nociceptiva; o extravasamento plasmático; a expressão de IL-1β, e *Es* reduziu a expressão de TRPV1. Concluiu-se que *Sm* e *Es* atuam como agentes antinociceptivos e antiinflamatórios, e que essa resposta não ocorre por meio das vias da hemoxigenase-1, do óxido nítrico e opioide, mas reduzindo o extravasamento plasmático, com envolvimento da IL-1β e de receptores TRPV-1.

Palavras-chave: Disfunção temporomandibular. Dor. Inflamação. *Stemodia maritima* Linn. Estemodina. Nocicepção.

ABSTRACT

Orofacial pain is described as all pain associated with soft or mineralized tissues of the oral cavity and face. It encompasses a set of conditions, among them, temporomandibular dysfunction (TMD). DTM is a set of disorders involving the masticatory muscles, temporomandibular joint (TMJ) and attached structures, representing the most prevalent category of chronic pain in the orofacial region. In the attempt to solve this pain, there are studies of substances with possible antinociceptive and anti-inflammatory activities, such as *Stemodia maritima* Linn (Sm) and its isolated compound esthemodine (Es). The aim of this study was to evaluate the phytotherapeutic potential of Sm and Es in the acute inflammatory hypernociception in TMJ of rats. Animals were pretreated (vo) with Sm (0.1, 1 and 10 µg / kg), Es (0.1 and 1 µg / kg) or saline 1 h prior to intra-articular formalin injection (1.5 % / 50µL), Capsaicin (1.5% / 20 µL) or saline in the left TMJ. Nociceptive behavior was assessed for 45 min. We evaluated vascular permeability through plasma extravasation of Evans Blue dye. To investigate the participation of HO-1 and NO pathway, we used the zinc inhibitors protoporphyrin IX and aminoguanidine, respectively, 30 min prior to administration of Sm or Es. To study the participation of opioid receptors, rats were pretreated with intrathecal injection of naloxone non-selective opioid inhibitor and 15min. then we administer Sm or Es. The trigeminal ganglion was removed for IL-1β dosing by ELISA in acute inflammatory hypernociception in the ATM induced by formalin. Immunohistochemistry was performed to verify the expression of TRPV-1 in the trigeminal ganglion of rats with acute inflammatory hypernociception induced by capsaicin. It was observed that pretreatment with Sm or Es reduced ($p < 0.05$): the nociceptive response; the plasma extravasation; the expression of IL-1β and TRPV. It is also concluded that Sm and Es act as antinociceptive and anti-inflammatory agents, and that this response does not occur through the hemeoxygenase-1, nitric oxide and opioid pathways, but reduces plasma extravasation, with involvement of IL-1β and probably of TRPV-1 receptors.

Keywords: Temporomandibular dysfunction. Pain.Inflammation.Stemodia maritima Linn. Estemodine. Nociception.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inervação orofacial.....	16
Figura 2 - Monitoramento da dor e das condições teciduais.....	19
Figura 3- Articulação temporomandibular.....	22
Figura 4 - <i>Stemodia maritima</i> Linn.....	34
Figura 5 - Anestesia inalatória.....	38
Figura 6 - Caixa de observação do comportamento.....	39
Figura 7 - Fotomicrografias do gânglio trigeminal de ratos.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito da <i>Sm</i> e <i>Es</i> na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos.....	48
Gráfico 2 –Efeito da <i>Sm</i> e <i>Es</i> sobre a permeabilidade vascular através do extravasamento plasmático do Azul de Evans na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos.....	49
Gráfico 3 - Estudo do envolvimento da HO-1 na atividade antinociceptiva da <i>Sm</i> na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos.....	50
Gráfico 4 - Estudo do envolvimento da HO-1 na atividade antinociceptiva da <i>Es</i> na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos.....	51
Gráfico 5 - Estudo do envolvimento do NO na atividade antinociceptiva da <i>Sm</i> na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos.....	52
Gráfico 6 - Estudo do envolvimento do NO na atividade antinociceptiva da <i>Es</i> na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos.....	53
Gráfico 7 - Estudo do envolvimento da via opioide na atividade antinociceptiva da <i>Sm</i> na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos.....	54
Gráfico 8 - Estudo do envolvimento da via opioide na atividade antinociceptiva da <i>Es</i> na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos.....	56
Gráfico 9 –Estudo da <i>Sm</i> e <i>Es</i> na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por capsaicina na ATM esquerda de ratos.....	57
Gráfico 10 –Dosagem de IL-1 β no gânglio trigeminal de ratos com hipernocicepção inflamatória aguda na ATM induzida por formalina.....	58
Gráfico 11 –Estudo da expressão do TRPV-1 no gângliotrigeminal de ratos com hipernocicepção inflamatória aguda induzida por capsaicina na ATM após pré-tratamento com <i>Sm</i> e <i>Es</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AminoAminoguanidina	
AMPA	Receptor AMPA
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ATM	Articulação temporomandibular
B1	Receptor adrenérgico beta tipo 1
CO2	Dióxido de carbono
COX1	Ciclo-oxigenase 1
COX2	Ciclo-oxigenase 2
DTM	Disfunção temporomandibular
Es	Estemodina
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
Indo	Indomentacina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
MMP	Metaloproteinases
MorfMorfina	
Nal	Naloxona
NMDA	Receptor glutamatérgicos
NO	Óxido nítrico
O2	Oxigênio
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
<i>Sm</i>	<i>Stemodia maritima</i>
SM-1	Diterpeno estemodina
SMFE	Extrato etanólico de folhas frescas da <i>Stemodia maritima</i>

SMFE-LC Extrato etanólico de folhas frescas da *Stemodia maritima* livre de clorofila

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa

TRVP1 Receptor potencial transiente vanilóide tipo 1

ZnPP-IX Zinco protoporfirina IX

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	13
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1.DOROROFACIAL	15
2.2.DOR INFLAMATÓRIA	18
2.3.ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR.....	20
2.4.DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR.....	23
2.5.MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NAS DTMS.....	24
2.5.1.HEMEOXIGENASE.....	24
2.5.2.ÓXIDO NÍTRICO.....	26
2.5.3.CITOCINAS.....	27
2.6.MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA HIPERNOCIEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	28
2.6.1.MODELO DE DOR INDUZIDA POR FORMALINA.....	28
2.6.2.MODELO DE DOR INDUZIDA POR CAPSAICINA.....	29
2.7.PLANTAS MEDICINAIS.....	31
2.7.1.FAMÍLIA PLANTAGINACEAE.....	32
2.7.1.1.GÊNERO STEMODIA.....	32
3.OBJETIVOS.....	35
3.1.OBJETIVOS GERAIS.....	35
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1.ANIMAIS.....	36
4.2.MATERIAL VEGETAL.....	36
4.3.DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
4.3.1.INJEÇÕES INTRA-ARTICULARES.....	38
4.3.2.TESTE COMPORTAMENTAL PARA AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS.....	38
4.4.AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS.....	40

4.4.1. ANÁLISE DA PERMEABILIDADE VASCULAR POR EXTRAVASAMENTO DE AZUL DE EVANS.....	40
4.4.2. DOSAGEM DE IL-1 β NO GÂNGLIO TRIGEMINAL DE RATOS COM HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR FORMALINA.....	41
4.5. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA HEMEOXIGENASE-1 (HO-1) NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA <i>STEMODIA MARITIMA</i> OU ESTEMODINA NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	42
4.6. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO NO NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA <i>STEMODIA MARITIMA</i> OU ESTEMODINA NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS.....	43
4.7. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA OPIOIDE NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA <i>STEMODIA MARITIMA</i> OU ESTEMODINA NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS.....	44
4.8. ESTUDO DA <i>STEMODIA MARITIMA</i> OU ESTEMODINA NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA PELA CAPSAICINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS.....	45
4.9. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECTAR A EXPRESSÃO DE TRPV-1 NO GÂNGLIO TRIGEMINAL DE RATOS COM HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR CAPSAICINA NA ATM.....	46
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1. EFEITO DA <i>S_{me} Es</i> NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	48
5.2. EFEITO DA <i>S_m</i> e <i>Es</i> SOBRE A PERMEABILIDADE VASCULAR ATRAVÉS DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO DO AZUL DE EVANS NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	49
5.3. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA HEMEOXIGENASE-1 NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA <i>S_m</i> NA HIPERNOCICEPÇÃO	

INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	50
5.4.ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA HEMEOXIGENASSE-1 NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA <i>Es</i> NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	51
5.5.ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO NO NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA <i>Sm</i> NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS.....	52
5.6.ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO NO NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA <i>Es</i> NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS.....	53
5.7.ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA OPIOIDE NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA <i>Sm</i> NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS.....	54
5.8.ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA OPIOIDE NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA <i>Es</i> NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS.....	55
5.9.ESTUDO DA <i>SmE Es</i> NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA PELA CAPSAICINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS.....	56
5.10.ESTUDO DA <i>SmE Es</i> SOBRE A DOSAGEM DA IL-1B NO GÂNGLIO TRIGEMINAL DE RATOS NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA NA ATM INDUZIDA POR FORMALINA.....	57
5.11.ESTUDO DA EXPRESSÃO DO TRPV-1 NO GÂNGLIO TRIGEMINAL DE RATOS COM HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR CAPSAICINA NA ATM APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM <i>Sm</i> E <i>Es</i>	58
6.DISSCUSSÃO.....	61
7.CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

A dor orofacial é descrita como toda dor associada a tecidos moles ou mineralizados da cavidade oral e da face, segundo a Sociedade Brasileira de Cefaleia (SBC, 2010). A mesma engloba um conjunto de condições, dentre elas, a disfunção temporomandibular (MAGNUSSON et al., 2000).

Segundo a Academia Americana de Dor Orofacial, a disfunção temporomandibular (DTM) é um conjunto de desordens que envolvem os músculos mastigatórios, a articulação temporomandibular (ATM) e estruturas associadas (GREENE, 2010; GIRO et al., 2018). Apresenta sinais e sintomas amplos e diversos, que podem incluir: dificuldade ao mastigar, falar e outras funções orofaciais, estando frequentemente associados com dor persistente (GÓES et al., 2018). As formas crônicas das DTM são extremamente incapacitantes, podendo acarretar afastamento ou incapacidade na realização de atividades diárias dos indivíduos acometidos, resultando em uma redução na qualidade de vida dos mesmos (FERREIRA; SILVA; FELÍCIO, 2016).

Em adultos jovens, a taxa de prevalência de sinais e sintomas variou de 41,5 a 68% (GONÇALVES et al., 2010). Tal comorbidade é mais comum em indivíduos do gênero feminino, podendo apresentar uma prevalência aproximadamente de até nove vezes maior para este gênero (FEHRENBACH; SILVA; BRONDANI, 2018). Estudos mostram que a composição da ATM em mulheres é geralmente mais flexível, menos densa e suportam uma menor pressão funcional no ligamento posterior da ATM. Esta característica parece estar associada a uma maior quantidade de colágeno tipo III nessa articulação (FEHRENBACH; SILVA; BRONDANI, 2018).

Há estudos que mostram que a DTM é a maior causa de dor não dental na região orofacial, resultando num custo estimado de U\$ 4 bilhões de dólares anualmente, explicitando assim a necessidade de pesquisas na área, visando a exploração da fisiopatologia e de novas opções de tratamento (BORTOLLETO et al., 2013; VELLY et al., 2013; GUI, RIZZATTI-BARBOSA; 2015).

Embora muitos aspectos da fisiopatologia da DTM ainda não estejam bem esclarecidos, sabe-se que, durante o processo inflamatório, há

mediadores que são responsáveis pelo desencadeamento da cascata inflamatória. Dentre eles podemos citar: interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1), prostaglandinas (PG), óxido nítrico (NO), metaloproteinases (MMP) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (LOPES, 2011; POLUHA; GROSSMANN,2018; ASAKAWA-TANNE et al, 2015; GÜVE et al., 2015).

Ademais, sabe-se que a dor na ATM é mediada por mecanismos periféricos e centrais do sistema nervoso trigeminal (PARK, 2015; SESSLE, 2009). Dentre estes mecanismos, alguns mediadores estão envolvidos, como: citocinas; neuropeptídeos; cininas; prostaglandinas; receptores (TRVP1, AMPA, NMDA, B1); células (células da glia, neurônios, macrófagos, neutrófilos) e redes neurais (córtex, complexo ventroposterior, ventrolateral e ventrobasal)(OKAMOTO et al.,2013; PARK, C.K, 2015; WANG, S. et al, 2012; RAMONDA, R. et al, 2015).

Neste contexto, há estudos que descrevem que a estratégia terapêutica para DTM, geralmente, é o tratamento conservador, reversível e não invasivo. Entretanto, observa-se que não há nenhuma intervenção resolutiva para este quadro, limitando-se, apenas, ao alívio dos sinais e sintomas desta doença (UEMOTO et al., 2012).

Vale destacar que o potencial fitoterápico de algumas plantas tem surgido como uma importante estratégia de tratamento de condições inflamatórias e dolorosas. De fato, há estudos que abordam a ação antinociceptiva e antiinflamatória de diferentes produtos naturais (BARRETO et al.,2016).

A *Stemodia maritima* Linn (*Sm*) vem se destacando pelo seu potencial fitoterápico. A *Sm* é um arbusto perene que cresce amplamente na Região Nordeste do Brasil, próximo à costa marítima, onde é conhecida como “mastruz-bravo” ou “melosa”. Possui propriedades antiinflamatórias; diminuindo os níveis de TNF- α , CINC-1, de estresse oxidativo e a transcrição dos genes TNF- α , IL1- β , RANK e iNOS no modelo de periodontite (TEIXEIRA et al.,2017), um dos membros do nosso grupo de estudo. Em estudos *in vitro*, observou-se tal ação por meio da inibição das enzimas COX₁ e COX₂ (RUSSELL et al.,2011). Já Silva (2013), em um estudo químico das folhas da *Sm* e do composto isolado da mesma, o diterpeno estemodina (*Es*), observou moderada ação bactericida de ambas.

Tendo em vista as propriedades antiinflamatórias da *Stemodia maritima*Linn, a escassez de trabalhos com este fitoterápico com potencial antiflogístico e a não padronização de um protocolo de tratamento eficaz para as DTMs, torna interessante conduzir estudos que investiguem a ação antiflogística da *Sme* do composto isolado da mesma, a estemodina, nos modelos de indução da dor inflamatória aguda na ATM.

2. REVISÃO DE LITERATURA

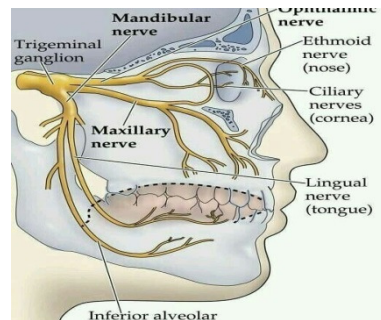
2.1. DOR OROFACIAL

A dor orofacial é descrita como dor envolvendo estruturas orofaciais como pele, vasos sanguíneos, ossos, dentes, periodonto, articulações, glândulas, estruturas nervosas, músculos, córnea, seios da face e mucosa nasal (SBC, 2010). Envolve um conjunto de condições como disfunção temporomandibular (DTM), cefaleias, neuropatias, dores odontogênicas e advindas da mucosa oral (MAGNUSSON et al., 2000).

A dor orofacial pode ser dividida, por suas características, em três categorias: dor somática, dor neurogênica e dor psicogênica. A dor somática resulta da estimulação de estruturas neurais que inervam os tecidos da face. A dor neurogênica é produzida dentro do próprio sistema nervoso e é causada pela anormalidade das estruturas neurais que inervam os tecidos da face. A dor psicogênica não resulta de estimulação nociva, nem de anormalidade neural, mas de causas psíquicas (SPIERINGS; MULDER et al., 2017).

Sabe-se que a região da face é predominantemente inervada pelos nervos trigêmeos, V par de nervocraniano, que é responsável pela condução da maior parte das informações somestésicas da face, cavidade oral, além da inervação motora dos músculos mastigatórios (WAITE, 2004). Ele está dividido em três ramos: oftálmico, maxilar e mandibular (Figura 1).

Figura 1 – Inervação orofacial



Fonte: anatomiaonline.com

A fisiologia da dor orofacial trata do funcionamento somestésico do sistema nervoso com enfoque em cabeça, pescoço e cavidade oral (SESSLE, 2009). Os nociceptores são terminações nervosas livres responsáveis pela transmissão da sensibilidade dolorosa e estão acoplados em fibras A-delta (mielinizadas e de condução rápida) e em fibras C (amielinizadas e de condução lenta) (SILVA et al., 2013).

Após a percepção de estímulo nociceptivo pelos nociceptores, essa informação é direcionada ao SNC através das fibras aferentes primárias, que apresentam os corpos celulares das fibras trigeminais sensitivas em um gânglio, localizado em uma depressão na base do crânio, ventralmente à ponte, denominado gânglio trigeminal. Esses neurônios primários fazem sinapse com neurônio de 2ª ordem no complexo trigeminal (SESSLE, 2009)

O complexo trigeminal é composto por quatro núcleos: núcleo sensitivo principal, núcleo mesencefálico e núcleo do trato espinal do trigêmeo que são responsáveis pelo processamento de informações somestésicas e proprioceptivas; enquanto o núcleo motor do trigêmeo é responsável pela inervação motora da musculatura mastigatória, além do músculo tensor do veu palatino e alguns músculos supra-hioideos (WAITE, 2004).

O núcleo sensitivo principal do trigêmeo recebe projeções de mecanorreceptores da face e cavidade oral. Essas projeções conduzem informações tácteis epicríticas da face ao núcleo principal ipsilateral, dando origem também a uma ramificação descendente que alcança o núcleo do trato espinal do trigêmeo ipsilateral, mas com uma projeção para o núcleo do trato espinal trigeminal contralateral (WAITE, 2004; SESSLE, 2003).

O núcleo do trato espinal trigeminal é dividido em três subnúcleos, a saber: oral, interpolar e caudal. Estudo anterior já evidenciou que o subnúcleo caudal é o correspondente ao corno dorsal da medula espinal na condução da sensibilidade térmica e dolorosa da região orofacial (SESSLE, 2009). O subnúcleo caudal recebe ainda projeções de outros nervos cranianos (facial, glossofaríngeo e vago) também responsáveis pela inervação da face, nervos cervicais superiores e das fibras corticais (SI, SII, córtex frontal e parietal). A divisão caudal deste núcleo apresenta uma divisão laminar similar do corno dorsal da medula espinal. Os aferentes primários que terminam nas lâminas III e IV e em regiões mais rostrais deste núcleo fazem sinapse com neurônios de 2ª ordem denominados mecanorreceptivos de limiar baixo; já os aferentes primários nociceptivos terminam principalmente nas lâminas I, II e V, onde estão concentrados os neurônios de 2ª ordem denominados de amplitude dinâmica ampla e neurônios nociceptivos específicos (WAITE, 2004; SESSLE, 2003).

Estudos anatômicos indicam que axônios que inervam a região facial próximo à linha média (região perioral) fazem sinapses rostralmente no núcleo caudal do trigêmeo, enquanto axônios que inervam regiões posteriores fazem sinapses primárias consecutivamente nas partes mais caudais deste núcleo (WAITE, 2004). Portanto, as áreas de referência de dor se distribuiriam de acordo com o arranjo das fibras aferentes no núcleo espinal do trigêmeo, porção caudal, e não de acordo com a inervação dos diferentes ramos trigeminais. Clinicamente, observa-se superposição destas áreas (FALACE et al., 1996; WAITE, 2004; SESSLE, 2003).

Dos núcleos trigeminais, parte da informação sensorial alcança o tálamo por meio lemnisco trigeminal, projetando-se ao núcleo ventro-pósteromedial e núcleos talâmicos posteriores. As projeções talâmicas são retransmitidas ao córtex somatossensorial e estão envolvidas nas respostas perceptivas, cognitivas e emocionais dos estímulos orofaciais (KANDEL et al., 2000, SESSLE, 2003). Porém, há projeções para outras regiões, como cerebelo, substância cinzenta periarquedutal, formação reticular do tronco cerebral, subnúcleo oral, onde parte da informação será retransmitida para centros cerebrais superiores, e a outra parte participará da modulação da transmissão somatossensorial (SESSLE, 2003).

Através de vias nervosas inibitórias descendentes, a dor é modulada no sistema nervoso central com o aumento da neurotransmissão de noradrenalina, serotonina e opioides endógenos (endorfinas, encefalinas e dinorfinas) (SESSLE, 2009).

2.2.DOR INFLAMATÓRIA

A dor é um dos cinco sinais cardinais do processo inflamatório, decorrente de estímulos térmicos, mecânicos e/ou biológicos. Conseqüentemente, a lesão tecidual geralmente ocorre associada ao acúmulo de mediadores endógenos liberados de neurônios aferentes, caracterizando a inflamação neurogênica, ou de células não-neuronais que residem ou, principalmente, que infiltram a área lesionada, como macrófagos e neutrófilos (WOOLF; SALTER, 2000).

A sensibilização periférica é comumente resultante de alterações associadas ao processo inflamatório, como mudança no padrão de mediadores químicos que podem atuar na fibra nervosa (WOOLF; SALTER, 2000).

O processo inflamatório inicia-se com os eventos vasculares, como: vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, mediados por aminas vasoativas (histamina e serotonina); óxido nítrico (NO); bem como bradicinina e o fator de ativação de plaquetas (PAF), liberados por mastócitos e monócitos. Ainda, o aumento na permeabilidade vascular é promovido por uma diversidade de proteínas do sistema complemento (C3a e C5a), substância P, entre outros (VIVIER; MALISSEN, 2005).

Na fase seguinte, que inclui os eventos celulares, a migração leucocitária acontece após a ativação do endotélio. Diversas selectinas e integrinas promovem a adesão e as quimiocinas promovem a migração de neutrófilos, macrófagos, monócitos, células dendríticas e células natural killer (NK) para o sítio inflamatório (SPRINGER, 1994; BENNOUNA et al., 2003; KUMAR; SHARMA, 2010).

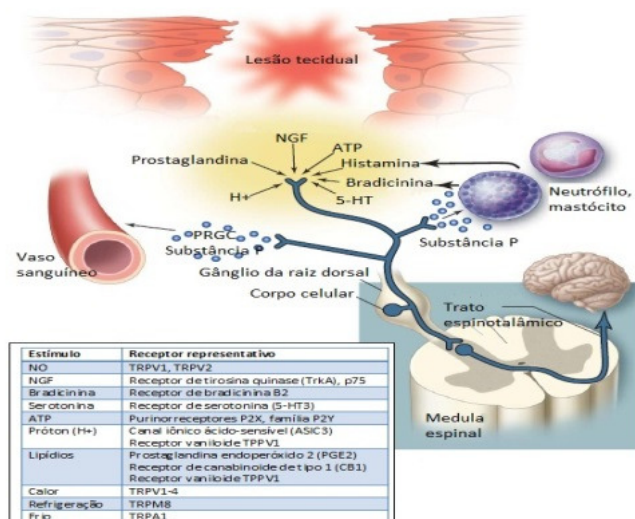
Concomitantemente, derivados do ácido araquidônico, mediadores lipídicos, são produzidos pela atividade das fosfolipases que clivam fosfolipídios constituintes da membrana celular; gerando prostaglandinas, leucotrienos e fator de ativação plaquetária (PAF). As prostaglandinas

produzidas têm funções inflamatórias capazes de induzir febre, hiperalgesia e vasodilatação (MESQUITA JR et al., 2008).

Moncada e colaboradores (1978) sugeriram que a dor inflamatória resulta da ação concomitante de dois tipos de estímulos nos neurônios nociceptores. O 1º estímulo ativaria diretamente o influxo de Na^+ , e isso seria responsável pela ativação dos nociceptores. Bradicinina, histamina, estimulações mecânica e térmica atuariam diretamente nos nociceptores causando a hiperalgesia, resultando então na redução do limiar de excitabilidade devido à modulação de canais de sódio voltagem-dependentes (KHASAR et al., 1999; VERRI et al., 2006).

Essa hiperalgesia ocorre devido à liberação de mediadores químicos por vários tipos celulares residentes, bem como de células migratórias recrutadas para o local da lesão tecidual (WOOLF; QIU FU, 2007; LOESER; TREEDE 2008). O 2º estímulo não geraria a atividade do nociceptor, mas facilitaria sua ativação, sendo, provavelmente, associado com um aumento das concentrações do AMPc/ Ca^{++} , como visto na figura 2 (LORENZETTI; FERREIRA, 1985).

Figura 2 - Monitoramento dos transdutores da dor e influência das condições teciduais



Fonte: Oaklander, 2011.

Tanto a liberação de mediadores primários quanto a síntese de novos mediadores são responsáveis pela ativação e/ou sensibilização de

nociceptores adjacentes à lesão. A sensibilização dos nociceptores diminui o limiar de ativação de fibras nervosas, aumentando a probabilidade de que estas disparem em resposta a estímulos de menor intensidade (COUTAUX et al., 2005; ABRAHAMSEN *et al.*, 2008). Citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α parecem apresentar papel importante na dor inflamatória aguda, como ocorre nas DTMS (RITTNER; MACHELSKA; STEIN, 2005; BASBAUM et al, 2009;GROSSMANN,2018).

Embora ainda exista discussão das evidências de uma ação direta dessas citocinas sobre os nociceptores, a contribuição delas para hipersensibilidade primária à dor parece resultar principalmente da potencialização da resposta inflamatória e aumento da produção de agentes pro-algésicos (como as prostaglandinas, o fator de crescimento neuronal, a bradicinina e prótons extracelulares).

Há ainda estudos recentes que apontam para a participação de receptores na fisiopatologia da dor inflamatória aguda na ATM (ICHIKAWA et al., 2004; WU et al.,2015). Sabe-se que a ativação de receptores TRPV1, por exemplo, é importante para sensibilização de nociceptores durante a inflamação, sendo eles responsáveis também por sintomas como alodínia e hiperalgesia (BASBAUM et al, 2009;RAMONDA, R. et al, 2015). Portanto, o uso de antagonistas dos receptores TRPV1,parece ser eficiente na diminuição da nocicepção em modelos animais relacionados a diversos tipos de estímulos dolorosos como a inflamação, a osteoartrite, e a neuropatia (GAVVA et al, 2004; RAMI et al., 2006). Os antagonistas com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica apresentaram melhor perfil anti-nociceptivo quando comparado aos análogos que agem apenas periféricamente, assim a expressão do TRPV1 em estrutura supra–espinhal parece ser importante neste efeito (CUI et al, 2006).

2.3. ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

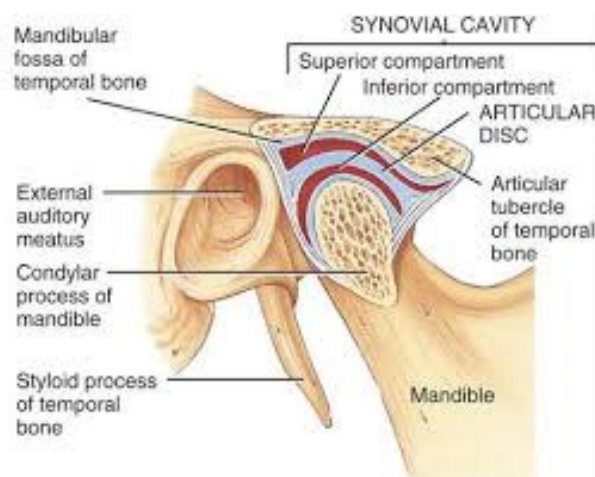
As articulações temporomandibulares (ATM) são uma das mais complexas articulações do corpo e se diferenciam das demais por funcionarem concomitantemente; apresentarem tecido conjuntivo denso fibroso ao invés de

cartilagem hialina; possuírem um ponto rígido ao final do movimento, os dentes, e por apresentarem um metabolismo diferenciado. Trabalha em conjunto com os músculos mastigatórios exercendo suas funções do sistema mastigatório (OKESON, 2013).

A ATM localiza-se anteriormente ao ouvido e é composta pelo côndilo mandibular, articulando na fossa mandibular do temporal; o disco articular, que se mantém posicionado por intermédio dos ligamentos intra-articulares (medial, lateral, anterior e posterior), contínuos com sua porção periférica e, inseridos basicamente no colo do côndilo da mandíbula e cápsula articular, localizando-se assim entre as estruturas ósseas com função de amortecer e estabilizar os côndilos; cápsula articular, limitando os movimentos excursivos mandibulares; cartilagem articular, composta por tecido conjuntivo denso fibroso, cuja matriz extracelular é composta por grande quantidade de proteoglicanas, glicoproteínas e fibrilas de colágeno do tipo II, produtos da intensa atividade dos condrócitos dessa região, e membrana sinovial (FERREIRA et al., 2014)

Os ligamentos intra-articulares são constituídos por tecido conjuntivo moderadamente denso, entremeado por áreas de tecido adiposo e conjuntivo frouxo, muito innervado e vascularizado, a saber os ligamentos discais laterais e mediais. Os ligamento extra-articulares, como o ligamento temporomandibular, é responsável pela limitação dos movimentos articulares, de modo a promover a integridade estrutural da articulação. Esse ligamento limita, simultaneamente, o deslocamento lateral de uma articulação e o deslocamento medial da outra, além de prevenir o deslocamento inferior e posterior de ambas as articulações. Os outros dois ligamentos extra-articulares, o esfenomandibular e o estilomandibular, não exercem nenhum papel funcional na ATM, apesar de limitarem movimento mandibular (Figura 3) (DE FREITAS et al., 2017).

Figura 3 - Articulação temporomandibular



Fonte: edisciplinas.usp.br

Outro importante componente, a membrana sinovial, constituída de cerca de 3 camadas de células, merece uma atenção especial, pois é a responsável pela produção do líquido sinovial, que preenche as cavidades articulares, desempenhando funções que colaboram com a manutenção da homeostase articular, além de ser responsável pelo transporte dos gases O_2 e CO_2 , de nutrientes e restos de metabolismo celular (GARCIA; OLIVEIRA,2017).

O líquido sinovial é constituído pelo líquido intersticial, proveniente dos capilares fenestrados da camada subíntima, que, ao se difundir pela camada íntima, em direção à cavidade articular, é adicionado de proteoglicanas, glicoproteínas e glicosaminoglicanas, produtos da intensa atividade secretora das células B (sinoviócitos tipo B ou Fibroblastos-símile), que conferem uma alta viscosidade ao líquido sinovial. Enquanto as células B desempenham um papel fundamental durante a biossíntese do líquido sinovial, as células A (sinoviócitos tipo A ou Macrófagos-símile) participam de sua degradação, uma vez que esse líquido é constantemente renovado (OKESON, 2013).

As células Os sinoviócitos tipo A exercem intensa atividade de pinocitose e digestão intracelular do líquido sinovial. A água e moléculas de baixo peso molecular que compõem esse líquido, após sua passagem pela camada íntima, retornam à circulação através dos vasos linfáticos e da porção venosa dos capilares sanguíneos presentes na camada subíntima. O líquido sinovial mantém as superfícies articulares em ambiente lubrificado, que, além de

impedir a adesão e o desgaste dos componentes internos da articulação, aumenta a eficiência dos movimentos articulares e colabora com a nutrição das estruturas avasculares (MIKAMI et al.,2014).

2.4. DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

As disfunções temporomandibulares (DTM) são a maior causa de dor não dental na região orofacial (MAGNUSSON et al., 2000) e englobam um grupo de condições musculoesqueléticas e neuromusculares envolvendo as ATMs, os músculos mastigatórios e todos os tecidos associados (GREENE, 2010; FERREIRA et al.,2014). Trabalhos têm relatado que a dor é a sintomatologia mais importante, seguido por limitação de movimentos mandibulares, que podem causar dificuldade em se alimentar ou falar, além de cefaleia secundária, dor cervical, sintomas otológicos como zumbido, otalgia e distúrbios do sono (CIANCAGLINI; RADAELLI, 2001; YATANI et al., 2002; CHISNOIU et al., 2015).

Esses sinais e sintomas estão frequentemente associadas com dor aguda ou persistente. As formas crônicas das DTMs são extremamente incapacitantes, podendo acarretar afastamento ou incapacidade nas atividades laborais e /ou sociais, resultando em diminuição da qualidade de vida dos seus pacientes e implicando ainda no aumento dos gastos financeiros para os serviços de saúde (GREENE, 2010).

Esse distúrbio é mais prevalente em pessoas com idade entre 20 a 40 anos, e aproximadamente 33% da população mundial tem pelo menos um sintoma de DTM, sendo que 3,6 a 7,0% da população apresentam gravidade suficiente para procurar tratamento (OUANOUNOU; GOLDBERG; HAAS, 2017).

A etiologia e patogênese desta condição são multifatoriais como: traumatismos, hábitos parafuncionais e ocupacionais, alterações do sono, condições genéticas, doenças sistêmicas, atividades posturais inadequadas e hábevidências que sugerem que a ansiedade, o estresse e outros distúrbios emocionais também atuam como fatores etiológicos ou exacerbam a DTM (OUANOUNOU; GOLDBERG; HAAS, 2017).

As possibilidades de tratamentos consistem em orientações de autocuidado, fisioterapia (laserterapia de baixa intensidade, exercícios musculares e terapias manuais), além de acupuntura, intervenções psicológicas, terapia farmacológica (AINES, opioides, anestésicos e antidepressivos) e procedimentos cirúrgicos (REID, 2013; AHRARI et al., 2014; PORPORATTI et al., 2015; SILVA et al., 2012; SCHMIDT; FERREIRA; WAGNER, 2015). Apesar de o curso extremamente incapacitante das DTMs, nenhuma das intervenções terapêuticas disponíveis na atualidade é curativa (CAIRNS, 2010; PESSOA et al., 2014).

Sabe-se que, pelo menos em parte, as condições dolorosas da ATM resultam de processos inflamatórios (KOPP, 2001). A inflamação da ATM é resultado da liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, em particular do fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) e as interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, e IL-17, que contribuem para uma remodelação articular assim como uma degradação da cartilagem (VERNAL et al., 2008; ASAKAWA-TANNE, Y. et al, 2015; GÜVEN, O et al., 2015).

A liberação destas citocinas facilitam a liberação de prostanoídes e aminas simpatomiméticas que promovem a sensibilização de nociceptores periféricos desta região (RAJA et al., 1988; ALSTERGEM; KOPP, 2000; NORDAHL et al., 2000; KOPP, 2001; OLIVEIRA et al., 2005; DAMLAR; ESEN; TATLI, 2015) e de neurônios nociceptivos centrais do complexo sensorial núcleo trigeminal do tronco encefálico (IWATA et al, 1999; SESSLE, 2000; DUBNER; REN, 2004; DO NASCIMENTO; LEITE-PANISSI, 2014).

2.5. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NAS DTMs

2.5.1. HEMEOXIGENASE (HO)

Os sistemas biológicos dispõem de vias que modulam a resposta inflamatória, ativando sistemas de defesa, promovendo um feedback negativo na ativação celular e geração de mediadores inflamatórios. Neste sentido, as vias da hemeoxigenase (HO) e do óxido nítrico mostram sua relevância, assim como a via opioide (DUARTE et al., 2018; MUÑOZ-SÁNCHEZ; CHÁNEZ-CÁRDENAS, 2014). A heme oxigenase ou hemoxigenase (HO) é

uma enzima que catalisa a degradação do grupamento heme, resultando em biliverdina, ferro ferroso e monóxido de carbono. Há três isoformas da HO (HO-1, HO-2 e HO-3) e a ativação da HO-1, a forma induzida da HO, resultam em redução do dano oxidativo e apoptose, reduzindo eventos inflamatórios como edema, migração celular e produção de citocinas pró-inflamatórias (MCCOUBREY et al., 1997; ALCARAZ et al., 2003; TOMCZYK et al., 2018). HO-2 e HO-3 são as formas constitutivas expressas na maioria dos tecidos (MCCOUBREY et al., 1997). Com base nestas observações, foi sugerido que a indução da HO-1 representa, pelo menos em parte, um mecanismo de defesa. Por outro lado, a inibição da HO-1 pelo Zinco protoporfirina-IX (ZnPP-IX), um inibidor específico de HO-1, aumenta a expressão das moléculas de adesão e a liberação de mediadores pró-inflamatórios (HUALIN et al., 2012), sugerindo um possível efeito anti-inflamatório por meio da ativação da via HO-1.

Foi observado que, na ativação da via HO-1, há redução na ATM do edema articular, degradação da cartilagem e tecidos inflamados, além de reduzir níveis de IL-1 β , IL-6, TNF α , secreção de PGE2 e a atividade enzimática de metaloproteinases-9 (FREITAS et al., 2016; VAAMONDE et al., 2017). Tais alterações foram observadas pelo nosso grupo, ao estudarmos o envolvimento do óxido nítrico e dos neutrófilos no modelo de hipernocicepção inflamatória da ATM com zymosan (CHAVES et al., 2011).

No modelo experimental de indução da hipernocicepção inflamatória da ATM com zymosan, Alves et al. (2017) descreveram a ação anti-inflamatória do ranelato de estrôncio, aumentando o limiar nociceptivo, reduzindo os níveis de TNF- α , no gânglio trigeminal de ratos.

Ademais, Chaves et al. (2018), estudando a via heme oxigenase-1 / biliverdina / monóxido de carbono, no modelo de hipernocicepção inflamatória da ATM com zymosan, observou haver uma resposta anti-inflamatória dependente da ativação da via da HO-1 / cGMP / PKG / K⁺_{ATP}.

Coura e seus colaboradores (2017) investigaram a ação antinociceptiva de uma fração polissulfatada da alga *Gracilaria* (Gc-FI) sobre a hipernocicepção da ATM induzida por formalina. Mostraram que seu efeito antinociceptivo se dava por meio da ligação deste composto com os receptores μ / δ / κ -opioides e pela ativação da via do canal NO / cGMP / PKG / K⁺_{ATP}, além da ativação da via da HO-1.

2.5.2. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O óxido nítrico (NO) é molécula cuja meia-vida é de 2 a 30 s, e que apresenta um elétron desemparelhado o tornando altamente reativo (CHAVES et al., 2011). É produzido por osteoblastos, osteoclastos, sinoviócitos, condrócitos e por células inflamatórias de forma constitutiva ou induzida por mediadores como IL-1 e TNF- α . Níveis elevados de NO foram observados no líquido sinovial de pacientes com DTM, dor articular e osteoartrite (TAKAHASHI et al., 1999). Nesses mesmos eventos foram observados a expressão de NOS_i, enquanto não se expressou ou pouco se expressou em tecidos normais (TAKAHASHI et al., 2003). Nagai et al. (2003) sugerem que a apoptose decorrente do estresse oxidativo, cujo NO atua como modulador, pode estar envolvida na fisiopatologia dos processos inflamatórios e degenerativos da ATM.

O NO induz eventos pró-inflamatórios e está presente nos diversos níveis de percepção da dor (periférico e cerebral), sensibilizando nociceptores por induzirem a liberação de PGE, inibindo a produção de substâncias endógenas antinociceptivas, porém, devido ao seu efeito dual, atua na redução da resposta nociceptiva pela via L-arginina/NO/GMPc/proteína G quinase/canais de potássio sensíveis ao ATP (SACHS et al., 2004; COURA et al., 2017).

Isto pode ser visto nos estudos como o de Lamana et al. (2017) no modelo de hipernocicepção inflamatória da ATM com formalina, que estudou o mecanismo de ação da droga tramadol, descrevendo sua ação antinociceptiva por meio da ativação intracelular NO/GMPc, em parte, independente do sistema opioide.

Corroborando com isto, os estudos realizados por Magalhães et al. (2018) descreveram que quando administrado o fitoterápico *Mimosa tenuiflora*, havia ação anticonceptiva por meio da ativação NO/GMPc/proteína G quinase/canais de potássio sensíveis ao ATP, sendo comprovado por meio do uso de um inibidor seletivo da NOS, L-NAME.

Assim, pode-se observar que o NO pode desempenhar um papel nociceptivo na dor inflamatória na região orofacial. Por meio de alguns estudos que têm indicado uma correlação entre a produção e a geração e/ou manutenção da dor crônica, incluindo distúrbios da articulação temporomandibular. Conforme alguns autores supracitados, pode-se observar que quando havia administração de um inibidor da NOS, havia uma redução significativamente na hiperalgesia em dor orofacial induzida tanto por formalina como por zymosan (FAN et al., 2012; MAGALHAES et al.,2018; LAMANA et al.,2017).

2.5.3. CITOCINAS

As citocinas são glicoproteínas extracelulares e hidrossolúveis, produzidas por diversos tipos de células no local da lesão, atuando especialmente por mecanismos parácrino e autócrino. Diversos tipos de células podem secretar a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células. As citocinas podem ser redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas.

São citocinas pró-inflamatórias (IL: 1, 2, 6, 7, 8 e TNF) e anti-inflamatórias (IL: 4, 10 e 13) e sua principal função na homeostase é ativar mecanismos da resposta inflamatória e modular a reparação de tecidos afetados; além de agir como mediadores na fisiopatologia de doenças infecciosas, inflamatórias e em respostas imunes, associadas à destruição tecidual (ALSTERGREN, 2000; OLIVEIRA et al., 2011).

É difícil determinar se o bloqueio da nocicepção contribui para a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias ou se a redução na produção de citocinas pró-inflamatórias resulta na amenização da dor (SHAVIT, Y.; FRIDEL, K.; BEILIN, B.; 2006). Tradicionalmente, em um ambiente pós-trauma, consideravam a migração de leucócitos associados à inflamação como responsáveis por secretar mediadores químicos que causavam a dor. Atualmente, acredita-se que as interleucinas que atuam no processo nóxico podem ter origem em células imunológicas, neuronais e gliais, desencadeando eventual hiperexcitabilidade crônica e alterações na expressão dos nociceptores com exacerbação da dor. Tais efeitos podem ser causados pelas

citocinas ou por mediadores formados sob seu controle (WATKINS, L.R., MAIER, S.F., 2011).

A interleucina-1 (IL-1), abordada em nosso estudo de forma enfática, é produzida por macrófagos; monócitos; células não imunológicas, como fibroblastos, e células endoteliais ativadas durante lesão celular, infecção e/ou inflamação. Há dois tipos, IL-1 α e IL-1 β , e atuam sobre os mesmos receptores, IL-1RI e IL-1RII (XU et al.,2016). Há estudos que evidenciam IL-1 β está expressa em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal (NEVES, 2018;ZHANG et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2011; ZHANG, 2007) e induz inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase-2, com a formação de PGE2 no hipotálamo anterior (ROSS; TELI; HARRISON,2016).

No estudo realizado por Lora et al. (2017), por meio da indução da hipernocicepção da ATM induzida por albumina, mostrou que quando administrado Toxina botulínica do tipo A, houve redução significativa na liberação dos neurotransmissores; Substância P, de peptídeos relacionados com o gene da calcitonina (CGRP) e a citocina pró-inflamatória IL-1 β .

2.6. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA HIPERNOCIEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DE RATOS ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.

Há uma diversidade de modelos que permitem estudar a hipernocicepção através de parâmetros como respostas nociceptivas, aspectos histológicos, dosagens bioquímicas ou expressão imunohistoquímica possíveis de serem encontrados no quadro de DTM. Dentre estes modelos, podemos citar: o de indução por formalina e capsaicina (CHICRE-ALCÂNTARA et al.,2012;OKAMOTO et al.,2015; WU et al.,2015).

2.6.1. MODELO DE DOR INDUZIDA POR FORMALINA.

Clavelou *et al.*, em 1994, estudando os efeitos de diferentes concentrações de formalina (0,2%, 0,5%, 1,5%, 2,5%, 5% e 10%) na resposta nociceptiva orofacial (fricção facial) e nas características histológicas da pele, concluíram que o aumento da concentração da formalina administrada

intrarticularmente na ATM de ratos causou um aumento da inflamação tecidual observado através dos sinais histológicos da lesão.

Este protocolo de estudo foi desenvolvido pioneiramente por Roveroni *et al.* (2001), que consiste na injeção de formalina a 1,5% (formaldeído 37% diluído em solução salina), sendo analisados parâmetros de nocicepção e inflamação tecidual. Observando este modelo, os pesquisadores denotaram que apenas para concentrações iguais e maiores que 1,5%, havia indução da lesão, pois a amplitude da resposta atingiu um máximo nessa concentração e se manteve acima dessa concentração, mas não houve diferença significativa entre as concentrações.

Analisando a produção de fibrina, mostrou-se que, 10 dias após a injeção, a cicatrização não foi concluída nas concentrações de 2,5-10%, indicando danos persistentes. O uso de concentrações mais elevadas (2,5-10%) para estudar a dor orofacial não pareceu ter justificativa, minimizando assim o sofrimento dos animais (Clavelou *et al.*, 1994).

Este modelo é constituído em duas fases: a primeira é induzida por uma ativação direta das fibras nociceptivas C, e a segunda fase é mediada pela estimulação contínua de mediadores inflamatórios (serotonina, histamina, bradicinina, NO e prostaglandinas) liberados do tecido lesado, levando à sensibilização dependente da atividade dos neurônios por meio da ativação dos receptores opioides mu (μ), delta (δ) e kappa (κ) encontrados no gânglio trigeminal (COURA *et al.*, 2017 ; CHAVES *et al.*, 2018).

Ao longo dos anos muitos pesquisadores usam tal protocolo para averiguar atividade anti-inflamatória e antinociceptivas de compostos naturais, sintéticos e terapias adjuvantes (CHEN *et al.*, 2014; COURA *et al.*, 2017; DESIDERÁ, 2015).

2.6.2. MODELO DE DOR INDUZIDA POR CAPSAICINA

A capsaicina estimula seletivamente os neurônios nociceptivos e tem sido amplamente utilizada para estudar eventos relacionados à dor. Um passo importante para a compreensão da nocicepção foi a clonagem do receptor de capsaicina (o ingrediente pungente das pimentas), o receptor vaniloide TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1). TRPV1 é um canal de cátion não-

seletivo expresso por muitos neurônios em gânglios da raiz dorsal (DRG) e nos seus processos periféricos na pele e nas vísceras (TOMINAGA *et al.*, 1999). Na pele, é importante para a nocicepção inflamatória e hiperalgesia térmica (CATERINA *et al.*, 1997).

A presença de TRPV1 em articulações foi proposta com base na expressão de TRPV1 em fibras aferentes articulares no interior da articulação temporomandibular de rato (ICHIKAWA *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2015). Também foi observada a presença desse receptor em joelho de rato e de humanos (CHAKRABARTI *et al.*, 2018; FERNIHOUGH *et al.*, 2005; KODA *et al.*, 2016)

Antes da descoberta do receptor ativado por capsaicina, a injeção intradérmica de capsaicina era usada para produzir hipersensibilidade primária e secundária a estímulos nocivos e inócuos em macacos e em ratos (Sluka & Willis, 1997).

Trabalhos demonstraram que a capsaicina excita os nociceptores aumentando o influxo de íons, como o cálcio, nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) (OH *et al.*, 1996). Esses trabalhos são um marco nos mecanismos de dor desde que demonstrou que a capsaicina induz comportamento semelhante à dor pela ativação dos receptores TRPV1 expressa pelos nociceptores. Naquela época, os receptores TRPV1 eram denominados de receptor vaniloide 1 (VR1). Essa descoberta mudou a compreensão dos mecanismos da dor, demonstrando que um canal acoplado ao receptor expresso por nociceptores detecta estímulos ambientais, resultando na despolarização do nociceptor e conseqüentemente produzindo dor (CATERINA *et al.*, 1997). A capsaicina age seletivamente em nociceptores C-polimodais e há termo-dependência de efeitos sensoriais em animais e humanos (SZOLCSANYI, 1977; KODA *et al.*, 2016).

Foi demonstrado recentemente que os flavonoides naringenina (ROSSATO *et al.*, 2011), vitexina (MARTINEZ *et al.*, 2011) e hesperidina metil chalcona (SHIN *et al.*, 2013) reduzem a dor inflamatória, tendo como alvo, pelo menos em parte, a ativação de TRPV1. Outros flavonoides também têm como alvo o TRPV1 e reduzem a dor como o eriodictyol (TREVISAN *et al.*, 2012) e hesperidina (ZHI *et al.*, 2013). Esses dados corroboram o conceito que os flavonoides modulam o TRPV1. Além disso, outras moléculas, como o

spinasterol, isoladas folhas da planta medicinal *Vernonia tweedieana*, produzem efeito antinociceptivo por antagonismo ao receptor TRPV1 (YEON et al., 2010).

A respeito dos achados clínicos, a caracterização dos mecanismos celulares e moleculares que formam a base da dor orofacial advinda da ATM, assim como seu diagnóstico e tratamento, carece realmente de maior estudo, sendo necessário o desenvolvimento de ferramentas que possam afetar seu curso evolutivo, para poder contribuir sobremaneira com a melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Evidências apontam para moléculas derivadas de produtos naturais como potenciais drogas terapêuticas. Neste sentido, recentes avanços biotecnológicos têm permitido a descoberta de novos agentes bioativos. A utilização de modelos experimentais com animais tem sido considerada uma ferramenta importante para explorar novas estratégias terapêuticas e para um melhor conhecimento da fisiopatologia de várias doenças. Portanto, a busca por novos compostos mais efetivos e com baixa toxicidade, possuindo efeitos adversos mínimos, é de extrema importância e vem sendo alvo de muitas pesquisas.

2.7. PLANTAS MEDICINAIS

A Organização Mundial da Saúde supõe que 80% da população mundial, de algum modo, utiliza plantas medicinais como medicamentos. Estima-se, também, que 25.000 espécies de plantas sejam usadas nas preparações da medicina tradicional, entretanto, com o desconhecimento sobre a biodiversidade das florestas tropicais, torna-se óbvio que o uso dos produtos naturais e plantas medicinais ainda é fragmentário e escasso (WHO, 2011). Dentro dessa diversidade, pesquisas visando o uso farmacológico das plantas com potenciais efeitos terapêuticos têm sido difundidas no meio científico.

Um dos pontos críticos no uso de plantas medicinais é a sua identificação botânica, pois somente o conhecimento pelos nomes populares pode trazer confusões no uso da planta correta, sendo necessário conhecer seu nome científico. Outra condição para que as plantas utilizadas sejam aproveitadas em todas as potencialidades de uso é a forma de cultivo,

determinante para o desenvolvimento, produtividade e concentração dos teores dos princípios ativos desejados (CITADINIZANETTE et al., 2015).

2.7.1.FAMÍLIA PLANTAGINACEAE

Plantaginaceae é uma família de plantas angiospérmicas (plantas com flor), pertencente à divisão: Magnoliophyta, classe: Magnoliopsida e à ordem Lamiales. Atualmente abrange 92 gêneros e aproximadamente 1.855 espécies. As espécies de Plantaginaceae são morfologicamente caracterizadas pelas suas folhas alternas, simples ou compostas. As flores são bissexuais e a corola tem cinco pétalas, podendo ser bilabiada, quando o limbo é dividido em dois lábios. Os estames estão presentes em número de quatro, dois grandes e dois pequenos, podendo haver um quinto. Em alguns casos, os estames estarão simplesmente reduzidos a um par. Os frutos das plantagináceas são do tipo cápsula septicida que, ao amadurecer, rompem-se na linha de união dos carpelos para liberar as sementes. A polinização é feita por moscas, pássaros e abelhas(ALBACH; MEUDT; OXELMAN, 2005).

A importância econômica fica por conta de substâncias produzidas por algumas espécies que auxiliam no tratamento de doenças, como a leishmaniose e doenças cardíacas(RIBEIRO *et al.*, 2014; RUSSELL *et al.*, 2011).

2.7.1.1. GÊNERO STEMODIA

O gênero *Stemodia* é representado por cerca de 55 espécies distribuídas na Ásia, África, Austrália e América. É um gênero de plantas de florescência, perenes com folhas dentadas e racemos de flores coloridas, que são, geralmente, em tom roxo(HASSLER, 2017).

O estudo químico de *Stemodia* resultou no isolamento de diterpenos com esqueleto do tipo estemodano. Este fato motivou a realização de um levantamento bibliográfico sobre a ocorrência destes metabólitos secundários em espécies do gênero *Stemodia*. Como resultados foram encontrados vinte e quatro diterpenos isolados de quatro espécies do gênero (SILVA, 2013).

Os diterpenos foram os compostos encontrados com maior frequência no gênero *Stemodia*, indicando que esta classe possa ser de importância quimiotaxonômica para o gênero. Segundo o levantamento realizado para os diterpenos, foram catalogadas vinte e quatro estruturas diferentes, sendo 13 com esqueleto estemodano; 6 labdano; 3 bisepóxido; 1 estemarano e 1 abietano. Os diterpenos estemodanos foram predominantes nas espécies *S. maritima* e *S. chilensis* e apresentaram como característica um esqueleto com o C-13 α -oxigenado, apresentando como substituinte, geralmente, uma hidroxila ou um açúcar, podendo ser: L-arabinopiranosose, D-glicopiranosose ou L-arabinofuranose (SILVA, 2013).

Stemodia maritima Linn é um arbusto perene que cresce amplamente na Região Nordeste do Brasil, próximo à costa marítima, onde é conhecida como “mastruz-bravo” ou “melosa” (Figura 4). Foi também identificada nas ilhas do Caribe onde é usada para tratar vários tipos de doenças. Dados da literatura sugerem ação antiviral, citotóxica e larvicida. Além disso, a população utiliza as folhas e caule para tratar dor de estômago e retenção de líquido (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Estudando o efeito do extrato de *Stemodia maritima* Linn na modulação da reabsorção óssea inflamatória e estresse oxidativo, em um modelo de periodontite em ratas, Teixeira *et al.* (2017), parte de nosso grupo de pesquisa, observaram um efeito protetor de *S. maritima* devido à inibição de parâmetros inflamatórios, da perda óssea alveolar e marcadores do estresse oxidativo, representando uma possível opção terapêutica no ensaio pré-clínico de periodontite em ratas. Outros trabalhos realizados pelo nosso grupo verificaram o potencial efeito antioxidante e antimicrobiano de compostos isolados (stemodina, stemodinoside B e crenatoside) (DA SILVA *et al.*, 2014).

Figura 4 -*Stemodia maritima* Linn.



Fonte: commons.wikimedia.org

Na área de dor, entretanto, ainda não há estudos envolvendo a *Stemodiamaritima*. Assim, acredita-se que o esclarecimento de um possível papel da *Stemodiamaritima* e do seu composto isolado Estemodina, sobre a hipernocicepção inflamatória aguda na ATM de ratos, poderá contribuir para a introdução de uma nova abordagem terapêutica no tratamento dessa patologia.

3.OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória da *Stemodia maritima* e do seu composto isolado estemodina em modelos de hipernocicepção inflamatória aguda na articulação temporomandibular (ATM) de ratos

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito antinociceptivo da *Stemodia maritima* e do seu composto isolado estemodina nos modelos de hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina e capsaicina na ATM de ratos;
- Avaliar o efeito da *Stemodia maritima* e do seu composto isolado estemodina sobre a permeabilidade vascular e geração de citocina IL-1 β no modelo de hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos;
- Averiguar se o efeito da *Stemodia maritima* e do seu composto isolado estemodina dependem das vias da hemeoxigenase-1, do óxido nítrico e opioide no modelo de hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos;
- Investigar o envolvimento dos receptores TRPV-1 na resposta antinociceptiva da *Stemodia maritima* e do seu composto isolado estemodina no modelo de hipernocicepção inflamatória aguda induzida pela capsaicina na ATM de ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram usados ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade *Wistar* (180-200g), machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais ficaram alojados (temperatura $22\pm 2^\circ\text{C}$, obedecendo a ciclos de claro-escuro de 12h) no Biotério Setorial da UFC Sobral até o momento de início dos experimentos, e receberam água e alimentação *ad libitum*. Foi utilizado n de 5 animais para cada grupo experimental.

Com relação aos aspectos éticos, o protocolo experimental foi elaborado de acordo com o “Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório” da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e foi submetido ao Comitê de Ética (protocolo nº 52/2015) para Uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Fortaleza. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

4.2. MATERIAL VEGETAL

Stemodia maritima Linn.(Sm) foi coletada no município de Flecheiras-CE, durante o período da floração, pela Professora Ângela Martha Campos Arriaga, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici. A identificação botânica foi realizada pelo Professor Edson P. Nunes do Departamento de Biologia da UFC. Sua exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do mesmo Departamento, sob o registro de nº 38.483. Para esse estudo, foi utilizado o extrato aquoso obtido de folhas frescas de Sm (DA SILVA et al., 2014)

As folhas (830 g) de *S. maritima* foram trituradas, secas e submetidas à extração com etanol à temperatura ambiente. A solução obtida foi filtrada e evaporada à pressão reduzida em rota-evaporador, resultando no extrato denominado SMFE (65,4 g) com 7,88% de rendimento.

Após obtenção do extrato SMFE, 30,6 g de massa foram dissolvidos em etanol (500 mL), e a esta solução adicionados 10,0 g de carvão ativado. A mistura ficou sob agitação durante 1 h e 30 min, seguida de filtração à vácuo em funil de Büchner com uma camada de celite. O filtrado foi concentrado à pressão reduzida, dando origem ao extrato de SMFE-LC (Livre de Clorofila).

SMFE-LC (20,27 g), um material sólido de coloração marrom, foi adsorvido em gel de sílica (42,0 g) e pulverizado em gral de porcelana, submetido à filtração a vácuo em funil de Büchner com hexano, hexano/acetato de etila 50% e acetona. A fração extraída com hexano/acetato de etila 50% rendeu 3,50 g, que, após submissão a sucessivos processos cromatográficos, forneceu um precipitado branco cristalino (63,0 mg) e solúvel em metanol denominada SM-1. A posterior análise dos dados espectroscópicos de SM-1 mostrou sua identidade com o diterpeno estemodina.

4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram pré-tratados (*per os*) como extrato aquoso obtido de folhas frescas de *Stemodia maritima* nas doses de 0,1; 1 ou 10 µg/kg ou Estemodina nas doses de 0,1 ou 1 µg/kg. Uma hora após o pré-tratamento, os animais receberam uma injeção intra-articular de Formalina 1,5% ou Capsaicina 1,5%, no volume de 50 e 20 µL respectivamente, e a resposta comportamental nociceptiva foi quantificada. Imediatamente após as análises comportamentais, os animais foram anestesiados com Ketamina 225 mg/Kg e xilasina 24 mg/Kg, seguida pela perfusão com PBS, para os grupos experimentais em que os tecidos foram removidos para dosagem de citocinas, ou PFA, para os grupos experimentais em que os tecidos foram removidos para realização de imunohistoquímica. Após serem perfundidos, os mesmos foram eutanasiados por decaptação e os gânglios trigeminiais foram removidos e processados para realizar as análises bioquímicas e histológicas.

4.3.1. INJEÇÕES INTRA-ARTICULARES

Os animais foram anestesiados com isoflurano e receberam uma injeção do agente inflamatório Formalina 1,5%(Formaldeído, Sigma Aldrich) ou Capsaicina 1,5%, no volume de 50 e 20 μ L respectivamente (ROVERONI et al., 2001; OLIVEIRA-FUSARO et al.,2012). Para administração da formalinaou capsaicina na ATM, uma agulha calibre 30G, conectada a uma seringa de Hamilton (50 μ l) por um tubo de polietileno P50, foi inserida na porção inferior da borda pósterio-inferior do arco zigomático da ATM esquerda, sendo avançada em direção anterior até contactar a região pósterio-lateral do côndilo.

Figura 5 - Anestesia inalatória



Fonte: Luiz Marques da Rocha Neto

4.3.2. TESTE COMPORTAMENTAL PARA AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS

As análises comportamentais foram realizadas durante a fase clara, entre 9h e 17h em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25 °C (ROSLAND, 1991). Durante o teste, os animais não tiveram livre acesso à água e a comida. Para minimizar o estresse durante as sessões experimentais, os animais foram previamente manipulados pelo pesquisador por um período de 7 dias. Para a realização das análises comportamentais, uma caixa de observação foi utilizada. A mesma tinha um formato cúbico com piso e paredes

espeelhadas, exceto a face pela qual nós realizávamos a observação e a face superior pela qual conduzíamos os animais para seu interior. Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na caixa por 10 min para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse (ABBOTT *et al.*, 1986).

Imediatamente após a injeção i.art.do agente nociceptivo, o animal foi recolocado na câmara de observação, e as respostas comportamentais (ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar a cabeça) quantificadas durante 45 minutos. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi registrado através de um cronômetro e as vezes que a cobaia levantou a cabeça foram registrados através de um contador de células manualmente. Considerando o tempo de 1 segundo por cada vez que o rato levantou a cabeça, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada em segundos, somando-se esses comportamentos (ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar a cabeça), como previamente foi padronizado (Roveroni *et al.*, 2001). Imediatamente após as análises comportamentais, os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação para coleta dos tecidos.

Figura 6 - Caixa de observação do comportamento



Fonte: Luiz Marques da Rocha Neto

4.4. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

4.4.1. ANÁLISE DA PERMEABILIDADE VASCULAR ATRAVÉS DO ESTUDO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO DO AZUL DE EVANS

Animais foram pré-tratados (v.o) com *Stemodia maritima* ou Estemodina 1h antes da injeção i. art.de formalina (1,5%, 50 μ L) na ATM esquerda. Todos os animais receberam(i.v.) uma dose de 50mg/kg do corante Azul de Evans a 1% (Torres-Chávez *et al.*, 2011) na veia peniana, imediatamente após a aplicação da formalina (1,5%, 50 μ L) na ATM e, após 45 min, os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação. Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas, o local da injeção foi identificado visualmente de acordo com a aparência do corante extravasado (Haas *et al.*, 1992), permitindo assim a remoção adequada dos tecidos periarticulares para análise do extravasamento plasmático através de técnicas espectrofotométricas.

Para a extração do corante, o tecido periarticular de cada animal foi pesado, imerso em diferentes tubos (eppendorffs) contendo 1mL de formamida e mantidos a 60°C por 24 h (Fiorentino *et al.*, 1999). Após a extração, a quantidade de corante extravasada no tecido foi determinada em um leitor de microplacas que mediu a absorbância das diferentes soluções de formamida (620 nm) simultaneamente. Os resultados dessas leituras foram comparados com os resultados de leituras correspondentes a soluções com quantidades conhecidas do corante Azul de Evans. A quantidade de corante extravasada (μ g) em cada solução foi dividida pelo peso (g) do respectivo tecido incubado. O extravasamento foi calculado em micrograma de corante por grama de tecido dissecado.

4.4.2. DOSAGEM DE IL-1 β NO GÂNGLIO TRIGEMINAL DE RATOS COM HIPERNOCEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR FORMALINA

Amostras de tecido, gânglio trigeminal, foram armazenadas em freezer -80°C. O material foi homogeneizado em solução RIPA (Santa Cruz Biotechnology, EUA) adicionado ao inibidor de protease (Sigma). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10.000 RPM/ 10 min / 4°C), e o sobrenadante utilizado para avaliar a expressão do mediador pró-inflamatório IL-1 β . A detecção da IL-1 β foi realizada por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). Brevemente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 14 horas a 4°C com 100 μ L por poço de anticorpo de captura para IL-1 β . Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e bloqueadas com 100 μ L por poço com reagente diluente (R&D Systems). Após bloqueio das placas por 1 hora, 50 μ L das amostras e da curva padrão foram adicionadas a cada poço em várias diluições e incubadas por 2 horas à 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1 β . Após o período de incubação à 4°C por 2 horas, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos com 100 μ L de estreptavidina diluída 1:200. As placas foram lavadas novamente por três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e 100 μ L da solução substrato para revelação (Kit DuoSet, R&D Systems) foi adicionado. As placas foram incubadas durante 20 minutos, no escuro à temperatura ambiente. A reação enzimática foi parada com a solução de parada (H₂SO₄), e a absorbância medida a 450nm. Expressaram-se os resultados obtidos em pg/mL.

4.5. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA HEMEOXIGENASE-1 (HO-1) NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DESTEMODIA MARITIMA OU ESTEMODINA NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS

Para avaliar o envolvimento da hemeoxigenase-1 na atividade antinociceptiva da *Stemodia maritima* do seu composto isolado Estemodina, os animais foram divididos em seis grupos, sendo cada um composto por cinco animais:

Grupo Sham (salina): O grupo recebeu (per.os) solução salina (0,9%) e, 1 h após, injeção (i.art.) de solução salina estéril 0,9% (50 µL) na ATM esquerda;

Grupo Formalina: O grupo recebeu (per.os) solução salina (0,9 %) e 1 h após, injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda;

Grupo Indometacina (Indo): O grupo recebeu pela via (s.c) indometacina (5 mg/kg) dissolvida em solução salina estéril, seguido 30 min após da injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda;

Grupo Sm ou Es: O grupo recebeu (peros) extrato aquoso da Smou Esna na melhor dose e, após 1 h, injeção (i.art.) de formalina (1,5 %; 50 µL) na ATM esquerda;

Grupo Sm ou Estratado com Zinco protoporfirina IX(ZnPP-IX): O grupo recebeu (s.c) ZnPP-IX (3 mg/kg), inibidor seletivo da enzima HO-1, diluído em solução tampão carbonato de sódio (Na₂CO₃) 50 mM, 30 minutos após receberam (peros) o extrato aquoso da Smou Esna melhor dose e, após 1h, receberam a injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda;

Grupo ZnPP-IX: O grupo recebeu (s.c) ZnPP-IX (3 mg/kg), inibidor seletivo da enzima HO-1, diluído em solução tampão carbonato de sódio (Na₂CO₃) 50 mM, 30 minutos após receberam (peros) salina e, após 1h, receberam injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda.

4.6. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA *STEMODIA MARITIMA* OU ESTEMODINA NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS

Para avaliar o envolvimento do NO na atividade antinociceptiva da *Stemodia martimae* Estemodina, os animais foram divididos em seis grupos, sendo cada um composto por cinco animais:

Grupo salina: O grupo recebeu (per.os) solução salina (0,9%) e, 1 h após, injeção (i.art.) de salina estéril 0,9% (50 µL) na ATM esquerda;

Grupo Formalina: O grupo recebeu (per.os) solução salina (0,9%) e 1 h após, injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda;

Grupo Indo: O grupo recebeu (s.c) indometacina (5 mg/kg) dissolvida em salina estéril e, após 30 min, injeção (i.art) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda;

Grupo Smou Es: O grupo recebeu (per.os) o extrato da *Smou Esna* na melhor dose, e após 1 h, injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda;

Grupo Smou Es tratado com Aminoguanidina (Amino): O grupo recebeu (i.p) Aminoguanidina (30 mg/kg), inibidor seletivo da NO sintetase induzida (NOSi), diluído em solução salina estéril (0,9%), 30 min após recebeu(per.os) extrato da *Stemodia martimae* ou estemodina na melhor dose e, após 1h do tratamento com Sm ou Es, receberam a injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda;

Grupo Aminoguanidina: O grupo recebeu (i.p) Amino (30 mg/kg), inibidor seletivo da NO sintetase induzida (NOSi), diluído em solução salina estéril (0,9%), 30 minutos após receberam (per.os) salina e, após 1h do tratamento com Sm ou Es, receberam injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda.

4.7. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA OPIOIDE NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA *STEMODIA MARITIMA* OU ESTEMODINA NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS

Para determinarmos o envolvimento da via opioide no efeito antinociceptivo do extrato da *Stemodia maritima* ou Estemodina na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM esquerda dos ratos, os animais foram divididos em seis grupos, sendo cada um composto por cinco animais:

Grupo salina: O grupo recebeu salina por via intra-tecal. 15 minutos após receberam (*per.os*) solução salina (0,9%) e, 1 h após, injeção (*i.art.*) de salina estéril 0,9% (50 μ L) na ATM esquerda;

Grupo Formalina: O grupo recebeu salina por via intra-tecal. 15 minutos após receberam (*per.os*) solução salina (0,9%) e, 1 h após, injeção (*i.art.*) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda;

Grupo Morfina (Morf): O grupo recebeu salina por via intra-tecal. 15 minutos após receberam pela via (*s.c*) morfina (5 mg/kg) dissolvida em salina estéril 0,9% e, 1 h após, injeção (*i.art.*) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda;

Grupo Morfina pré-tratado com naloxona: Os animais receberam naloxona, antagonista não seletivo dos receptores opioides, por via intra-tecal 15 minutos antes de receberem pela via (*s.c*) morfina (5 mg/kg) dissolvida em salina estéril 0,9% e, 1 h após, injeção (*i.art.*) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda;

Grupo Sm ou Es: O grupo recebeu salina por via intra-tecal. 15 minutos após receberam (*per.os*) o extrato da *Stemodia maritima* ou estemodina na melhor dose e, após 1 h, injeção (*i.art.*) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda;

Grupo Sm ou Es pré-tratado com naloxona: Os animais receberam naloxona, antagonista não seletivo dos receptores opioides, por via intra-tecal, 15 minutos antes de receberem (*per os*) o extrato da *Stemodia maritima* ou estemodina na melhor dose e, após 1h, injeção (*i.art.*) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda.

Para proceder à administração intra-tecal da naloxona, os animais ficaram sob anestesia (isoflurano), quando então realizamos a tricotomia da

região cervical. Posicionados em decúbito ventral, acessamos o espaço suboccipital com uma agulha de calibre 30G, conectada a uma seringa Hamilton de 50 μ L através de uma cânula de polietileno. Inserimos a agulha logo abaixo do osso occipital penetrando a pele sobre o espaço suboccipital até 4 mm de profundidade e inclinando em direção cranial avançamos mais 2 mm para perfurar a membrana atlanto-occipital e atingir o espaço subaracnóideo bulbar. A administração da droga foi realizada no líquido cefalorraquidiano, próximo do subnúcleo caudal trigeminal. O volume total das injeções intratecais foi de 10 μ L e administradas a uma velocidade de 1 μ L/s, como previamente padronizado (FISCHER et al., 2005).

4.8. ESTUDO DA *STEMODIA MARITIMAE* ESTEMODINA NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA PELA CAPSAICINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS

Para avaliar o envolvimento da capsaicina, ingrediente pungente da pimenta e agonista do receptor vaniloide TRPV-1, na atividade antinociceptiva da *Stemodia maritima* e Estemodina no modelo de hipernocicepção inflamatória aguda induzida pela capsaicina na ATM esquerda de ratos, os animais foram divididos em quatro grupos, sendo cada um composto por cinco animais:

Grupo salina: O grupo recebeu (*per os*) solução salina (0,9%) e, 1 h após, injeção (i.art.) de salina estéril 0,9% (50 μ L) na ATM esquerda;

Grupo Capsaicina (não-tratado): O grupo recebeu (*per os*) solução salina (0,9%) e, 1 h após, injeção (i.art.) de capsaicina (1,5%; 20 μ L) na ATM esquerda;

Grupo Sm ou Es: O grupo recebeu (*per os*) o extrato da *Stemodia maritima* ou estemodina na melhor dose e, 1 h após, receberam a injeção (i.art.) de capsaicina (1,5%; 20 μ L) na ATM esquerda.

4.9. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECTAR A EXPRESSÃO DE TRPV-1 NO GÂNGLIO TRIGEMINAL DE RATOS COM HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR CAPSAICINA NA ATM

A imunohistoquímica para TRPV1 foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). Os tecidos foram desidratados em álcool, sendo, então, incluídos em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4µm em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em álcool e imersos em tampão citrato DAKO (pH 6,0) sob aquecimento em banho PT-LINK (DAKO), por 30 minutos para recuperação antigênica a 95°C. Após esfriamento, foram feitas lavagens com solução tampão de fosfato (Wash buffer), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ DAKO (20 minutos). Em seguida foi feito bloqueio de proteína (protein in block) por 20 minutos. Os cortes foram incubados por 1 hora com anticorpo primário de cabra anti-VR1 (Abican), diluído 1:400. Após a lavagem em PBS, foi feita a incubação com anticorpo secundário (de detecção) em solução HRP (DAKO) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

As imagens foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (leica DM1000, Alemanha). Foram fotografados 6 campos por corte histológico no aumento de 400x e realizada a contagem de células positivas marcadas por cada campo utilizando o Adobe Photoshop CS6. Foram consideradas as células positivas marcadas com coloração marrom citoplasmática e nuclear.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

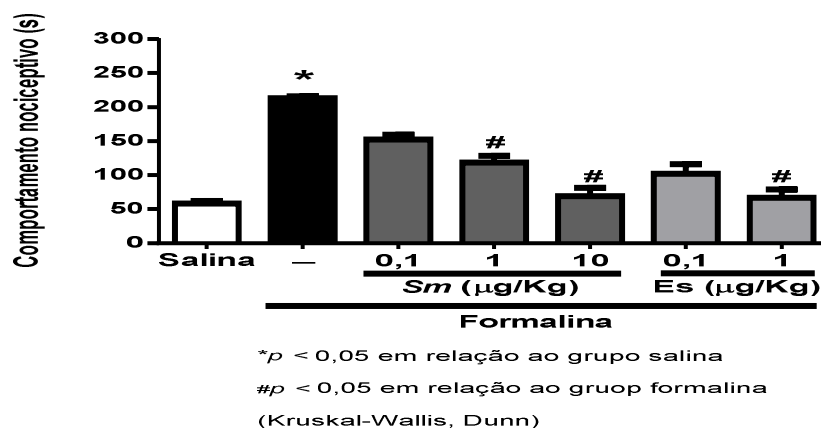
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), sendo utilizado para os cálculos estatístico o software SPSS e GraphPad Prism 6.0 para os gráficos. Para avaliar a normalidade dos dados, utilizamos o Teste de Shapiro-Wilk. O teste para análise de variância empregado foi (ANOVA). Os testes de comparações múltiplas dos dados paramétricos foram de Tukey ou Games-Howell. Para os dados não paramétricos, os resultados foram expressos em mediana e avaliados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DAS *Sm* E *Es* NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS

A administração intra-articular na ATM esquerda dos ratos do agente nociceptivo formalina (1,5%; 50 μ L) ($213,1 \pm 2,677$) resultou em um aumento estatisticamente significativo na resposta nociceptiva comportamental em comparação com o grupo salina ($58,20 \pm 3,839$). Os grupos pré-tratados (v.o) com extrato da *Stemodia maritima* nas doses 1 ($118,5 \pm 9,812$) e 10 μ g/kg ($69,10 \pm 12,38$); e estemodina na dose de 1 μ g/kg ($66,80 \pm 12,34$), apresentaram uma redução na resposta nociceptiva comportamental de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo formalina ($213,1 \pm 2,677$). Com base nesses resultados, utilizamos a dose de 10 μ g/kg da *Stemodia maritimae* 1 μ g/kg da estemodina para realização dos demais experimentos (**Gráfico 1**).

Gráfico 1 - Efeito da *Sm* e *Es* na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos



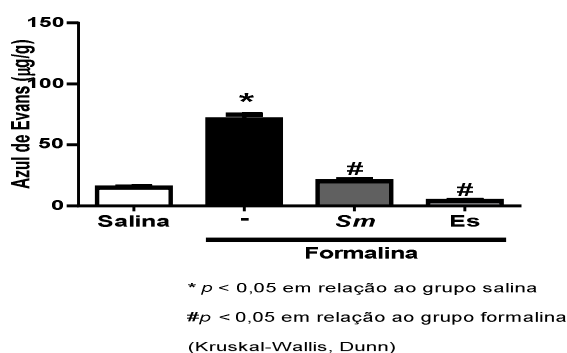
Fonte: dados da pesquisa.

A injeção i. art. do agente nociceptivo formalina induziu resposta nociceptiva. *Sm* nas doses 1 e 10 μ g/kg e *Es* na dose 1 μ g/kg reduziram a resposta comportamental nociceptiva. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina (ANOVA, Kruskal-Wallis).

5.2.EFEITO DA *Sm* E *Es* SOBRE A PERMEABILIDADE VASCULAR ATRAVÉS DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO DO AZUL DE EVANS NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS

A administração intra-articular na ATM esquerda dos ratos do agente nociceptivo formalina (1,5%; 50 μ L) resultou em um aumento do extravasamento plasmático de forma estatisticamente significativa do grupo formalina ($70,89 \pm 3,903$), quando comparado com o grupo salina ($15,13 \pm 0,751$). Observou-se que o grupo pré-tratado com *Stemodia maritima* 10 μ g/kg ($20,46 \pm 1,491$) e estemodina na dose de 1 μ g/kg ($4,102 \pm 0,708$) reduziram o extravasamento plasmático induzido pela formalina de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo formalina ($70,89 \pm 3,903$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Efeito da *Sm* e *Es* sobre a permeabilidade vascular através do extravasamento plasmático do Azul de Evans na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos



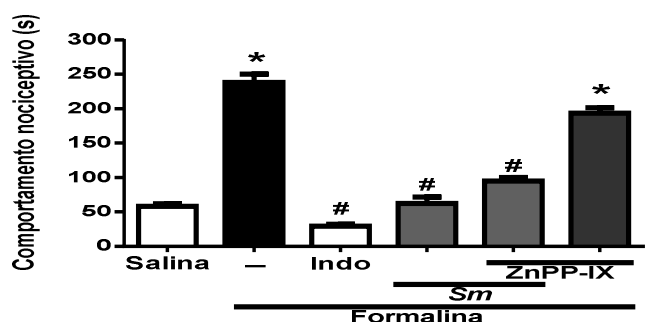
Fonte: dados da pesquisa.

Observou-se que o pré-tratamento com *Stemodia maritima* e estemodina na melhor dose reduziram o extravasamento plasmático induzido pela formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM de ratos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina (ANOVA, Kruskal-Wallis).

5.3. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA HEMEOXIGENASSE-1 NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA *Sm* NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS

Houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na resposta nociceptiva comportamental no grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$), quando comparado ao grupo salina ($58,20 \pm 3,839$). Os grupos *Stemodia maritima* ($62,60 \pm 9,059$) e indometacina (5 mg/kg) ($29,40 \pm 2,977$) reduziram de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) o efeito comportamental nociceptivo, quando comparados ao grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$). ZnPP-IX ($94,80 \pm 5,014$) não reverteu o efeito antinociceptivo da *Stemodia maritima* (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), quando comparado com o grupo *Stemodia maritima* ($62,60 \pm 9,059$). O grupo ZnPP-IX (3 mg/kg) ($193,5 \pm 7,751$), inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 (HO-1), quando administrado sozinho, não alterou a resposta nociceptiva comportamental, quando comparado ao grupo formalina (**Gráfico 3**).

Gráfico 3 -Estudo do envolvimento da HO-1 na atividade antinociceptiva da *Stemodia maritima* na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos



* $p < 0,05$ em relação ao grupo salina

$p < 0,05$ em relação ao grupo formalina

(ANOVA, Tukey)

Fonte: dados da pesquisa.

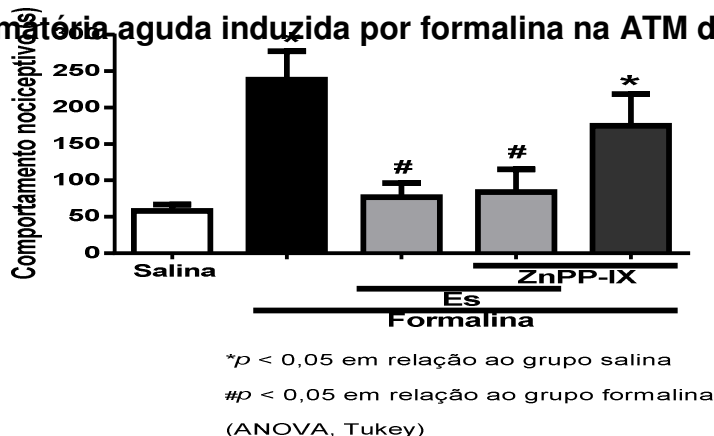
Indo e *Sm* (v.o) (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) reduziram significativamente as respostas nociceptivas induzida pela formalina. ZnPP-IX (3 mg/kg) não reverteu o efeito antinociceptivo da *Sm* e, quando administrado sozinho, não apresentou uma redução do comportamento nociceptivo comparado ao grupo formalina.* $p < 0,05$

em relação ao grupo salina e $\#p < 0,05$ em relação ao grupo formalina (ANOVA, Tukey).

5.4. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA HEMEOXIGENASSE-1 NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA Es NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS

Houve um aumento na resposta nociceptiva comportamental de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$), quando comparado ao grupo salina ($58,20 \pm 3,839$). Estemodina ($77,00 \pm 9,652$) reduziu os efeitos nociceptivos comportamentais de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$). ZnPP-IX ($84,20 \pm 13,92$), inibidor seletivo da hemeoxigenase-1 (HO-1), não reverteu o efeito antinociceptivo de estemodina quando comparado com o grupo estemodina ($77,00 \pm 9,652$). O grupo ZnPP-IX (3 mg/kg) ($175,2 \pm 19,26$), quando administrado sozinho, não alterou a resposta nociceptiva comportamental, quando comparado ao grupo formalina (**Gráfico4**).

Gráfico 4 -Estudo do envolvimento da HO-1 na atividade antinociceptiva da estemodina na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos



Fonte: dados da pesquisa.

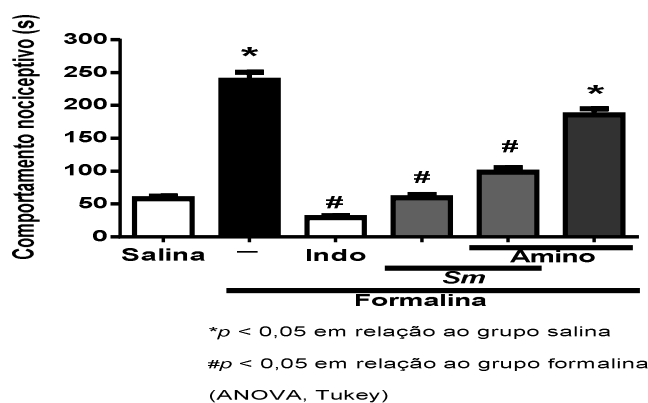
A injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda dos ratos induziu respostas nociceptivas. O grupo estemodina reduziu as respostas nociceptivas induzida pela formalina. ZnPP-IX (3 mg/kg) não reverteu o efeito antinociceptivo da estemodina e, quando administrado sozinho, não apresentou diferença estatística no comportamento nociceptivo, quando comparado ao

grupo formalina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina(ANOVA, Kruskal-Wallis).

5.5. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO NO NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA *Sm* NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS

Houve um aumento estatisticamente significativo na resposta nociceptiva comportamental no grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$), quando comparado ao grupo salina($58,20 \pm 3,839$). Os grupos indometacina (5 mg/kg) ($29,40 \pm 2,977$), controle positivo e *Stemodia maritima*($59,56 \pm 5,061$) reduziram de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) o efeito nociceptivo comportamental, quando comparado ao grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$). Aminoguanidina($98,60 \pm 6,837$), inibidor da enzima NOS, não foi capaz de revertero efeito de *Stemodia maritimade* forma estatisticamente significativa, quando comparado com o grupo *Stemodia maritima* ($59,56 \pm 5,061$). O grupo Aminoguanidina ($185,8 \pm 9,002$) quando administrado sozinho, não alterou a resposta nociceptiva, quando comparado ao grupo formalina (**Gráfico5**).

Gráfico 5 - Estudo do envolvimento do NO na atividade antinociceptiva da *Stemodia maritima* na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos



Fonte: dados da pesquisa.

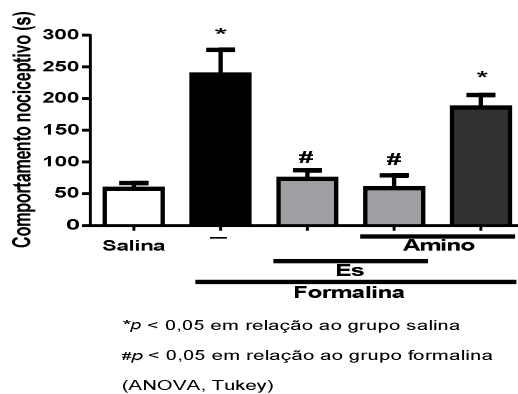
A injeção (i.art.) de formalina na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. Os grupos Indometacina e *Stemodia maritima* reduziram significativamente as respostas nociceptivas induzida pela formalina. Aminoguanidina não reverteu o efeito antinociceptivo da *Stemodia maritima* e, quando administrado sozinho, não apresentou diferença estatística comparado ao grupo formalina.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina (ANOVA, Kruskal-Wallis).

5.6. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DO NO NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA Es NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS

Houve um aumento de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na resposta nociceptiva comportamental no grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$), quando comparado ao grupo salina ($58,20 \pm 3,839$). O grupo Es ($73,60 \pm 4,347$) reduziu o efeito nociceptivo comportamental de forma estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$). No grupo Es tratado com Aminoguanidina ($59,00 \pm 8,944$) não houve diferença estatística no efeito antinociceptivo, quando comparado com o grupo Es ($73,60 \pm 4,347$). O grupo Aminoguanidina ($185,8 \pm 9,002$), inibidor da enzima (NOS), quando administrado sozinho, não alterou a resposta nociceptiva comportamental, quando comparado ao grupo formalina. (**Gráfico6**).

Gráfico 6 -Estudo do envolvimento do NO na atividade antinociceptiva da Es na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos



Fonte: dados da pesquisa

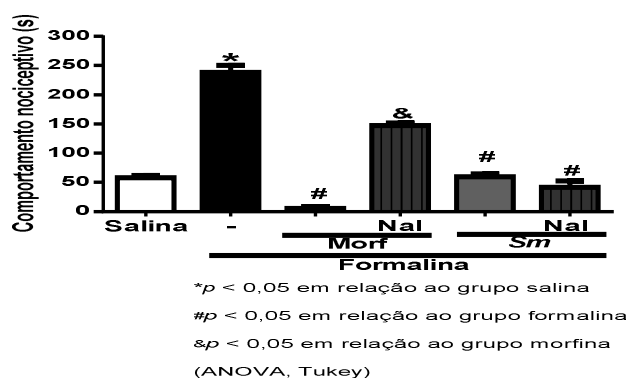
A injeção (i.art.) de formalina na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. Es ($1 \mu\text{g/kg}$) reduziu as respostas nociceptivas induzida pela formalina. O tratamento com aminoguanidina, não reverteu o efeito antinociceptivo daEs.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina (ANOVA, Kruskal-Wallis).

5.7. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA OPIOIDE NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA *Sm* NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS

Observou-se aumento estatisticamente significativo na resposta nociceptiva comportamental no grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$), quando comparado ao grupo salina ($58,20 \pm 3,839$). Os grupos Morfina ($5,600 \pm 3,092$), controle positivo, e *Stemodia maritima* ($59,56 \pm 5,061$) reduziram de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) o comportamento nociceptivo, quando comparados ao grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$). Naloxona, antagonista opioide, reverteu o efeito da morfina de forma estatisticamente significativa, resultando em um aumento na resposta nociceptiva comportamental ($147,2 \pm 4,609$), quando comparado ao grupo morfina. Naloxona ($41,40 \pm 11,17$) não reverteu o efeito antinociceptivo da *Stemodia maritima*, quando comparado com o grupo *Stemodia maritima* ($59,56 \pm 5,061$). (Gráfico7).

Gráfico 7 -Estudo do envolvimento da via opioide na atividade antinociceptiva da *Stemodia maritima* na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos



Fonte: dados da pesquisa.

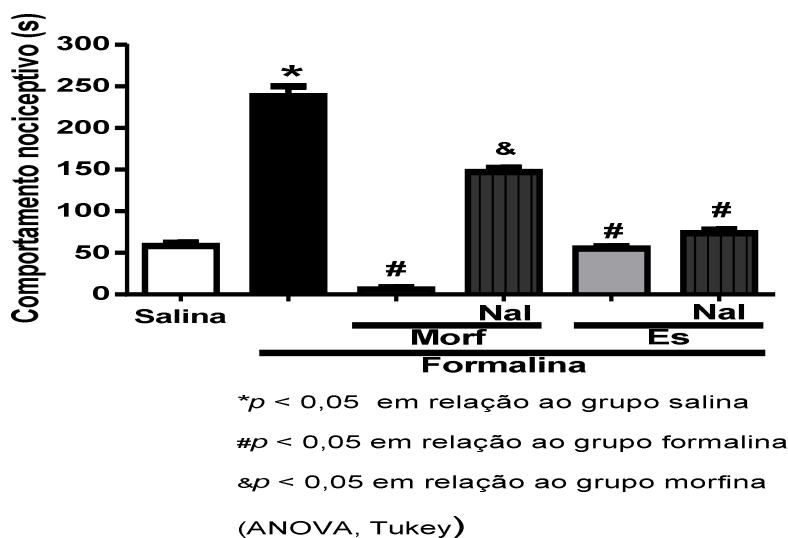
A injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. Morfina e *Stemodia maritima*(v.o) (10 μ g/kg) reduziram de forma

estatisticamente significativa às respostas nociceptivas induzidas pela formalina. A naloxona reverteu o efeito da morfina, porém não reverteu o efeito da *Stemodia maritima*(v.o) (10 µg/kg). * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina e $\alpha p < 0,05$ em relação ao grupo morfina(ANOVA, Kruskal-Wallis).

5.8. ESTUDO DO ENVOLVIMENTO DA VIA OPIOIDE NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA Es NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS

Observou-se um aumento de forma estatisticamente significativa na resposta nociceptiva comportamental do grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$), quando comparado ao grupo salina($58,20 \pm 3,839$). Os grupos morfina ($5,600 \pm 3,092$), controle positivo, eestemodina ($73,60 \pm 4,347$) reduziram de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) o comportamento nociceptivo, quando comparado ao grupo formalina ($238,1 \pm 12,35$). Observamos que no grupo morfina pré-tratado com naloxona ($147,2 \pm 4,609$), essa última reverteu de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) o efeito da morfina, resultando no aumento da resposta nociceptiva comportamental, quando comparado ao grupo morfina ($5,600 \pm 3,092$). No grupo estemodina pré-tratado com naloxona ($55,00 \pm 2,739$), a mesma não conseguiu reverter o efeito antinociceptivo da estemodina e, ao compararmos com o grupo estemodina ($73,60 \pm 4,347$), evidenciamos que não há diferença estatisticamente significativa (**Gráfico8**).

Gráfico 8 - Estudo do envolvimento da via opioide na atividade antinociceptiva da estemodina na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos



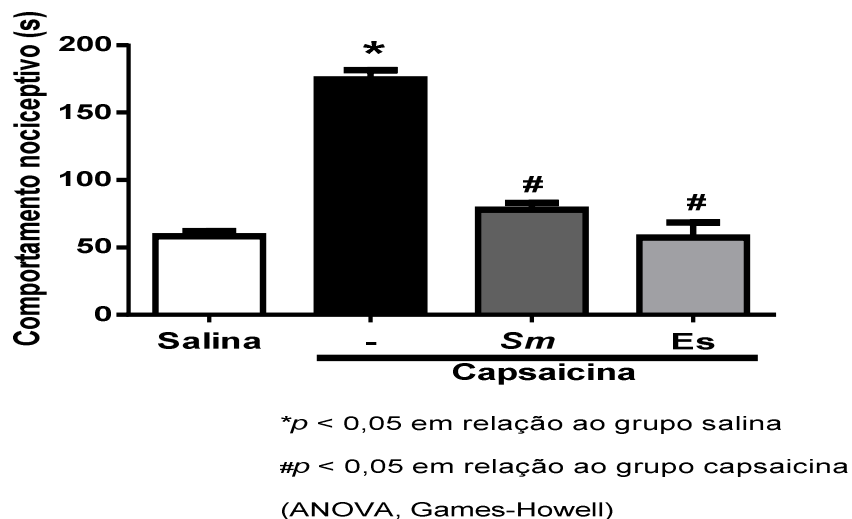
Fonte: dados da pesquisa.

A injeção (i.art.) de formalina na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. Os grupos morfina e estemodina reduziram a resposta nociceptiva comportamental induzida pela formalina. A naloxona reverteu o efeito da morfina, porém não conseguiu reverter o efeito da estemodina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina, # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina e & $p < 0,05$ em relação ao grupo morfina (ANOVA, Kruskal-Wallis).

5.9. ESTUDO DA *SmE* Es NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA PELA CAPSAICINA NA ATM ESQUERDA DE RATOS

A administração (i.art.) na ATM esquerda dos ratos do agente nociceptivo capsaicina 1,5% (20 μ L) resultou em um aumento estatisticamente significativo na resposta nociceptiva comportamental do grupo capsaicina ($174,6 \pm 6,996$) em comparação com o grupo salina ($58,20 \pm 3,839$). Os grupos *Stemodia maritima* ($78,00 \pm 5,016$) e estemodina ($57,38 \pm 11,17$) reduziram a resposta nociceptiva comportamental de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$), quando comparada ao grupo capsaicina (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Estudo da *Sme* Es na hipernocicepção inflamatória aguda induzida pela capsaicina na ATM esquerda de ratos



Fonte: dados da pesquisa.

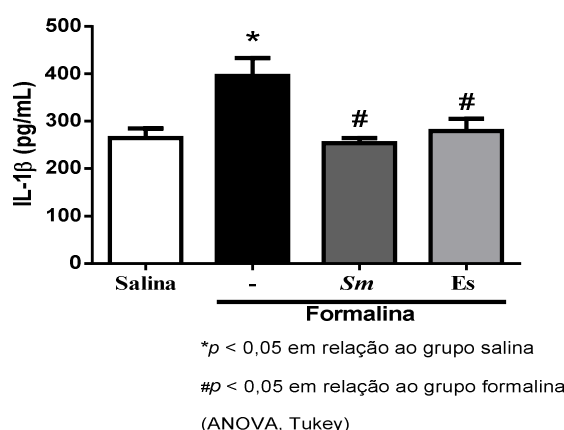
A administração (i.art.) na ATM dos ratos do agente nociceptivo capsaicina 1,5% (20 μ L) resultou em um aumento na resposta nociceptiva comportamental. Os grupos *Sme* *Es* reduziram a resposta nociceptiva comportamental, quando comparado ao grupo capsaicina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo capsaicina (ANOVA, Kruskal-Wallis).

5.10.AVALIAR O EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM *Sme* *Es* SOBRE A DOSAGEM DA IL-1 β NO GÂNGLIO TRIGEMINAL DE RATOS NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA NA ATM INDUZIDA POR FORMALINA

Observou-se um aumento de forma estatisticamente significativa na concentração de IL-1 β no gânglio trigeminal de ratos com hipernocicepção inflamatória induzida por formalina do grupo formalina (395,6 \pm 37,81), quando comparado com o grupo salina (264,3 \pm 20,90). Os grupos pré-tratados com *Sme* na concentração de 10 μ g/kg (253,6 \pm 10,83) e *Es* na concentração de

1µg/kg ($279,8 \pm 25,56$) reduziram de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a concentração de IL-1 β quando comparado ao grupo formalina(Gráfico 10).

Gráfico 10. Dosagem de IL-1 β no gânglio trigeminal de ratos com hipernocicepção inflamatória aguda na ATM induzida por formalina



Fonte: dados da pesquisa.

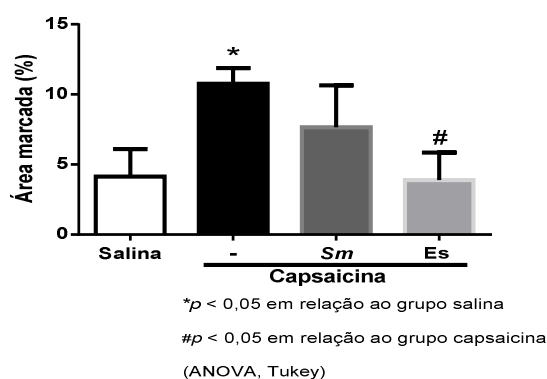
Houve um aumento na concentração de IL-1 β no gânglio trigeminal de ratos após a indução por formalina da hipernocicepção inflamatória aguda na ATM, quando comparado ao grupo salina. Os grupos pré-tratados com *Sm* e *Es* reduziram a concentração de IL-1 β no gânglio trigeminal de forma estatisticamente significativa. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina (ANOVA, Tukey).

5.11. ESTUDO DA EXPRESSÃO DO TRPV-1 NO GÂNGLIO TRIGEMINAL DE RATOS COM HIPERNOCEPÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA POR CAPSAICINA NA ATM APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM *Sm* E *Es*, SEGUIDA DA ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DO MESMO.

Observou-se um aumento de forma estatisticamente significativa no grupo capsaicina ($10,76 \pm 0,56$) da expressão do TRPV-1 no gânglio trigeminal de ratos com hipernocicepção inflamatória aguda induzida por capsaicina, quando

comparado com o grupo salina ($4,13 \pm 0,97$). Os grupos pré-tratados com *Sm* na concentração de $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($7,67 \pm 1,18$) e *Es* na concentração de $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($3,88 \pm 0,97$) reduziram a expressão de TRPV-1, porém somente reduziu de forma estatisticamente significativa quando comparado ao grupo capsaicina ($p < 0,05$) (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Estudo da expressão do TRPV-1 no gânglio trigeminal de ratos com hipernocicepção inflamatória aguda induzida por capsaicina na ATM após pré-tratamento com *Sm* e *Es*

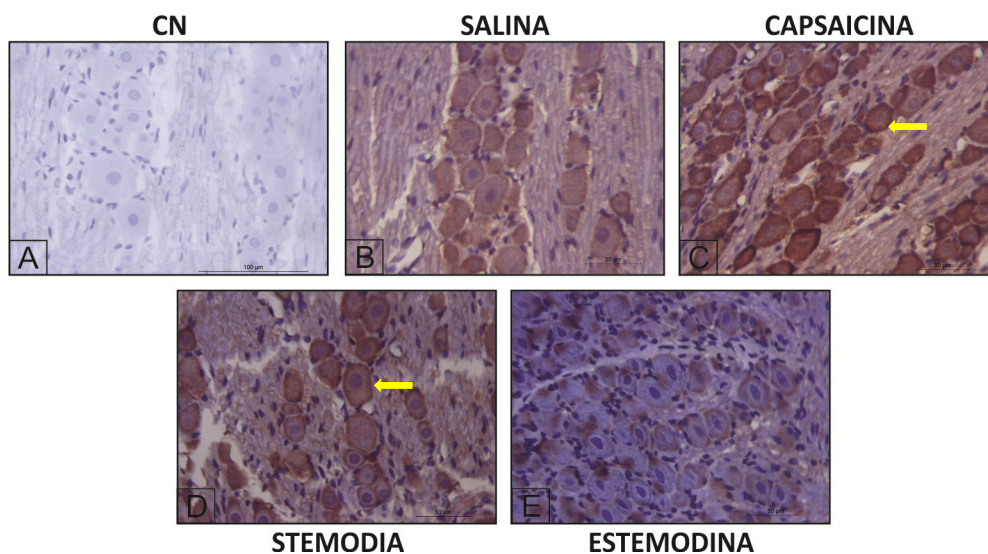


Fonte: dados da pesquisa.

Houve um aumento na expressão do TRPV-1 no gânglio trigeminal de ratos após a indução por capsaicina da hipernocicepção inflamatória aguda na ATM, quando comparado ao grupo salina. Os grupos pré-tratados com *Stemodia maritima* e *estemodina* reduziram a expressão do TRPV-1, porém somente esse último reduziu de forma estatisticamente significativa. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo capsaicina (ANOVA, Tukey).

Figura 7 – Fotomicrografias do gânglio trigeminal de ratos com hipernocicepção inflamatória aguda induzida por capsaicina. (A) Controle negativo, grupo no

qual não foi induzido o processo inflamatório e nem receberam nenhum tipo de tratamento (400x). (B) Grupo salina, os animais receberam pré-tratamento (V.O) com solução salina e 1h depois, injeção intra-articular (i. art.) com solução salina na ATM esquerda (400x). (C) Grupo capsaicina, os ratos foram pré-tratados (V.O) com solução salina e após 1h, receberam injeção i. art. na ATM esquerda de capsaicina (1,5%; 20 μ L) (400x). (D) Grupo Stemodia, no qual foi feito pré-tratamento (V.O) com extrato de *Stemodia maritima* dose de 10 μ g/kg e, após 1h, administração i. art. de capsaicina (1,5%; 20 μ L) na ATM esquerda dos ratos (400x). (E) Grupo estemodina, no qual foi feito pré-tratamento (V.O) com estemodinana dose de 1 μ g/kg e, após 1h, administração i. art. de capsaicina (1,5%; 20 μ L) na ATM esquerda dos ratos (400x). Seta amarela indica imunoposição de TRPV1 na membrana celular de neurônios.



6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, utilizamos modelos experimentais de hipernociceção inflamatória agudana ATM induzida por formalina e

capsaicina, a fim de avaliar o efeito do extrato etanólico das folhas da *Stemodia maritima* (Sm) e do diterpeno estemodina (Es). O tratamento com Sm e Es reduziram o comportamento nociceptivo nos dois modelos experimentais e o extravasamento plasmático, enfatizando o envolvimento da citocina IL-1 β no mecanismo de ação de Sm e Es, e o envolvimento do receptor TRPV1 no mecanismo de ação da Es.

Modelos animais são utilizados, pois se sabe que há semelhanças entre a ATM de ratos e humanos, comprovada através de análises histopatológicas, histoquímicas e imunohistoquímica, podendo ser utilizada em estudos experimentais (FURSTMAN, 1966; FUJITA & HOSHINO, 1989; NOZAWA-INOQUE et al., 2003). Para desenvolver o modelo experimental, utilizam-se animais com peso entre 180 e 200g, o que corresponde à idade dos animais em torno de 8 semanas, momento em que os ratos atingem a maturidade da ATM (FURSTMAN, 1966; FUJITA & HOSHINO, 1989; NOZAWA-INOQUE et al., 2003).

Ao longo dos anos, muitos estudos avaliam as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de compostos naturais, sintéticos e terapias adjuvantes na dor inflamatória da ATM. De fato, nosso grupo tem um histórico de estudos, utilizando modelos experimentais com diferentes estímulos inflamatórios, avaliando polissacarídeos e lectinas obtidas de algas marinhas, assim como extratos, compostos isolados e substâncias semissintéticas na nocicepção trigeminal da ATM (ALVES et al., 2018; COURA et al., 2017; FERNANDES et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017; FREITAS et al., 2016; ABREU et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016).

Nessa perspectiva, sabe-se que Sm é um arbusto muito comum que cresce amplamente na Região Nordeste do Brasil, perto da costa do mar, onde é conhecido como “melosa”. No curso da investigação fitoquímica de *S. maritima*, nosso grupo relatou anteriormente a elucidação quanto à sua composição, que inclui esteroides, flavonoides e terpenos (DA SILVA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2010). Teixeira et al., em 2017, estudando o efeito do extrato de *Stemodia maritima* Linn. na modulação da reabsorção óssea inflamatória e estresse oxidativo em um modelo de periodontite experimental em ratas, concluiu que o extrato reduziu a perda óssea alveolar, através da redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10.

Avaliando os resultados dos experimentos realizados anteriormente, ficou claro que o pré-tratamento com a melhor dose da *Stemodia maritima* (10 µg/kg) e da estemodina (Es) (1 µg/kg) reduziram o comportamento nociceptivo de forma estatisticamente significativa se comparadas ao grupo formalina (grupo não tratado), revelando o efeito antinociceptivo. Para avaliarmos o efeito sobre a permeabilidade vascular, mensuramos o extravasamento plasmático do corante azul de Evans, considerado um método visual e quantitativo seguro para se estudar a inflamação, visto que o mesmo se liga a proteínas plasmáticas (HAAS et al., 1992). Sabe-se que um dos cinco sinais cardinais da inflamação é o edema causado pelo aumento da permeabilidade vascular e subsequente extravasamento de fluídos e proteínas. Portanto, durante a inflamação, há extravasamento do corante azul de Evans ligados a proteínas plasmáticas que pode ser mensurado quantitativamente (HAAS et al., 1992).

Haas et al. (1992) descreveram o uso da medida do extravasamento de azul de Evans em ATM de ratos nos quais foi aplicado óleo de mostarda (i. art.) numa concentração de 20% e mostrou que na fase sub-aguda, 30 min. após indução da artrite, houve pico de extravasamento plasmático. Embasado nesses estudos, porém utilizando a formalina na indução da hipernocicepção inflamatória aguda, observamos que houve uma redução de forma estatisticamente significativa do extravasamento do corante azul de Evans e consequentemente redução da permeabilidade vascular nos grupos que foram pré-tratados com *Stemodia maritima* ou estemodina, quando comparado ao grupo formalina, evidenciando assim um possível efeito anti-inflamatório do pré-tratamento.

Continuando com a avaliação dos parâmetros anti-inflamatórios, o gânglio trigeminal dos ratos com hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina foi coletado para realizar a dosagem de IL-1β por ELISA. Um dos parâmetros avaliado por Lamana et al., em 2017, estudando os mecanismos envolvidos no efeito anti-inflamatório periférico do tramadol na articulação temporomandibular de ratos com hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina, foi dosagem de IL-1β no gânglio trigeminal. O mesmo observou em seu estudo que a injeção intra-articular de tramadol (500 µg/ATM) não afetou a expressão de ICAM e CD55 ($p > 0,05$), mas reduziu significativamente a

liberação das citocinas inflamatórias TNF α e IL-1 β , induzidas pela formalina. ICAM e CD55 são proteínas expressas por células endoteliais e que estão relacionados com a migração de leucócitos para os sítios da inflamação.

Em nossos experimento, estudando a influência do tratamento com *Sm* e *Es* sobre a dosagem da IL-1 β no gânglio trigeminal de ratos com hipernocicepção inflamatória aguda na ATM induzida por formalina, observamos que houve uma redução de forma estatisticamente significativa de IL-1 β , sugerindo um potencial efeito anti-inflamatório com *Sm* e *Es*. Corroborando com essa hipótese, observou-se que o pré-tratamento com *S. maritima* foi capaz de reduzir a quantidade de radicais livres e a expressão de TNF- α , IL-1 β , iNOS e RANK (TEIXEIRA et al., 2017).

Embuídos de averiguar por qual via o efeito de *Sm* e *Es* se dava, investigamos a participação da HO-1 na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina, utilizando o inibidor da enzima, zinco protoporfirina IX (ZnPP-IX). Sabe-se que a ativação da heme oxigenase-1 (HO-1), a forma induzida da HO, resulta em redução do dano oxidativo e apoptose, reduzindo eventos inflamatórios como edema, migração celular e produção de citocinas pró-inflamatórias (ALCARAZ et al., 2003). É uma enzima citoprotetora induzida no local da inflamação que converte o grupo heme em monóxido de carbono (CO), biliverdina e ferro livre. Há um estudo que relata a ligação da ativação da HO-1 com a prevenção da dor neuropática periférica em ratos (BIJJEM et al., 2013). HO-1 também está presente nos gânglios da raiz dorsal, nos gânglios trigêmeos e nas regiões superiores das vias da dor, participando de mecanismos protetores e adaptativos (AKRAM et al., 2016; SHEN et al., 2015). Observamos que o ZnPP-IX não reverteu o efeito antinociceptivo do pré-tratamento com *Sm* e *Es*, mostrando assim, que o efeito antinociceptivo de *Sm* e *Es* não ocorre por meio da ativação da HO-1.

Para investigar então a participação do NO sobre o efeito do pré-tratamento com *Sm* e *Es* na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina na ATM de ratos, utilizamos aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintetase induzida (NOSi), previamente à *Sm* e *Es*. As possíveis fontes de NOSi nos sítios inflamatórios articulares ainda causam divergência entre autores, mas se sabe que uma grande variedade de células pode expressar NOSi após exposição a estímulos inflamatórios. Foi demonstrado que NO é produzido por

células endoteliais (LAMAS et al., 1992), macrófagos (DI ROSA et al., 1990), neutrófilos (WRIGHT et al., 1989), fibroblastos (WERNER-FELMAYER et al., 1990), osteoblastos e osteoclastos (EVANS & RALSTON, 1996), células neuronais (KNOWLES et al., 1989), sinoviócitos (MCINNES et al., 1996) e condrócitos (STADLER et al., 1991).Grabowski et al. (1996) afirmaram que células articulares como condrócitos, sinoviócitos e osteoblastos são capazes de produzir NO estimuladas por citocinas como IL-1 e TNF α , não acontecendo o mesmo com leucócitos. Outros autores, entretanto, afirmaram que leucócitos infiltrantes como neutrófilos e linfócitos, assim como macrófagos e mastócitos são capazes de gerar grandes quantidades de NO (WEINBERG et al., 1995; WHELEER et al., 1997).Nos experimentos, a via NO pela qual a aminoguanidina exerce seu papel, não contribuiu na regulação da capacidade da Sm e Es de diminuir a sensibilização neuronal periférica, uma vez que a inibição da sintase do óxido nítrico não alterou o efeito antinociceptivo do pré-tratamento com ambas.

Objetivando encontrar a via pela qual o efeito antinociceptivo de Sm e Es ocorre, resolvemos estudar ainda a participação dos receptores opioides. Os receptores opioides centrais estão envolvidos nas vias reguladoras da dor e os estudos farmacológicos têm procurado drogas que atuam nesses receptores como possíveis alternativas terapêuticas no controle da dor (GIRI E HRUBY, 2014; LINZ et al., 2014; STEIN, 2016). No entanto, a maioria das drogas tem efeitos adversos graves, como constipação, náusea, dependência e outras condições potencialmente perigosas, como depressão respiratória (LEE et al., 2011; MANGLIK et al., 2016). Portanto, estudos sobre o desenho de drogas e desenvolvimento de novos compostos com atividade sobre os receptores opioides e menos efeitos colaterais são altamente necessários. Em nosso trabalho, ao usar a naloxona como antagonista não seletivo de receptores opioides, observamos que o efeito antinociceptivo que as drogas (Sm e Es) não se dava por meio da via opioide, pois não reverteu o efeito antinociceptivo observado pelo tratamento.

Outro modelo de indução da hipernocicepção inflamatória aguda na ATM dos ratos foi com a capsaicina, o ingrediente pungente das pimentas, que estimula seletivamente os neurônios nociceptivos e tem sido amplamente

utilizada para estudar eventos relacionados à dor, atuando nos receptores TRPV1 (TOMINAGA *et al.*, 1999).

Com intuito de estudar a participação dos receptores TRPV1 no mecanismo de ação de Sm e Es, utilizamos o modelo de hipernocicepção inflamatória aguda na ATM induzido por capsaicina. *Stemodia maritima* e estemodina reduziram o comportamento nociceptivo, sugerindo uma efetiva ação antinociceptiva do tratamento. Ademais, houve redução de forma significativa na expressão do TRPV1 no gânglio trigeminal dos ratos que foram pré-tratados com Sm e Es.

Um passo importante para a compreensão da nocicepção foi a clonagem do receptor de capsaicina, o receptor vaniloide TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1). Os canais TRPV1 são uma grande família de canais não seletivos que estão envolvidos na transmissão da dor. Eles funcionam para detectar estímulos externos, como calor (<42 ° C), prótons, voltagem e pressão (LA ROSA-LUGO *et al.*, 2017). TRPV1 estão expressos no sistema nervoso periférico e central, especialmente nos gânglios trigeminais (GT) e no gânglio da raiz dorsal (DRG), giro do hipocampo e do dentado (TOMINAGA *et al.*, 1999; LA ROSA-LUGO *et al.*, 2017). A ativação do TRPV1 resulta em aumento da permeabilidade em relação ao Na⁺ e ao Ca²⁺, aumentando assim, a excitabilidade neuronal (LA ROSA-LUGO *et al.*, 2017). A presença de TRPV1 em articulações foi proposta com base na expressão de TRPV1 em fibras aferentes articulares no interior da articulação temporomandibular de rato (ICHIKAWA *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2015).

De maneira geral, quando ativado pelo calor, por acidose ou por agonistas endógenos (endovaniloide)/exógenos (capsaicina), o TRPV1 abre transitoriamente os canais de sódio e cálcio, possibilitando o influxo dos mesmos, resultando em potenciais de ação que se propagam para a medula espinhal e o cérebro, gerando uma sensação de aquecimento, ardor ou coceira (CORTRIGHT; SZALLASI, 2009; LA ROSA-LUGO *et al.*, 2017).

Sessle, em 2009, conseguiu sensibilizar fibras aferentes que inervam a região facial dos ratos, independentemente se o mesmo induziu a dor com glutamato, capsaicina ou combinação de ambos, mostrando a efetiva ação de capsaicina na indução da dor. Ademais, observou-se um aumento de forma estatisticamente significativa da expressão do TRPV1 no gânglio

trigeminal de ratos com hipernocicepção inflamatória aguda induzida por capsaicina (SESSLE, 2009; LA ROSA-LUGO et al., 2017).

7. CONCLUSÃO

Observou-se que o pré-tratamento com o extrato de *Stemodia maritima* Linne estemodina reduziram a resposta nociceptiva; o extravasamento plasmático; a dosagem de IL-1 β no gânglio trigeminal de ratos com

hipernocicepção inflamatória aguda induzida por formalina, e que Es reduziu a expressão de TRPV-1 no gânglio trigeminal de ratos com hipernocicepção inflamatória aguda induzida por capsaicina. Conclui-se ainda que *Stemodia maritima* e estemodina atuam como agentes antinociceptivos e antiinflamatórios, e que essa resposta não ocorre por meio das vias do óxido nítrico, hemeoxigenase-1 e opioide, mas reduzindo o extravasamento plasmático, com envolvimento da IL-1 β , e provavelmente de receptores TRPV-1.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, F.V., FRANKLIN, K.B. and CONNELL, B. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. *Eur J Pharmacol.* 1986; 126:1414.

ABREU, T. M. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Lectin from Marine Red Alga *Solieria filiformis*. *Thieme E-journals. Sobral*, p. 596-605. maio 2016.

AHRARI, F. et al. The efficacy of low-level laser therapy for the treatment of myogenous temporomandibular joint disorder. *Lasers in medical science*, v. 29, n. 2, p. 551-557, 2014.

AKRAM, M., KIM, K. A., Kim, E.S., SYED, A.S., KIM, C.Y., LEE, J.S., BAE, O.N. Potent Anti-inflammatory and Analgesic Actions of the Chloroform Extract of *Dendropanax morbifera* Mediated by the Nrf2/HO-1 Pathway. *Biol. Pharm. Bull.* 39, 728–36, 2016. doi:10.1248/bpb.b15-00823.

ALCARAZ, M.J.; FERNANDEZ, P.; GUILLEN, M.I. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Desig*, n. 9, p. 2541–2551, 2003.

ALSTERGREN, P., KOOP, S. Prostaglandin E2 in temporomandibular joint synovial fluid and its relation to pain and inflammatory disorders. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58(2)180-6; discussion 186-8.

ALSTERGREN, P. Cytokines in temporomandibular joint arthritis. *Oral Dis.*, v. 6, p. 331-334, 2000.

ALVES, S. M. et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of strontium ranelate on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats depend on TNF- α inhibition. *Pharmacological Reports*, v. 69, n. 4, p. 764-772, 2017.

ANAMARIA SIRIANE DE OLIVEIRA, ET AL. Impacto da dor na vida de portadores de disfunção temporomandibular, *J Appl Oral Sci* 2003; 11(2):138-43

ASAKAWA-TANNE, Y. et al. Effects of enzymatic degradation after loading in temporomandibular joint. *Journal of dental research*, v. 94, n. 2, p. 337-343, 2015.

BARRETO, R. S.S. et al. Evidence for the involvement of TNF- α and IL-1 β in the antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl. (Lamiaceae) essential oil and (-)- α -bisabolol, its main compound, in mice. *Journal of ethnopharmacology*, v. 191, p. 9-18, 2016.

BAUMANN, T.K.; SIMONE, D.A.; SHAIN, C.N.; LAMOTTE, R.H. Neurogenic hyperalgesia: The search for the primary cutaneous afferent fibers that contribute to capsaicin-induced pain and hyperalgesia. *J. Neurophysiol.*

BESSION, M. Screening and treating neurogenic pain. *Revue medicale suisse*, v. 10, n. 415, p. 273-274, 2014.

BIJJEM, K. R. V.; PADI, S. S. V.; LAL SHARMA, P. Pharmacological activation of heme oxygenase (HO)-1/carbon monoxide pathway prevents the development of peripheral neuropathic pain in Wistar rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 386, 79–90, 2013.doi:10.1007/s00210-012-0816-1

BONFANTE, R. Avaliação da hiperalgesia inflamatória na progressão da artrite reumatóide experimentalmente induzida na articulação temporomandibular de ratos. 2013. 34 f. TCC (Graduação) - Curso de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2013.

BORTOLLETO, P.P.B.; MOREIRA, AP.M.; MADUREIRA, P.R. Análise dos hábitos parafuncionais e associação com disfunção das articulações temporomandibulares. *Rev assoc paul cir dente*, v. 67, n. 3, p. 216-21.2013.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Quimica Nova*, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

CAIRNS, B. E .Pathophysiology of TMD pain – basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *J Oral Rehabil*, v.37,n.6, p. 391–410,2010.

CARLESON, J.; ALSTERGREN, P.; APPELGREN, A.; APPELGREN, B.; KOOP, S.; THEODOESSON, E.; LUNDEBERG., T. A model for experimental induction of acute temporomandibular joint inflammation in rats: effects of substância P (SP) on neuropeptide-like immunoreactivity. *Life.Sci.*, v. 59, n. 15, p. 1193-1201, 1996.

CARLSSON, G.E., LERESCHE, L. Epidemiology of temporomandibular disorders. In: *Temporomandibular Disorders and Related Pain Conditions*, edited by Sessle BJ, Bryant PS, and Dionne RA. Seattle, WA: IASP Press,1995, p. 497%u2013506.

CATERINA MJ, SCHUMACHER MA, TOMINAGA M., ROSEN TA, LEVINE JD, JULIUS D. O receptor da capsaicina: um canal iônico ativado por calor na via da dor. *Natureza*. 1997; 389 : 816-824.

CHAKRABARTI, S. et al. Acute inflammation sensitizes knee-innervating sensory neurons and decreases mouse digging behavior in a TRPV1-dependent manner. *bioRxiv*, p. 350637, 2018.

CHAVES HV, LEITÃO AKA, FARRAPO AR, RIBEIRO RA, BRITO GAC. Papel de mediadores inflamatórios na dor, na inflamação e em processos degenerativos da articulação temporomandibular. *JBA. Jornal brasileiro de oclusão, ATM & Dor orofacial*, v. 5, p. 76-84, 2005.

CHAVES HV, RIBEIRO RA, SOUZA AM, RODRIGUES e SILVA AA, GOMES

AS, VALE ML, BEZERRA MM, BRITO GA. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:707985.

CHAVES, H. V. et al. Heme oxygenase-1/biliverdin/carbon monoxide pathway downregulates hypernociception in rats by a mechanism dependent on cGMP/ATP-sensitive K⁺ channels. *Inflammation Research*, p. 1-16, 2018.

CHEN, Yong et al. TRPV4 is necessary for trigeminal irritant pain and functions as a cellular formalin receptor. *PAIN*, v. 155, n. 12, p. 2662-2672, 2014.

CHICRE-ALCÂNTARA, T. C. et al. Local kappa opioid receptor activation decreases temporomandibular joint inflammation. *Inflammation*, v. 35, n. 1, p. 371-376, 2012.

CHIZH, B.A.; O'DONNELL, M.B.; NAPOLITANO, A.; WANG, J.; BROOKE, A.C.; AYLOTT, M.C.; BULLMAN, J.N.; GRAY, E.J.; LAI, R.Y.; WILLIAMS, P.M.; et al. The effects of the TRPV1 antagonist SB-705498 on TRPV1 receptor-mediated activity and inflammatory hyperalgesia in humans. *Pain* 2007, 132, 132–141.

CHRISTIDIS, N. et al. Expression of 5-HT₃ receptors and TTX resistant sodium channels (Na^v1.8) on muscle nerve fibers in pain-free humans and patients with chronic myofascial temporomandibular disorders. *The journal of headache and pain*, v. 15, n. 1, p. 63, 2014.

CHRISTIDIS, N. et al. Repeated tender point injections of granisetron alleviate chronic myofascial pain—a randomized, controlled, double-blinded trial. *The journal of headache and pain*, v. 16, n. 1, p. 104, 2015.

COHEN, STEVEN P.; MAO, Jianren. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *Bmj*, v. 348, p. f7656, 2014.

CORTRIGHT, D. N.; SZALLASI, A. TRP channels and pain. *Current Pharmaceutical Design*, v. 15, n. 15, p. 1736-1749, 2009.

COURA, C. O. et al. Mechanisms involved in antinociception induced by a polysulfated fraction from seaweed *Gracilaria cornea* in the temporomandibular joint of rats. *International journal of biological macromolecules*, v. 97, p. 76-84, 2017.

CUI, M. et al. Os receptores TRPV1 no SNC desempenham um papel fundamental na analgesia de amplo espectro dos antagonistas do TRPV1. *J Neurosci.* 2006; 26 : 9385-9393.

CUI, M.; GOSU, V.; BASITH, S.; HONG, S.; CHOI, S. Polymodal Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Nociceptor: Structure, Modulators, and Therapeutic Applications. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2016, 104, 81–125.

DAMLAR, İ; ESEN, E; TATLI, U. Effects of glucosamine-chondroitin combination on synovial fluid IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE2 levels in internal

derangements of temporomandibular joint. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, v. 20, n. 3, p. e278, 2015.

DI ROSA, M.; RADOMSKI, M.; CARNUCCIO, R.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 172, n. 3, p. 1246 – 1252, 1990.

DE FREITAS, D. G et al. Os efeitos da desativação dos pontos-gatilho miofasciais, da mobilização articular e do exercício de estabilização cervical em uma paciente com disfunção temporomandibular: um estudo de caso. *Fisioterapia em Movimento*, v. 24, n. 1, 2017.

DE GIORGI, ILARIA et al. The use of conventional transcutaneous electrical nerve stimulation in chronic facial myalgia patients. *Clinical oral investigations*, v. 21, n. 1, p. 275-280, 2017.

DE LEEUW R, editor. , ed. *Orofacial Pain: Guidelines for Assessment, Diagnosis, and Management*. 4th ed. Chicago, IL: Quintessence Publishing Co Inc; 2008:1–24

DE SÁ JUNIOR, PAULO FRANCISCO et al. Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos de espécies da família Anacardiaceae. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 15, n. 1, p. 56-61, 2016.

DESIDERÁ, A. C. et al. Laser therapy reduces gelatinolytic activity in the rat trigeminal ganglion during temporomandibular joint inflammation. *Oral diseases*, v. 21, n. 5, p. 652-658, 2015.

DO NASCIMENTO, G. C; LEITE-PANISSI, C. R. A. Time-dependent analysis of nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to persistent inflammation of the temporomandibular joint. *Physiology & behavior*, v. 125, p. 1-7, 2014.

DO VAL, D. R. et al. Tephrosia toxicaria Pers. reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception: The involvement of the HO-1 pathway. *European Journal of Pain*, v. 18, n. 9, p. 1280-1289, 2014.

DUARTE, A. R. et al. The inhibition of heme oxygenase-1 (HO-1) abolishes the mitochondrial protection induced by sesamol in LPS-treated RAW 264.7 cells. *Chemico-biological interactions*, 2018.

EVANS, D. E.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. *J. Bone. Miner. Res.*, v. 11, p. 300 – 305, 1996.

FALACE, D.; REID, K.; RAYENS, M. The influence of deep (odontogenic) pain intensity, quality and duration of incidence and characteristics of referred orofacial pain. *J. Orofacial. Pain*, v. 10, n.3, p. 232 – 239, 1996.

FEHRENBACH, JULIA; SILVA, BETINA SUZIELLEN GOMES DA; BRONDANI, LUCAS PRADEBON. The association of temporomandibular dysfunction with orofacial pain and headache. *Journal Of Oral Investigations*. Passo Fundo, p. 69-78. 12 maio 2018.

FERNANDES, A. I. W. et al. Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. *Elsevier B.v., Sobral*, v. 44, n. 1, p.160-167, mar. 2017.

FERNIHOUGH J, GENTRY C, BEVAN S, WINTER J. Regulação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e TRPV1 em um modelo de osteoartrite em ratos. *Neurosci Lett*. 2005; 388 : 75-80.

FERREIRA, C. L. P; SILVA, M. A. M. R ; FELÍCIO, C. M. Signs and symptoms of temporomandibular disorders in women and men. In: *Codas. Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia*, 2016. p. 17-21.

FERREIRA, F. M. et al. Total temporomandibular joint alloplastic reconstruction. *Revista Dor*, v. 15, n. 3, p. 211-214, 2014.

FERREIRA, M. C. et al. Body posture changes in women with migraine with or without temporomandibular disorders. *Brazilian journal of physical therapy*, v. 18, n. 1, p. 19-29, 2014.

FIORENTINO, P.M., CAIRNS, B.E., HU, J.W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol*. v.44, p. 27-32, 1999.

FISCHER, L.; PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H. A novel method for subarachnoid delivery in the medullary region of rats. *J Neurosci Methods*, v. 148, n. 2, p.108-112, 2005.

FISCHER, L.; CLEMENTE, J. T.; TAMBELI, C. H.; J PAIN. 2007 MAY; 8(5): 437-42. The Protective Role of Testosterone in the Development of Temporomandibular Joint. *J Pain*. v. 8, n. 5, p. 437-442, 2007.

FREITAS, R. S. et al. Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and $\text{tnf-}\alpha$ and $\text{il-1}\beta$ suppression. *International immunopharmacology*, v. 38, p. 313-323, 2016.

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.

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

GARCIA, J. D; OLIVEIRA, A. A . C. A fisioterapia nos sinais e sintomas da disfunção da articulação Temporomandibular (ATM). HÓRUS, v. 6, n. 1, p. 111-122, 2017.

GAUER, R. L.; SEMIDEY, M. J. Diagnosis and treatment of temporomandibular disorders. American family physician, v. 91, n. 6, 2015.

GAVVA NR, KLIONSKY L, QU Y, SHI L, TAMIR R, EDENSON S. Determinantes moleculares da sensibilidade vanilóide no TRPV1. J Biol Chem. 2004; 279 : 20283-20295. [PubMed]

GIRI, A.K., HRUBY, V.J. Investigational peptide and peptidomimetic μ and δ opioid receptor agonists in the relief of pain. Expert Opin. Investig. Drugs 23, 227–41, 2014. doi:10.1517/13543784.2014.856879

GIRO, G et al. Effect of educational and self-care therapies on masticatory performance of women with painful temporomandibular disorder. Revista de Odontologia da UNESP, n. AHEAD, 2018.

GLUZ, I. C et al. Administração aguda de melatonina em ratos Sprague-Dawley submetidos a um modelo de dor crônica orofacial reverte alodinia mecânica. Revista HCPA. Porto Alegre, 2013.

GÓES KRB, GRANGEIRO MTV, FIGUEIREDO VMG. Epidemiologia da disfunção temporomandibular: Uma revisão de literatura. J DENT PUB H. 2018;9(2):115-120.

GRABOWSKI, P. S.; MACPHERSON, H.; RALSTON, S. H. Nitric oxide production in cells derived from the human joint. Br. J. Rheumatol., v. 35, n. 3, p. 207 – 212, 1996.

GRAFF-RADFORD, S. B., BASSIUR, J. P. Temporomandibular disorders and headaches. Neurol. Clin. 2014; 32, 525-537.

GREENE, C. S., 2010. Managing the care of patients with temporomandibular disorders. The Journal of the American Dental Association, 141(9), 1086-1088.

GUI, M.S, RIZZATTI-BARBOSA, C.M. Chronicity factors of temporomandibular disorders: a critical review of the literature. Braz Oral Res [online]., v. 29, n. 1, p. 1-6. 2015.

GÜVEN, O et al. Relationship between activity of glutathione peroxidase and nitric oxide in synovial fluid and the progression of temporomandibular joint internal derangement. Journal of Craniofacial Surgery, v. 26, n. 3, p. e210-e213, 2015.

HAAS, D. A.; NAKANISHI, O.; MACMILLAN, R. E.; JORDAN, R. C.; HU, J. W. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. Arch Oral Biol. 1992; 37(5):417-22.

HARADA, A., SEKIDO, N., AKAHOSHI, T., WADA, T., MUKAIDA, N., AND MATSUSHIMA, K. (1994) Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 56, 559–564.

HOCKLEY, J. R.F et al. Visceral and somatic pain modalities reveal Nav1.7-independent visceral nociceptive pathways. *The Journal of physiology*, v. 595, n. 8, p. 2661-2679, 2017.

HOLMES, W.E., LEE, J., KUANG, W.J., RICE, G.C., AND WOOD, W.I. (1991) Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 253, 1278–1280.

HSU, S. M. et al. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.*, v. 29, p. 1349-1353, 1981.

HUALIN, C. et al. The anti-inflammatory mechanism of heme oxygenase-1 induced by hemin in primary rat alveolar macrophages. *Inflammation*, v. 35, n. 3, p. 1087-1093, 2012.

HUBER, J. P. et al. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA DOR OROFACIAL. *Ação Odonto*, n. 2, 2017.

ICHIKAWA M, NISHIDA S, ONO H. Depth perception from second-order motion stimuli yoked to head movement. *Japan, Vision Research* 44 (2004) 2945–2954.

IMAI ,H., SAKAMOTO, I., YODA, T., YAMASHITA, Y. A model for internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint with experimental traction of the mandibular ramus in rabbit. *Oral Dis.* v.7, p. 185-91, 2001.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. The perception of pain. In: *Essentials of neural science and behavior*. 4^aEd. Chicago: Prentice Hall, p. 472-500, 2000.

KAWAI., Y.; KUBOTA., E.; OKABE., E. Reactive oxygen species participation in experimentally induced arthritis of the temporomandibular joint in rats. *J. Dent. Res.*, v. 79, n. 7, p. 1489-1495, 2000.

KELLESARIAN, S. V. et al. Cytokine profile in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders: A systematic review. *Cytokine*, v. 77, p. 98-106, 2016.

KERINS, C. A.; CARLSON, D. S.; HINTON, R. J.; HUTCHINS, B.; GROGAN, D. M.; MARR, K.; KRAMER, P. R.; SPEARS, R. D.; BELLINGER, L. Specificity of meal pattern analysis as an animal model of determining temporomandibular joint inflammation/pain. *Inter. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2005.

KNOWLES, R. G.; PALACIOS, M.; PALMER, R. M.; MONCADA, S.; Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a traduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 86, n. 13, p. 5159- 5162, 1989.

KODA, K. et al. Sensitization of TRPV1 by protein kinase C in rats with mono-iodoacetate-induced joint pain. *Osteoarthritis and cartilage*, v. 24, n. 7, p. 1254-1262, 2016.

KOPP, S. Neuroendocrine, immune, and local responses related to temporomandibular disordes. *J. Orofac Pain*. 2001; 15:9-28.

KUMAR, ROHIT et al. Berberis aristata Ameliorates Adjuvant-Induced Arthritis by Inhibition of NF- κ B and Activating Nuclear Factor-E2-related Factor 2/hem Oxygenase (HO)-1 Signaling Pathway. *Immunological investigations*, v. 45, n. 6, p. 473-489, 2016.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (eds.) Robbins e Contran. *Patologia – bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 49-90, 1592.

LAMANA, S. M. S. et al. The anti-inflammatory effect of tramadol in the temporomandibular joint of rats. *European journal of pharmacology*, v. 807, p. 82-90, 2017.

LAMAS, S.; MARSDEN, P. A.; LI, G. K.; TEMPST, P.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and caracterirzation of a distict constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 89, n. 14, p. 6348-6352, 1992.

LAROSA-LUGO, VIANEY de et al. Antinociceptive effect of natural and synthetic alkamides involves TRPV1 receptors. *J Pharm Pharmacol.. México*, p. 884-895. abr. 2017.

LERESCHE, L., 2003. Critérios para diagnóstico na pesquisa das desordens temporomandibulares. *Dor Orofacial e Distúrbios Temporomandibulares*. 1ª ed., Editora Santos, cap 13, p 189-203.

LEE, M., SILVERMAN, S., HANSEN, H., PATEL, V., MANCHIKANTI, L.A Comprehensive Review of Opioid-Induced Hyperalgesia. *Pain Physician* 14, 145–161, 2011. doi:10.1017/CBO9781107415324.004

LIN E, CALVANO SE, LOWRY SF – Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 2000;127:117-126.

LITTLE, J. G. Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome. *Nature reviews Rheumatology*, v. 11, n. 11, p. 639, 2015.

LINZ, K., CHRISTOPH, T., TZSCHENTKE, T.M., KOCH, T., SCHIENE, K., GAUTROIS, M., SCHRÖDER, W., KÖGEL, B.Y., BEIER, H., ENGLBERGER, W., SCHUNK, S., DE VRY, J., JAHNEL, U., FROSCH, S. Cebranopadol: a novel potent analgesic nociceptin/orphanin FQ peptide and opioid receptor agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349, 535–48, 2014. doi:10.1124/jpet.114.213694

LOPES, Paulo Raimundo Rosário. Dor e inflamação nas disfunções temporomandibulares: revisão de literatura dos últimos quatro anos. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, Salvador, v. 10, n. 3, p.317-325, dez. 2011.

TOMAS, Magnusson et al. Um Estudo Epidemiológico Longitudinal de Sinais e Sintomas de Disfunções Temporomandibulares de 15 a 35 Anos de Idade. *Journal Of Orofacial Pain*. São Paulo, p. 310-319. mar. 2000.

MAGALHÃES, F. E. A. et al. Orofacial antinociceptive effect of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 97, p. 1575-1585, 2018.

MANGLIK, A., LIN, H., ARYAL, D.K., MCCORVY, J.D., DENGLER, D., CORDER, G., LEVIT, A., KLING, R.C., BERNAT, V., HÜBNER, H., HUANG, X.-P., SASSANO, M.F., GIGUÈRE, P.M., LÖBER, S., DA DUAN, SCHERRER, G., KOBILKA, B.K., GMEINER, P., ROTH, B.L., SHOICHET, B.K. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature* 537, 1–6, 2016. doi:10.1038/nature19112

MARTINEZ, A.L.; GONZALEZ-TRUJANO, M.E.; CHAVEZ, M.; PELLICER, F.; MORENO, J.; LOPEZ-MUNOZ, F.J. Hesperidin produces antinociceptive response and synergistic interaction with ketorolac in an arthritic gout-type pain in rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **2011**, 97, 683–689.

MCINNES, I. B.; LEUNG, B. P.; FIELD, M.; WEI, X. Q.; HUANG, F. P.; STURROCK, R. D.; KINNINMONTHE, A.; WEIDNER, J.; MUMFORD, R.; LIEW, F. Y. Production nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J. Exp. Med.*, v. 184, n. 4, p. 1519 – 1524, 1996.

MCNEILL C. *Temporomandibular Disorders: Guidelines for Classification, Assessment, and Management*. Chicago, IL: Quintessence Publishing Co Inc; 1993:12–30.

MIKAMI, T. et al. Cytopathologic diagnosis on joint lavage fluid for patients with temporomandibular joint disorders. *Diagnostic cytopathology*, v. 42, n. 1, p. 30-36, 2014.

MILLER RJ, JUNG H, BHANGOO SK et al. – Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. *Handb Exp Pharmacol*, 2009;(194):417-449.

MUÑOZ-SÁNCHEZ, J; CHÁNEZ-CÁRDENAS, M. E. A review on hemeoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2014, 2014.

MURPHY, P.M., AND TIFFANY, H.L. (1991) Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 253, 1280–1283.

NEVES, A. F. Papel dos receptores p2x7 presentes nos gânglios sensoriais na dor induzida por inflamação do tecido periférico. 2018. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

NOGUCHI M, KUROSE M, YAMAMURA K, INOUE M , TAGUCHI Y, SESSLE BJ, YAMADA Y. Unilateral application of an inflammatory irritant to the rat temporomandibular joint region produces bilateral modulation of the jaw-opening reflex. *Brain Res Bull.* v.67, p. 182-8, 2005.

NOZAWA-INOQUE, K.; AMIZUKA, N.; IKEDA, N.; SUZUKI, A.; KAWANO, Y.; MAEDA, T.; Synovial membrane in the temporalmandibular joint – Its morphology, function and development. *Arch. Histol. Cytol.*, v. 66, n. 4, p. 289-306, 2003.

OBATA H, EISENACH JC, HUSSAIN H et al. – Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. *J Pain*, 2006;7:816-822

OKAMOTO, K. et al. Estrogen status and psychophysical stress modify temporomandibular joint input to medullary dorsal horn neurons in a lamina-specific manner in female rats. *PAIN®*, v. 154, n. 7, p. 1057-1064, 2013.

OKAMOTO, K. et al. Inhibition of temporomandibular joint input to medullary dorsal horn neurons by 5HT3 receptor antagonist in female rats. *Neuroscience*, v. 299, p. 35-44, 2015.

OKESON, J. P. Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão. 4 .ed. São Paulo: Artes Médicas, 2000.

OKESON, JEFFREY. Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão. Elsevier Brasil, 2013.

OLIVEIRA, CAIO MARCIO BARROS DE et al. Citocinas e Dor. *Rev Bras Anestesiologia*, São Paulo, v. 61, n. 2, p.255-265, abr. 2011.

OLIVEIRA, M. C., PARADA, C. A., VEIGA, M. C., RODRIGUES, L. R., BARROS, S. P., TAMBELI, C. H. Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. *Eur J Pain*. 2005; 9:87–93.

OUANOUNOU, AVIV; GOLDBERG, Michael; HAAS, Daniel A.. Pharmacotherapy in Temporomandibular Disorders: A Review. *Canadian Dental Association*. Toronto, p. 1-8. 08 ago. 2017.

PARK, CHUL-KYU. Maresin 1 Inhibits TRPV1 in temporomandibular joint-related trigeminal nociceptive neurons and tmj inflammation-induced synaptic plasticity in the trigeminal nucleus. *Mediators of Inflammation*, v. 2015, 2015.

PESSOA, C. P. Instrumentos utilizados na avaliação do impacto da dor na qualidade de vida de pacientes com dor orofacial e disfunção temporomandibular. *Revista Baiana de Saúde Pública*, v. 31, n. 2, p. 267, 2014.
PIERRE, CLAVELOU et al. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. Elsevier Science B.v. Clermont-ferrand, France., p. 295-301. set. 1995.

POLUHA, R. L; GROSSMANN, E. Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions. *BrJP.*, v. 1, n. 1, p. 60-65, 2018.

POLUHA, R. L; GROSSMANN, E. Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions. *BrJP.*, v. 1, n. 1, p. 60-65, 2018.
PORPORATTI, A. L. et al. Acupuncture therapeutic protocols for the management of temporomandibular disorders. *Revista Dor*, v. 16, n. 1, p. 53-59, 2015.

PORPORATTI, ANDRÉ LUÍS et al. Acupuncture therapeutic protocols for the management of temporomandibular disorders. *Revista Dor*, v. 16, n. 1, p. 53-59, 2015.

RAEBURN CD, SHEPPARD F, BARSNESS KA et al. – Cytokines for surgeons. *Am J Surg*, 2002;183:268-273.

Rami, H. K. et al. Discovery of SB-705498: a potent, selective and orally bioavailable TRPV1 antagonist suitable for clinical development. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16:3287–3291. [PubMed]

RAMONDA, R. et al. Molecular mechanisms of pain in crystal-induced arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 29, n. 1, p. 98-110, 2015.

REID KI, GREENE CS. Diagnosis and treatment of temporomandibular disorders: an ethical analysis of current practices. *J Oral Rehabil*. 2013;40(7):546-61. <https://doi.org/10.1111/joor.12067>

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

RIBEIRO, Kátia A. et al. Alpha-2 Adrenergic and Opioids Receptors Participation in Mice Gastroprotection of *Abelmoschus esculentus* Lectin. *Current Pharmaceutical Design*, [s.l.], v. 22, n. 30, p.4736-4742, 7 set. 2016. Bentham Science Publishers Ltd..
<http://dx.doi.org/10.2174/1381612822666160201152438>.

ROCHA, A. P. F.; NARDELLI, M. R.; RODRIGUES, M. F. Epidemiology of temporomandibular disorders: study of prevalence of symptomatology and its interrelation with the age and sex of patients. *Rev Serviço*, v.2, p. 5-10, 2002.

RODRIGUES, F.E.A.; ARRIAGA, A.M.C.; LEMOS, T.L.G.; SANTIAGO, G.M.P.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, J. G. M. Estudo químico e avaliação da atividade antibacteriana de *Stemodia maritima* Linn (Scrophulariaceae). 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Anais...2010.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. *Rev. Bra. Farmacologia*, v. 20, n. 6, 2010.

RODRIGUES, F.E.A.; ARRIAGA, A.M.C.; LEMOS, T.L.G.; SANTIAGO, G.M.P.; MAFEZOLI, J.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, J. G. M. Diterpene and other constituents from *Stemodia maritima*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 21, n. 8, p. 1581-1586, 2010.

ROSSATO, M.F.; TREVISAN, G.; WALKER, C.I.; KLAFKE, J.Z.; DE OLIVEIRA, A.P.; VILLARINHO, J.G.; ZANON, R.B.; ROYES, L.F.; ATHAYDE, M.L.; GOMEZ, M.V.; et al. Eriodictyol: A flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochem.Pharmacol.* **2011**, 81, 544–551.

ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain.*1991; 45: 211-6.

ROSS, C. L.; TELI, T; HARRISON, B. S. Electromagnetic Field Devices and Their Effects on Nociception and Peripheral Inflammatory Pain Mechanisms. *Alternative Therapies in Health & Medicine*, v. 22, n. 3, 2016.

ROVERONI, R.C., PARADA, C.A., CECILIA, M., VEIGA, F.A. and TAMBELI, C.H., Developmente of a behavioral model of TMJ pain in rats: The TMJ formalin test. *Pain*, v. 94, p. 185-191, 2001.

RUSSELL, F.A. et al. Stemodin-derived analogues with lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation inhibitory activities. *Phytochemistry*, v. 72, n. 18, p. 2361-2368, 2011.

SCHMID-SCHWAP, M.et al. Sex-specific differences in patients with temporomandibular disorders. *Journal of Orofacial Pain*, v. 27, n. 1, 2013.

SCHMIDT, D. R; FERREIRA, V. R. T; WAGNER, M. F. Disfunção temporomandibular: sintomas de ansiedade, depressão e esquemas iniciais desadaptativos. *Temas em Psicologia*, v. 23, n. 4, p. 973-985, 2015.

SCHMIDT, DIEGO RAFAEL; FERREIRA, VINÍCIUS RENATO THOMÉ; WAGNER, MARCIA FORTES. Disfunção temporomandibular: sintomas de ansiedade, depressão e esquemas iniciais desadaptativos. *Temas em Psicologia*, v. 23, n. 4, p. 973-985, 2015.

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. Mecanismos de dor orofacial no tronco cerebral. In: FRICTON, J. R. e DUBNER, R. *Dor orofacial e desordens temporomandibulares*, São Paulo: Editora Santos, 2003. P. 43-60.

SESSLE, BARRY J.. Mecanismos periféricos e centrais da dor orofacial e suas correlações clínicas. In: ALVES NETO, Onofre et al. *Dor: princípios e prática*. Porto Alegre: Artmed, 2009. Cap. 14. p. 189-204.

SHAVIT Y, FRIDEL K, BEILIN B – Postoperative pain management and proinflammatory cytokines: animal and human studies. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006;1:443-451.

SHEN, Y., ZHANG, Z.J., ZHU, M. Di, JIANG, B.C., YANG, T., GAO, Y.J. Exogenous induction of HO-1 alleviates vincristine-induced neuropathic pain by reducing spinal glial activation in mice. *Neurobiol. Dis.* 79, 100–110, 2015 doi:10.1016/j.nbd.2015.04.012

SHIN, J.H.; LEE, C.W.; OH, S.J.; YUN, J.; LEE, K.; PARK, S.K.; KIM, H.M.; HAN, S.B.; KIM, Y.; KIM, H.C.; et al. Protective effect of silymarin against ethanol-induced gastritis in rats: role of sulfhydryls, nitric oxide and gastric sensory afferents. *Food Chem. Toxicol.* 2013, 55, 353–357.

SILVA, FRANCISCA RENATA LOPES DA. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE *Tephrosia toxicaria* Pers. (Fabaceae) E *Stemodia maritima* Linn. (Scrophulariaceae). 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmacy*, v. 94, p. 18-23, 2013.

SILVA, PF da et al. Avaliação funcional da disfunção temporomandibular após bioestimulação associado à cinesioterapia. *Fisioter Brasil*, v. 13, n. 4, p. 264-271, 2012.

SPIERINGS, E. L.H; MULDER, M. J.H.L. Persistent orofacial muscle pain: Its synonymous terminology and presentation. *CRANIO®*, v. 35, n. 5, p. 304-307, 2017.

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

STEIN, C. Opioid Receptors. *Annu. Rev. Med.* 67, 433–451, 2016. doi:10.1146/annurev-med-062613-093100

SUKEDAI, M.; TOMINAGA, K.; HABU, M.; MATSUKAWA, A.; NISHIHARA, T.; FUKUDA, J. Involvement of tumor necrosis factor- α and interleukin-8 in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 33, n. 2, p. 102-110, 2004.

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

TEIXEIRA, A. H. et al. *Stemodia maritima* L. extract decreases inflammation, oxidative stress, and alveolar bone loss in an experimental periodontitis rat model. *Frontiers in physiology*, v. 8, p. 988, 2017.

TREVISAN, G.; ROSSATO, M.F.; WALKER, C.I.; KLAFKE, J.Z.; ROSA, F.; OLIVEIRA, S.M.; TONELLO, R.; GUERRA, G.P.; BOLIGON, A.A.; ZANON, R.B.; et al. Identification of the plant steroid α -spinasterol as a novel transient Receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012, 343, 258–269.

TOMCZYK, M et al. Modulation of the monocyte/macrophage system in heart failure by targeting heme oxygenase-1. *Vascular pharmacology*, 2018.

TOMINAGA K, ALSTERGREN P, KURITA H, KOPP S. Clinical course of an antigen-induced arthritis model in the rabbit temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med.* V.28(6),p.268-73, 1999.

TORRES-CHÁVEZ. K.E; SANFINS, J.M; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T; PELEGRINI-DA-SILVA, A; PARADA, C. Aet al. Effect of gonadal steroid hormones on formalin-induced temporomandibular joint inflammation. *Eur J Pain.* 2011 Jul 7.

UEMOTO, L et al. Impact of supportive therapy for otological changes in patients with temporomandibular joint disorders. *Revista Dor*, v. 13, n. 3, p. 208-212, 2012.

VAAMONDE.G.C. et al. The nuclear factor-erythroid 2-related factor/heme oxygenase-1 axis is critical for the inflammatory features of type 2 diabetes-associated osteoarthritis. *Journal of Biological Chemistry*, p. jbc. M117. 802157, 2017.

VASCONCELOS, MARGARIDA BOTELHO DE NORONHA DE. PROBLEMAS AUDITIVOS ASSOCIADOS A DISFUNÇÃO TEMPOROMANDIBULAR. 2017. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Medicina Dentária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

VELLY, A.M. et al. Feasibility of a Clinical Trial of Pain-related Temporomandibular Muscle and Joint Disorders: A Survey from the CONDOR

Dental PBRNs. *J Am Dent Assoc.* v. 144(1): e01-e10, jan. 2013.

VELLY, A.M. et al. Feasibility of a Clinical Trial of Pain-related Temporomandibular Muscle and Joint Disorders: A Survey from the CONDOR Dental PBRNs. *J Am Dent Assoc.* v. 144(1): e01-e10, jan. 2013.

VILLELA, C. DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES: ATUALIZAÇÃO FARMACOLÓGICA. *International Journal of Science Dentistry*, v. 1, n. 49, 2018.

VON KO RFF M, ORMEL J, KEEFE FJ, DWORKIN SF. Grading the severity of chronic pain. *Pain.* 1992;50:133–149

VON KORFF M, DWORKIN SF, LE RESCHE L, KRUGER A. An epidemiologic comparison of pain complaints. *Pain.* 1988;32:173–183

WAITE, P. M. E. Trigeminal sensory system. In: PAXINOS, G. *The rats nervous system.* 3^a Ed. Amsterdam: Elsever, 2004. p. 817-851.

WANG, S. et al. Exacerbated mechanical hyperalgesia in rats with genetically predisposed depressive behavior: role of melatonin and NMDA receptors. *PAIN@*, v. 153, n. 12, p. 2448-2457, 2012.

WATKINS LR, MAIER SF – Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev*, 2002;82:981-1011.

WEINBERG, J. B.; MISUKONIS, M. A.; SHAMI, P. J.; MASON, S. N.; SAULS, D. L.; DITTMAN, W. A.; WOOD, E. R.; SMITH, G. H.; MCDONALD, B.; BACHUS, K. E. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide syntetase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, bioproterin and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood*, v. 86, n. 3, p. 1184-1195, 1995.

WERNER-FELMAYER, G.; WERNER, E. R.; FUCHS, D.; HAUSEN, A.; REIBNEGGER, G.; WACHTER, H. Tetrahydrobiopterin-depedent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts. *J. Exp. Med.*, v. 172, n. 6, p. 1599-1607, 1990.

WHELEER, M. A.; SMITH, S. D.; GARCIA-CARDENA, G.; NATHAN, C. F.; WEISS, R. M.; SESSA, W. C. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in humam neutrophils. *J. Clin. Invest.*, v. 99, p. 110-116, 1997.

WU, Y.W et al. Synovial TRPV1 is upregulated by 17- β -estradiol and involved in allodynia of inflamed temporomandibular joints in female rats. *Archives of oral biology*, v. 60, n. 9, p. 1310-1318, 2015.

XU, JIE et al. IL-1 β -regulating angiogenic factors expression in perforated temporomandibular disk cells via NF- κ B pathway. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 45, n. 8, p. 605-612, 2016.

YEON, K.Y.; KIM, S.A.; KIM, Y.H.; LEE, M.K.; AHN, D.K.; KIM, H.J.; KIM, J.S.; JUNG, S.J.; OH, S.B. Curcumin produces an antihyperalgesic effect via antagonism of TRPV1. *J. Dent. Res.* 2010, 89, 170–174.

ZAMMA T. Adjuvant-induced arthritis in the temporomandibular joint of rats. *Infect. Immun.*, v.39, n. 3, p. 1291-1299, 1983.

ZHANG, J.M., AN, J.; Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007;45:27-37.

ZHANG, Y et al. Inhibition of morphine tolerance by MrgC receptor via modulation of interleukin-1 β and matrix metalloproteinase 9 in dorsal root ganglia in rats. *European Journal Of Pharmacology. China*, p. 10-17. nov. 2017.

ZHI, L.; DONG, L.; KONG, D.; SUN, B.; SUN, Q.; GRUNDY, D.; ZHANG, G.; RONG, W. Curcumin acts via transient receptor potential vanilloid-1 receptors to inhibit gut nociception and reverses visceral hyperalgesia. *Neurogastroenterol. Motil.* 2013, 25, e429–e440.