

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio)

DANIELLE ROCHA DO VAL

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UM
COMPOSTO SEMISSINTÉTICO DERIVADO DE *Tephrosia toxicaria* PERS. EM
RATOS**

Recife
2017

DANIELLE ROCHA DO VAL

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UM
COMPOSTO SEMISSINTÉTICO DERIVADO DE *Tephrosia toxicaria* PERS. EM
RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio), Área de Concentração Biotecnologia em Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Bernadete de Sousa Maia

Co-orientadora: Mirna Marques Bezerra

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Val, Danielle Rocha do

Avaliação da segurança e da atividade antinociceptiva de um composto semissintético derivado de Tephrosia toxicaria Pers. em ratos / Danielle Rocha do Val. – Recife: O Autor, 2017.

133 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Bernadete de Sousa Maia

Coorientadora: Mirna Marques Bezerra

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2017.

Inclui referências e apêndices

1. Fitoquímicos 2. Toxicidade- testes 3. Dor orofacial I. Maia, Maria Bernadete de Sousa (orient.) II. Bezerra, Mirna Marques (coorient.) III. Título

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-326

572.2

DANIELLE ROCHA DO VAL

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UM
COMPOSTO SEMISSINTÉTICO DERIVADO DE *Tephrosia toxicaria* PERS. EM
RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio), Área de Concentração Biotecnologia em Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

Aprovado: 03/ 03/ 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete de Sousa Maia (Presidente e Orientadora)
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof^a. Dr^a. Mirna Marques Bezerra Brayner (Examinadora Interna)
(Universidade Federal do Ceará - UFC)

Prof. Dr^a. Gloria Isolina Boente Pinto Duarte (Examinador Externo)
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof^a. Dr^a. Hellíada Vasconcelos Chaves (Examinadora Externa)
(Universidade Federal do Ceará - UFC)

Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto (Examinador Externo)
(Universidade Federal do Ceará - UFC)

Dedico a Deus e aos amores maiores da minha vida:
Meus pais, meus irmãos e minha sobrinha, Maria Isis, que sempre de tão longe
torceram por mim! Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Como conseguir traduzir a grandeza de sentimentos como agradecimento, reconhecimento e gratidão em palavras? Como demonstrar o significado de ser verdadeira e profundamente grata a alguém? Apesar de estar certa que, mesmo com as palavras mais bonitas, seja indescritível manifestar a sinceridade e intensidade da minha gratidão, quero agradecer imensamente as pessoas que, direta ou indiretamente, tornaram os anos que cursei o Doutorado uma das etapas mais positivas, construtivas e importantes da minha vida pessoal e profissional.

Agradeço a Deus primeiramente a força e equilíbrio diante das adversidades enfrentadas no dia-a-dia. Porque sei que Dele tudo parte e tudo depende.

A minha família por todo apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida. Obrigada por todo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

A minha orientadora, Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia, pessoa admirável e profissional inspiradora. Por ter me aceitado como sua orientanda sem me conhecer. Por ter me acolhido com segurança, motivação, entusiasmo e competência. Por me incentivar a sempre buscar o meu melhor. Por me dar foco, direção e objetividade. Por me apoiar e me compreender nos momentos de desespero e tristeza, com palavras de conforto e carinho. Muito obrigada por tudo.

A minha co-orientadora, Dra. Mirna Marques Bezerra, obrigada mais uma vez pela confiança e oportunidade que me foi oferecida, como também pela amizade, pelos sorrisos e pelos excelentes ensinamentos que certamente foram muito além do científico e que contribuíram de maneira muito positiva para a minha formação profissional e pessoal. E, principalmente, por me ensinar humildemente, dia após dia, que cada um é do tamanho dos seus sonhos. Basta acreditar, trabalhar e esperar. Eternamente grata!

A professora Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves, pelos valiosos ensinamentos durante todos esses anos. Você me inspira cada dia buscar o meu melhor! A você, meu respeito, afeto e eterna gratidão...

A Prof. Dra. Ângela Martha Campos Arriaga pela atenção, ensinamentos, ajuda e principalmente pela maneira tão gentil em que sempre me atendeu.

A Prof. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga pela concessão do laboratório de Dor e Inflamação (FOP- UNICAMP).

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), pelos valiosos e inestimáveis ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para as pesquisas e a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pela bolsa concedida.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) - *Campus* Sobral, através do Laboratório de Farmacologia e Laboratório de Patologia/ Histologia, que viabilizou a execução deste trabalho em seus laboratórios e que contribuíram para enriquecer o meu conhecimento científico.

A minhas grandes e melhores amigas, Eglene Aguiar, Mariana Rabelo, Tarcila Mendes, Juliana Moreira, Jordana Alverne, Raphaela Barros, Juliana Freitas por me ensinarem lições para uma vida inteira. Obrigada por mesmo de tão longe mandarem mensagens, e-mails, ligarem me dando apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

A Flaviane Melo que esteve ao meu lado sempre me ajudando nas horas difíceis, tristes e confusas. Quando me virei e comecei a caminhar, você me seguiu para que eu não me perdesse no caminho. E sempre, sempre segurou a minha mão e disse: Dani tudo vai dar certo! Muito obrigada por tudo.

A minha prima, Lilianne Rocha que sempre me recebeu de portas abertas e com um sorriso no rosto juntamente com sua família.

A todos os integrantes do Laboratório de Farmacologia de Sobral. Em especial aos integrantes do Grupo da Artrite, pela dedicação e por contribuírem muito para a minha formação profissional. Obrigada, por tornarem tão agradável a realização deste trabalho.

Ao Isaac Fernandes, Hermany Capistrano, Rodrigo Santos, Mateus Gomes por toda a imensurável ajuda.

Aos técnicos da Universidade Federal do Ceará- *Campus* Sobral em especial a Jordânia Marques, Anderson Weiny, Adalberto Junior, pelo auxílio, competência, excelente trabalho.

Ao corpo Docente das Faculdades Inta em especial, Theodora Thais, Bruna Vieira, Herminia Ponte, Daniele D'avila, Michele Bispo, Regina Carneiro, Alany Rocha, Amélia Romana por todas as palavras de apoio e incentivo. E ao corpo Discente que sempre me estimula a buscar o meu melhor.

Gostaria também de agradecer aos animais de experimentação, pelos quais tenho grande respeito e que deram suas vidas para que este trabalho pudesse ser realizado.

À banca examinadora, pela disponibilidade e atenção dispensada à leitura deste trabalho.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram. O meu carinho e gratidão pela força e confiança. Que Deus abençoe a todos!

"Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente de qualquer jeito."

Martin Luther King

RESUMO

As disfunções temporomandibulares (DTM) abrangem uma série de problemas clínicos que envolvem os músculos mastigatórios e/ou articulação temporomandibular (ATM) e estruturas associadas, sendo a segunda fonte mais comum de dor orofacial. Apesar da farmacoterapia diversa para tratamento das DTMs, nenhuma das intervenções terapêuticas disponíveis na atualidade é curativa, limitando-se, portanto a aliviar os sinais e sintomas da doença. Avaliar a segurança e a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de um composto semissintético derivado de *Tephrosia toxicaria* Pers. Realizou-se processo de hidrogenação da 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromeno-[2",3":7,8]-flavanona para obtenção 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO). Para avaliar os efeitos sistêmicos da administração subaguda, camundongos machos e fêmeas receberam diariamente PHO (10 µg/kg; *per.os* ou *i.p.*) durante 14 dias. O grupo controle recebeu solução salina durante o mesmo período. No 15º dia foi realizada eutanásia para avaliação de parâmetros bioquímicos e posterior análise histopatológica dos órgãos. Na toxicidade aguda camundongos machos e fêmeas em jejum receberam PHO (1, 10 e 100 mg/kg; *per.os* ou *i.p.*) ou solução salina, e foram observados por um período de 48 h. Para avaliação se o efeito farmacológico da PHO (10 µg/kg; *per.os*) interferia na atividade motora dos animais foi realizado o teste do *rota rod* em ratos. Avaliou-se ainda o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de PHO no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM. Ratos foram pré-tratados (*per.os.*) com PHO (0,1, 1 ou 10 µg/kg) 60 min antes da injeção de formalina (1,5%) intraarticular (*i.art.*). O grupo Sham recebeu solução salina (*i.art.*) e o grupo Formalina recebeu formalina (1,5%) (*i.art.*). A resposta comportamental nociceptiva foi avaliada durante um período de observação de 45 min. Os tecidos periarticulares foram coletados para dosagem de TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-10 pelo método ELISA e avaliação da expressão de ICAM-1 e CD55. Além disso, foram realizados os ensaios da análise da permeabilidade vascular. Em outra série de experimentos investigamos o envolvimento da via HO-1 e NO/GMPc/PKG/K+ATP no efeito antinociceptivo de PHO. A partir do processo de hidrogenação, obteve-se 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO) que gerou o depósito de patente do nosso grupo sob número de registro: BR1020130287938 no INPI. PHO 10 µg/kg durante 14 dias não alterou a variação ponderal, o peso úmido dos órgãos e parâmetros bioquímicos em relação ao grupo salina. No teste de toxicidade aguda não ocorreu nenhuma morte em todas as doses administradas. No teste do Rota-rod não houve alteração motora nos grupos tratados com o composto. PHO 10 µg/kg reduziu ($p < 0,05$) a hipernocicepção inflamatória, quando comparado ao grupo formalina. Reduziu o extravasamento plasmático, os níveis TNF-α, IL-1β, IL-8 e aumentou IL-10 nos tecidos periarticulares quando comparado ao grupo formalina ($p < 0,05$). A expressão de ICAM-1 e CD55 foi reduzida após a administração de PHO quando comparado ao grupo não tratado ($p < 0,05$). O efeito antinociceptivo de PHO é multimodal, não atuando pela via do HO-1/GMPc/PKG, porém dependendo da integridade das vias do NO e canais K⁺ sensíveis a ATP. PHO possui atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, Não apresentando toxicidade, com valor biotecnológico para o tratamento de dor orofacial.

Palavras chaves: *Tephrosia toxicaria*. Hipernocicepção. Biotecnológico.

ABSTRACT

Temporomandibular disorders (TMD) encompass clinical conditions involving masticatory muscles and/or the temporomandibular joint (TMJ) as well as the associated structures. Even with the drug therapy available for the TMD treatment, none of the interventions are definitive since the treatments only relieve the symptoms associated with these disorders. To evaluate the safety, antinociceptive and anti-inflammatory activities of a semi-synthetic molecule derived from *Tephrosia toxicaria* Pers. 5-hydroxy-6",6"-dimethyl chroman-[2",3":7,8]-flavone underwent hydrogenation, producing 5-hydroxy-6",6"-dimethyl chromone - [2",3":7,8]-flavone (PHO). To evaluate systemic effects, male and female mice received daily PHO (10 µg/kg; *per.os* or *i.p.*) for 14 days. Negative control groups received saline solution. Animals were euthanised on day 15 to assess biochemical parameters and histopathological analysis of the organs. In the acute toxicity assay, male and female received PHO (10 µg/kg; *per.os* or *i.p.*) or saline solution, and were observed for 48 hours. PHO (10 µg/kg; *per.os*) was also assayed for motor impairment in the rota-rod test in rats. The anti-inflammatory and antinociceptive effects of PHO were assayed in the formalin-induced TMJ inflammatory hypernociception. Rats were pre-treated (*per.os.*) with PHO (0.1, 1 or 10 µg/kg) 60 min before intra-articular formalin (1.5%) injection. Sham groups received saline solution intra-articular injection. Nociceptive responses were evaluated during 45 minutes. Periarticular tissues were excised for TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-10 levels (ELISA) and ICAM-1/CD55 expression. Further, the Evans blue vascular permeability assay was carried out. In another series of experiments, we investigated the involvement of the HO-1 and NO/GMPc/PKG/K⁺ATP pathways in the PHO nociceptive effects. 5-hydroxy-6",6"-dimethyl chromone - [2",3":7,8]-flavone was patented under the registration number (BR1020130287938) at INPI. PHO 10 µg/kg did not alter body mass, wet organ weight, and biochemical parameters after 14 days. In the acute toxicity test, no death episode occurred at the tested doses. The rota-rod test showed no motor impairment. PHO (10 µg/kg) reduced ($p<0.05$) inflammatory hypernociception, vascular permeability, TNF-α, IL-1β, IL-8 levels, and promoted IL-10 level increase in the periarticular tissues. ICAM-1/CD55 expression was reduced after PHO administration. The PHO antinociceptive effect is polymodal, not acting via the HO-1/GMPc/PKG pathway, but depending on the NO and ATP-sensitive K⁺ channels integrity. PHO possesses antinociceptive and anti-inflammatory activities as well as it is not toxic in animals. This product, thus, presents biotechnological relevance in the treatment of orofacial pain.

Keywords: *Tephrosia toxicaria*. Hypernociception. Biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	ILUSTRAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS ATRAVÉS DO ENDOTÉLIO VASCULAR.	24
FIGURA 2 -	MONITORAMENTO DOS TRANSDUTORES NOCICEPTORES DA DOR (NOCICEPTORES) E INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES TECIDUAIS.	31
FIGURA 3 -	FOTO DE <i>Tephrosia toxicaria</i> EM GUARACIABA DO NORTE-CE.	40
FIGURA 4 -	COMPOSTO ISOLADOS E SEMISSINTÉTICO de <i>Tephrosia toxicaria</i>	60
GRÁFICO 1 -	VARIAÇÃO PONDERAL EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM PHO (10µg/kg) DURANTE 14 DIAS CONSECUTIVOS	61
FIGURA 5 -	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS APÓS O TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM PHO (10µg/kg) DURANTE 14 DIAS	63
GRÁFICO 2 -	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DA PHO NO TESTE DO ROTA ROD	64
GRÁFICO 3 -	EFEITO DA PHO NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS WISTAR.	65
GRÁFICO 4 -	EFEITO DA PHO NOS NÍVEIS DE TNF- α , IL-1B, IL-8 E IL-10 NOS TECIDOS PERIARTICULARES	66
GRÁFICO 5 -	EFEITO DA PHO NOS NÍVEIS DE ICAM-1 NOS TECIDOS PERIARTICULARES	67
GRÁFICO 6 -	EFEITO DA PHO NOS NÍVEIS DE CD55 NOS TECIDOS PERIARTICULARES.	68
GRÁFICO 7 -	EFEITO DA PHO NA PERMEABILIDADE VASCULAR NA HIPERNOCICEPÇÃO	69

	INFLAMATÓRIA DA ATM INDUZIDA POR FORMALINA.	
GRÁFICO 8 -	EFEITO DA PHO NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR SEROTONINA NA ATM DE RATOS WISTAR.	70
GRÁFICO 9 -	ENVOLVIMENTO DA HO-1 NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS	71
GRÁFICO 10 -	ENVOLVIMENTO DO NO NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS	72
GRÁFICO 11 -	ENVOLVIMENTO DO GMPC NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO (10MG/KG) NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.	73
GRÁFICO 12 -	ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA KINASE G NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.	74
GRÁFICO 13 -	ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE K ⁺ ATP-DEPENDENTE NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO (<i>per.os</i>) COM PHO	62
(10µg/kg) DURANTE 14 DIAS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E PESOS RELATIVOS DO FÍGADO, CORAÇÃO, RINS E BAÇO DE CAMUNDONGOS. GRUPO CONTROLE RECEBEU APENAS VEÍCULO (SOLUÇÃO SALINA).	
TABELA 2 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO (<i>i.p</i>) COM PHO	62
(10µg/kg) DURANTE 14 DIAS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E OS PESOS RELATIVOS DO FÍGADO, CORAÇÃO, RINS E BAÇO DE CAMUNDONGOS. GRUPO CONTROLE RECEBEU APENAS VEÍCULO (SOLUÇÃO SALINA).	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Ácido Araquidônico

AINES - Anti-Inflamatórios Não Esteroidais

AMPC - Adenosina Monofosfato Cíclico

ATM - Articulação Temporomandibular

ASICs - Canais Iônicos Ácido-Sensíveis

Bk - Bradicinina

BVD – Biliverdina

Ca⁺⁺ - Cálcio

CGRP - Gene de Calcitonina

CO – Monóxido de Carbono

DTM - Disfunções Temporomandibulares

GPMc - Guanilato Monofosfato Cíclico

GRD - Gânglios da Raiz Dorsal

HO - Hemeoxigenase

HO-1 – Hemeoxigenase - 1

HO-2 – Hemeoxigenase - 2

HO-3 – Hemeoxigenase - 3

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor

IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 – Interleucinas 1, 2, 6, 8 e 12, respectivamente

LTs - Leucotrienos

MMP-9 - Matrix Metalloproteinase-9

MPO – Mieloperoxidase

NGF- Fator de Crescimento Nervoso

NK - Células Natural Killer

NO - Óxido Nítrico

NOS - Óxido Nítrico Sintase

OMS - Organização Mundial de Saúde

O₂- Oxigênio Molecular

PAF- Fator de Ativação de Plaquetas

PGs - Prostaglandinas

PGE₂ –Prostaglandina E₂

SNP- Sistema Nervoso Periférico

SNC - Sistema Nervoso Central

SP - Substância P

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

TRPV1- Receptor Vanilóide de Potencial Transitório Tipo 1

TXs - Tromboxanos

ZnPP-IX - Zinco Protoporfirina-IX

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 EMBASAMENTO TEORICO.....	22
2.1 INFLAMAÇÃO.....	22
2.1.1 Atuação de importantes sistemas e vias de regulação endógena na inflamação.....	24
2.1.1.1 Heme – oxigenase.....	24
2.1.1.2 Óxido Nítrico (NO).....	25
2.2 DOR.....	26
2.2.1 Dor inflamatória.....	29
2.2.2 Dor orofacial.....	32
2.3 DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES.....	33
2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA NA ATM.....	34
2.5 PLANTAS MEDICINAIS.....	36
2.6 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE.....	37
2.7 GÊNERO TEPHROSIA.....	38
2.7.1 Considerações Botânicas sobre a espécie <i>Tephrosia toxicaria</i> Pers	39
2.7.1.2 Metabólitos secundários oriundos de <i>Tephrosia toxicaria</i> Pers.....	40
2.8 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E O PROCESSO DE BIOPROSPECÇÃO.....	41
3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	43
4 HIPÓTESES.....	45
5 OBJETIVOS.....	46
5.1 OBJETIVO GERAL.....	46
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
6 METODOLOGIA.....	47
6.1 MATERIAL VEGETAL.....	47
6.2 MODELO ANIMAL E PRINCÍPIOS BIOÉTICOS	48
6.3 TOXICIDADE.....	48
6.3.1 Avaliação da Toxicidade Aguda <i>in vivo</i> de PHO.....	48
6.3.2 Avaliação da Toxicidade Subaguda <i>in vivo</i> de PHO.....	49

6.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA - TESTE DO ROTA ROD.....	49
6.5 EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DE PHO NO MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR (ATM) DE RATOS.....	50
6.5.1 Delineamento experimental.....	50
6.5.2 Injeções intra-articulares	50
6.5.3 Estudo do efeito da PHO na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM - Teste comportamental para avaliação das respostas nociceptivas	51
6.5.4 Grupos experimentais.....	51
6.5.5 Parâmetros avaliados.....	52
6.5.5.1 Dosagem de TNF α , IL-1 β , IL-8 e IL-10 nos tecidos periarticulares	52
6.5.5.2 Expressão protéica de (ICAM-1) e CD55.....	53
6.5.5.3 Extração de proteínas.....	53
6.5.5.4 Dosagem de proteína.....	53
6.5.5.5 Western Blotting.....	54
6.6 ANÁLISE DA PERMEABILIDADE VASCULAR POR EXTRAVASAMENTO DE AZUL DE EVANS.....	55
6.7 EFEITO DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR SEROTONINA NA ATM.....	56
6.7.1 Grupos experimentais.....	56
6.8 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA HO-1 NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM	56
6.8.1 Grupos experimentais.....	57
6.9 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA NO/GMPC/PKG/K+ATP DEPENDENTE NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM	57
6.9.1 Grupos experimentais.....	58
6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
7 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	60

7.1	MOLÉCULA SEMISSINTÉTICA 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO)	60
7.2	AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA.....	60
7.2.1	Avaliação da toxicidade aguda.....	60
7.2.2	Avaliação da toxicidade subaguda.....	61
7.3	EFEITO DO COMPOSTO SEMISSINTÉTICO PHO NO TESTE DO ROTA ROD.....	63
7.4	PHO INIBE HIPERNOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS	64
7.5	EFEITO DA PHO NOS NÍVEIS DE TNF- α , IL-1B, IL-8 E IL-10 NOS TECIDOS PERIARTICULARES APÓS A INDUÇÃO DA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	65
7.6	EFEITO DA PHO NA EXPRESSÃO PROTEICA DE ICAM-1 NOS TECIDOS PERIARTICULARES.....	66
7.7	EFEITO DA PHO NA EXPRESSÃO PROTEICA DE CD55 NOS TECIDOS PERIARTICULARES.....	67
7.8	PHO REDUZ PERMEABILIDADE VASCULAR NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	68
7.9	PHO INIBE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR SEROTONINA NA ATM DE RATOS	69
7.10	ENVOLVIMENTO DA HO-1 NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	70
7.11	ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	71
7.12	ENVOLVIMENTO DO GMPC NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	72
7.13	ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA KINASE G NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	73

7.14 ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE POTÁSSIO ATP-DEPENDENTES NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.....	74
8 DISCUSSÃO.....	76
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
REFERENCIAS	85
APÊNDICE.....	103
APÊNDICE A - ARTIGO DERIVADO DA TESE.....	103
APÊNDICE B - Comprovante de Submissão do Artigo.....	132
APÊNDICE C – Comprovante Depósito de Patente.....	133

1 INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência complexa e pessoal, refletindo um conjunto de condições psicossociais, fisiológicas, genéticas e culturais, perpassando os processos fisiológicos e fisiopatológicos até o processamento emocional e cognitivo no cérebro humano (JULIUS; BASBAUM, 2001). A dor serve como um importante sinal de alerta ao dano tecidual, resultante de um trauma acidental, infecção ou inflamação, por exemplo. Geralmente, a dor desaparece após o tecido lesado estar cicatrizado (SESSE, 2012).

A dor nas estruturas articulares e musculares em pacientes com disfunções temporomandibulares (DTM), portanto, é uma fonte comum de dor orofacial crônica, o que pode levar à ausência ou insuficiência de trabalho ou interações sociais, resultando em uma redução na qualidade de vida das pessoas acometidas (GREENE *et al.*, 2010). Estima-se que 3 e 15% da população possui (DTM) (BENDER, 2014). Aliado a isso, estudos epidemiológicos ressaltaram a prevalência da dor orofacial na população indicando diferenças de gênero nas respostas clínicas e experimentais de dor (GONÇALVES *et al.*, 2010; FILLINGIM *et al.*, 2006). Estima-se que mulheres apresentem maior prevalência de dor orofacial e outras sintomatologias de DTM que homens, com proporções de 2 a 6 mulheres para cada homem (ROCHA; NARDELLI; RODRIGUES, 2002; SCHMID-SCHWAP *et al.*, 2013).

Dentre os tratamentos disponíveis atualmente, vários fármacos se destinam ao controle da dor, incluindo os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), agentes semelhantes à morfina (opioides), os anestésicos e várias substâncias não opióides. Podemos citar também a laserterapia, acupuntura, placas oclusais. Sabe-se que essa terapêutica é embasada na fisiopatologia da dor orofacial e que ainda, apesar do curso extremamente incapacitante das DTM, nenhuma das intervenções terapêuticas disponíveis na atualidade é curativa, limitando -se, portanto a aliviar os sinais e sintomas da doença (CAIRNS, 2010; OKESON, 2000; MICHELOTTI; IODICE, 2010). Essa realidade estimula cada vez mais os pesquisadores a tentar entender os mecanismos moleculares associados a DTM e buscar novas terapias para o controle da dor inflamatória.

Sabendo que o conhecimento sobre produtos naturais é, muitas vezes, o único recurso terapêutico de variadas comunidades e grupos étnicos em todo o mundo, e

que há necessidade de novas abordagens terapêuticas para tratamento das condições dolorosas inflamatórias advindas da articulação temporomandibular (ATM), a pesquisa de recursos naturais tem-se revelado promissora na descoberta de ferramentas farmacológicas que podem ser utilizadas para testes de novas substâncias ou mesmo em testes diagnósticos. Essa prática vem despertando nas últimas décadas a atenção da comunidade científica na perspectiva de avaliar a eficácia e segurança além de prospectar esses recursos naturais.

Diversos estudos reportam experimentalmente a utilização de produtos naturais em modelos de hipernocicepção induzida na ATM de ratos para avaliação do efeito biológico destes compostos bem como os mecanismos moleculares envolvidos durante o processo nosológico (VAL *et al.*, 2014; RIVANOR *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2016; COURA *et al.*, 2017; ARAUJO *et al.*, 2017).

Assim este trabalho teve como objetivo avaliar a segurança e a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de um composto semissintético derivado de *Tephrosia toxicaria* Pers.

2 EMBASAMENTO TEÓRICO

2.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação é reconhecida como um processo fisiológico que ocorre no tecido conjuntivo sensoriais e nos constituintes celulares e extracelulares desse tecido. (TRACEY, 2002; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006). Estímulos biológicos, físicos, químicos e/ou alguma combinação destes podem gerar um processo inflamatório de causa não específica no tecido acometido (ZHOU *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2009). Atualmente, a inflamação tornou-se um dos principais focos da pesquisa científica mundial em todas as doenças humanas e animais (IBRAHIM *et al.*, 2013).

A resposta inflamatória é considerada um processo essencial na homeostase do organismo. Tal processo é considerado biossinteticamente ativo e regulado por vias de ativação, mediadores bioquímicos e lipídicos com atividades “pró-resolutivas”, cujo objetivo é neutralizar o agente causador (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010; SERHAN; PETASIS, 2011). Vários são os componentes envolvidos nesta resposta inflamatória, tais como proteínas plasmáticas, células circulantes (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas), vasos sanguíneos e componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo (mastócitos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, proteínas fibrosas estruturais, glicoproteínas de adesão e proteoglicanos) (KUMAR; SHARMA, 2010). Este processo pode ser encarado como um mecanismo de defesa do organismo, permitindo abrir caminhos para os processos de reparação, com a cicatrização e a regeneração do tecido afetado (TIZARD, 2002). Entretanto, apesar de extremamente necessário, esse processo poderá em determinadas situações se exacerbar, levando a efeitos deletérios (GILMAN *et al.*, 2006).

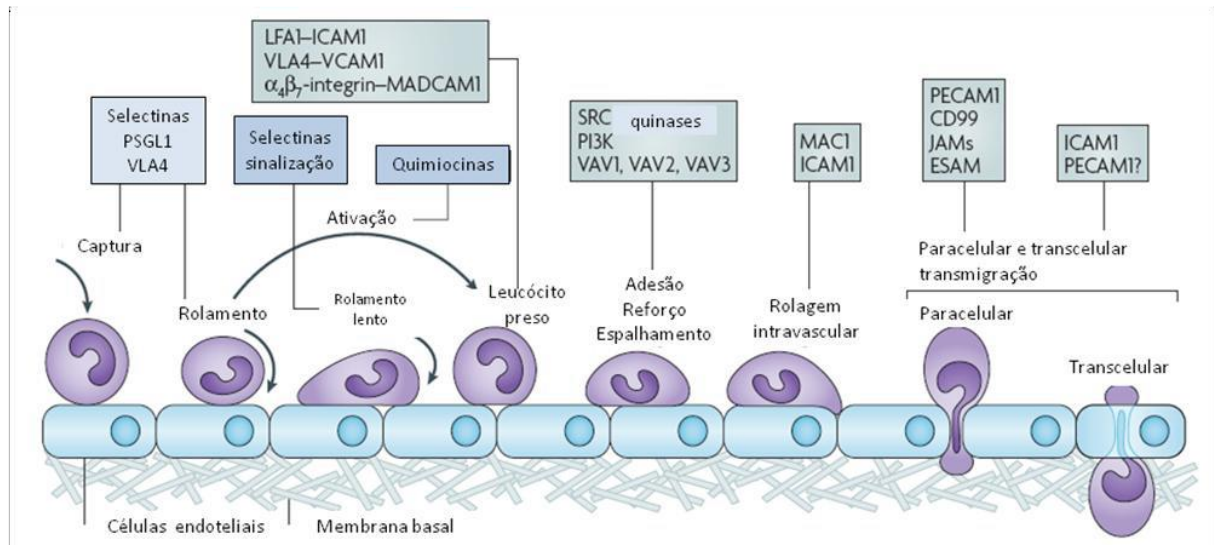
O processo inflamatório envolve eventos vasculares e celulares que ocorrem simultaneamente (MCEVER, 1992; MALIK; LO, 1996; LEES *et al.*, 2004). Logo após o dano, uma série de alterações ocorrem, iniciando com os eventos vasculares, como o aumento do fluxo sanguíneo (vasodilatação) e da permeabilidade vascular mediados por aminas vasoativas, histamina, serotonina e óxido nítrico (NO), produzido por células do endotélio vascular, 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 as proteínas do sistema complemento (C3a e C5a), a substância P, entre outros. Adicionalmente, estes eventos permitem que um exsudato rico em proteínas e água extravase para o espaço extra vascular (VIVIER; MALISSEN, 2005).

O líquido extravasado durante o processo inflamatório é formado por produtos de cascatas proteolíticas (sistema complemento, sistema de coagulação, sistema fibrinolítico e sistema de cininas). Este exsudato inflamatório local é constituído de proteínas do plasma e leucócitos (principalmente neutrófilos). Os leucócitos que, normalmente ficam restritos aos vasos sanguíneos, com o aumento da permeabilidade, vão ter acesso, através da vênulas pós-capilares, ao local da infecção (ou lesão) (ROCK; KONO, 2008).

Dentre os eventos celulares, a migração leucocitária (**Figura 1**) acontece após a ativação do endotélio. As diversas selectinas permitem a adesão fraca dos neutrófilos, as integrinas promovem a adesão forte e as quimiocinas ativam e estimulam a migração dos neutrófilos para o foco inflamatório. Estas interações fazem com que os neutrófilos rolem pela parede do vaso e sejam expostos aos fatores quimiotáticos. O gradiente quimiotático crescente direciona a migração dos neutrófilos ao sítio inflamatório. Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas denominadas moléculas de adesão e de mediadores quimiotáticos (TNF- α , IL-1, IL-8, IL-12, IFN- γ), que ativam e atraem macrófagos, monócitos, células dendríticas e células natural killer (NK) para o local da infecção (SPRINGER, 1994; BENNOUNA *et al.*, 2003; KUMAR; SHARMA, 2010). Simultaneamente a este processo, mediadores lipídicos também são produzidos. Estes mediadores são derivados do ácido araquidônico; são produzidos em consequência da ativação de fosfolipases que clivam fosfolipídios constituintes da membrana celular, gerando prostaglandinas, leucotrienos e PAF (fator de ativação plaquetária). As prostaglandinas produzidas têm funções inflamatórias que induz a febre, a hiperalgesia e a vasodilatação (MESQUITA JR *et al.*, 2008).

Figura 1: Ilustração da migração de leucócitos através do endotélio vascular.



Fonte: Adaptado de LEY *et al*, 2007.

2.1.1 Atuação de importantes sistemas e vias de regulação endógena na inflamação

2.1.1.1 Heme-oxigenase

Felizmente, os sistemas biológicos dispõem de vias contra-regulatórias que também modulam a resposta inflamatória, ativando sistemas de defesa em células expostas ao estresse, promovendo um feedback negativo na ativação celular e geração de mediadores inflamatórios. Neste sentido, a via da hemeoxigenase (HO) e do óxido nítrico mostram sua relevância, assim como a via opioide (CHAVES *et al.*, 2011).

Três isoformas da HO (HO-1, HO-2 e HO-3) foram identificadas (MAINES *et al.*, 1988; MCCOUBREY *et al.*, 1997). A ativação de 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). HO-2 e HO-3 são as formas constitutivas expressas na maioria dos tecidos (MCCOUBREY *et al.*, 1992; 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 da via da HO-1/BVD/CO.

O CO exibe algumas propriedades semelhantes ao NO, incluindo a geração de GPMc (guanilato monofosfato cíclico), atuando na regulação no tônus vascular, sinalização neuronal (neurotransmissor e neuromodulador), inibição de apoptose e da síntese de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, NO e PGs (MCCOUBREY *et al.*, 1997; MORITA *et al.*, 1995; MAINES, 1997; PETRACHE *et al.*, 2000; OTTERBEIN *et al.*, 2000; BARANANO; SNYDER, 2001). Além disso, o CO reduz respostas inflamatórias em diversos modelos de estresse oxidativo (OTTERBEIN *et al.*, 2003).

Foi observado que a indução farmacológica de HO-1 reduziu edema articular, degradação da cartilagem e proliferação de tecidos inflamados articulares, além de reduzir níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF α , a secreção de PGE2 e a atividade de MMP-9 (BENALLAOUA *et al.*, 2007). Esse mesmo grupo de pesquisa, entretanto, mostrou, em artrite induzida por colágeno, que tanto inibidores da HO-1 quanto compostos capazes de liberar CO promovem redução do infiltrado celular inflamatório, da inflamação articular e da destruição articular, assim como redução dos níveis de IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α e PGE2, mostrando a importância de compostos que liberam CO no tratamento da artrite (FERRÁNDIZ *et al.*, 2008; IBÁÑEZ *et al.*, 2011). Há evidência também da participação da via hemeoxigenase-1/monóxido de carbono/GMPc na modulação tanto periférica quanto espinhal da dor inflamatória e não inflamatória (STEINER *et al.*, 2001; NASCIMENTO; BRANCO, 2007; 2008; CARVALHO *et al.*, 2011).

2.1.1.2 Óxido Nítrico (NO)

Outra via sinalizadora da resposta imune-inflamatória é a via do óxido nítrico (NO). O NO é formado através de uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em que o oxigênio molecular (O₂) é fonte do oxigênio e a L-arginina é a fonte do nitrogênio de seu grupo guanidino terminal (MONCADA *et al.*, 1991).

Três isoformas distintas da NOS foram identificadas: uma isoforma neuronal (NOSn), inicialmente isolada do cérebro (BREDT *et al.*, 1991; SESSA *et al.*, 1992), uma endotelial (NOSe), isolada do endotélio (LAMAS *et al.*, 1992) e uma isoforma induzida (NOSi), isolada inicialmente de macrófagos (XIE *et al.*, 1992). A NOSn e NOSe são expressas constitutivamente em seus tecidos de origem, portanto referidas como NOS constitutivas (NOSc), enquanto a NOSi é expressa durante processos patológicos. O NO pode ainda ser gerado independente de enzimas a partir do nitrito no ambiente ácido do estômago e farmacologicamente por compostos doadores de NO usados clinicamente como vasodilatadores (MONCADA *et al.*, 1993).

Ademais, sabe-se que a elevação dos níveis intracelulares de GMPc, gerados a partir do NO, inibe a hipersensibilidade do nociceptor (CUNHA *et al.*, 1999; BEZERRA *et al.*, 2007), e que essa ação se dá pelo aumento da condutância de íons K⁺ pela abertura de canais de potássio sensíveis à ATP direta ou indiretamente pela via da proteína kinase G (SACHS *et al.*, 2004).

O NO é produzido pelas células residentes articulares sinoviócitos e condrócitos, assim como por osteoblastos e osteoclastos, e também por células inflamatórias presentes durante patologias, de forma constitutiva ou induzida por mediadores como IL-1 e TNF- α (STADLER *et al.*, 1991; MCINNIS *et al.*, 1996; EVANS; RALSTON, 1996). Alguns autores demonstraram um efeito dual do NO em modelo de artrite induzida pela injeção de zymosan em joelho de ratos, uma vez que a administração local de um doador de NO reduziu a dor inflamatória nesse modelo (ROCHA *et al.*, 2002). Além disso, nesse mesmo trabalho os autores demonstraram que a administração profilática de inibidores da NOS reduziu a dor inflamatória (ROCHA *et al.*, 2002). O NO pode desempenhar um papel pronociceptivo da dor inflamatória na região orofacial. Vários estudos têm indicado uma correlação entre a produção e a geração e/ou manutenção da dor crônica, incluindo distúrbios da articulação temporomandibular. Alguns autores tem demonstrado que o inibidor da NOS reduziu significativamente a hiperalgesia em dor orofacial induzida por formalina (JUNG *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2012).

2.2 DOR

A dor é um dos mais importantes sintomas de muitas patologias, sendo uma experiência complexa, que envolve não somente a transdução do estímulo nocivo proveniente do meio externo, mas também diversos elementos como emoção, cognição, memória e o próprio meio social (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; FARQUHAR-SMITH, 2007). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), define a dor como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano presente ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. (LOESER; MELZACK, 1999; RAINVILLE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Sua cronificação, pode ser experimentada por 30% dos adultos (BREIVIK, *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2014) pode causar sofrimento e ainda comprometer a qualidade de vida, limitando-os muitas vezes de suas atividades laborais (STEWART *et al.*, 2006), o que implica aumento dos gastos financeiros para os serviços públicos de saúde, pois é considerada o principal motivo de procura aos mesmos (WITTE; STEIN, 2010).

Atualmente, sabe-se que a dor resulta geralmente da sinalização de estímulos nocivos, que se inicia em estruturas localizadas no sistema nervoso periférico (SNP) e é conduzida até diferentes locais do sistema nervoso central (SNC), fazendo com que ocorra uma reação neurossensorial descrita como percepção ou sensação dolorosa (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al.*, 2009). Esta sensação exerce um importante papel fisiológico, pois alerta o organismo que indica a presença de um estímulo lesivo e que aciona respostas protetoras apropriadas (WOOLF, SALTER, 2000; JULIUS, BASBAUM, 2001; MILLIGAN; WATKINS, 2009).

A dor inicia-se com o estímulo nociceptivo, que ativa ou sensibiliza os nociceptores, que então levam a informação da periferia para o SNC através das fibras nociceptivas (SANDKUHLER, 2009). As fibras aferentes de primeira ordem foram classificadas em termos de estrutura, diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução em A α e A β , A δ ou C (COSTIGAN; WOOLF, 2000, JULIUS; BASBAUM, 2001; ZEILHOFER; BENKE; YEVENES, 2012). As fibras mielinizadas A α e A β representam proprioceptores e receptores mecânicos de baixo limiar e são especializadas na condução do estímulo mecânico inócuo. As fibras A δ do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53°C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores à 43°C. A maioria das fibras C também é polimodal, (ativados por estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos). Algumas são

insensíveis a estímulos mecânicos, mas respondem ao calor nocivo. Os corpos celulares destes neurônios primários da dor localizam-se nos gânglios da raiz dorsal, no gânglio trigêmio e no gânglio nodoso, e seus axônios projetam-se para uma variedade de alvos periféricos, incluindo a pele e as vísceras (BAUTISTA; PELLEGRINO; TSUNOZAKI, 2013).

Os receptores da dor, também conhecidos como nociceptores, que segundo a IASP (2011) são definidos como terminações nervosas de alto limiar sensorial do sistema nervoso periférico somatossensorial capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos. O termo nocicepção é definido como sendo o processo neural de codificação e processamento dos estímulos nocivos (IASP, 2011). Os nociceptores polimodais respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, são ativados por muitos tipos de danos teciduais, e estão associados com dor prolongada e conduzem a dor lenta. Grande quantidade das fibras C, contém uma variedade de neuropeptídeos, incluindo substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) e expressa receptores de neurotrofina tirosina quinase. Outra classe de fibras sensitivas são as fibras mielinizadas A δ que são ativadas por sensibilização mecânica e térmica e conduzem a dor rápida (FARQUHAR-SMITH, 2007). Existem também os nociceptores silenciosos, que são normalmente inativos e irresponsivos ao estímulo nociceptivo agudo, porém tornam-se ativados e sensibilizados gradualmente durante a resposta nociceptiva e inflamatória (DRAY, 1997; HUNT; MANTYH, 2001; COUTAUX *et al.*, 2005).

As respostas dos nociceptores aos estímulos resultam na despolarização da fibra nervosa aferente, desencadeando potenciais de ação, cuja formação e propagação são dependentes de canais iônicos, tais como canal de sódio dependente de voltagem (DIB-HAJJ *et al.*, 2010). Além disso, substâncias endógenas, como ácido araquidônico (AA), substância P (SP), óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), neuropeptídeos (substância P), cininas (bradicinina (Bk), podem ativar periféricamente os nociceptores.

As fibras sensitivas A δ e C, ao levarem informações da periferia para o sistema nervoso central, fazem conexões com neurônios de segunda ordem localizados nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal (lâminas I, II e V), resultando na liberação de neurotransmissores (BASBAUM *et al.*, 2009). Os neurônios de segunda ordem, por sua vez, integram as vias supra-espinhais, distribuindo, desta

maneira, informações para circuitos cerebrais responsáveis pelos diferentes componentes da dor (sensorial e emocional) (HUNT; MANTYH, 2001; PRICE, 2002).

No corno dorsal da medula diversas substâncias, neurotransmissores e/ou neuromoduladores, estão envolvidas na transmissão central e na modulação da resposta nociceptiva, como o glutamato, a substância P, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e o óxido nítrico (NO) (OLIVEIRA; SILVA, 2009). Estas substâncias, por sua vez, são liberadas e/ ou sintetizadas em elevadas concentrações no ambiente tecidual em decorrência de diversos processos inflamatórios.

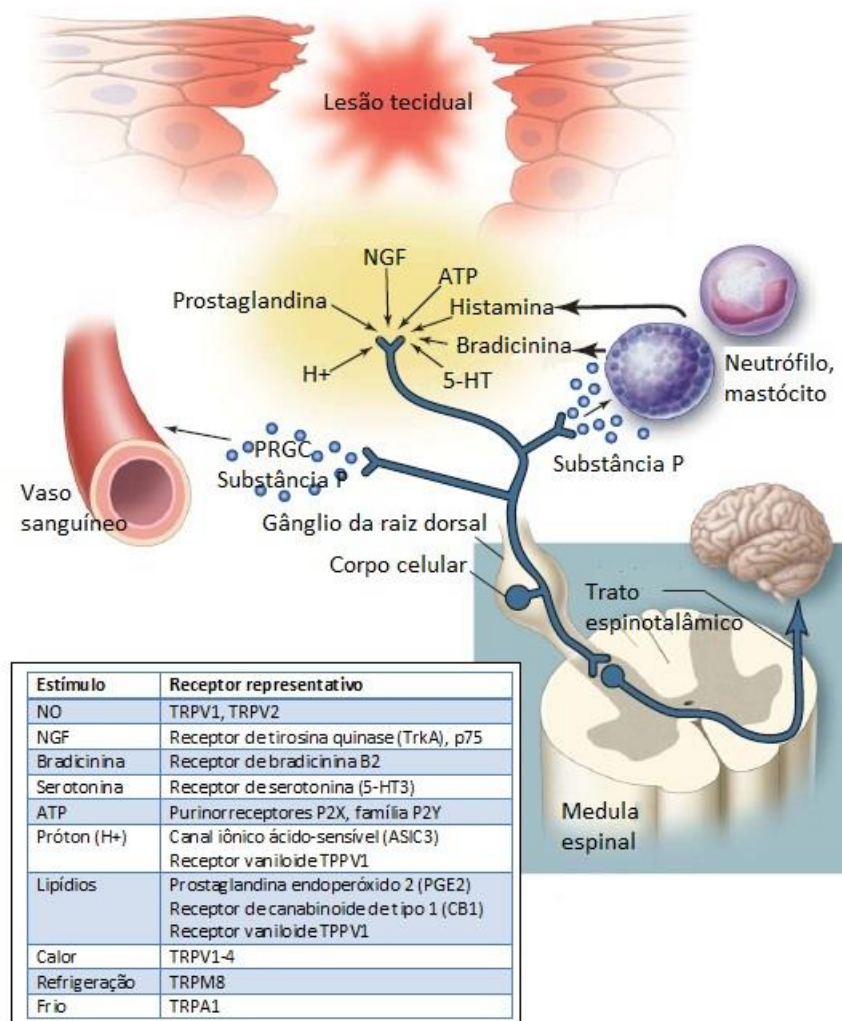
2.2.1 Dor inflamatória

A dor é um dos cinco sinais clássicos do processo inflamatório, decorrente de estímulos inflamatórios ou lesões teciduais. Consequentemente, a lesão tecidual geralmente ocorre associada ao acúmulo de mediadores endógenos liberados de nociceptores ativados ou de células não-neuronais que residem ou, principalmente, que infiltram na área lesionada, como macrófagos e neutrófilos, entre outros. A liberação da sensibilização periférica é comumente resultante de alterações associadas ao processo inflamatório, como alteração no padrão de mediadores químicos que podem atuar na fibra nervosa (WOOLF; SALTER, 2000).

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 iniciação da ativação dos nociceptores (bradicinina, histamina, estimulações mecânica e térmica atuando diretamente nos nociceptores causando a hiperalgesia, resultado da 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, 2007; LOESER; TREDE, 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^{++} (LORENZETTI; FERREIRA, 1985).

Moléculas sinalizadoras como neuropeptídeos (substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), bradicinina, aminas simpatomiméticas, eicosanoides (prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TXs), endocanabinóides, neurotrofinas, citocinas, e quimiocinas, proteases e prótons, dentre outros (Figura 2) (CALIXTO *et al.*, 2004; BASBAUM *et al.*, 2009; LINLEY *et al.*, 2010) presentes no sistema vascular, células imunes, tecido lesado e adjacentes, nervos sensoriais e nos nervos simpáticos. Esses mediadores atuam em seus respectivos receptores pró-inflamatórios e pró-nociceptivos, tais como receptores NK-1 (FURST, 1999; LOFGREN, QI; LUNDEBERG, 1999; TURNBACH; RANDICH, 2002), TRPV1 (FERREIRA *et al.*, 1993; MATHIS; CRISCIMAGNA; LEEB-LUNDBERG, 1996; AUSTIN *et al.*, 1997). Alguns destes são acoplados a proteína G e induzem a formação de segundos mensageiros, outros são acoplados a canais iônicos regulando a permeabilidade e a concentração celular de íons (SCHAIBLE *et al.*, 2011; PETHO; REEH, 2012).

Figura 2. Monitoramento dos transdutores nociceptores da dor (nociceptores) 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). Mediadores como as citocinas são liberados, entre elas, as mais importantes são IL-1 β , IL-6 e TNF- α (RITTNER; MACHELSKA; STEIN, 2005; BASBAUM *et al.*, 2009). Embora exista discussão das evidências de uma ação direta dessas citocinas sobre os nociceptores, a contribuição delas para hipersensibilidade primária à dor resulta principalmente da potencialização da resposta inflamatória e aumento da produção de

agentes pro-algésicos (como as prostaglandinas, o NGF, a bradicinina e prótons extracelulares). Além disso, sabe-se que a ativação principalmente de receptores TRP (TRPV1 – vanilóide e TRPA1 - anquirina) e ASICs são importantes na ativação de nociceptores durante a inflamação, sendo eles responsáveis também por sintomas como alodínia e hiperalgesia (BASBAUM *et al*, 2009). Entretanto, as citocinas podem desempenhar um papel importante na geração e manutenção da dor evocada pela inflamação, pelo menos em parte, através dos efeitos diretos sobre seus receptores localizados em fibras aferentes primárias (SCHAIBLE *et al*, 2010).

2.2.2 Dor orofacial

A dor na região oral ou craniofacial representa um grande problema de saúde uma vez que a dor é a razão número um para a procura de tratamento, sendo um importante indicador de saúde (HARGREAVES, 2011). A dor orofacial, por sua vez, é descrita como toda dor associada a tecidos moles ou mineralizados da cavidade oral e da face ou descrita como dores referidas a essa região envolvendo estruturas como pele, vasos sanguíneos, ossos, dentes, periodonto, articulações, glândulas, estruturas nervosas, músculos, córnea, meninges, seios da face e mucosa nasal, segundo a Sociedade Brasileira de Cefaleia (SBC, 2010).

A dor orofacial envolve um grande grupo de condições como disfunção temporomandibular (DTM), cefaleias secundárias, neuropatias, dores odontogênicas e advindas da mucosa oral e dor facial idiopática (SHINAL; FILLINGIM, 2007). Alguns estudos estimam que cerca de 20% da população é afetada por algum tipo de dor orofacial, considerando a prevalência alta (MACFARLANE *et al.*, 2002). Enquanto a maioria destes será de origem odontogênica, mais de 5% pode ser considerada crônica, com maior incidência em pacientes mais idosos (ZAKRZEWSKA, 2010).

Sua presença ou sua cronificação, portanto, pode comprometer a qualidade de vida dos pacientes, alterando suas atividades profissionais, afetando suas relações emocionais, sociais e familiares e implicando ainda aumento dos gastos financeiros para os serviços públicos de saúde (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Das condições dolorosas da região orofacial, merece destaque as disfunções temporomandibulares (DTM), que são a maior causa de dor não dental na região

orofacial (MAGNUSSON *et al.*, 2000), sendo esta de grande relevância científica e social, já que acomete mais de 33% da população (MCNEILL, 2003) e é muitas vezes refratária aos tratamentos existentes. Por sua origem ser multifatorial, muitos estudos buscam definir os mecanismos predisponentes, causais e perpetuantes desta patologia. Entretanto, a avaliação e descrição da dor relacionada à disfunção da articulação temporomandibular precisam ser melhores esclarecidas (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

2.3 DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES

A artrite na articulação temporomandibular (ATM) se apresenta como um dos diagnósticos diferenciais nas disfunções temporomandibulares (DTM) que, por sua vez, engloba um grupo de condições musculoesqueléticas e neuromusculares envolvendo as ATMs, os músculos mastigatórios e todos os tecidos associados (GREENE *et al.*, 2010). Trabalhos têm relatado que a dor é a sintomatologia mais importante, seguido por limitação de movimentos mandibulares limitados que podem causar dificuldade em comer ou falar além de cefaleia secundária, dor cervical, sintomas otológicos como zumbido, otalgia, barohipoacusia 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 (GREENE *et al.*, 2010). Apesar do curso extremamente incapacitante das DTM, nenhuma das intervenções terapêuticas disponíveis na atualidade é curativa, limitando-se, portanto a aliviar os sinais e sintomas da doença (CAIRNS, 2010).

Estudos epidemiológicos mostram que a prevalência de DTM na população é maior que 5% (GHALI *et al.*, 2012). Estudos mostram ainda que 40 a 70% da população podem apresentar sinais e sintomas de DTM, destacando a alta prevalência do gênero feminino, enfatizada em vários estudos (SHAEFER, *et al.*, 2013).

A etiologia e patogênese desta condição é mal compreendida. 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 α (TNF- α) e as interleucinas IL-1, IL-6, IL-12, e IL-17, que contribuem para uma remodelação articular assim como uma degradação da cartilagem (VERNAL *et al.*, 2008). A liberação destas citocinas facilitam a liberação de prostanóides e aminas simpatomiméticas que promovem a sensibilização de nociceptores periféricos desta região (RAJA *et al.*, 1988; ALSTERGREG; KOPP, 2000; NORDAHL *et al.*, 2000; KOPP, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005) e de neurônios nociceptivos centrais do complexo sensório-nuclear trigeminal do tronco encefálico (IWATA *et al.*, 1999; SESSLE, 2000; DUBNER; REN, 2004).

A despeito 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. 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.

2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA NA ATM

Nas últimas duas décadas, a investigação sobre os mecanismos da dor orofacial tem mostrado considerável progresso. Alguns modelos experimentais, utilizando diferentes espécies animais, têm sido desenvolvidos para o estudo da nocicepção da ATM. Substâncias flogísticas têm sido utilizadas para indução da inflamação experimental como formalina, zymosan, adjuvante completo de Freund e

óleo de mostarda (HAAS *et al.*, 1992; EDWARDS *et al.*, 2007; CASTANO *et al.*, 2007; GUERRERO *et al.*, 2008). Após a aplicação de tais agentes, segue-se uma reação inflamatória que inclui edema, migração celular, eritema, alodinia e hiperalgesia (MARCHAND *et al.*, 2005).

Neste projeto foi utilizado dois modelos experimentais de hipernocicepção inflamatória induzida na ATM de ratos. O primeiro modelo utilizou como substância flogística o zymosan. Esta substância é um polissacarídeo retirada da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, tendo o seu componente principal estrutural a β -glucana que apresenta propriedades imunoestimulatórias (DERBOCIO *et al.*, 2005). Quando injetado intraperitoneal (AJUEBOR *et al.*, 1998), intradérmica (RIDGER *et al.*, 1997) ou intra-articular (ROCHA *et al.*, 1999), causa resposta inflamatória intensa.

O zymosan, inicialmente, é reconhecido pelo receptor detectina 1 que é expresso em monócitos, macrófagos, células dendríticas (WILLMENT *et al.*, 2003). Feito esse reconhecimento, ocorre um estímulo para a produção de citocinas (TAYLOR *et al.*, 2002).

Chaves *et al.*, 2011, padronizaram um modelo experimental de artrite na ATM de ratos induzida por zymosan que é capaz de reproduzir as principais condições encontradas clinicamente, modelo este que serviu de base para presente estudo. Os resultados obtidos apresentaram hipernocicepção mecânica durante a 4ª e 6ª hora. Ademais, zymosan aumentou o número de polimorfonucleares, da atividade da MPO, acompanhado do aumento da permeabilidade vascular.

O segundo modelo utilizou como substância flogística a formalina. Este modelo é constituído em duas fases: a primeira é induzida por uma ativação direta das fibras nociceptivas C. A segunda fase é mediada pela estimulação contínua de nociceptores por mediadores inflamatórios (serotonina, histamina, bradicinina, NO e prostaglandinas) liberados do tecido lesado, levando à sensibilização dependente da atividade dos neurônios do sistema nervoso central dentro do corno dorsal (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

As respostas nociceptivas (levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial) após a indução da formalina na ATM demonstraram que estas só aparecem na primeira fase em concentrações acima de 0,5% (ROVERONI *et al.*, 2001).

O teste da formalina é amplamente utilizado para se avaliar a ação de fármacos analgésicos ou de produto naturais com atividade antinociceptiva, sendo considerado

um modelo confiável de dor tônica do tipo inflamatória (DUBUISSON; DENNIS, 1977; ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK *et al*, 1995).

2.5 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de produtos naturais, particularmente da flora, com fins terapêuticos, nasceu com a humanidade. Fatos históricos ou de evidências preservados permitem avaliar de forma interdisciplinar as aplicações e significados culturais de espécies vegetais, viabilizando uma melhor compreensão científica sobre o uso de recursos biológicos. Indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontradas nas civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas mais remotas utilizadas pelo homem para a cura, prevenção e tratamento de doenças servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (ANDRADE, CARDOSO, BASTOS, 2007).

Os primeiros registros arqueológicos permitiram calcular que as plantas são utilizadas para fins medicinais desde há cerca de 60.000 anos, e documentos sumérios datados de há cerca de 5000 a.C. referem a utilização de plantas para o tratamento de enfermidades que afetavam os animais e os seres humanos, especialmente a “planta da Alegria”, isto é o Ópio (SOLECKI, SHAMIDAR, 1975; DIAS, 2009). Estas civilizações notaram que alguns vegetais experimentados no combate às doenças revelavam um potencial curativo, levando um processo de construção de um arcabouço de conhecimentos profundo passado verbalmente de geração a geração (GURIB, 2006). É válido enfatizar que a construção desse conhecimento sobre o processo curativo desses vegetais foi construído por tentativas de erros e acertos ao longo de séculos.

O homem primitivo buscou na natureza as soluções para os diversos males que o assolava, fossem esses de ordem espiritual ou física. Aos feiticeiros, considerados intermediários entre os homens e os deuses cabia a tarefa de curar os doentes, unindo-se, desse modo, magia e religião ao saber empírico das práticas de saúde, a exemplo do emprego de plantas medicinais. A era antiga inaugurou outro enfoque, quando, a partir do pensamento hipocrático, que estabelecia relação entre ambiente

e estilo de vida das pessoas, os processos de cura deixaram de ser vistos apenas com enfoque espiritual e místico. (ALVIM *et al.*, 2006; FIRMO, 2011).

As plantas medicinais contribuem de maneira significativa no controle terapêutico mundial e, em particular nos países em desenvolvimento. Boa parte da população de países como Africa, Chile e Colombia, dependem exclusivamente das plantas medicinais para cuidados básicos de saúde (WHO, 1999; AGRA *et al.*, 2008). No entanto, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), países desenvolvidos tenham acesso aos serviços da medicina moderna, ainda assim, o uso de plantas medicinais e produtos naturais tem mantido sua popularidade por razões históricas e/ou culturais (WHO, 1999).

2.6 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE A FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae, também classificada como Leguminosae, é uma das maiores famílias botânicas existentes das Angiospermas, possuindo cerca de 740 gêneros e 19.400 espécies (LEWIS *et al.*, 2005; GIULIETTI *et al.*, 2005). Seus representantes podem ser ervas, arbustos, árvores e até mesmo lianas; perenes ou anuais. São notadamente generalistas, com grandes espécies vivendo em florestas, até herbáceas bem reduzidas em campos, todas com grande diversidade nos métodos de crescimento, reprodução e defesa (POLHILL *et al.*, 1981; SOUZA; LORENZI 2005). Possui distribuição cosmopolita, devido a sua capacidade de adaptação tanto a climas tropicais quanto subtropicais, sendo menos frequentes em regiões temperadas (BORTOLUZZI; MIOTTO; REIS, 2007).

A família Fabaceae apresenta três subfamílias – Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae, sendo a última a mais derivada e diversa das Fabaceae (POLHILL 1981; BARROSO *et al.*, 1991).

No Brasil há cerca de 2716 espécies reunidas em 212 gêneros, distribuídos pela Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Floresta Amazônica (LIMA *et al.*, 2012). Sendo encontradas em maior quantidade na região norte no domínio do cerrado (LIMA *et al.*, 2012).

Fabaceae constitui uma das famílias botânicas de maior importância econômica. Há muitas de suas espécies úteis e inúmeras delas são cultivadas desde

a antiguidade devido principalmente ao seu potencial alimentício e medicinal, embora existam várias outras utilidades diretas: forrageira, melífera, ornamental, madeireira, como fornecedoras de celulose, óleos, adubo verde, carvão, lenha, resinas, tintas, vernizes e cortiça (MIOTTO *et al.*, 2008; MARTINS, 2009; SOUZA; SOUZA, 2011).

O uso de plantas medicinais desta família pela população de diferentes partes do mundo tem sido respaldada nos trabalhos científicos, que comprovam a eficácia em diferentes modelos experimentais.

As espécies dessa família possuem em média 16 atividades, como imunomodulação, inibição da proliferação e da disseminação tumoral, estimulação da produção de interleucinas do tipo II e ação antimicrobiana. Algumas Fabaceae apresentam células secretoras contendo taninos, os quais possuem diversas atividades biológicas, sendo elas: antisséptica, antidiarreica e antioxidante (BRUNETON, 2001).

A família Fabaceae é uma das famílias que possui isoflavonas, subclasse de flavonoides conhecida pelas suas propriedades anti-inflamatórias, bactericidas, antifúngicas e estrogênicas (SIMÕES *et al.*, 2007).

2.7 GÊNERO TEPHROSIA

O gênero *Tephrosia* compreende cerca de 350 espécies, sendo considerado o maior gênero da tribo Millettieae (GEESINK, 1984; SCHRIRE, 2005). Seus representantes, muitos dos quais têm importantes usos tradicionais, estão distribuídos em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios (HEGAZY *et al.*, 2011; STEVENSON *et al.*, 2012).

Diversas investigações fitoquímicas tem reportado os diferentes metabolitos secundários neste gênero, entre eles: rotenoides, isoflavonas, chalconas, flavanonas prevalecendo os flavonoides (CLARKE, BANERJEE, 1910; STEVENSON *et al.*, 2012).

Metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades, e, em contraste com os primários, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou mesmo presente em todos eles. Além disto, são conhecidos por serem sintetizados em tipos celulares especializados. Estes

constituintes químicos são extremamente diversos. Cada família, gênero, e espécie produz uma categoria química característica ou uma mistura delas, e elas, por vezes, podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (BELL *et al.*, 1980; WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008). Ademais, apresentam atividades biológicas interessantes, promissoras de novas moléculas potencialmente úteis ao homem.

No tratamento de patologias, em geral, diversos flavonoides têm apresentado potencial atividade farmacológica, tais como: antioxidante (PATWARDHAN; BHATT, 2015), redução do risco de aterosclerose (SUN *et al.*, 2015), antidiabético (NICOLLE *et al.*, 2011), antitumoral (LAN *et al.*, 2015), anti-inflamatório (EL *et al.*, 2016; DZOYEM *et al.*, 2015), anticolinesterase (DZOYEM *et al.*, 2015).

Plantas deste gênero já tiveram suas atividades biológicas descritas na literatura, sendo úteis no tratamento da dor (VAL *et al.*, 2014) inflamação (MARTINEZ *et al.*, 2012; VAL *et al.*, 2014), fungos (LUO *et al.*, 2015), diabetes e complicações cardiovasculares (BHADADA; GOYAL, 2015), e atividades inseticida e ictiotóxica (VASCONCELOS *et al.*, 2012), hepatoprotetora (GORA *et al.*, 2014), anticâncer (AHMED *et al.*, 2014).

2.7.1 Considerações Botânicas sobre a espécie *Tephrosia toxicaria* Pers.

Tephrosia toxicaria também conhecida como *Tephrosia sinapou* (Buc'hoz), pertence à família Fabaceae e à subfamília Papilionoideae, é popularmente conhecida por timbó de caiena (JANG *et al.*, 2003). Apresenta-se como subarborescente, ereta, de folhas imparipinadas, possuindo de 10 a 20 folíolos. Suas flores são brancas ou amareladas com a base lilás e dispostas em racemos axilares ou terminais. Seu fruto apresenta-se na forma de vagem, curva ou reta (CORRÊA, 1974). (Figura 3)

A espécime que foi realizada a extração dos metabólitos secundários e posterior modificação estudada neste trabalho foi coletada em Guaraciaba do Norte, Ceará, que está localizada a 299 Km de Fortaleza, Ceará.

Figura 3 - Foto de *Tephrosia toxicaria* em Guaraciaba do Norte-CE.



Fonte: Adaptada da Profa. Telma L. G. de Lemos, 2010.

2.7.1.2 Metabólitos secundários oriundos de *Tephrosia toxicaria* Pers.

A literatura reporta a atividade como defensivo agrícola natural do extrato aquoso das raízes maceradas de *Tephrosia toxicaria*. Outros autores já demonstraram a atividade anticâncer, larvicida, antioxidante, inseticida, antinociceptiva, anti-inflamatória do extrato etanólico das raízes de *Tephrosia toxicaria* (CORRÊA, 1974; JANG *et al.*, 2003; REVILLA, 2002; VASCONCELOS, *et al.*, 2009, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2012; VAL *et al.*, 2014).

Destarte, o isolamento de diversos flavonoides do extrato etanolico das raízes de *Tephrosia toxicaria*, tais como: iso-obovatina, obovatina, 6a,12a-desidro- β -toxicarol, 6a, 12a-desidro- α -toxicarol e α -toxicarol (VASCONCELOS, *et al.*, 2009), além das atividades biológicas desses metabólitos no modelo de hipernocicepção induzida por zymosan na ATM de ratos (VAL, 2012).

É válido ressaltar que devido aos resultados promissores da obovatina, nosso grupo desenvolveu então um bioproduto semissintético - a obovatina hidrogena - que foi fruto de depósito de patente do nosso grupo sob número de registro: BR1020130287938 no INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial intitulado

“Uso da 5-hidroxi-6”,6”-dimetilcromano-[2”,3”:7,8]-flavanona, levógira, como agente analgésico e anti-inflamatório, para aplicação nos setores da indústria farmacêutica” .

Portanto, o estudo do possível efeito da obovatina hidrogenada semissintética (PHO) na modulação da inflamação e da nocicepção observadas no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida na ATM de ratos e os mecanismos de ação envolvidos nesses processos poderá contribuir para a introdução de uma nova abordagem terapêutica mais específica para as condições inflamatórias da ATM, trazendo benefícios superiores a um tratamento paliativo no tratamento dessa patologia.

2.8 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E O PROCESSO DE BIOPROSPECÇÃO

Nossa biodiversidade respresenta um enorme reservatório para descoberta de moléculas bioativas. As plantas produzem uma vasta gama de metabólitos primários e secundários. Destes, os metabólitos secundários são moléculas reguladoras que atuam de forma direta ou indiretamente no crescimento, reprodução. Estes tem merecido destaque no últimos anos na aplicação no campo da nutrição, cosméticos e pesquisas na área da saúde (BOURGAUD *et al.*, 2001; KIRAKOSYAN; CSEKE; KAUFMAN, 2009).

Entre os principais grupos farmacologicamente ativos destes compostos já descritos na literatura podemos citar os alcalóides, flavonas, terpenos, fenólicos e polifenóis (CHIN *et al.*, 2006; NCUBE; AFOLAYAN; OKOH, 2008). A literatura reporta que as isoflavonas de soja aumentam a expressão do óxido nítrico endotelial, a biodisponibilidade NO, aumento de nitrato / nitrito plasmático e a diminuição dos níveis de endotelina-1 em complicações arteriais sistêmicas em homens e mulheres pós-menopausa (TEEDE *et al.*, 2003). Saxena *et al.*, (2016) avaliaram a atividade anti-inflamatória de diaril-heptanoides, um metabólito majoritário extraído do extrato de *Alnus nepalensis* em modelo de inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Estudos realizados uma lactona sesquiterpênica extraída da planta dente-de leão, ativou o fator de transcrição nuclear eritróide 2 (Nrf2) em hepatócitos humanos (ESATBEYOGLU *et al.*, 2017). Segundo Funk *et al.*, (2016) demonstraram os efeitos anti-inflamatórios do gengibre, seus metabólitos secundários e óleos essenciais em

ratas no modelo de artrite induzida por SCW. A dose de (28 mg/kg/ip) evitou a inflamação crônica das articulações, no entanto, não alterou a fase inicial aguda do edema das articulações nem a formação de granulomas nos locais de deposição do agente flogístico SCW no fígado.

Nas últimas décadas foram isolados cerca de doze mil agentes derivados de plantas (CHIN *et al.*, 2006). Os metabólitos secundários extraídos de vegetais não são apenas considerados como fontes diretas de novos produtos farmacêuticos, mas oferecem uma fonte inesgotável de oportunidades de diversidade química para bioprospecção e produção de novas drogas.

Um levantamento realizado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) revelou que os produtos naturais representam mais de um terço de todas as novas entidades moleculares. Quase metade destes são derivados de mamíferos, um quarto de micro-organismos e um quarto de vegetais (PATRIDGE *et al.*, 2015).

Ao longo da história, Friedrich Serturmer isolou o componente ativo da resina de ópio em 1804 produzindo a morfina (SCHIFF, 2002). Outro derivado vegetal semi-sintético é a guaifenesina utilizado ineficazmente no tratamento da sífilis durante o século XVI, posteriormente utilizado como supressor da tosse em 1952 (FRITH, 2012). Aproximadamente 30 compostos derivados de plantas apresentaram atividade anti-tumoral contra vários tipos de tumor e utilizados em ensaios clínicos, como taxol, podophyllotoxin, vinblastina e outros (NIRMALA; SAMUNDEESWARI; SANKAR, 2013; RONGHUI *et al.*, 2014).

Historicamente esses produtos e seus derivados contribuíram significativamente para o avanço na área da medicina, produzindo grande quantidade de drogas que ainda hoje fazem parte do arsenal farmacêutico no combate de muitas patologias.

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A dor nas estruturas articulares e musculares em pacientes com DTM, portanto, é uma fonte comum de dor orofacial crônica, o que pode levar à ausência ou insuficiência de trabalho ou interações sociais, resultando em uma redução na qualidade de vida das pessoas acometidas (GREENE *et al.*, 2010).

Várias classes de fármacos são indicadas para o tratamento da doença, tais como anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) durante 7-14 dias. Em pacientes com dor neuropática crônica que o tratamento por AINES não é eficaz, tem se utilizado antidepressivo tricíclico (SHARMA *et al.*, 2011). Apesar da farmacoterapia diversa para tratamento das DTMs, nenhuma das intervenções terapêuticas disponíveis na atualidade é curativa, limitando-se, portanto a aliviar os sinais e sintomas da doença (CAIRNS, 2010). Assim, o uso de drogas alternativas, que possam agir como veículos anti-inflamatórios e analgésicos em substituição aos compostos tradicionalmente utilizados na clínica médica, são extremamente importantes.

Vegetais são fontes ricas em compostos bioativos. Sabendo que o conhecimento sobre produtos naturais é, muitas vezes, o único recurso terapêutico de variadas comunidades e grupos étnicos em todo o mundo, e que há necessidade de novas abordagens terapêuticas para tratamento das condições dolorosas inflamatórias advindas da ATM, a pesquisa de recursos naturais tem-se revelado promissora na descoberta de ferramentas farmacológicas que podem ser utilizadas para testes de novas substâncias ou mesmo em testes diagnósticos. Essa prática vem despertando nas últimas décadas a atenção da comunidade científica na perspectiva de avaliar a eficácia e segurança desses recursos naturais. Prontos naturais são descritos na literatura com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória no modelo de hipernocicepção induzida na ATM de ratos (COURA *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2016; RIVANOR *et al.*, 2014; VAL *et al.*, 2014).

Somado a isso, a bioprospecção de novos agentes farmacológicos derivados de vegetais, assim como a análise de sua eficácia é de grande interesse socioeconômico uma vez que beneficiará a economia de países em desenvolvimento, contribuindo sobremaneira para o acesso da população a medicamentos seguros e de custo relativamente menor, refletindo em uma melhor qualidade de vida da população. Além disso, a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos na

utilização destas substâncias possibilita o entendimento para uma melhor abordagem terapêutica e/ou preventiva.

4 HIPÓTESES

1 A 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO) não apresenta toxicidade sistêmica verificável por meio de observações comportamentais, dosagens de enzimas hepáticas e renais, sendo assim considerada segura para o uso.

2 A 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO) não afeta a motricidade de coordenação motora dos animais.

3 A 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO) reduz os parâmetros nociceptivos e inflamatórios nos tecidos periarticulares no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina e serotonina na ATM de ratos.

4 O mecanismo de ação da 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO) envolve, pelo menos parcialmente, a via NO/GMPc/proteína kinase G/canais de K⁺ sensíveis a ATP.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a segurança e a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de um composto semissintético derivado de *Tephrosia toxicaria* Pers.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Avaliar a toxicidade da 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO) (doses repetidas e aguda) em camundongos;
- b) Avaliar o efeito da 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO) sobre o desempenho motor de ratos Wistar no teste do *rota rod*;
- c) Investigar o efeito da 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO) nos modelos de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina e serotonina na ATM de ratos Wistar;
- d) Investigar o mecanismo da 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO) avaliando o envolvimento da via HO-1 e NO/GMPc/PKG/K+ATP no modelo hipernocicepção inflamatória induzida pela formalina na ATM de ratos Wistar.

6 METODOLOGIA

6.1 MATERIAL VEGETAL

Neste estudo foi realizada a obtenção da 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO) ou obovatina hidrogenada semissintética a partir da 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromeno-[2",3":7,8]-flavanona, um dos constituintes de *Tephrosia toxicaria* Pers. O isolamento e a obtenção da molécula semissintética PHO ocorreu no Laboratório de Química Inorgânica - UFC – Campus do Pici – Fortaleza, sob a coordenação da Profa. Ângela Martha Campos Arriaga.

Para este fim, a 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona, levógira, $[\alpha]_D^{20}$ -65,86 (obovatina hidrogenada semissintética (PHO) foi obtida à partir da hidrogenação catalítica (Pd/C) da obovatina (5-hidroxi-6",6"-dimetilcromeno-[2",3":7,8]-flavanona). O composto denominado obovatina (5-hidroxi-6",6"-dimetilcromeno-[2",3":7,8]-flavanona (80,0 mg) foi dissolvido em clorofórmio (30 mL) e em seguida adicionado 10,0 mg do catalizador paládio adsorvido em carvão ativo (Pd/C). Gás H₂ foi borbulhado na solução e em seguida um balão de borracha contendo o gás foi conectado ao balão da mistura reacional. A solução permaneceu sob agitação magnética por 45 horas, sendo a reação monitorada por cromatografia em camada delgada (fase móvel: hexano/diclorometano 60%). Após este período decorrido, a solução resultante foi filtrada e concentrada à temperatura ambiente.

O sólido obtido (83,0 mg) continha o material de partida e o produto de hidrogenação. A mistura foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna semi-preparativa operando em modo normal, utilizando octadecilsilano como fase estacionária e solução de hexano/clorofórmio 30% como fase móvel. O material foi dissolvido em cerca de 4 mL da fase móvel e as injeções realizadas em alíquotas de 200 µL de solução previamente filtrada. A detecção foi realizada na região de 260 – 400 nanômetros a um fluxo de 3,0 mL/min em que foram coletados dois picos: o pico 1 identificado como o produto de partida o composto obovatina (5- hidroxi-6",6"-dimetilcromeno-[2",3":7,8]-flavanona (36,5 mg), material de partida da reação, e o pico 2, a 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona

(18,5 mg), identificado como o produto da reação de hidrogenação, que foi usada como ferramenta farmacológica no presente estudo.

6.2 MODELO ANIMAL E PRINCIPIOS BIOÉTICOS

Foram usados camundongos machos e fêmeas (*Mus musculus*) albinos (25-30g) para determinação da toxicidade aguda e sub aguda de (PHO) e ratos machos (*Rattus novergicus*) albinos (variação Wistar) (180-220g) para avaliação da eficácia antinociceptiva, anti-inflamatória e ação na motricidade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do (UFC) e do biotério local da Faculdade de Medicina de Sobral. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas, em sala com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) obedecendo os ciclos de claro e escuro (de 12 em 12 horas) no biotério local, com água e comida *ad libitum*.

Com relação aos aspectos éticos, o protocolo experimental foi elaborado de acordo com a “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos - DBCA” da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA, da Universidade Federal do Ceará – Campus de Sobral (nº 13/15). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

6.3 TOXICIDADE

6.3.1 Avaliação da Toxicidade Aguda *in vivo* de PHO

A toxicidade aguda por gavagem (*per.os*) foi realizada utilizando-se camundongos machos e fêmeas (*Mus musculus*) albinos (25-30g) (n=5 animais/grupo). Os animais foram mantidos em jejum prévio de 12 horas e foram pesados antes de serem tratados com o PHO (1mg/kg; 10 mg/kg; 100 mg/kg). O grupo controle recebeu solução salina 0,9% (5mL/kg; *per.os* ou *i.p*). Os animais foram observados por um período de 48 h para o registro de sinais de toxicidade e/ou mortalidade (MILLER e TAINTER, 1944).

6.3.2 Avaliação da Toxicidade Subaguda *in vivo* de PHO

Na perspectiva de avaliar a segurança da PHO, camundongos machos e fêmeas, divididos em dois grupos de cinco animais receberam por (*per.os*) PHO (10 µg/kg) ou solução salina 0,9% (5mL/kg; *per.os* ou *i.p*) durante 14 dias consecutivos. Durante esse intervalo de tempo de 14 dias os animais ficaram sob observação para a detecção de sinais físicos como coçar nariz, lamber as patas, rodopiar, piloereção, além de sinais comportamentais, como apatia e/ou agressividade. No 15º dia, todos os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (200 mg/ kg; *i.p*), e amostras de sangue foram coletadas a partir do plexo retro orbitário para as dosagens de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Para análise bioquímica do soro, o sangue foi centrifugado a 3000 g, durante 15 min após coleta. As amostras de soro foram estocadas a -80°C até as análises. Os parâmetros bioquímicos que seguem foram determinados por testes enzimáticos e colorimétricos da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa/MG, Brasil): AST, ALT e creatinina. Em seguida, os camundongos foram submetidos à eutanásia sob anestesia, seguido da retirada e pesagem dos órgãos (coração, fígado, rim, baço), e posterior processamento histológico para proceder análise histopatológica por um avaliador cego. Os aumentos utilizados foram: 100x, para aspectos morfológicos gerais e 400x, para análise detalhada dos eventos histológicos, tanto celulares quanto na matriz extra celular (MEC), com análise cega de grupos experimentais (fármacos-teste), seguindo a norma ISO 10993-11.

6.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA - TESTE DO ROTA ROD

O teste do *Rota Rod* mede o efeito do relaxamento muscular ou desordem da coordenação motora ocasionada pela ação de drogas em animais (CARLINI e BURGOS, 1979). Os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória separada por amplas abas que possibilitam a análise comportamental de cada animal. No modelo para ratos, são quatro divisões, cujo rotor apresenta diâmetro de 7 cm, possibilitando o estudo simultâneo de 4 animais, com uma rotação de 4 a 40 rpm, por um período de 5 minutos, após 1 hora a administração de PHO (10 µg/kg;

per.os) ou veículo (apenas solução salina (5 mL/ kg; *per.os*). Foram registrados: tempo de latência (segundos), tempo de permanência na barra giratória (segundos), e o número de quedas (DUNHAM e MIYA, 1957; PIEL, 2014).

6.5 EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DE PHO NO MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR (ATM) DE RATOS

6.5.1 Delineamento Experimental

Os animais foram pré-tratados (*per.os*) com PHO (0,1µg/kg; 1µg/kg ou 10µg/kg). Uma hora após o pré-tratamento com a substância supracitada, os animais receberam uma injeção intra-articular de formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL) e então foram submetidos à análise comportamental para avaliar a resposta nociceptiva. Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação. Cada grupo possuiu n=5 animais (ratos machos, *Rattus norvegicus* albinos Wistar entre 180 a 220g). A melhor dose obtida no teste da formalina foi utilizada no teste da serotonina (5-HT) 225ug/50uL (SIGMA – H9523) visando minimizar o número de animais utilizados.

6.5.2 Injeções intra-articulares

Os animais foram anestesiados com isoflurano e receberam uma injeção do agente inflamatório (Formalina a 1,5% ou Serotonina 225ug/50uL) (Formaldeído, Sigma Aldrich; (SIGMA – H9523) (ROVERONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA-FUSARO *et al.*, 2012). Para administração da formalina ou serotonina na ATM, uma agulha calibre 30G, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50 µl) por um tubo de polietileno P50, foi inserida na porção inferior da borda póstero-inferior do arco zigomático da ATM esquerda, sendo avançada em direção anterior até contactar a região póstero-lateral do côndilo.

6.5.3 Estudo do efeito da PHO na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina e serotonina na ATM - Teste comportamental para avaliação das respostas nociceptivas

As análises comportamentais foram realizadas durante a fase clara, entre 6h e 17h em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25 °C (ROSLAND, 1991). Durante o teste, os animais não tiveram acesso à água ou à 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 medindo 30x30x30 cm com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro foi utilizada. Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na caixa por 10 minutos para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse (ABBOTT *et al.*, 1986).

Imediatamente após a injeção intra-articular de formalina ou serotonina, o animal, já consciente, foi recolocado na câmara de observação, e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 min no teste da formalina, divididos em 15 blocos de 3 min. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células (ROVERONI *et al.*, 2001). É válido ressaltar que o tempo de observação das respostas nociceptivas no teste da serotonina é de apenas 30 min. Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1 s de duração, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada somando-se esse comportamento ao ato de coçar a região injetada, como previamente padronizado (ROVERONI *et al.*, 2001). Imediatamente após as análises comportamentais os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação e realizado a coleta do subnúcleo caudal, gânglio trigeminal e tecidos periarticulares.

6.5.4 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em sete grupos, sendo cada um composto por cinco animais:

Grupo Sham: O grupo recebeu (*per.os*) o veículo (salina 0,9 %), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) de salina estéril 0,9 % (50 μ L);

Grupo Formalina: O grupo recebeu (*per.os*) o veículo (salina 0,9 %), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 μ L);

Grupo Morfina: O grupo recebeu (*s.c*) morfina (5 mg/kg) dissolvida em salina estéril, seguido 30 min após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 μ L);

Grupo Indometacina: O grupo recebeu (*s.c*) indometacina (5 mg/kg) dissolvida em salina estéril, seguido 30 min após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 μ L);

Grupos PHO: Os grupos receberam (*per.os*) PHO (0,1 μ g/kg; 1 μ g/kg ou 10 μ g/kg), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 μ L).

6.5.5 Parâmetros avaliados

6.5.5.1 Dosagem de TNF α , IL-1 β , IL-8, e IL-10 nos tecidos periarticulares

Amostras do tecido periarticular dos grupos Sham, Formalina e PHO (10 μ g/kg) foram obtidas e homogeneizadas em solução RIPA (Santa Cruz, USA). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10.000 RPM/ 10 min / 4 °C), e o sobrenadante será utilizado para avaliar a expressão dos mediadores TNF α , IL-1 β , IL-8, e IL-10. Placas de 96 poços foram incubadas “overnight” em temperatura de 4°C com anticorpos contra TNF α , IL-1 β , IL-8, e IL-10 (10pg/ml). No dia seguinte, as placas foram lavadas e incubadas por uma hora com uma solução a 1 % de albumina bovina sérica (BSA) no intuito de evitar ligações inespecíficas. Após esse bloqueio e lavagem das placas, as curvas-padrão em várias diluições ou as amostras foram adicionadas e incubadas durante duas horas. As placas então foram lavadas três vezes com tampão, e os anticorpos policlonais biotinizados específico para cada mediador testado, diluídos e adicionados (100 μ l/poço). Após incubação em temperatura ambiente por 2 horas, as placas foram lavadas e 100 μ l de estreptavidina-HRP diluídas (1:200) adicionados. Em seguida (quinze minutos após) as placas foram

lavadas e 100µl da solução substrato (o-fenilenodiamina-2HCl; OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO-USA) foi adicionada e mantidas no escuro. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ 1M, e as absorbâncias determinadas em 450nm.

6.5.5.2 Expressão protéica de (ICAM-1) e CD55

Para avaliar a expressão protéica de (ICAM) e CD55 nos tecidos periarticulares dos grupos Sham, Formalina e PHO (10µg/kg) realizou-se Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

6.5.5.3 Extração de proteínas

Os tecidos periarticulares foram macerados com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. O produto desse processo foi inserido em microtubo contendo 200 µl de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (SigmaAldrich, EUA, 1µL de inibidor de protease: 100µL de RIPA). Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

6.5.5.4 Dosagem de proteína

As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinconínico e foi realizado conforme descrito pelo fabricante (Thermo Scientific, Estados Unidos, EUA). De acordo com este método, as proteínas presentes nas amostras reduzem o cobre da sua forma cúprica (Cu²⁺) para a cuprosa (Cu¹⁺). Este se liga a duas moléculas de ácido bicinconínico, resultando na cor púrpura visualizada no final da reação. Inicialmente, a proteína foi diluída (1 µl de proteína: 20 µl de RIPA) e preparado 75µL de proteína diluída. Em seguida, misturou-se o reagente A (Contém ácido bicinconínico) e B (contém cobre) respectivamente na proporção de 50:1.

Posteriormente, colocou-se em duplicata 25 µl de cada amostra diluída e 200 µl da mistura final do reagente A e B em placa de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada por 30 min a 37°C em estufa. Enfim, efetuou-se a leitura da reação em leitor de Elisa a 562 nm. Para a curva, foram utilizadas concentrações conhecidas de Albumina sérica bovina (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/mL.

6.5.5.5 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 20 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% (ICAM-1) e CD55 e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 v por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos anti-ICAM-1 (Abcam, 1:100), anti- CD55 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), ou anti- α-tubulin (Millipore, EP1123Y, 1:500) diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit (Invitrogen, 656120, 1:1000) ou HRP-rabbit anti-goat (Invitrogen, A16142, 1:1000) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas três vezes, duração de 10 min cada, com TBST. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as

membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA) ou expostas a filme radiográfico.

6.6 ANÁLISE DA PERMEABILIDADE VASCULAR POR EXTRAVASAMENTO DE AZUL DE EVANS

Os animais foram pré-tratados com PHO (10µg/kg; *per.os*). Após 1 hora os animais receberam tribromo (1%, i.p., 0,1mL/100g) (HU *et al.*, 1990) e em seguida injeção (i.art) de formalina (1,5%, 50µL) na ATM. O grupo Sham recebeu (*per.os*) o veículo (salina 0,9%) 1h antes da injeção de tribromo, seguida da injeção (i.art) de salina estéril 0,9%. O grupo Formalina recebeu (*per.os*) o veículo (salina 0,9 %), seguido 1 h após da injeção da injeção de tribromo da injeção (i.art) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL). Para averiguação da inflamação todos os animais receberam uma dose de 1mg/kg do corante Azul de Evans (TORRES-CHÁVEZ *et al.*, 2011) e.v. (veia peniana) imediatamente após a aplicação de formalina (1,5%, 50µL) na ATM e após 45 minutos os animais foram eutanasiados por decapitação. Baseando-se na propriedade do corante Azul de Evans de ligar-se às proteínas plasmáticas, o local da injeção de formalina foi identificado visualmente, devido à maior concentração de corante no referido tecido (HAAS *et al.*, 1992), permitindo assim a remoção adequada dos tecidos para posterior análise do extravasamento através de técnicas espectrofotométricas. Para a extração do corante, o tecido periarticular de cada animal foi pesado e colocado em microtubos tipo eppendorf contendo 1mL de formamida e mantido por 24 horas a 60°C (FIORENTINO; CAIRNS; HU, 1999). Após a extração, a quantidade de corante extravasada no tecido foi determinada em um leitor de microplacas, afim de medir as absorbâncias (em 620nm) das diferentes soluções de formamida. Os resultados dessas leituras foram posteriormente comparados com os resultados de leituras de soluções com concentrações conhecidas (curva de calibração com 4µg, 2µg, 1µg e 0,5µg de corante por mL de formamida). A quantidade de corante extravasada (µg) em cada solução foi dividida pelo peso (g) do respectivo tecido incubado. O extravasamento de azul foi calculado em microgramas de corante por grama de tecido dissecado.

6.7 EFEITO DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR SEROTONINA NA ATM

Após a injeção intra-articular de Serotonina, o animal, já consciente, foi recolocado na câmara de observação, e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 30 min, divididos em 10 blocos de 3 min. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células (ROVERONI *et al.*, 2001).

6.7.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo cada um composto por cinco animais:

Grupo Sham: O grupo recebeu (*per.os*) o veículo (salina 0,9 %), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) de salina estéril 0,9 % (50 µL);

Grupo Serotonina: O grupo recebeu (*per.os*) o veículo (salina 0,9 %), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) formalina (225ug/articulação; 50 µL);

Grupo Indometacina: O grupo recebeu (*s.c*) indometacina (5 mg/kg) dissolvida em salina estéril, seguido 30 min após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupos PHO: Os grupos receberam (*per.os*) PHO (10µg/kg), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL).

6.8 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA HO-1 NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM

Para determinar se o efeito antinociceptivo da PHO na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM depende da via HO-1, foi utilizada droga que atua na via previamente à administração da PHO.

6.8.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em sete grupos, sendo cada um composto por cinco animais:

Grupo Sham: O grupo recebeu (*per.os*) o veículo (salina 0,9 %), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) de salina estéril 0,9 % (50 µL);

Grupo Formalina: O grupo recebeu (*per.os*) o veículo (salina 0,9 %), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupo Morfina: O grupo recebeu (*s.c*) morfina (5 mg/kg) dissolvida em salina estéril, seguido 30 min após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupo Indometacina: O grupo recebeu (*s.c*) indometacina (5 mg/kg) dissolvida em salina estéril, seguido 30 min após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupos PHO: Os grupos receberam (*per.os*) PHO (10µg/kg), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupo ZnPP IX + PHO: 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, após 30 min receberam (*per.os*) PHO (10µg/kg), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL).

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, após 30 min receberam a injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL).

6.9 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA NO/GMPC/PKG/K+ATP DEPENDENTE NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM

Para determinar se o efeito antinociceptivo da PHO na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM depende da via NO/GMPc/PKG/K+ATP, foram utilizadas drogas que atuam na via previamente à administração da PHO.

6.9.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em doze grupos, sendo cada um composto por cinco animais:

Grupo Sham: O grupo recebeu (*per.os*) o veículo (salina 0,9 %), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) de salina estéril 0,9 % (50 µL);

Grupo Formalina: O grupo recebeu (*per.os*) o veículo (salina 0,9 %), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupo Indometacina: O grupo recebeu (*s.c*) indometacina (5 mg/kg) dissolvida em salina estéril, seguido 30 min após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupos PHO: Os grupos receberam (*per.os*) PHO (10µg/kg), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupo Aminoguanidina + PHO: O grupo recebeu (*i.p*) Aminoguanidina (30 mg/kg), inibidor seletivo da NO sintetase induzida (NOSi), diluído em solução salina estéril (0,9 %), após 30 min receberam (*per.os*) PHO (10µg/kg), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupo Aminoguanidina: O grupo recebeu (*i.p*) Aminoguanidina (30 mg/kg), inibidor seletivo da NO sintetase induzida (NOSi), diluído em solução salina estéril (0,9 %), após 30 min receberam injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupo ODQ + PHO: O grupo recebeu (*s.c*) ODQ (5 mg/kg) inibidor da guanilil sintase (GC) - enzima que catalisa reação para formação de GMPc, diluído em DMSO 3% e solução salina estéril (0,9 %) após 30 min receberam (*per.os*) PHO (10µg/kg), seguido 1 h após da injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupo ODQ: O grupo recebeu (*s.c*) ODQ (5 mg/kg) inibidor da guanilil sintase (GC) - enzima que catalisa reação para formação de GMPc, diluído em DMSO 3% e solução salina estéril (0,9 %) após 30 min receberam a injeção (*i.art*) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupo KT5823 + PHO: O grupo recebeu (s.c) KT5823 (4 µg/mL) inibidor da proteína quinase G (PKG), diluído em solução salina estéril (0,9 %); após 30 min receberam (*per.os*) PHO (10µg/kg), seguido 1 h após da injeção (i.art) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupo KT5823: O grupo recebeu (s.c) KT5823 (4 µg/mL) inibidor da proteína quinase G (PKG), diluído em solução salina estéril (0,9 %); após 30 min receberam a injeção (i.art) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL);

Grupo Glibenclamida + PHO: O grupo recebeu (i.p) Glibenclamida (10 mg/kg) bloqueador de canais de K⁺ATP - dependente, diluído em solução salina estéril (0,9 %), após 30 min receberam (*per.os*) PHO (10µg/kg), seguido 1 h após da injeção (i.art) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL).

Grupo Glibenclamida: O grupo recebeu (i.p) Glibenclamida (10 mg/kg) bloqueador de canais de K⁺ATP - dependente, diluído em solução salina estéril (0,9 %), após 30 min receberam a injeção (i.art) formalina (1,5 %/ articulação; 50 µL).

6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), exceto os escores histopatológicos que foram expressos pela mediana. A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 5.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: o teste t de Student para comparar dois grupos; o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

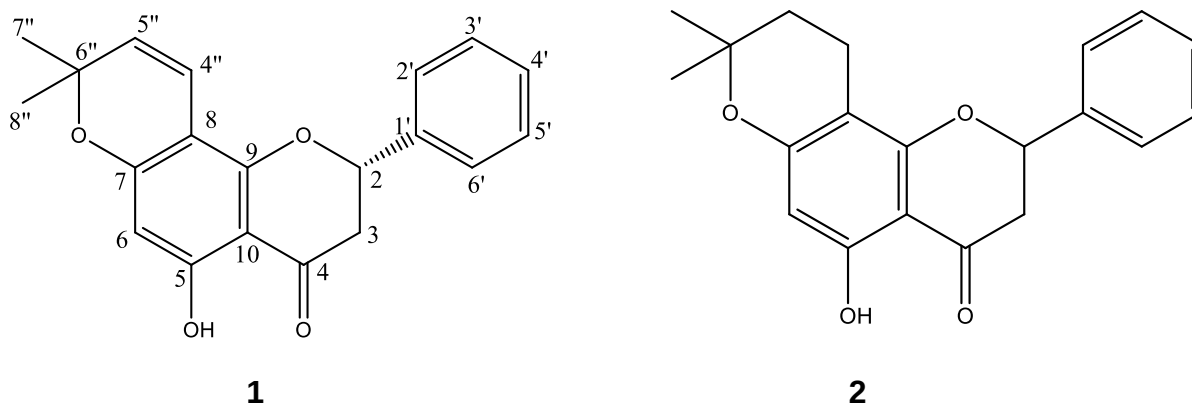
O nível de significância adotado foi de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

7.1 MOLÉCULA SEMISSINTÉTICA 5-hidroxi-6'',6''-dimetilcromano-[2'',3'':7,8]-flavanona (PHO)

Conforme mostra a figura 4 a estrutura final do composto obtido pelas reações químicas descritas na metodologia.

Figura 4 - Composto isolado e semissintético de *Tephrosia toxicaria*. (1) 5- hidroxi-6'',6''-dimetilcromeno-[2'',3'':7,8]-flavanona foi isolado a partir do extrato etanólico das raízes de *Tephrosia toxicaria*. (2) 5- hidroxi-6'',6''-dimetilcromano-[2'',3'':7,8] – flavanona ou composto semissintético foi obtido através da hidrogenação do composto (1).



Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.2 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA

7.2.1 Avaliação da toxicidade aguda

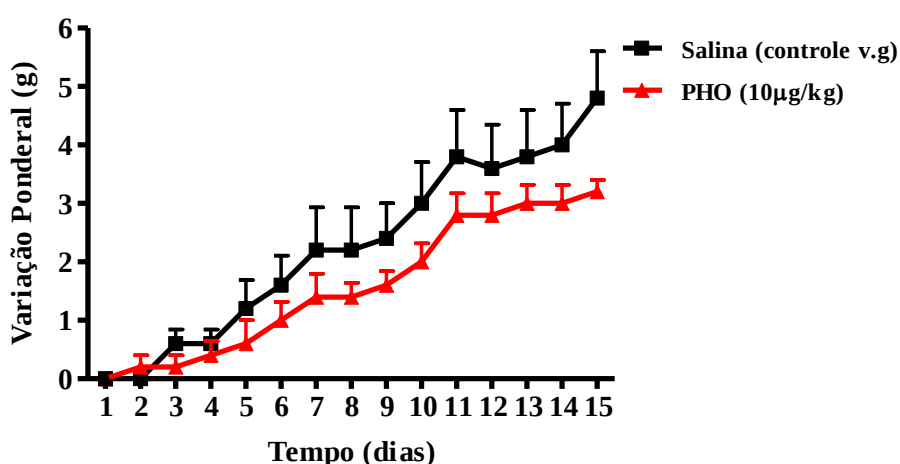
PHO nas doses de (1, 10 e 100 mg kg) administrada oralmente (*per.os* ou *i.p*) não resultaram em mortalidade nem tampouco produziram modificações no comportamento dos animais de alteração neurológica durante todo o ensaio.

7.2.2 Avaliação da toxicidade subaguda

Para investigar a segurança da PHO, camundongos machos e fêmeas foram tratados (*per.os* ou *i.p*) diariamente por 14 dias com PHO (10µg/kg). O grupo controle recebeu (*per.os* ou *i.p*) apenas o veículo (solução salina).

Não foi observado qualquer tipo de alteração comportamental ou morte durante os 14 dias de tratamento. Não ocorreu variação ($p > 0,05$) no peso dos animais que receberam PHO (10µg/kg) ($1,57 \pm 0,29$), comparados ao grupo controle ($2,25 \pm 0,40$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Variação ponderal em camundongos tratados com PHO (10µg/kg) durante 14 dias consecutivos. Os animais foram tratados (*per.os*) com PHO (10µg/kg) ou solução salina (grupo Controle), diariamente durante 14 dias e pesados diariamente. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle (ANOVA; Bonferroni). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle (ANOVA; Bonferroni).



Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

A análise macroscópica dos órgãos dos animais tratados com PHO não revelou qualquer tipo de alteração. Após avaliação do peso relativo dos órgãos (órgão/peso corporal x 100) foi constatado que não houve redução em relação ao grupo controle (TABELA 1).

Na TABELA 2 pode-se observar que o tratamento com PHO (10µg/kg) não alterou ($p > 0,05$) os parâmetros hematológicos, quando comparado ao grupo controle. Ademais, não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) nos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), em relação ao grupo controle.

Tabela 1: Efeito da administração (*per.os*) com PHO (10µg/kg) durante 14 dias sobre os parâmetros bioquímicos e pesos relativos do fígado, coração, rins e baço de camundongos. Grupo controle recebeu apenas veículo (solução salina).

Órgãos	Controle (macho)	PHO (macho)	Controle (fêmea)	PHO (fêmea)
Fígado	1,64± 0,07	1,58±0,05	1,38± 0,08	1,45±0,02
Coração	0,22± 0,03	0,16±0,01	0,23± 0,01	0,16±0,003
Rim	0,47± 0, 04	0,52± 0,04	0,51± 0,03	0,44± 0,01
Baço	0,09± 0,009	0,08± 0,01	0,09± 0,009	0,09± 0,003
AST (TGO)	64,22 ± 19,8	25,00 ± 4,5	55,67 ± 3,4	34,67 ± 7,9
ALT (TGP)	58,96 ± 21,6	71,32 ± 7,5	67,94 ± 9,0	87,50 ± 14,65
Creatinina	0,52 ± 0,11	0,60 ± 0,10	0,42 ± 0,05	0,60 ± 0,07

Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

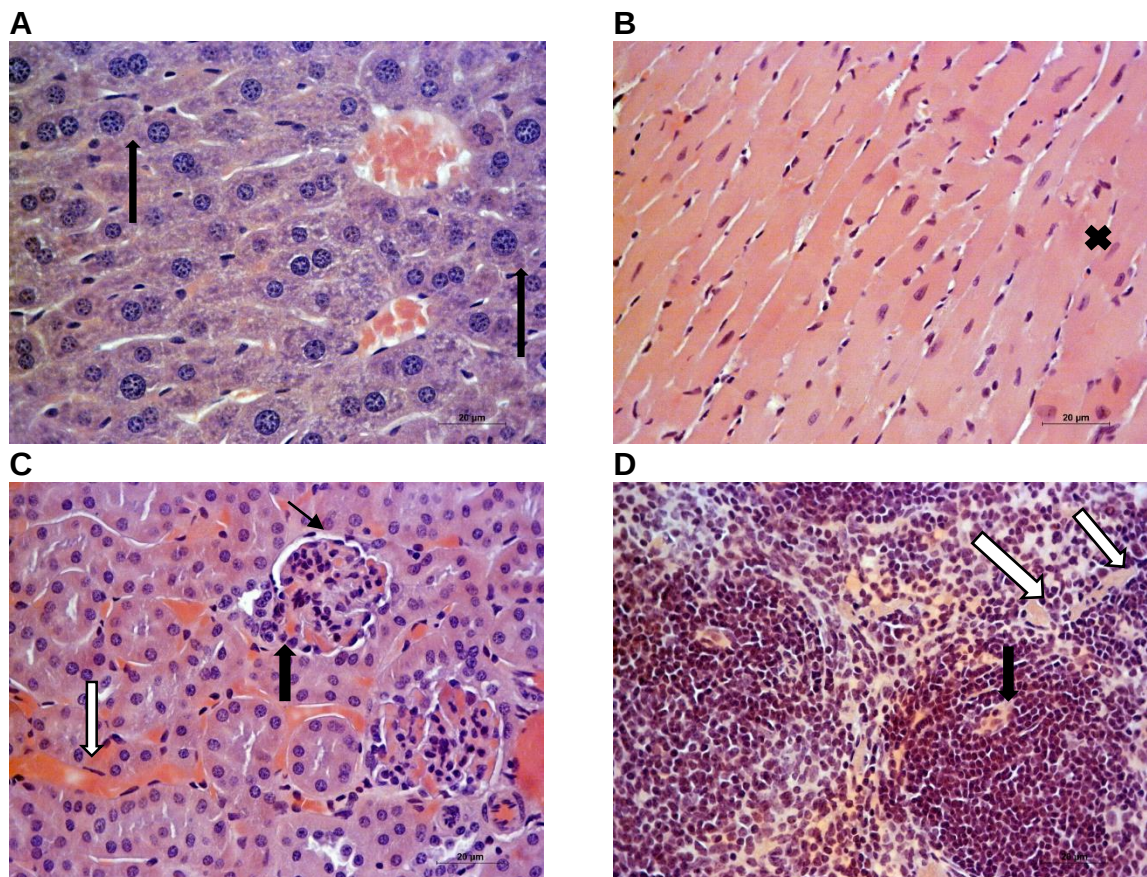
Tabela 2: Efeito da administração (*i.p*) com PHO (10µg/kg) durante 14 dias sobre os parâmetros bioquímicos e os pesos relativos do fígado, coração, rins e baço de camundongos. Grupo controle recebeu apenas veículo (solução salina).

Órgãos	Controle (macho)	PHO (macho)	Controle (fêmea)	PHO (fêmea)
Fígado	1,82± 0,06	1,65±0,08	1,21± 0,10	1,49±0,10
Coração	0,17± 0,01	0,18±0,006	0,15± 0,001	0,16±0,01
Rim	0,62± 0,03	0,63± 0,03	0,41± 0,02	0,42± 0,01
Baço	0,08± 0,003	0,08± 0,006	0,12 ± 0,007	0,09± 0,01
AST (TGO)	51,1 ± 9,5	29,7 ± 11,5	35,7± 12,0	25,7 ± 5,7
ALT (TGP)	60,3 ± 14,8	80,9 ± 15,5	88,4 ± 23,6	117,1 ± 34,0
Creatinina	0,67 ± 0,08	0,80 ± 0,08	0,53 ± 0,03	0,60 ± 0,05

Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

À análise histopatológica, foi observada ausência de toxicidade da PHO nos órgãos coração, baço, rim e fígado, que tiveram sua morfologia geral preservada, bem como a integridade de suas células parenquimatosas (típicas da constituição de cada tecido) e estromais (tecido conjuntivo de permeio e vasos sanguíneos). Apenas o baço exibiu maior reatividade na produção linfocitária na polpa branca. Esses resultados podem afirmar que PHO não gera toxicidade sistêmica e apresenta biocompatibilidade *in vivo* (Figura 5).

Figura 5 - Avaliação histopatológica de órgãos de camundongos após o tratamento subcrônico com PHO (10µg/kg) durante 14 dias: **(A)** fígado com presença de binucleação típica (setas pretas), entremeados por capilares sinusóides. **(B)** coração com cardiomiócitos com aspectos morfológicos dentro do padrão de normalidade. Células com eosinofilia citoplasmática característica (*) e núcleos basofílicos preservados. **(C)** região cortical do rim, com corpúsculos renais formados por glomérulos renais e cápsula renal (setas finas), capilares sanguíneos hiperêmicos (setas brancas), mácula densa (seta preta) dentro do padrão morfológico de normalidade. **(D)** baço com presença de nódulos linfáticos (NL) com arteríola central (setas pretas), envoltos por capilares sinusóides (setas brancas). As secções dos tecidos foram observados sob um microscópio a magnificação 400x, coloração (HE).



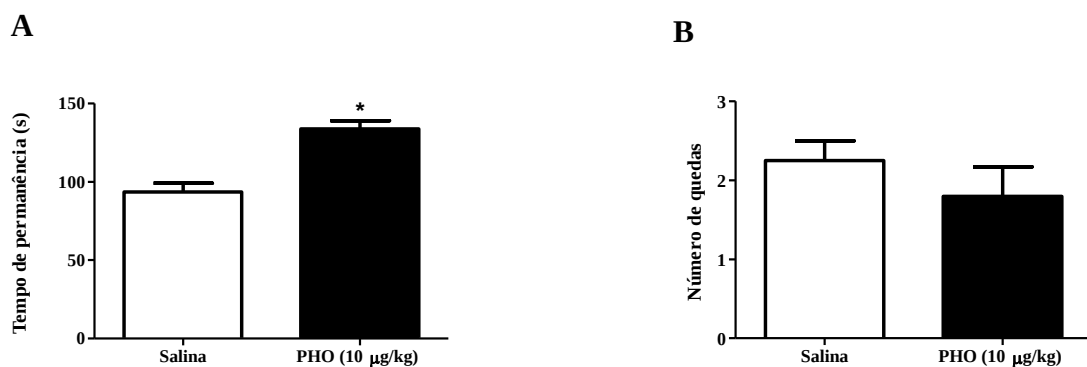
Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.3 EFEITO DO COMPOSTO SEMISSINTÉTICO PHO NO TESTE DO *ROTA ROD*

Para avaliar se PHO pode causar letargia, sonolência relaxamento na musculatura muscular ou desordem na coordenação motora que implique nos testes comportamentais (Formalina), foi realizado o *Rota rod*.

PHO (10µg/kg) não diminuiu o tempo de permanência ($133,8 \pm 5,15$) e a performance dos animais ($1,80 \pm 0,37$) no teste do *rota rod*, sendo semelhante ao grupo salina ($93,5 \pm 5,664$) e ($2,25 \pm 0,2$), respectivamente (Gráfico 2)

Gráfico 2- Efeito da administração aguda da PHO no teste do Rota rod. (A) PHO (10µg/kg) aumentou o tempo de permanência dos animais no aparelho do Rotarod. (B) PHO (10µg/kg) reduziu o número de quedas dos animais do aparelho (B). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina (ANOVA; t-Student).

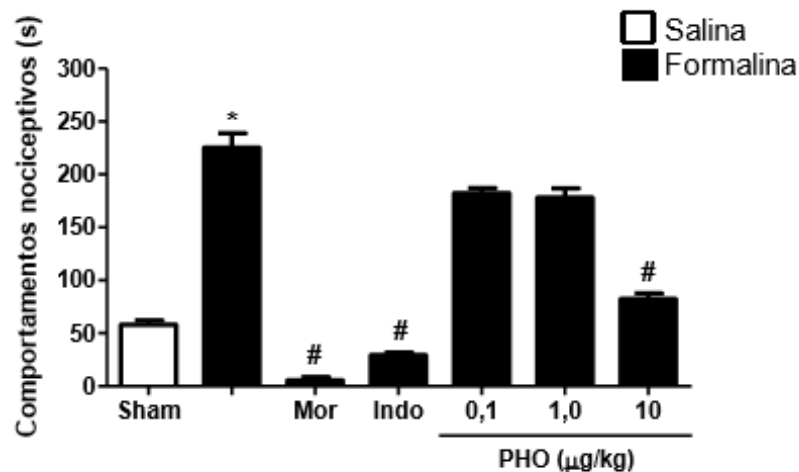


Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.4 PHO INIBE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS

Como observado no Gráfico 3, a dose da PHO (10µg/kg) reduziu as respostas nociceptivas ($p < 0,05$) de maneira significativa ($82,40 \pm 5,30$), quando comparado ao grupo Formalina ($234,7 \pm 8,20$), não sendo diferente do grupo Sham ($58,20 \pm 3,83$). Similarmente, os grupos tratados previamente com Indometacina ou morfina usados como controles positivos reduziram ($32,33 \pm 2,43$; $5,60 \pm 3,09$), respectivamente as respostas nociceptivas ($p < 0,05$).

Gráfico 3- Efeito da PHO na resposta nociceptiva induzida por formalina na ATM de ratos Wistar. A injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. PHO (10 μ g/kg) reduziu significativamente as respostas nociceptivas induzida pela formalina. Os grupos controles, morfina ou indometacina aboliram o efeito nociceptivo. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (n = 5). *p < 0,05 em relação ao grupo Sham, #p < 0,05 em relação ao grupo formalina. (ANOVA, Bonferroni).



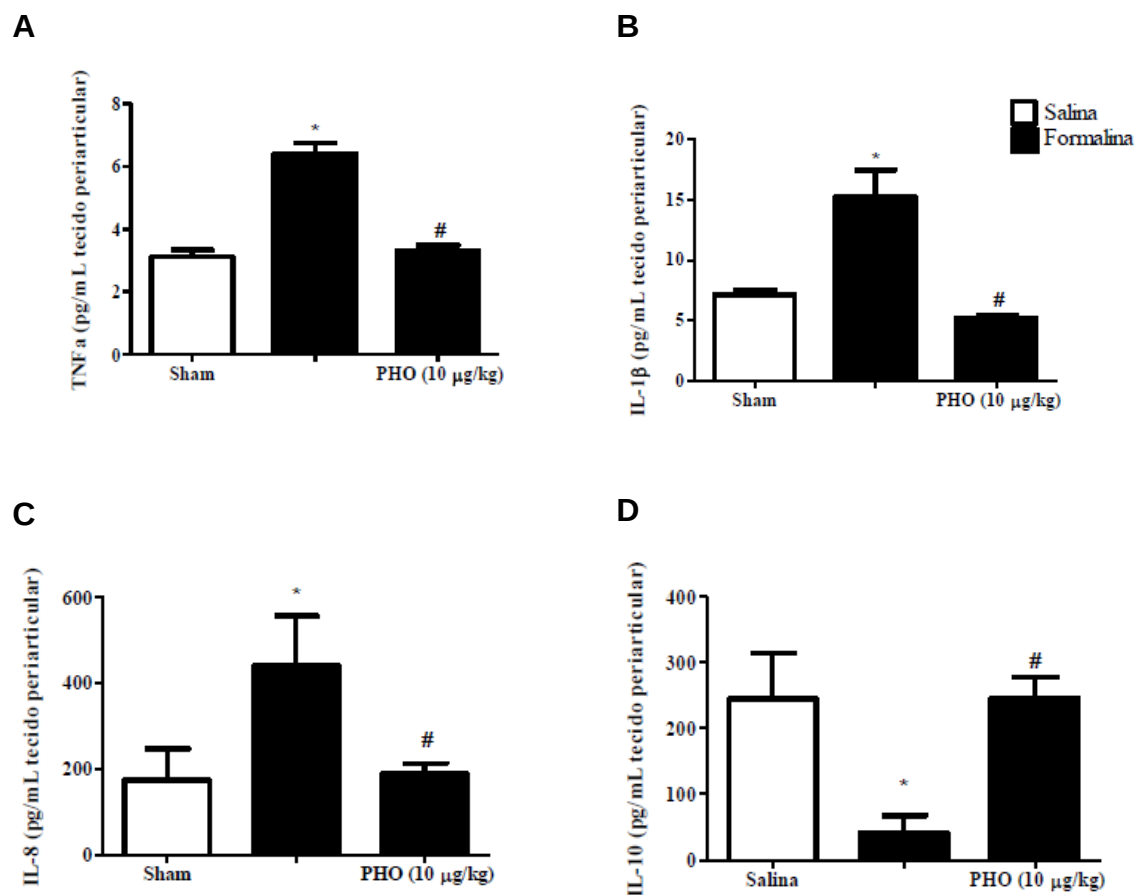
Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.5 EFEITO DA PHO NOS NÍVEIS DE TNF- α , IL-1 β , IL-8 E IL-10 NOS TECIDOS PERIARTICULARES APÓS A INDUÇÃO DA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.

Os níveis da expressão de TNF- α , em que os resultados revelaram um aumento ($6,3 \pm 0,3$) ($p < 0,05$) nos níveis da expressão TNF- α nos animais que receberam somente injeção (iart) de formalina, comparados ao grupo controle salina ($3,1 \pm 0,2$), e PHO (10 μ g/kg) reduziu ($3,3 \pm 0,1$) ($p < 0,05$) os níveis da expressão TNF- α comparados ao grupo formalina (Gráfico 4A). Foi observado aumento ($15,1 \pm 2,2$) nos níveis da expressão IL-1 β nos animais que receberam somente injeção (iart) de formalina, comparados ao grupo controle salina ($7,1 \pm 0,4$) ($p < 0,05$). No entanto, PHO (10 μ g/kg) foi capaz de diminuir ($5,2 \pm 0,2$) ($p < 0,05$) os níveis da expressão IL-1 β comparados ao grupo formalina. (Gráfico 4B). Os resultados revelaram um aumento ($529,0 \pm 117,2$) ($p < 0,05$) nos níveis da expressão IL-8 nos animais que receberam somente injeção (iart) de formalina, comparados ao grupo controle salina ($173,8 \pm 73,1$), e PHO (10 μ g/kg) reduziu ($188,5 \pm 25,0$) ($p < 0,05$) os níveis da expressão IL8

comparados ao grupo formalina (Gráfico 4C). Foi observado uma redução ($41,5 \pm 16,3$) ($p < 0,05$) nos níveis da expressão IL-10 nos animais que receberam somente injeção (i.art) de formalina, comparados ao grupo controle salina ($244,8 \pm 43,1$). No entanto, PHO ($10 \mu\text{g/kg}$) foi capaz de aumentar ($246,7 \pm 30,8$) ($p < 0,05$) os níveis da expressão IL-10 comparados ao grupo formalina (Gráfico 4D).

Gráfico 4- Efeito da PHO nos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-10 nos tecidos periarticulares. (A) PHO ($10 \mu\text{g/kg}$) reduziu significativamente a liberação de IL-1 β após a indução por formalina na ATM ($p < 0,05$). (B) PHO ($10 \mu\text{g/kg}$) reduziu significativamente a liberação de TNF- α após a indução por formalina na ATM ($p < 0,05$). (C) PHO ($10 \mu\text{g/kg}$) reduziu significativamente a liberação de IL-8 após a indução por formalina na ATM ($p < 0,05$). (D) PHO ($10 \mu\text{g/kg}$) aumentou significativamente a liberação de IL-10 após a indução por formalina na ATM ($p < 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ($n = 5$). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham; # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina. (ANOVA, Bonferroni).

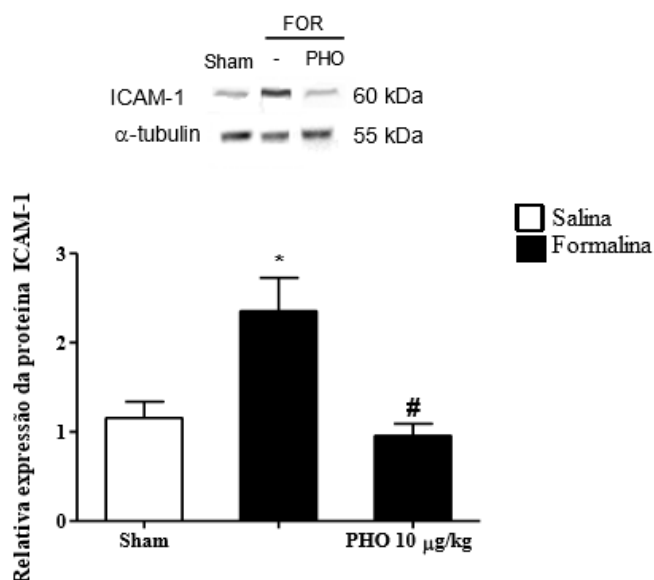


Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.6 EFEITO DA PHO NA EXPRESSÃO PROTEICA DE ICAM-1 NOS TECIDOS PERIARTICULARES

De acordo com a gráfico 5, a expressão proteica de ICAM-1, em que os resultados revelaram um aumento ($2,3 \pm 0,3$) ($p < 0,05$) nos níveis da expressão ICAM-1 nos animais que receberam somente injeção (i.art) de formalina, comparados ao grupo controle salina ($1,1 \pm 0,1$), e PHO ($10 \mu\text{g/kg}$) reduziu ($0,9 \pm 0,1$) ($p < 0,05$) os níveis da expressão ICAM-1 comparados ao grupo formalina.

Gráfico 5- Efeito da PHO nos níveis de ICAM-1 nos tecidos periarticulares. Os tecidos periarticulares foram coletados e processados para realizar Western Blotting com o objetivo de mensurar a expressão proteica de ICAM-1. Observa-se que PHO reduz a expressão proteica de ICAM-1 quando comparado ao grupo formalina. Os valores foram apresentados como média+ EPM da expressão proteica de ICAM-1 que resultou da relação da densidade de ICAM-1 e de α -tubulin. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ($n = 5$). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Sham; # $p < 0,05$ em relação ao grupo formalina. (ANOVA, Bonferroni).

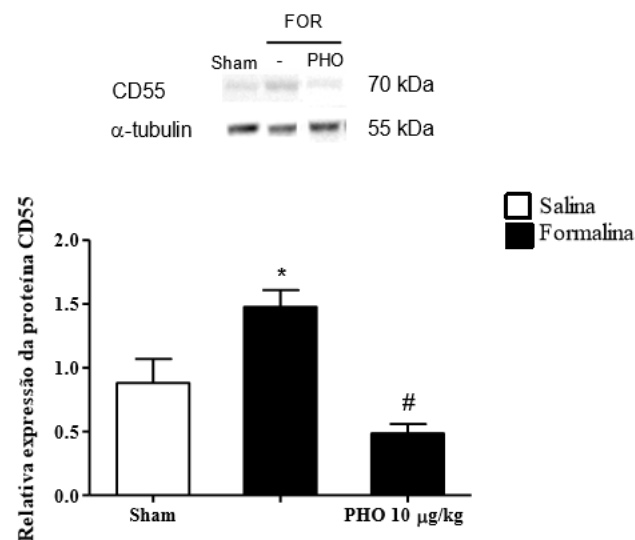


Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.7 EFEITO DA PHO NA EXPRESSÃO PROTEICA DE CD55 NOS TECIDOS PERIARTICULARES

De acordo com a gráfico 6, a expressão proteica de CD55, em que os resultados revelaram um aumento ($1,4 \pm 0,1$) ($p < 0,05$) nos níveis da expressão CD55-1 nos animais que receberam somente injeção (i.art) de formalina, comparados ao grupo controle salina ($0,8 \pm 0,1$), e PHO ($10 \mu\text{g/kg}$) reduziu ($0,4 \pm 0,07$) ($p < 0,05$) os níveis da expressão CD55 comparados ao grupo formalina.

Gráfico 6- Efeito da PHO nos níveis de CD55 nos tecidos periarticulares. Os tecidos periarticulares foram coletados e processados para realizar Western Blotting com o objetivo de mensurar a expressão proteica de CD55. Observa-se que PHO reduz a expressão proteica de CD55 quando comparado ao grupo formalina. Os valores foram apresentados como média+ EPM da expressão proteica de CD55 que resultou da relação da densidade de CD55 e de α -tubulin. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (n = 5). *p < 0,05 em relação ao grupo Sham; #p < 0,05 em relação ao grupo formalina. (ANOVA, Bonferroni).

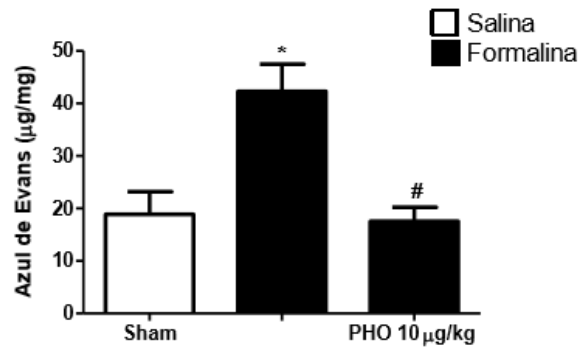


Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.8 PHO REDUZ PERMEABILIDADE VASCULAR NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS.

Conforme mostra o gráfico 7, a formalina a 1,5% promoveu aumento ($p < 0,05$) na permeabilidade vascular ($42,3 \pm 5,1$ µg de azul de Evans/mg de tecido) em relação ao grupo salina ($18,8 \pm 4,2$ µg de azul de Evans/mg de tecido). O pré-tratamento (uma hora) com PHO (10µg/kg) reduziu de maneira significativa ($p < 0,05$) o aumento da permeabilidade vascular em ($17,5 \pm 2,6$ µg de azul de Evans/mg de tecido) quando comparado ao grupo formalina.

Gráfico 7- Efeito da PHO na permeabilidade vascular na hipernocicepção inflamatória da ATM induzida por formalina. A injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda induziu aumento da permeabilidade vascular. PHO (10 μ g/kg) reduziu significativamente a permeabilidade vascular. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (n = 5). *p < 0,05 em relação ao grupo Sham; #p < 0,05 em relação ao grupo formalina. (ANOVA, Bonferroni).

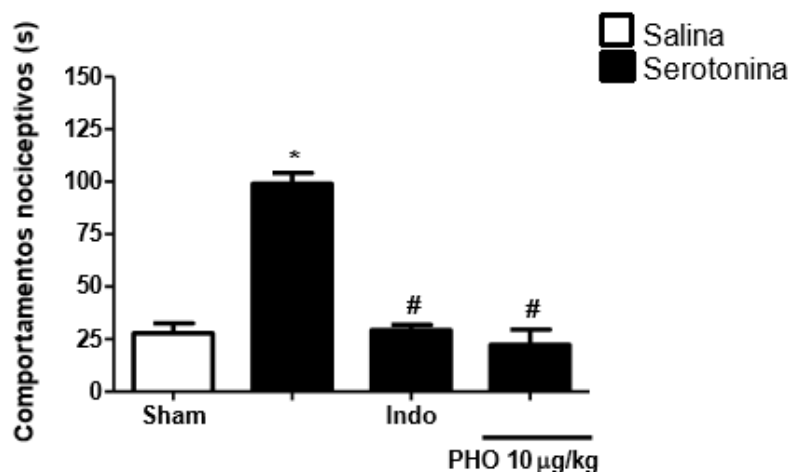


Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.9 PHO INIBE NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR SEROTONINA NA ATM DE RATOS

Como observado no Gráfico 8, a dose da PHO (10 μ g/kg) reduziu as respostas nociceptivas ($p < 0,05$) de maneira significativa ($22,25 \pm 7,29$), quando comparado ao grupo Serotonina ($99,08 \pm 5,16$), não sendo diferente do grupo Sham ($27,83 \pm 4,71$). Similarmente, os grupos tratados previamente com Indometacina usado como controle positivos reduziu ($29,33 \pm 2,43$) as respostas nociceptivas ($p < 0,05$).

Gráfico 8- Efeito da PHO na resposta nociceptiva induzida por serotonina na ATM de ratos Wistar. A injeção (i.art.) de serotonina (225ug/articulação; 50 µL) na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. PHO (10µg/kg) reduziu significativamente as respostas nociceptivas induzida pela serotonina. O grupo controle ou indometacina aboliram o efeito nociceptivo. Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 5). *p < 0,05 em relação ao grupo Sham, #p < 0,05 em relação ao grupo serotonina. (ANOVA, Bonferroni).

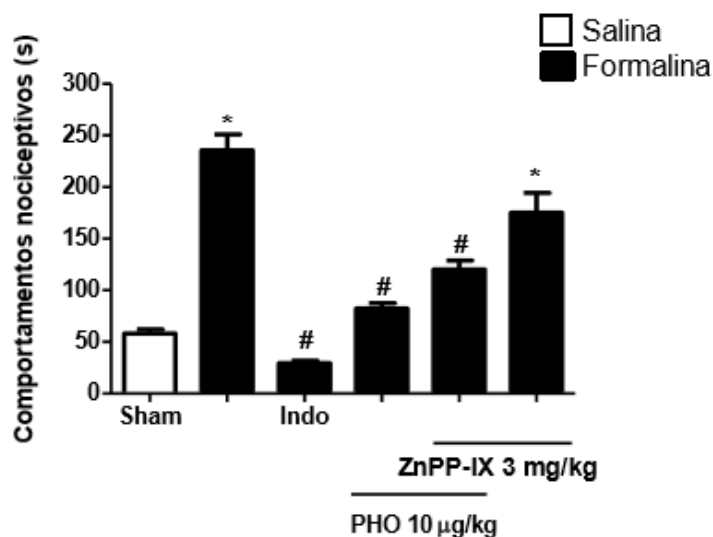


Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.10 ENVOLVIMENTO DA HO-1 NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS

A fim de avaliar o envolvimento da via da HO-1 no efeito de PHO, um grupo de animais foi pré-tratado (s.c.) com ZnPP-IX (3 mg/kg) e após trinta minutos com PHO (10µg/kg). O controle positivo ZnPP-IX (3 mg/kg), inibidor seletivo da hemeoxigenase 1 (HO-1), aumentou os comportamentos nociceptivos (175,2±16,2) (p> 0,05). O grupo PHO pré-tratado com ZnPP-IX não foi capaz de reverter (120,2±8,6) o efeito antinociceptivo quando comparado com o grupo PHO (82,40±5,30). (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Envolvimento da HO-1 na atividade antinociceptiva da PHO na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos. A injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. Indometacina e PHO (10 μ g/kg) reduziram significativamente as respostas nociceptivas induzida pela formalina. ZnPP-IX (3 mg/kg) não reverteu o efeito de PHO. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (n = 5). *p < 0,05 em relação ao grupo Sham; #p < 0,05 em relação ao grupo formalina. (ANOVA, Bonferroni).

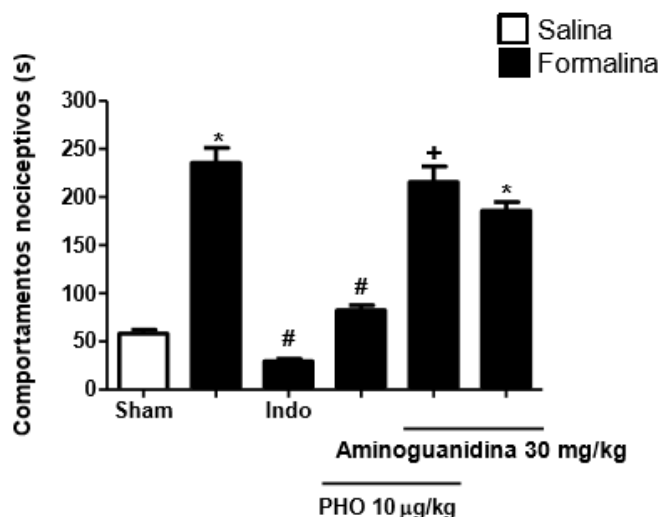


Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.11 ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS

Para avaliar o envolvimento do NO no efeito de PHO, um grupo de animais foi pré-tratado (i.p.) com aminoguanidina (30 mg/kg) e após trinta minutos com PHO (10 μ g/kg). O controle positivo aminoguanidina (30 mg/kg), inibidor seletivo da NO sintetase induzida (NOSi), aumentou os comportamentos nociceptivos (185,8 $\pm$ 9,0) (p > 0,05). O grupo PHO pré-tratado com aminoguanidina foi capaz de reverter (215,5 $\pm$ 10,6) o efeito antinociceptivo quando comparado com o grupo PHO (82,40 $\pm$ 5,30) (Gráfico 10)

Gráfico 10- Envolvimento do NO na atividade antinociceptiva da PHO na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos. A injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. Indometacina e PHO (10 μ g/kg) reduziram significativamente as respostas nociceptivas induzida pela formalina. Aminoguanidina (30 mg/kg) reverteu o efeito de PHO. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (n = 5). *p < 0,05 em relação ao grupo Sham; #p < 0,05 em relação ao grupo formalina; +p < 0,05 em comparação com o grupo PHO. (ANOVA, Bonferroni).

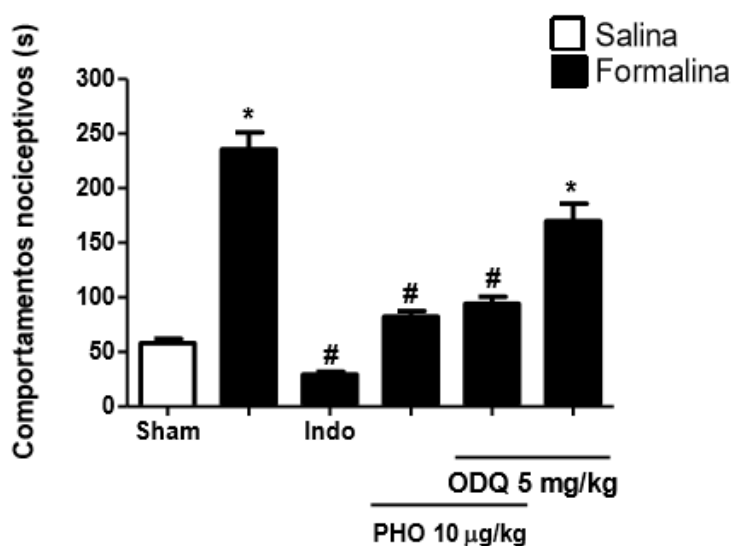


Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.12 ENVOLVIMENTO DO GMPC NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS

Para investigar o envolvimento do GMPc no efeito de PHO, um grupo de animais foi pré-tratado (s.c.) ODQ (5 mg/kg) e após trinta minutos com PHO PHO (10 μ g/kg) O controle positivo ODQ (5 mg/kg), inibidor da guanilil sintase (GC), aumentou os comportamentos nociceptivos (184,8 $\pm$ 7,6) (p> 0,05). O grupo PHO pré-tratado com ODQ não foi capaz de reverter (94,2 $\pm$ 6,3) o efeito antinociceptivo quando comparado com o grupo PHO (82,40 $\pm$ 5,30). (Gráfico 11)

Gráfico 11- Envolvimento do GMPc na atividade antinociceptiva da PHO (10µg/kg) na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos. A injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. Indometacina PHO (10µg/kg) reduziram significativamente as respostas nociceptivas induzida pela formalina. ODQ (5 mg/kg) não reverteu o efeito da PHO. Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 5). *p < 0,05 em relação ao grupo Sham; #p < 0,05 em relação ao grupo formalina. (ANOVA, Bonferroni).

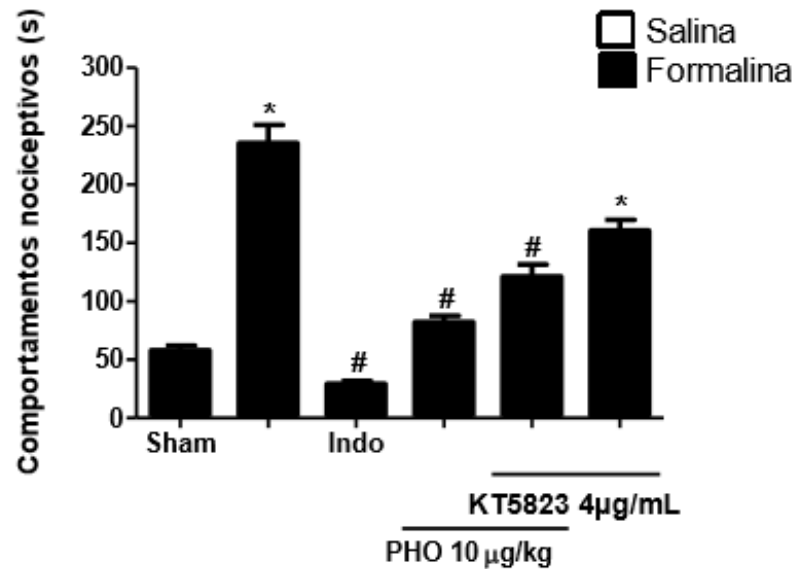


Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.13 ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA KINASE G NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS

A fim de avaliar o envolvimento da proteína quinase G no efeito de PHO, um grupo de animais foi pré-tratado (s.c.) KT5823 (4 µg/mL) e após trinta minutos com PHO (10µg/kg). O controle positivo KT5823 (4 µg/mL), inibidor da proteína quinase G (PKG), aumentou os comportamentos nociceptivos ($160,5 \pm 9,3$) ($p > 0,05$). O grupo PHO pré-tratado com KT5823 não foi capaz de reverter ($123,7 \pm 18,6$) o efeito antinociceptivo quando comparado com o grupo PHO ($82,40 \pm 5,30$). (Gráfico12)

Gráfico12- Envolvimento da proteína Kinase G na atividade antinociceptiva da PHO na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos. A injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 μ L) na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. Indometacina e PHO (10 μ g/kg) reduziram significativamente as respostas nociceptivas induzida pela formalina. KT5823 (4 μ g/mL) reverteu o efeito da PHO. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (n = 5). *p < 0,05 em relação ao grupo Sham; #p < 0,05 em relação ao grupo formalina (ANOVA, Bonferroni).

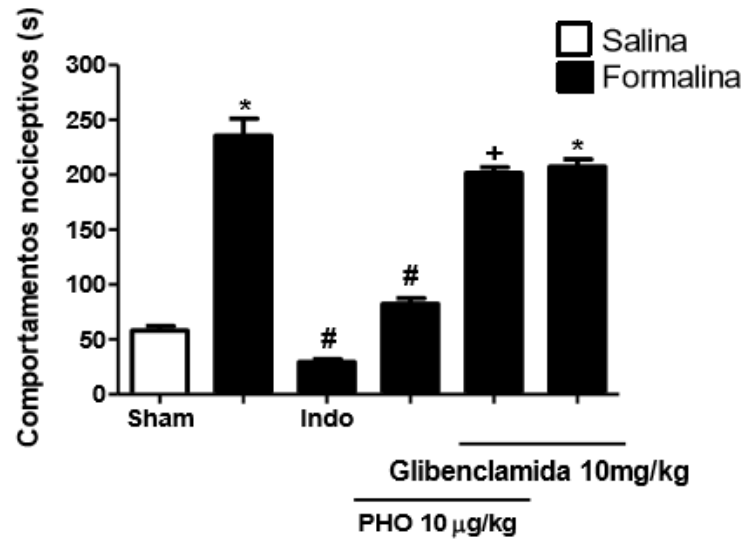


Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

7.14 ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE POTÁSSIO ATP-DEPENDENTES NA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA PHO NA HIPERNOCEPÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR FORMALINA NA ATM DE RATOS

Por fim, avaliou-se o envolvimento do K⁺ATP - dependente no efeito de PHO, um grupo de animais foi pré-tratado (i.p.) glibenclamida (10 mg/kg) e após trinta minutos com PHO (10 μ g/kg). O controle positivo glibenclamida (10 mg/kg), bloqueador de canais de K⁺ATP - dependentes, aumentou os comportamentos nociceptivos (207,3 $\pm$ 6,9) (p > 0,05). O grupo PHO pré-tratado com glibenclamida foi capaz de reverter (201,6 $\pm$ 5,3) o efeito antinociceptivo quando comparado com o grupo PHO (82,4 $\pm$ 5,3). (Gráfico 13)

Gráfico 13 - Envolvimento de canais de K⁺ ATP-dependente na atividade antinociceptiva da PHO na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos. A injeção (i.art.) de formalina (1,5%; 50 µL) na ATM esquerda induziu respostas nociceptivas. Indometacina e PHO (10µg/kg) reduziram significativamente as respostas nociceptivas induzida pela formalina. Glibenclamida (10 mg/kg) reverteu o efeito da PHO. Os dados representam a média ± E.P.M. (n = 5). *p < 0,05 em relação ao grupo Sham; #p < 0,05 em relação ao grupo formalina, +p < 0,05 em comparação com o grupo PHO. (ANOVA, Bonferroni).



Fonte: Dados da Pesquisa (2017)

8 DISCUSSÃO

Neste trabalho, reportamos as atividades farmacológicas da 5-hidroxi-6",6"-dimetilcromano-[2",3":7,8]-flavanona (PHO), que apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida na ATM de ratos. Assim como não causou nenhuma alteração na motricidade dos animais. Esta antinocicepção procedeu, pelo menos em parte, através da via NO/K+ATP-dependente assim como da redução de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-8 e aumento de citocina anti-inflamatória IL-10 nos tecidos periarticulares. Além disso, estes achados foram acompanhados por redução da expressão proteica de ICAM-1 e CD55. Ainda, sem, contudo, apresentar efeitos tóxicos em testes de toxicidade subaguda.

Sabe-se que, de acordo com a literatura, essa é a primeira demonstração de que um flavonoide semissintético (PHO) é capaz de exercer ação antinociceptiva e anti-inflamatória no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida na ATM de ratos.

Os flavonoides são metabólitos secundários conhecidos por ter várias atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* entre os quais podemos destacar suas notáveis propriedades antitumoral, antioxidantes, levando a um menor desenvolvimento de doenças crônicas (PROCHÁZKOVÁ *et al.*, 2011). Observa-se nos últimos anos um crescente aumento por estudos com flavonoides. Alguns autores já reportaram diferentes ações desses compostos como a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em modelo de artrite induzida por zymosan (VAL, 2012), anti-lipoxigenase (ESHWARAPPA *et al.*, 2016), papel protetor contra hipercolesterolemia e condições lipêmicas (TARIQ *et al.*, 2016), atividade antipirética (AFSAR *et al.*, 2015), e antidiabético (ALI *et al.*, 2015). Ademais, são conhecidos por exercerem um potente efeito inibitório sobre inúmeras enzimas relacionadas à ativação celular e à produção de mediadores inflamatórios (BRITO, 2007).

Atualmente, existe uma busca crescente por novas drogas analgésicas e anti-inflamatórias, seja motivada por distorções na efetividade do arsenal atualmente empregado, seja pelos altos custos envolvendo o desenvolvimento e produção de medicamentos (YUNES; CALIXTO, 2001; SIMÕES *et al.*, 2003). Apesar de os seres humanos há várias décadas usar ervas medicinais para o tratamento de algumas doenças, somente há poucos anos as propriedades bioquímicas e farmacológicas dos

flavonoides começaram a ser desvendadas (HAVSTEEN, 2002). Essas substâncias representam uma das mais importantes e interessantes classes de compostos biologicamente ativos (GARG *et al.*, 2001).

Plantas são consideradas organismos ricos em metabólitos potencialmente bioativos, havendo um grande interesse no uso destas como alternativa à síntese de medicamentos. No entanto, poucos estudos foram realizados sobre o perfil de segurança e toxicidade desse compostos semissintéticos (QIN *et al.*, 2009, KANDHARE *et al.*, 2016).

Os ensaios de toxicidade aguda constituem geralmente o primeiro passo na avaliação e das características tóxicas de uma substância (GHOSH *et al.*, 2017). Este tipo de estudo auxilia na determinação de valores de DL50 e fornece informações sobre tipos potenciais da atividade de uma nova estrutura química. No entanto, em nosso estudo de toxicidade aguda, todos os animais tratados por via oral e intraperitoneal permaneceram vivos não manifestaram sinais visíveis de toxicidade nas doses avaliadas (1, 10 e 100 mg/kg). Na observação dos parâmetros descritos no protocolo experimental, não foi evidenciado nenhum tipo de alteração em nenhum dos sexos durante o período de observação. Não sendo possível determinar a dose letal média (DL50), pois as doses administradas não provocaram morte em nenhum dos animais estudados durante o período de observação.

A dose que apresentou efeito antinociceptivo foi (10 µg/kg; *per.os.*) no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina ou serotonina na ATM. Isso sugere que PHO possui uma janela de segurança ampla.

O estudo de toxicidade de doses repetidas é vitalmente necessário não apenas para identificar a gama de doses que podem ser utilizadas posteriormente, mas também para revelar os possíveis sinais clínicos provocados pelas substância sob investigação. Neste aspecto, para avaliar a segurança da utilização de um flavonoide semissintético, foram avaliados parâmetros de toxicidade utilizando camundongos (machos e fêmeas) tratados (*per.os.* e *i.p.*) com PHO (10 µg/kg), diariamente durante 14 dias.

Na toxicidade aguda pré-clínica, os sinais de toxicidade sistêmica são definidos considerando a redução na massa corporal, além da redução do desenvolvimento ponderal dos animais experimentais (TOFOVIC; JACKSON 1999; RAZA *et al.*, 2002; TEO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2016).

Quanto ao peso corporal dos animais tratados com PHO (10 µg/kg) não houve qualquer alteração ponderal em ambos os sexos em relação ao grupo que recebeu apenas solução salina.

Em estudo realizado por Silva *et al.* (2015) com extrato hidroalcolico de própolis vermelha (HERP) rico em flavonoides, foi verificado que a administração subaguda oral de HERP (10, 100 e 200 mg/kg por dia durante 28 dias) resultou em alterações insignificantes no consumo de ração e água em comparação com o grupo controle. Os mesmos autores observaram ainda que ocorreram mudanças significativas na ingesta de alimentos (machos durante as semanas 1 e 3 tratados com HERP 200 e em fêmeas na semana 3 em HERP 100) e na ingestão de água (machos durante semana 1 tratados com HERP 200 e fêmeas: semana 3 tratadas com HERP 100). No entanto, ocorreu um aumento no grupo das fêmeas tratadas com a dose de 200 aumentou comparado com o grupo controle. Esse resultado pode estar relacionado ação estrogênica dos fitoestrógenos presentes em própolis.

Flavonoide tectorigenina extraído das raízes de *Belamcanda chinensis* teve sua toxicidade subaguda avaliada durante 28 dias por Ha *et al.*, (2013) nas doses 100 e 300 mg/kg. Não foram observadas nenhum sinal de toxicidade, nem alterações das atividades fisiológicas, pesos corporais durante e consumo de alimentos durante o tratamento com o composto flavonidico.

Outros sinais de toxicidade podem ser expressos pela alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (GONZALEZ e SILVA, 2003). As análises das enzimas transaminases (ALT e AST) e da fosfatase alcalina são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas (MARTIN *et al.*, 1981; SILVA *et al.*, 2005). Estas estão amplamente distribuídas nos tecidos, a AST predomina no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e a ALT no fígado, rim e coração. A AST está presente no citosol e nas mitocôndrias dos hepatócitos. Considerando que estas transaminases são sensíveis indicadores de dano hepatocelular e dentro dos limites dos padrões podem fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos sofridos pelos hepatócitos (MILLER; GONÇALVES, 1999; ALHABORI *et al.*, 2002). No presente estudo observou-se que a massa relativa dos órgãos e os parâmetros bioquímicos não sofreram nenhuma alteração significativa quando comparados ao grupo controle.

Silva *et al.*, (2015), observaram um aumento significativo do peso do baço no grupo tratado com HERP100 em comparação com o grupo controle. No entanto, as análises histopatológicas demonstraram que este evento era irrelevante. Dados histopatológicos semelhantes foram obtidos pelos autores Gupta; Sasmal e Mukherjee (2014) para o extrato de acetona de *Saraca asoca* na dose mais elevada (1000 mg/kg) preservando o revestimento e a estrutura interna do fígado e rim.

Schauss *et al.*, (2015), relataram a ausência de efeitos deletérios em testes subagudos de sete dias e crônicos por noventas dias do lavitol, além de ensaios de genotoxicidade. Este composto está patenteado e é utilizado como aditivo alimentar e como ingrediente de suplemento dietético. Rico em um flavonoide a dihydroquercetina, um potente antioxidante também é conhecido como taxifolina. Na avaliação sub aguda os animais foram tratados com as doses 10000 ou 15000 mg/kg, não sendo observada nenhuma alteração no peso, comportamento e morte destes animais. No ensaio crônico foi observado que a dose de 1500 mg/kg reduziu a atividade motora e número de defecações em fêmeas no trigésimo dia.

Em estudos não clínicos de substâncias com atividade antinociceptiva devem ser anuladas possíveis alterações do desempenho motor, que podem ser produzidas por alguns fármacos potencialmente analgésicos. Tendo em vista que uma das maiores fonte de erros em estudos sobre fármacos que interferem na transmissão da resposta nociceptiva é a modificação no desempenho motor do animal (MILLAN, 2002). Por tal motivo, avaliamos se a PHO interferia na coordenação motora dos animais por meio do teste *rota rod*. Nossos resultados demonstraram que PHO 10 µg/kg não altera o desempenho motor dos animais. Assim, comprovou-se que a redução das respostas nociceptivas dos animais nos testes avaliados ocorrem devido ao efeito analgésico de PHO.

Esses resultados são reafirmados por outros estudos de autores que avaliaram flavonoides ou extratos e óleos de vegetais ricos nestes compostos. Em estudo realizado por Suganya e Sumathi (2016) com Rutin (3, 3',4 ', 5, 7-pentahydroxyflavona-3-rhamnoglucoside) na dose de (50 mg/kg; *per.os.*) foi verificado que não alterou o desempenho motor dos animais. Almeida *et al.*, (2015) demonstraram que 3,6-dimethoxy-6",6"-dimethyl-(7,8,2",3")-chromeneflavona nas doses de (2,5; 5 e 10 mg/kg; *i.p*) não alterou a performance dos animais no teste.

Um estudo recente com o óleo essencial das partes aéreas de *Artemisia ludoviciana* na dose de (316 mg/kg; i.p) rico em flavonoides, mostrou a ausência de efeitos sedativos no teste (ANAYA-EUGENIO *et al.*, 2016). Em concordância com esses resultados, Martinez *et al.* (2013) utilizando o mesmo modelo, demonstraram que o efeito antinociceptivo do extrato etílico de *Tephrosia sinapou* (100 mg/kg; i.p), não interferia na motricidade e coordenação motora dos animais.

Uma série de avanços foram alcançados no que se refere ao controle da dor e os mecanismos moleculares envolvidos durante este processo. No entanto, apesar do investimento considerável na pesquisa farmacêutica, ainda existem poucas classes de drogas analgésicas, principalmente para o controle da dor crônica (WOODCOCK; WITTER, DIONNE, 2007) Neste sentido, alguns modelos de estudos de nocicepção em animais podem ser utilizados para avaliar a atividade antinociceptiva de compostos bioativos que, de uma maneira geral, apresentam características próprias e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos a fim de prospectar gerando novos fármacos no controle da inflamação e dor.

O modelo para avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de PHO foi padronizado por Roveroni *et al.*, (2001). Neste estudo foi observado que a substância flogística, formalina 1,5% na ATM induzia alterações comportamentais em ratos. As respostas foram caracterizadas pelo movimento de mandíbula, levantamento de cabeça e coçar a região orofacial ipsi ou contralateral a administração de formalina a 1,5% quantificadas durante 45 minutos.

Este modelo está constituído em duas fases: a primeira é induzida por uma ativação direta das fibras nociceptivas C. A segunda fase é mediada pela estimulação contínua de nociceptores por mediadores inflamatórios (serotonina, histamina, bradicinina, NO, prostaglandinas, cininas) liberados do tecido lesado, levando à sensibilização dependente da atividade dos neurônios do sistema nervoso central dentro do corno dorsal (TJØLSEN *et al.*, 1992; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Reportamos pela primeira vez na literatura que um flavonoide semissintético (PHO), reduziu o limiar de hipernocicepção no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos.

Coura *et al.*, (2017), observaram que uma fração polissulfatada (1, 3, ou 9 mg/kg; s.c.) obtida da alga marinha vermelha, *Gracilaria cornea* (Gc-FI), ao serem

administradas 30 minutos antes da injeção de formalina a 1,5% na ATM esquerda, foi capaz de reduzir o limiar de hipernocicepção inflamatória quando comparado ao grupo formalina. Araújo *et al.*, (2017), verificaram que o pré tratamento de ratos com uma fração polisacarídica FII (0,03, 0,3 ou 3,0 mg/kg; s.c.) obtida da alga marinha vermelha, *Solieria filiformis* administradas 30 minutos antes da injeção de formalina a 1,5% na ATM esquerda, reduziu o limiar nociceptivo no mesmo modelo.

Quanto aos parâmetros inflamatórios, PHO diminuiu o extravasamento plasmático do corante azul de Evans no exsudato dos tecidos periarticulares quando comparado ao grupo formalina. A acumulação no tecido de corante azul de Evans é uma indicação do extravasamento de proteína do plasma (FIORENTINO *et al.*, 1999).

Almeida *et al.*, (2017), reportaram que o epóxido de limoneno (75 mg/kg) reduziu o extravasamento plasmático quando comparado aos animais tratados com o composto 48/80. O flavonoide quercitina na dose de (0,1 mg/kg) reduziu o extravasamento plasmático no modelo de avaliação de motilidade gastrointestinal em ratos (HUIJIN *et al.*, 2015).

As citocinas são proteínas sinalizadoras e glicoproteínas vitais para a organização da migração de leucócitos para os tecidos danificados, sendo um processo sequencial e coordenado que requer citocinas/quimiocinas, selectinas, integrinas e intercélulas de adesão molecular (ICAMs) (NAPIMOGA *et al.*, 2007). O TNF- α é considerado uma citocina pró-inflamatória primária, devido seu papel de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8), sendo que o ponto final da cascata resulta na ativação da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (SOMMER; KRESS, 2004). As citocinas inflamatórias, incluindo a IL-6, IL-1, IL-1 β , e TNF- α , estão envolvidos na patogênese da artrite reumatoide, induzindo a infiltração de células do sistema imunológico, estimulando a liberação da matriz de metaloproteinase e outras proteases para degradar a cartilagem, e regular a expressão de genes pró inflamatórios (MCINNES, SCHETT, 2011; LIN *et al.*, 2014).

No presente estudo, notou-se uma redução expressiva nos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-8 e aumento de IL-10 nos tecidos periarticulares.

Outros autores tem demonstrado efeitos anti-inflamatórios dos flavonoides, mostrando a dependência da inibição de TNF- α e IL-1 β . Zhong *et al.* (2014), demonstrou a eficácia do flavonoide de *Litsea coreana* em modelo de artrite por adjuvante de Freund, inibindo TNF- α e IL-1 β . Galangina, em modelo de artrite por

colágeno, inibiu IL-1 β , TNF- α e IL-17 (JEONG *et al*, 2013). Morin reduziu a expressão das metaloproteinases e IL-1 β (CHEN *et al*, 2012).

Em adição as citocinas pró-inflamatórias, ICAM-1 (CD-54) é uma proteína que desempenha um papel crucial na adesão e migração de neutrófilos através do endotélio (SUMAGIN; SARELIUS, 2007; YANG *et al*, 2005). Ademais, é uma molécula de transdução de sinal que liga as interações leucócito-célula endotelial com a regulação da permeabilidade endotelial. ICAM-1 também é significativamente regulada positivamente e localizada na superfície apical em vários epitélios sob condições inflamatórias (SUMAGIN; PARKOS, 2015). Outra importante proteína reguladora é a CD55. É expressa em todos as células e tecidos e é encontrada na forma solúvel nos fluidos corporais (MEDOF *et al.*, 1987).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que PHO reduziu os níveis de expressão de ICAM-1 e CD55 em animais que receberam a administração intra-articular de formalina 1,5 %.

Tsaroucha *et al.*, 2016 demonstraram por ELISA que os animais tratados com o flavonoide apigenina diminuiu os níveis de expressão de ICAM-1 comparado com o grupo não tratado, sugerindo uma limitação do processo inflamatório que ocorre durante a reperfusão. Outro estudo mostrou que o flavonoide eupafolina reduziu a expressão de ICAM-1 em células A549 tratadas com TNF- α (SUNG *et al.*, 2015). O DiMNF, composto flavonidico, reprimiu a expressão de CD55 em células Huh7 e Hep3B. Estas células foram tratadas durante uma hora com DiMNF 10 μ M e subsequentemente Tratado durante 24 h com 10 ng / ml de IL1 (GITANJALI *et al.*, 2015).

Ademais, elucidamos o possível mecanismo de ação na modulação farmacológica da PHO, avaliando o possível envolvimento da via HO-1 e NO/ GMPc/PKG/K+ATP dependente.

Similarmente aos opióides periféricos, o mecanismo antinociceptivo de PHO envolve a ativação de NO/K+ATP-dependente. Esta conclusão foi observada quando a atividade antinociceptiva periférica de PHO revertida por inibidores específicos da via, a saber: aminoguanidina, e glibenclamida, respectivamente.

A literatura relata processos dicotômicos na modulação do NO em relação as funções neurológicas, fisiopatológicas e psicológicas (LINDSAY *et al*, 2010). Por isso, pode não ser surpreendente que o NO esteja envolvido na modulação de vias

pronociceptivas, bem como antinociceptivas. Geralmente, o NO ou outros óxidos de nitrogênio assumem funções biológicas, incluindo relaxamento do endotélio, a inibição da agregação plaquetária, da inflamação e infecção, e ainda na modulação da neurotransmissão da dor (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; CUNHA *et al.*, 2010).

Adicionalmente a via NO-PKG- canais de K⁺ ATP-dependente é um importante mecanismo analgésico de opióides, alguns fármacos não-esteroides anti-inflamatórios, tais como o diclofenaco e a dipirona, produtos naturais e doadores de NO (D. SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004; POSSEBON *et al.*, 2014, SACHS *et al.*, 2004, SANTODOMINGO-GARZON *et al.*, 2006; STAURENGO-FERRARI *et al.*, 2014).

Os canais K⁺ ATP-dependente, uma vez bloqueados, são impedidos de liberar o potássio para o meio extra celular causando hiperpolarização celular neuronal, não ocorrendo a despolarização necessária para desencadear a condução do impulso doloroso (HAJHASHEMI; AMIN, 2011). Dependendo da localização, esses canais podem agir direta ou indiretamente nos sinais de transmissão da dor. Atualmente, vários anestésicos utilizados na clínica agem pela interação com os canais de K⁺ (McCURDY; SUCULLY, 2005). Estes dados suportam a ideia de que o efeito antinociceptivo produzido por PHO, pode ocorrer através do envolvimento do NO/K⁺ATP, semelhante a alguns anti-inflamatórios não esteroides (AGUIRRE; GRANADOS, 2000; ORTIZ *et al.*, 2002).

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do grande número de drogas anti-inflamatórias e analgésicas disponíveis, seus efeitos colaterais e a ineficácia de algumas drogas em algumas condições exigem a busca contínua de novas drogas. Demonstramos que a (PHO) é segura e apresenta efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivo em modelos de hipernocicepção inflamatória induzida na ATM de ratos. Essa antinocicepção se deu através da redução dos níveis proteicos dos mediadores inflamatórios $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-8 e aumento de IL-10 nos tecidos periarticulares além da ativação da via da NO/K⁺ATP-dependente. É válido ressaltar que este é o primeiro estudo que descreve o mecanismo de ação no efeito anti-inflamatório da (PHO). Além disso, sugerimos que PHO poderá contribuir para a introdução de uma nova abordagem terapêutica mais específica para as condições inflamatórias da ATM, trazendo benefícios superiores a um tratamento paliativo no tratamento dessa patologia.

REFERÊNCIAS

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

ABRAHAMSEN, B et al. The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. **Science**. v. 1, n. 321(5889), p. 702-5, 2008.

AFSAR T. et al. Antipyretic, anti-inflammatory and analgesic activity of *Acacia hydaspica* R. Parker and its phytochemical analysis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. p. 15:136, 2015.

AGRA, M.F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for the participation of the nitric oxide–cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 395, n. 1, p. 9-13, 2000.

AHMED HASSAN L.E. et al. . Crystal structure elucidation and anticancer studies of (-)-pseudosemiglabrin: a flavanone isolated from the aerial parts of *Tephrosia apollinea*. **PLoS One**. v.7; n.9, 2014

AJUEBOR, M. N. et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan induced inflammation. **Immunol**. v. 95, p. 625- 630, 1998.

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.

AL-HABORI, M. et al. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 209-217, 2002.

ALI, M.A. et al. Antidiabetic and antioxidant activities of ethanolic extract of *Semecarpus anacardium* (Linn.) bark. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 138, 2015.

ALMEIDA, J.R.G.S et al. 3, 6-Dimethoxy-6 ", 6 "-Dimethyl-(7, 8, 2 ", 3 ") -Chromene flavone, a Flavonoid Isolated from *Lonchocarpus Araripensis* Benth.(Fabaceae), Reduces Nociceptive Behaviour in Mice. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 10, p. 1622-1627, 2015.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, n. 1000 , p. 40-56, 2004.

ALSTERGREG P.; KOOP S. Prostaglandin E2 in temporomandibular joint synovial fluid and its relation to pain and inflammatory disorders. **J Oral Maxillofac Surg**, n. 2, p. 180-186, 2000.

ALVIM, N.A.T. et al. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 14, n. 3, 2006.

ANAYA-EUGENIO, G.D. et al. Antinociceptive activity of the essential oil from *Artemisia ludoviciana*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 179, p. 403-411, 2016.

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.

ARAÚJO, I. W. F. et al. Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. **International Immunopharmacology**, v. 44, p. 160-167, 2017.

AUSTIN, C. E et al. Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. **J Biol Chem**, v. 272, p. 11420-5, 1997.

BARANANO, D.E.; SNYDER S.H. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p.10996–11002, 2001.

BARROSO, G. M. et al. Leguminosae. In: Sistemática de Angiospermas do Brasil. **Imprensa Universitária**, Viçosa, v. 2, p. 15- 100, 1991.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v.2, n. v. 139, p.267-284, 2009. Disponível em : < <http://www.doi:10.1016/j.cell.2009.09.028>>. Acesso em: 24 jan. 2016.

BAUTISTA, D.M.; PELLEGRINO, M.; TSUNOZAKI, M. TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation. **Annual Review of Physiology**, n. 75, 1-20, 2013.

BELL, E. A.; CHARLWOOD, B.V. Secondary plant products, in Encyclopedia Plant Physiology. **New York: Springer-Verlag**, Berlin, Heidelberg, v. 8, 1980.

BENALLAOUA, M. et al. Pharmacologic induction of heme oxygenase 1 reduces acute inflammatory arthritis in mice. **Arthritis Rheum**, v. 56, p.2585–2594, 2007.

BENDER, S. D. Orofacial pain and headache: a review and look at the commonalities. **Current pain and headache reports**, v. 18, n. 3, p. 1-6, 2014.

BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. d Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 1, p. 214-223, 2000.

BENNOUNA, S.L. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. **J Immunol**, v. 171, n.11,p. 6052-6058, 2003.

BEZERRA, M. M.et al. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 374, n. 4, p. 265–273, 2007.

BHADADA, S. V.; GOYAL, R. K. Effect of aqueous extract of Tephrosia purpurea on cardiovascular complications and cataract associated with streptozotocin-induced diabetes in rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n. 5, p. 522, 2015.

BORTOLUZZI, R. L. C. et al. Abordagens taxonômicas e citogenéticas em Leguminosae-Caesalpinioideae na Região Sul do Brasil. **Rev Bras Bioc**, v. 5, n. 2, p. 339-341, 2007.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

BREDT, D. S. et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, v. 351 n.6329, p. 714-718, 1991.

BREIVIK, H. et al. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. **Eur. J. Pain** , v.10, n. 4 , p. 287-333, 2005.

BRITO, F.A et al. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Braz J Med Biol Res**. v. 40, n. 1, p. 105-15, 2007.

BRUNETON, J. **Farmacognosia**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2001.

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.

CALIXTO ,J. B. et al. Receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology**, v.143, n.7, p.803-818. . Disponível em:< [http://www. doi:10.1038/sj.bjp.0706012](http://www.doi:10.1038/sj.bjp.0706012)>. Acesso em: 06 jun.2015.

CARVALHO, P.G.; BRANCO, L.G.S.; LEITE- PANISSI, C.R.A. Involvement of the heme oxygenase–carbon monoxide–cGMP pathway in the nociception induced by acute painful stimulus in rats. **Brain Res**, v. 1385, p. 107 – 113, 2011.

CHAVES, H.V. et al. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. **J Biomed Biotech**, v. 2011, n. 707985, p.11 , 2011.

CHEN, W.P. et al. Morin exerts antiosteoarthritic properties: an in vitro and in vivo study. **Exp Biol Med (Maywood)**. v. 237, n. 4, p. 380-6, 2012 .

CHIN, Y. W. et al. Drug discovery from natural sources. **The AAPS journal**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.

CHISNOIU, A.M. et al. Factors involved in the etiology of temporomandibular disorders - a literature review. **Clujul Medical**. v. 88, n. 4, p. 473-478, 2015.

CIANCAGLINI, R.; RADAELLI, G. The relationship between headache and symptoms of temporomandibular disorder in the general population. **J. Dent**, v. 29, n. 2, p. 93-98, 2001.

CLARKE, G.; BANERJEE, S.C. A glucoside from *Tephrosia purpurea*. **J. Chem. Soc**, v.97, p.1833–1837, 1910.

CORBY, H.D.L. The systematic value of leguminous root nodules. In: R.M. Polhill & P.H. Raven (eds.). **Advances in Legume Systematics**. United Kingdom, 1981. p. 657-669.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro, 1974.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C.J. Pain: molecular mechanisms. **J Pain**. v. 1, n. 3, p. 35-44, 2000

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

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**, 2017.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**. v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.

CUNHA FQ, TEIXERA MM, FERREIRA SH. Pharmacological modulation of secondary mediator systems—cyclic AMP and cyclic GMP—on inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**. v. 127, n. 3, p. 671-678, 1999.

CUNHA, T.M. et al. Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1 β maturation. **Molecular pain**, v. 6, n. 1, p. 63, 2010.

DA SILVA, R. O. et al. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 170, p. 66-71, 2015.

DE ALMEIDA, A. A. C. et al. Physio-pharmacological Investigations About the Anti-inflammatory and Antinociceptive Efficacy of (+)-Limonene Epoxide. **Inflammation**, p. 1-12, 2017.

DERBOCIO, A.M et. al. The hemodynamic effects of zymosan in the perfused rat liver. **Vascular Pharmacology**, v. 43, p.75-85, 2005.

DIAS, J.M. Dor: Passado, presente e futuro. **Anest Reg Terap Dor**. p. 10-30, 2009.

DIB-HAJJ, SD. et. al. Sodium channels in normal and pathological pain. **Annu Rev Neurosci.**, v. 33, p. 325-347, 2010. Disponível em: < [http://www. doi: 10.1146/annurev-neuro-060909-153234](http://www.doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153234)>. Acesso em: 29 jul.2015.

DRAY, A.; PERKINS, M. Kinins and pain. In: FARMER, S.G. **The Handbook of Immunopharmacology: The Kinin System**. Academic Press: London, 1997, p. 157-172.

DUBNER, R.; REN, K. Brainstem mechanisms of persistent pain following injury. **J Orofac Pain**, v. 18, n. 4, p.299-305, 2004.

DUBUISSON, D; DENNIS S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**. v.4, n. 2, p. 161-74, 1977.

DZOYEM, J.P. et al. Anti-inflammatory and anticholinesterase activity of six flavonoids isolated from *Polygonum* and *Dorstenia* species. **Arch Pharm Res**, n.8, 2015.

EL SHOUBAKY, G.A. et al. Isolation and Identification of a Flavone Apigenin from Marine Red Alga *Acanthophora spicifera* with Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities. **Journal of experimental neuroscience**, v. 10, p. 21, 2016.

ESATBEYOGLU, T. et al. Sesquiterpene Lactone Composition and Cellular Nrf2 Induction of *Taraxacum officinale* Leaves and Roots and Taraxinic Acid β -d-Glucopyranosyl Ester. **Journal of Medicinal Food**, 2016.

ESHWARAPPA R.S.B. et al. Anti-Lipoxygenase Activity of Leaf Gall Extracts of *Terminalia chebula* (Gaertn.) Retz. (Combretaceae). **Pharmacognosy Research**. v. 8, n. 1, p. 78-82. 2016.

EVANS, D. M.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 3, p. 300-305, 1996.

FAN, W. et al. The role of nitric oxide in orofacial pain. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 1, p. 32-37, 2012.

FARQUHAR-SMITH, P. Anaesthetic/interventional techniques. In: DAVIES A, editor. **Cancer-Related Bone Pain**. Oxford; Oxford University Press, p.85-97, 2007.

FERRANDIZ, M. L. et al. Treatment with a CO-releasing molecule (CORM-3) reduces joint inflammation and erosion in murine collagen-induced arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 9, p. 1211-1217, 2008.

- FERREIRA, S. H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**, **46 Suppl 1**, p. 1-9, 1993.
- FILLINGIM, R. B. et al. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. **The journal of pain**, v. 10, n. 5, p. 447-485, 2009.
- FIORENTINO, P.M.; CAIRNS, B.E.; HU, J.W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. **Archs Oral Biol**. v. 44, n. 1, p. 27-32, 1999.
- FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**, São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.
- FRITH, J. et al. Syphilis-its early history and treatment until penicillin, and the debate on its origins. **Journal of Military and Veterans Health**, v. 20, n. 4, p. 49, 2012.
- FUNK, J. L. et al. Anti-inflammatory effects of the essential oils of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in experimental rheumatoid arthritis. **PharmaNutrition**, v. 4, n. 3, p. 123-131, 2016.
- FURCHGOTT, R. F. et al. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.
- FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res Bull**. v. 48, p. 129-41, 1999.
- GARG, A. et al. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 655-669, 2001.
- GEESINK, R. Scala Millettiearum. A survey of the genera of the tribe Millettieae (Leguminosae, Papilionoideae). **Leiden Bot. Ser**, n. 8, p. 118 – 121, 1984.
- GHOSH, N. et al. Acute, 28days sub acute and genotoxic profiling of Quercetin-Magnesium complex in Swiss albino mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 279-291, 2017.
- GILMAN, A.G. et al. **Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11 ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.
- GONZÁLEZ, F.H. D. SILVA, S.C da. Introdução à bioquímica clínica veterinária. **Porto Alegre: UFRGS**. p.179-198, 2006.
- GORA, R.H. et al. Hepatoprotective activity of *Tephrosia purpurea* against arsenic induced toxicity in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 197, 2014.
- GREENE, C.S.; KLASSER, G.D.; EPSTEIN, J.B. Revision of the American Association of Dental Research's Science Information Statement about Temporomandibular Disorders. **J Can Dent Assoc**, v.76, p.115, 2010.

GU, R. et al. Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 6, p. 903-915, 2014.

GUPTA, M. SASMAL, S. MUKHERJEE, A. Therapeutic effects of acetone extract of saraca asoca seeds on rats with adjuvant-induced arthritis via attenuating inflammatory responses. **ISRN rheumatology**, v. 2014, 2014.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HA, L. M. et al. Toxicity, analgesic and anti-inflammatory activities of tectorigenin. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 35, n. 3, p. 336-340, 2013.

HAAS, A et al.. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. *Archives of Oral Biology* v.37, n.5, p. 417–422, 1992.

HAJHASHEMI, V.; AMIN, B. Effect of glibenclamide on antinociceptive effects of antidepressants of different classes. **Clinics**, v. 66, n. 2, p. 321-325, 2011.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 67-202, 2002.

HEGAZY, M. E. F. et al. Estrogenic activity of chemical constituents from *Tephrosia candida*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 5, p. 937-942, 2011.

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.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 83-91, 2001.

IASP – Internacional Association for the Study of Pain Taxonomy. **Pain terms, a current list with definitions and notes on usage**. p. 209-214, 2011.

IBRAHIM, I. A. A. et al. Leaves extract of *Muntingia calabura* protects against gastric ulcer induced by ethanol in Sprague-dawley rats. **Clinical & Experimental Pharmacology**, v. 2013, 2013.

IWATA, K. et al. Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, n. 3, p. 1244-1253, 1999.

JANG, D. S. et al. Potential cancer chemopreventive flavonoids from the stems of *Tephrosia toxicaria*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 9, p. 1166-1170, 2003.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. Sep v. 13, n. 413(6852):203-10, 2001.

JUNG, H. S. et al. Preventing extracellular diffusion of trigeminal nitric oxide enhances formalin-induced orofacial pain. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 13, n. 5, p. 379-383, 2009.

KANDHARE, A. D. et al. Acute and repeated doses (28 days) oral toxicity study of Vicenin-1, a flavonoid glycoside isolated from fenugreek seeds in laboratory mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 522-531, 2016.

KHASAR S. G. et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. **Neuron**.v. 24, p253–260, 1999.

KIRAKOSYAN, A.CSEKE, L.J.; KAUFMAN, P.B. The use of plant cell biotechnology for the production of phytochemicals. In: **Recent Advances in Plant Biotechnology**. Springer US, 2009. p. 15-33.

KOPP, S. Neuroendocrine, immune, and local responses related to temporomandibular disorders. **Journal of Orofacial Pain**, v. 15, n. 1, 2001.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 11, p. 1325-1334, 2010.

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

LAN, X. et al. The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications. **Molecular Neurobiology**, p. 1-8, 2015.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S.W.. Animal models of nociception. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEES, P. et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 479-490, 2004.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACHINDER, B.; LOCK, M.**Legumes of the World**. Surrey, Royal Botanic Gardens, 2005.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.

LIMA, H.C. Q. et al. **Fabaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000115>, 2012.

LIN S et al. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. **Elife**. v. 15; 3:e04766, 2014.

LINLEY, J. E. et al. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 459, n. 5, p. 657-669, 2010.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008.

LOFGREN, O.; QI, Y; LUNDEBERG, T. Inhibitory effects of tachykinin receptor antagonists on thermally induced inflammatory reactions in a rat model. **Burns**, v. 25, p. 125-9, 1999.

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 114, n. 3, p. 375-381, 1985.

LUO, Z. P. et al. Phylogenetic Diversity and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Associated with *Tephrosia purpurea*. **Mycobiology**, v. 43, n. 4, p. 435-443, 2015.

MACFARLANE, T. V. et al. Orofacial pain: just another chronic pain? Results from a population-based survey. **Pain**, v. 99, n. 3, p. 453-458, 2002.

MAGNUSSON, T.; EGERMARK, I.; CARLSSON, G. E. A longitudinal epidemiologic study of signs and symptoms of temporomandibular disorders from 15 to 35 years of age. **Journal of orofacial pain**, v. 14, n. 4, 2000.

MAINES, M. D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. **The FASEB Journal**, v. 2, n. 10, p. 2557-2568, 1988.

MARTIN, D. W. Mayes; RODWELL, Victor W. Harper's review of biochemistry. 1981

MARTIN, M. et al. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and Cancer magister larvae. **Marine Pollution Bulletin**, v. 12, n. 9, p. 305-308, 1981.

MARTINEZ, R. M. et al. *Tephrosia sinapou* ethyl acetate extract inhibits inflammatory pain in mice: Opioid receptor dependent inhibition of TNF α and IL-1 β production. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 10, p. 1262-1271, 2013.

MARTINEZ, R. M. et al. *Tephrosia sinapou* extract reduces inflammatory leukocyte recruitment in mice: effect on oxidative stress, nitric oxide and cytokine production. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 587-597, 2012.

MARTINS, M.V. Leguminosas arbustivas e arbóreas de fragmentos florestais remanescentes no noroeste paulista, **Brasil**. 2009.

MATHIS, S. A.; CRISCIMAGNA, N. L.; LEEB-LUNDBERG, L. M. B1 and B2 kininreceptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. **Mol Pharmacol**, v. 50, p. 128-39, 1996.

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

MCCOUBREY, W. K.; HUANG, T. J.; MAINES, M. D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **European Journal of Biochemistry**, v. 247, n. 2, p. 725-732, 1997.

MCCURDY C.R; SCULLY S.S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sci**. v. 22; n. 78(5), p. 476-84, 2005.

MCEVER, R. P. Leukocyte endothelial cell interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 840-849, 1992.

MCINNES, F.R.C.P.; SCHETT, G. M. D. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **N Engl J Med**. v. 365, p. 2205-2219, 2011.

MCINNES, I. B. et al. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 4, p. 1519-1524, 1996.

MEDOF, M.E. et al. Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and in body fluids. **Journal of Experimental Medicine**, v. 165, n. 3, p. 848-864, 1987.

MESQUITA J.R. D. et al. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse de Reumatologia**, São Paulo, p. 66 - 81, 2008.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MILLER, Otto. Laboratório para o Clínico. In: **Laboratório para o clínico**. Atheneu, 1999.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 23-36, 2009.

MIOTTO, S. T. S. et al. A família Leguminosae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, 2008.

MONCADA, S. R. M. J.; PALMER, R. M. L.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MORITA, T. et al. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 5, p. 1475-1479, 1995.

NAPIMOGA, M.H. et al., 15d-prostaglandin J2 inhibits inflammatory hypernociception: involvement of peripheral opioid receptor. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 324, n. 1, p. 313-21, 2007.

NASCIMENTO, C. G. O.; BRANCO, L. G. S. Role of the peripheral heme oxygenase–carbon monoxide pathway on the nociceptive response of rats to the formalin test: Evidence for a cGMP signaling pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 556, n. 1, p. 55-61, 2007.

NASCIMENTO, C. G. O.; BRANCO, L. G. S. Role of the spinal cord heme oxygenase–carbon monoxide–cGMP pathway in the nociceptive response of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 581, n. 1, p. 71-76, 2008.

NICOLLE, E. et al. Flavonoids as promising lead compounds in type 2 diabetes mellitus: molecules of interest and structure-activity relationship. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 17, p. 2661-2672, 2011.

NORDAHL, S.; ALSTERGREN, P.; KOPP, S. Tumor necrosis factor-alpha in synovial fluid and plasma from patients with chronic connective tissue disease and its relation to temporomandibular joint pain. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 58, n. 5, p. 525-530, 2000.

OAKLANDER A. L. Chronic pain. **ACP Medicine**, p.1-19, 2011. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/conteudo/acpmedicine/5249/dor_cronica_%E2%80%93anne_louise_oaklander.htm>. Acesso em: 12 dez 2015.

OLIVEIRA, M. C. G. et al. Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. **European Journal of Pain**, v. 9, n. 1, p. 87-93, 2005.

ORTIZ, M. I. et al. Pharmacological evidence for the activation of K⁺ channels by diclofenac. **European Journal of Pharmacology**, v. 438, n. 1, p. 85-91, 2002.

OTTERBEIN, L. E. et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. **Nature Medicine**, v. 6, n. 4, p. 422-428, 2000.

OTTERBEIN, L. E. et al. MKK3 mitogen-activated protein kinase pathway mediates carbon monoxide-induced protection against oxidant-induced lung injury. **The American Journal of Pathology**, v. 163, n. 6, p. 2555-2563, 2003.

PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug discovery today**, v. 21, n. 2, p. 204-207, 2016.

PATWARDHAN, J.; BHATT, P. et al. Ultraviolet-B protective effect of flavonoids from *Eugenia caryophyllata* on human dermal fibroblast cells. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 44, p. 397, 2015.

PETHŐ, G.; REEH, P. W. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 4, p. 1699-1775, 2012.

PETRACHE, I. et al. Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblasts. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 278, n. 2, p. L312-L319, 2000.

POSSEBON, M.I. et al. Pimaradienoic Acid Inhibits Inflammatory Pain: Inhibition of NF- κ B Activation and Cytokine Production and Activation of the NO–Cyclic GMP–Protein Kinase G–ATP-Sensitive Potassium Channel Signaling Pathway. **Journal of natural products**, v. 77, n. 11, p. 2488-2496, 2014.

PROCHÁZKOVÁ D, BOU(OVÁ I, WILHELMOVÁ N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**. v.82, p. 513–523, 2011.

RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Current opinion in neurobiology**, v. 12, n. 2, p. 195-204, 2002.

RAJA S.N.; MEYER R. A.; CAMPBELL JN. Peripheral mechanisms of somatic pain. **Anesthesiology**, v. 68, n. 4, p. 571-590, 1988.

RAZA, M. et al. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002.

REVILLA, J. **Plantas úteis da Bacia Amazônica**. Manaus: INPA/ SEBRAE, v.2. 2002.

RIDGER V.C. et al. Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-N6-(1-iminoethyl) lysine on zymosan-induced plasmaextravasation in rat skin. **J. Immunol.** v. 159, p. 383–390, 1997.

RITTNER, H. L.; MACHELSKA, H.; STEIN, C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 6, p. 1215-1222, 2005.

ROCHA et al. Periarthritis promotes articular incapacitation in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflam. Res.** v. 48, p. 485–490, 1999.

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.

ROCHA, J. C. S. et al. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 4, p. 588-596, 2002.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 99, 2008.

ROVERONI, R. C. et al. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. **Pain**, v. 94, n. 2, p. 185-191, 2001.

SACHS D, CUNHA FQ, FERREIRA SH Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 101, p. 3680–3685, 2004.

SACHS, D. CUNHA, F. Q. FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3680-3685, 2004.

SANDKÜHLER J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiol Rev**. v. 89, n. 2, p. 707-58, 2009.

SANTODOMINGO-GARZÓN, T. et al. Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. **British journal of pharmacology**, v. 149, n. 1, p. 14-22, 2006.

SAXENA, A. et al. Diarylheptanoids from *Alnus nepalensis* attenuates LPS-induced inflammation in macrophages and endotoxic shock in mice. **International immunopharmacology**, v. 30, p. 129-136, 2016.

SCHAIBLE HG.; RICHTER F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SCHAIBLE, H. G et al. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 2, p. 210, 2011.

SCHAUSS, A. G. et al. Toxicological and genotoxicity assessment of a dihydroquercetin-rich dahurian larch tree (*Larix gmelinii* Rupr) extract (Lavitol). **International journal of toxicology**, p. 1091581815576975, 2015.

SCHIFF P. L. Opium and its alkaloids. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 66, n. 2, p. 186, 2002.

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

SCHRIRE, B. D. Tribe Millettieae. In: G. LEWIS.; B. SCHRIRE, B. Mackinder & M. Lock (eds), **Legumes of the World**, Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 367 – 387, 2005.

SERHAN, C. N.; PETASIS, N. A. Resolvins and protectins in inflammation resolution. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5922-5943, 2011.

SESSA, W. C.; HARRISON, J. K.; BARBER, C. M.; ZENG, D.; DURIEUX, M. E.; D'ANGELO, D. D.; LYNCH, K. R.; PEACH, M. J. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. **J Biol Chem**, v. 267, n. 22, p. 15274-15276, 1992.

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. The pain crisis: what it is and what can be done. **Pain research and treatment**, v. 2012, 2012.

SHAEFER, J. R. et al. Pain and temporomandibular disorders: a pharmaco-gender dilemma. **Dental Clinics of North America**, v. 57, n. 2, p. 233-262, 2013.

SHINAL, R. M.; FILLINGIM, R. B. Overview of orofacial pain: epidemiology and gender differences in orofacial pain. **Dental Clinics**, v. 51, n. 1, p. 1-18, 2007.

SILVA, E. J. et al. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Rev. bras. farmacogn**, v. 15, n. 2, p. 88-93, 2005.

SILVA, J. Cabral. 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, S.L. et al. Preclinical acute toxicological evaluation of the methanolic stem bark extract of *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2016.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento: Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC. p.291-320, 2003.

SMITH, D. et al. Chronic pain and mortality: a systematic review. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99048, 2014.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427-439, 2010.

SOLECKI, R. S.; SHANIDAR .Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science*, v. 190, p. 880-881, 1975.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci Lett**. v. 6, n. 361, p. 184-7, 2004.

SOUZA, N. M.; SOUZA, L. A. G. Levantamento do potencial de aproveitamento das leguminosas no distrito da Barreira do Andirá, Barreirinha, AM. *Enciclopédia Biosfera: Goiânia*, v. 7, n.12, 2011.

SOUZA, V.C; LORENZI, H. *Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Plantarum, Nova Odessa, 2005.

SPRINGER, T. A. et al. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 301-314, 1994.

STADLER, JOSEF et al. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 11, p. 3915-3920, 1991.

STAURENGO-FERRARI, L. et al. The ruthenium nitric oxide donor, [Ru (HEDTA) NO], inhibits acute nociception in mice by modulating oxidative stress, cytokine production and activating the cGMP/PKG/ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 387, n. 11, p. 1053-1068, 2014.

STEINER, A. A. et al. Role of the haeme oxygenase/carbon monoxide pathway in mechanical nociceptor hypersensitivity. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, n. 8, p. 1673-1682, 2001.

STEVENSON, P. C. et al. Distinct chemotypes of *Tephrosia vogelii* and implications for their use in pest control and soil enrichment. **Phytochemistry**, v. 78, p. 135-146, 2012.

SUGANYA, S.N. SUMATHI, T.. Effect of rutin against a mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid induced biochemical, behavioral and histological alterations-a pilot study on Huntington's disease model in rats. **Metabolic Brain Disease**, p. 1-11, 2016.

SUMAGIN, R.; PARKOS, C.A. Epithelial adhesion molecules and the regulation of intestinal homeostasis during neutrophil transepithelial migration. **Tissue barriers**, v. 3, n. 1-2, p. e969100, 2015.

SUMAGIN, R.; SARELIUS, I.H. A role for ICAM-1 in maintenance of leukocyte-endothelial cell rolling interactions in inflamed arterioles. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 62, n. 5, p. H2786, 2007.

SUN, L. et al. Quercetin increases macrophage cholesterol efflux to inhibit foam cell formation through activating PPAR γ -ABCA1 pathway. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 9, p. 10854, 2015.

SUNG, Hsin-Ching et al. The protective effect of eupafolin against TNF- α -induced lung inflammation via the reduction of intercellular cell adhesion molecule-1 expression. **Journal of ethnopharmacology**, v. 170, p. 136-147, 2015.

TARIQ S. et al. Phytopreventive antihypercholesterolemic and antilipidemic perspectives of zedoary (*Curcuma Zedoaria* Roscoe.) herbal tea. **Lipids in Health and Disease**. p. 15:39, 2016.

TAYLOR P.R. et al. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **J Immunol**. v. 169, n. 7, p. 3876-82, 2002.

TEEDE, H.J. et al. Isoflavones reduce arterial stiffness. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 6, p. 1066-1071, 2003.

TEO, S. et al. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, n. 3, p. 183-196, 2002.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002.

TJØLSEN, Arne et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TOFOVIC, S.P. JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 360-366, 1999.

TSAROUCHA, A.K. et al. Intraperitoneal administration of apigenin in liver ischemia/reperfusion injury protective effects. **Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 22, n. 6, p. 415, 2016.

TURNBACH, M. E.; RANDICH, A. The role of spinal neurokinin-1 and glutamate receptors in hyperalgesia and allodynia induced by prostaglandin E(2) or zymosan in the rat. **Pain**, v. 97, p. 127-37, 2002.

VAL, D.R. EFICÁCIA E SEGURANÇA DE *Tephrosia toxicaria* Pers. NA ARTRITE DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS: ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO, HEMEOXIGENASE-1 E CANAIS DE POTÁSSIO ATP-DEPENDENTES. Sobral. [Dissertação] - UFC, 2012.

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

VASCONCELOS, J. N. et al. Estudo químico e biológico de *Tephrosia toxicaria* Pers. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 382-386, 2009.

VASCONCELOS, J. N. et al. Rotenoids from *Tephrosia toxicaria* with larvicidal activity against *Aedes aegypti*, the main vector of dengue fever. *Química Nova* (Impresso), v. 6, p. 1097-1100, 2012.

VERNAL, R. et al. Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 10, p. 910-915, 2008.

VERRI, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006.

VIVIER, E.; MALISSEN, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nature Immunology**, v. 6, n. 1, p. 17-21, 2005.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. E. D. Thin layer chromatography in phytochemistry. **Chromatographic Science Series**, v. 99, 2008.

WANSTALL, J. C.; HOMER, K. L.; DOGGRELL, S. A. Evidence for, and importance of, cGMP-independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets. **Current Vascular Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 41-53, 2005.

WHO. **WHO monographs on selected medicinal plants**. World Health Organization, 1999.

WILLMENT J.A. et al. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. **J Immunol**. v. 171, n. 9, p. 4569-73, 2003.

WITTE, W.; STEIN, C. History, Definitions, and Contemporary Viewpoints. In . Kopf, A.; PATEL, N .B. Guide to Pain Management in Low-Resource Settings. **Seattle: International Association for the Study of Pain**, p. 3-7, 2010.

WOODCOCK, J. WITTER, J. DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 9, p. 703-710, 2007.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-1768, 2000.

XIE, Q. W.; CHO, H. J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R. A.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 225-228, 1992.

YANG, L. et al. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. **Blood**, v. 106, n. 2, p. 584-592, 2005.

YATANI, H. et al. Comparison of sleep quality and clinical and psychologic characteristics in patients with temporomandibular disorders. **Journal of Orofacial Pain**, v. 16, n. 3, p. 221-228, 2002.

YUNES, R.A. PEDROSA, R.C. CECHINEL, F. V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZAKRZEWSKA, J. M. Facial pain. In: STANNARD, C.; KALSO, E.; BALLANTYNE, J . **Evidence-based chronic pain management**. Oxford: Blackwell Publishing, 2010. p. 134–150.

- ZEILHOFER H.U.; BENKE D.; YEVENES G.E. Chronic pain States: pharmacological strategies to restore diminished inhibitory spinal pain control. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 52, p. 111–133, 2012.
- ZHONG J. et al. Flavonoids from *Litsea coreana* Decreases TNF- α Secretion from Peritoneal Macrophages in Adjuvant-Induced Arthritis Rats via UPR Pathway. **Am. J. Chin. Med.** v. 42, n. 905, 2014.

APÊNDICE

APÊNDICE A - ARTIGO DERIVADO DA TESE

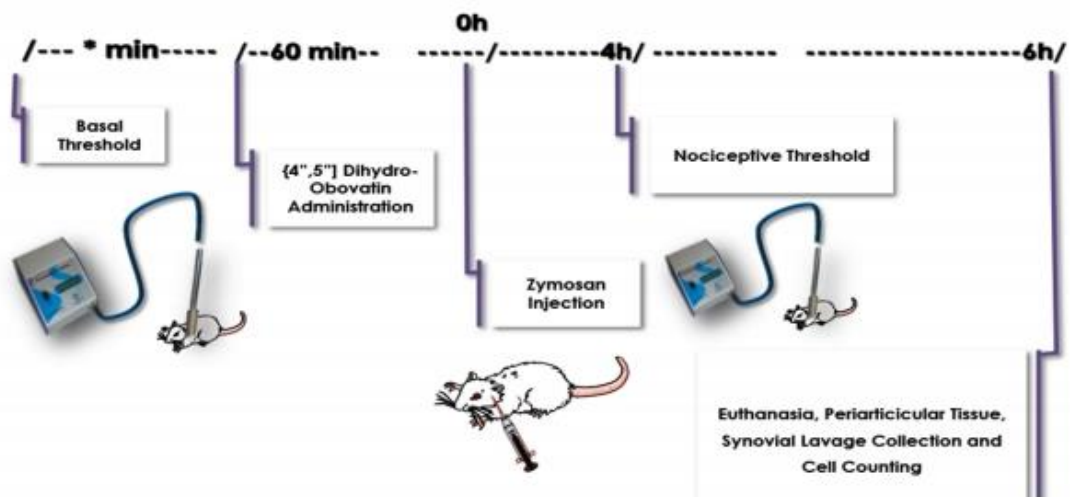
A seguir será apresentado o primeiro artigo, derivado da tese:

O artigo, intitulado "A Semi-Synthetic Molecule, [4 ", 5"] Dihydro-Obovatín, Isolated from *Tephrosia Toxicaria* Pers Reduces Zymosan-Induced Temporomandibular Joint Inflammatory Hypernociception in Rats" foi submetido ao Pharmacological Reports.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interest regarding the publication of this study

Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of [4",5"] Dihydro-Obovatin



A Semi-Synthetic Molecule, [4'', 5''] Dihydro-Obovatins, Isolated from Tephrosia Toxicaria Pers Reduces Zymosan-Induced Temporomandibular Joint Inflammatory Hypernociception in Rats

Running head: [4'', 5''] Dihydro-Obovatins Reduces TMJ Hypernociception in Rats

ABSTRACT

Background: Arthritis possesses inflammatory components and flavonoids of well known structures exert anti-inflammatory activity. Here, we aim to evaluate the effects of [4'', 5''] dihydro-obovatin and three structurally-defined flavonoids from *Tephrosia toxicaria* Pers roots on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats as well as their toxicity.

Material and Methods: Rats were pre-treated with the flavonoids (1 and 10 mg/kg) and [4'',5''] dihydro-obovatin (0.1 and 1.0 mg/kg) one hour before intra-articular zymosan-injection (2 mg, 40 µL). Von Frey test was used to evaluate the nociceptive threshold at the 4th hour after zymosan-injection. Six hours after zymosan-injection, synovial lavage was collected for total cell counting. Acute toxicity assay for [4'', 5''] dihydro-obovatin (1, 10, 100 mg/kg) were performed along with the sub-chronic toxicity assay by administering [4'',5''] di-hydro-obovatin (0.01 mg/kg) or saline solution for 14 consecutive days and the rota-rod test was carried out to determine whether [4'',5''] dihydro-obovatin would impair motor functions.

Results: The tested flavonoids and [4'',5''] dihydro-obovatin increased nociceptive threshold and reduced the cell counting in the synovial lavage in the temporomandibular joint compared with the zymosan group. [4'',5''] di-hydro-obovatin did not induce toxic effects as well as did not alter the motor function in the rota-rod test. The flavonoids and [4'',5''] dihydro-obovatin exerted antinociceptive and anti-inflammatory effects on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats and the latter did not show significant toxic effects.

Conclusion: [4'',5''] dihydro-obovatin would be a promising anti-inflammatory and

antinociceptive agent.

Keywords: *Tephrosia toxicaria* Pers; [4",5"] di-hydro-obovatin; temporomandibular joint; hypernociception.

INTRODUCTION

Temporomandibular joint-related pathologies encompass a group of musculoskeletal and neuromuscular illnesses that affect this joint and associated structures, culminating in pain and impairments in orofacial functions [1]. Experimental models that allow the study of the mechanisms underlying these conditions are of great clinical relevance, so that we developed an experimental model of temporomandibular joint (TMJ) arthritis in rats through intra-articular injection of zymosan [2].

To develop potential tools for novel therapies to reduce the TMJ inflammatory pain, there has been a continuous interest in the use of natural products [3-4]. *Tephrosia* is a perennial genus that is largely distributed in tropical and sub-tropical regions. Its species are important sources of phenolic substances such as flavonoids [5-6]. *Tephrosia toxicaria* Pers has long been used in the traditional medicine in tropical countries due to its anti-inflammatory effects [7-8] and we are the first group to demonstrate the pharmacological effects of *Tephrosia toxicaria* Pers on the TMJ arthritis [9].

It is also reported that *Tephrosia toxicaria* produces low weight secondary flavonoids, for instance, obovatin and 12a-hydroxi- α -toxicarol, as well as rotenoids such as deguelin [6]. Hence, to comprehend which of these three flavonoids would exert biological activities, we aimed to analyse their antinociceptive and anti-inflammatory efficacies in reducing the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats. In addition, we designed and synthesised a molecule - [4 ", 5"] dihydro-obovatin based on the original obovatin molecule (patent number BR1020130287938) which we also aim to analyse its effects on the mentioned arthritis experimental model.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (160–220 g) (n=100) and Swiss mice (25–30 g) (n=50) were housed in standard plastic cages with food and water available *ad libitum*. They were maintained in a temperature-controlled room (23±2 °C) with a 12/12-hour light-dark cycle. All experiments were designed to minimise animal suffering and to use the minimum number of animals required to achieve a valid statistical evaluation. The experimental protocol was conducted in accordance with the local Institutional Animal Care and with the approval of the Local Ethics Committee under the registration number 13/15.

Chemicals for Pharmacological Modulation

Tephrosia toxicaria Pers exsiccate is registered under the identification number 32.139 and is deposited in local herbarium. The air-dried and powdered roots of *T. toxicaria* Pers. (710.0g) were processed with ethanol (95%) at room temperature. After filtration, the solvent was removed by vacuum, affording 78.9 g of the ethanolic extract (EtOH). Subsequently, EtOH (22.1g) underwent column chromatography in silica gel by hexane, CH₂Cl₂, EtOAc e MeOH, producing the compounds 1- obovatin (0.05%), 2 - 12a-hydroxi- α -toxicarol (0.03%), and deguelin (0.09%).

Determination of the Obovatin, 12a-hydroxi- α -toxicarol, and Deguelin Relative Values

The *Tephrosia toxicaria* extracts underwent silylation reaction by performing the Kamerling, 1975 procedure and was analysed by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (Shimadzu QP2010 GCMS-SE) using a capillary column Rtx®-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ M) for the obovatin (1), 12a-hydroxi- α -toxicarol (2), and deguelin (3) relative quantification. The operating conditions were as following: 70 eV, transporting gas (He), flow rate 13.6 mL min⁻¹, and 53.5 kPa of pressure. The temperature protocol employed was 100 °C (3 min) and 310 °C (3.5 °C min).

Obovatin (1)

Solid yellow cristal; mp 119.8–121.2 °C; EI/MS m/z (Int. rel.): 322 ([M]⁺•, 56), 308 (34), 307 (89), 217 (11), 203 (100), 175 (16), 153 (17), 91 (28), 77 (48), 69 (26); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) - δ (multiplicity, J Hz): 12.11 (s, OH), 7.40–7.48 (m, H-2'–6'), 6.56 (d, 10, H-4"), 6.02 (s, H-6), 5.48 (d, 10, H-5"), 5.44 (dd, 13.0 e 3.0, H-2), 3.06 (dd, 17.1,

13.0, H-3ax), 2.84 (dd, 17.1, 3.0, H-3eq), 1.46 (s, H-8"), 1.44 (s, H-7"). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 195.9 (C-4), 164.0 (C-5), 162.5 (C-7), 157.0 (C-9), 138.7 (C-1'), 129.0 (C-3', 5'), 126.7 (C-5"), 126.2 (C-2', 6'), 115.8 (C-4"), 103.1 (C-10), 102.2 (C-8), 97.9 (C-6), 79.3 (C-2), 78.4 (C-6"), 43.5 (C-3), 28.7 (C-8"), 28.5 (C-7"). ¹H e ¹³C NMR. Spectral data are in accordance with Arriaga et al., 2009.

Obovatin Hydrogenation

Obovatin (80 mg) was dissolved in chloroform (30 mL) and then gaseous H₂ was bubbled into the solution, which was maintained under magnetic agitation for 45 minutes. After being filtrated, the mixture was purified by normal phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using hexane-chloroform (7:3 v/v) as mobile phase, obtaining [4",5"] dihydro-obovatin (4) (18.8 mg). The structures of all compounds were established by 1D ¹H and ¹³C ({¹H} and DEPT) and 2D ¹H-¹H-COSY, HSQC and HMBC NMR spectral data and by comparing their spectroscopy data with that reported by Arriaga et al., 2009.

Temporomandibular Joint (TMJ) Inflammatory Hypernociception Induction

Rats were briefly anaesthetised with inhaled isoflurane (1.5%) and received an intra-articular (i.art.) injection of 2 mg zymosan (40 µL total volume) dissolved in sterile saline into the left TMJ using a 30-gauge needle and 0.5 mL syringe. Sham animals received only saline i.art. Before zymosan or saline injections, the TMJ skin region was carefully shaved, the postero-inferior border of the zygomatic arch was palpated, and the needle was inserted inferior to this point and advanced in a medial and anterior direction until the needle contacted the condyle. This contact was verified by the moving of the mandible, and the puncture of the needle into the joint space was confirmed by the loss of resistance. Gentle aspiration ruled out intravascular placement, after which the specified volume of zymosan or saline was injected. As previously shown [2], during the time course of zymosan TMJ inflammatory hypernociception development, it is maximal at 4 h of arthritis whereas cell influx peaks at 6 h. Based on these results we used these time points to assess both nociceptive (head withdrawal threshold) and inflammatory parameters (total cell counting in the synovial lavage).

Evaluation of the TMJ Inflammatory Hypernociception

Inflammatory hypernociception in the TMJ was evaluated by measuring the threshold of force intensity that needed to be applied to the TMJ region of rats until the occurrence of a reflex response of the animal (e.g. head withdrawal). The measurements were performed by an examiner unaware of the treatments and used a digital device (Insight) that consisted of a rigid filament linked in an electronic device that measured the response threshold in grams (g) when the filament was applied to the surface of the tested region [26]. The facial areas to be tested around the TMJ were carefully shaved, and the animals were put into individual plastic cages 45 min before the beginning of the tests. The animals were submitted to a conditioning session of head withdrawal threshold measurements in the testing room for 4 consecutive days under controlled temperatures ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) and low illumination. On the fifth day, the basal force threshold value was recorded (in triplicate) before the intra articular injections of either zymosan or vehicle and after 4 h.

Synovial Lavage Collection and Cell Counting

Six hours after zymosan-injections the rats were sacrificed under anaesthesia and exsanguinated. The superficial tissues were dissected, and the TMJ cavity was washed to collect the synovial lavage by a pumping and aspiration technique using 0.05 mL of EDTA in neutral phosphate-buffered saline (1.77 mg/ml). This procedure was repeated twice. The total number of white cells in the synovial lavage was counted using a Neubauer chamber.

Treatments

Obovatin (1), 12a-hydroxi- α -toxicarol (2), deguelin (3) and [4",5"] dihydro-obovatin (4) were diluted into 10 μL of Tween 80 and the final volume of each solution was adjusted using 0.9% sterile saline solution. Compounds 1, 2, and 3 (1 or 10 mg/kg; 1 mL/200 g) were orally administered 1 hour before the zymosan-injection (i.art). To analyse the effects of compound 4 on the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats, the animals were pre-treated with compound 4 (0.1 or 1 mg/kg; 1 mL/200 g). After 1 hour, zymosan-injection (i.art) was administered and the nociceptive parameters were assessed after 4 hours as previously described. The zymosan group consisted of rats that were administered sterile saline solution (0.9%, 1 mL/200 g) 1 hour before the zymosan-injection. To allow data validation, an indomethacin pre-treated group

(s.c., 5 mg/kg) was the positive control in this study. The sham group, in turns, underwent 0.9% sterile saline solution administration 1 hour before the saline solution injection into the left temporomandibular joint.

Acute Toxicity Assay

Acute toxicity assay was performed to find the median lethal dose (LD₅₀) of [4",5"] dihydro-obovatin after oral and intraperitoneal administration in male and female mice (n=5) as previously described [27]. Different doses of [4",5"] di-hydro-obovatin (1-100 mg/kg, i.p. or 1-100 mg/kg, per os.) or saline solution (5mL/kg per os.) were administered to mice once only. Animals were then observed for 48 hours to register toxicity or mortality signals.

Sub-Chronic Toxicity Assay

Aiming to evaluate the [4",5"] di-hydro-obovatin safety, male mice, divided into two groups of five animals, received (per os) [4",5"] dihydro-obovatin at 0.01 mg/kg or saline solution at 5 mL/kg (per os) during 14 consecutive days. This dose was chosen as it was the highest one used in the experimental protocol of this study. During the 14-day period, animals were observed to allow detection of physical and behavioural signals of toxicity such as scratching of the nose, licking of the paws, cachexia, whirling, aggressiveness, and apathy. On the 15th day, the animals were anaesthetised with ketamine/xylazine (200 mg/kg, i.p.) and blood samples were collected for aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) measurement (LabTest). Mice were then euthanized and had their organs: heart, liver, kidneys, and spleen, collected, weighted, and evaluated under histopathological techniques (H&E) by an examiner unaware of the experimental groups.

Rota-Rod Test

The rota-rod test measures the effects of drugs on the muscular tonus or on the motor coordination [28]. Rats were placed on the four paws over a spinning bar which is split into four compartments that allow the behavioural analysis of each animal simultaneously. In the rota-rod model designed for rats, there is a 7 cm-diameter rotor that allows simultaneous study of four animals at 4-40 rpm for 5 minutes. One hour after the [4",5"] dihydro-obovatin administration (0.01 mg/kg; per os) or sterile saline

solution (5 mL/kg; per os.), the rats were placed for 5 minutes on the apparatus and latency time, (seconds), length of stay on the spinning bar (seconds), and number of falls [29] were registered.

Statistical Analysis

The data are presented as the means $\pm$ S.E.M. or medians, when appropriate. Differences between means were compared using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. Toxicity parameters were presented as medians and the T-Test analyse them. A probability value of $p < 0.05$ indicated significant differences.

RESULTS

Efficacy of three flavonoids isolated from *Tephrosia toxicaria* Pers. in reducing the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception (Fig. 1 and Fig. 2)

The zymosan injection significantly reduced ($p < 0.05$) the head-withdrawal nociceptive threshold at the 4th hour (Fig. 1). Similarly, it significantly increased ($p < 0.05$) the leukocyte numbers (Fig. 2). The sham group did not show any significant changes in the head-withdrawal threshold nor the leukocyte counting (Fig. 1 and 2). The three isolated flavonoids – obovatin (1), 12a-hydroxi- α -toxicarol (2), and deguelin (3), could reduce ($p < 0.05$) the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats as well as the leukocyte counting to values like those of the indomethacin group (Fig. 2A, 2B, 2C).

Flavonoids isolated from the ethanolic extract of the *Tephrosia toxicaria* Pers roots and the semi-synthetic molecule (Fig. 3)

Three flavonoids obovatin (1), 12a-hydroxi- α -toxicarol (2), and deguelin (3) were isolated from the ethanolic extract of the *Tephrosia toxicaria* Pers roots. From the obovatin hydrogenation process, the only one amongst the three flavonoids that could undergo such chemical reaction, it was obtained [4",5"] dihydro-obovatin, a semi-synthetic molecule (4) (Fig. 3)

Efficacy of [4'',5''] dihydro-obovatin in reducing the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception (Fig. 4)

The treatment of rats with [4'',5''] dihydro-obovatin (0.1 and 1 mg kg⁻¹) significantly increased ($p < 0.05$) the nociceptive threshold (Fig. 4A) and decreased ($p < 0.05$) the leukocyte counting in the synovial lavage (Fig. 4B).

Acute and Sub-Chronic Toxicity Assay (Fig.5 and Fig. 6)

[4'',5''] dihydro-obovatin at 1, 10, and 100 mg/kg (per os or i.p.) did not result in mortality neither did it produce animal behavioural changes during this assay. The [4'',5''] dihydro-obovatin treatment (0.01 mg/kg) during 14 days did not alter organ weight nor biochemical dosages (Table 1). Furthermore, no macroscopic alterations in the organs were observed. The body mass variation curve of the [4'',5''] dihydro-obovatin group was not statistically different from the saline-treated group (Fig. 5). At the histopathological analysis, it was observed absence of toxic effects of [4'',5''] dihydro-obovatin on organs, which also preserved their morphology preserved. Only the spleen showed a greater lymphocytic production in the white pulp. These results ensure that [4'',5''] dihydro-obovatin does not produce systemic toxicity and presents biocompatibility *in vivo* (Fig. 6).

Effects of [4'',5''] dihydro-obovatin on motor function in the rota-rod test (Fig. 7)

[4'',5''] dihydro-obovatin (0.01 mg/kg) did not reduce the latency time and the performance of animals in the rota-rod test, being its results similar to the control group. These results suggest that the effects of [4'',5''] dihydro-obovatin on the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats were not caused by impaired motor functions, proving its antinociceptive effect (Fig. 7).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated the antinociceptive and anti-inflammatory effects of three isolated compounds – obovatin (1), 12a-hydroxi- α -toxicarol (2), and deguelin (3) – from the roots of *Tephrosia toxicaria* Pers. We also demonstrated the chemical process via which [4'',5''] dihydro-obovatin was obtained, its antinociceptive and anti-

inflammatory effects on the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats, as well as its safety and impacts on motor function.

Our group previously showed the effects of the ethanolic extract of the *Tephrosia toxicaria* Pers. roots on the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats and its safety when administered for 14 days to Swiss mice [9]. To our knowledge, this is the first demonstration of isolated compounds from *Tephrosia toxicaria* Pers. are capable of exerting antinociceptive and anti-inflammatory effects on the TMJ pain.

Currently, there is an increasing search for new analgesic and anti-inflammatory drugs. This can be motivated by distortions of the effectiveness of our current choices or due to the high costs involved in drug design and development [10-11]. Albeit humanity has been using natural medicines to treat diseases for centuries, it has only been a few years since biochemical and pharmacological properties of flavonoids were unravelled [12]. These substances represent one of the most important and interesting class of biologically active compounds [13].

In fact, the three studied flavonoids - obovatin (1), 12a-hydroxi- α -toxicarol (2), and deguelin (3) – reverted the zymosan inflammatory effects. Among these compounds, the one that showed the best anti-inflammatory and antinociceptive activities was obovatin (1). Thereafter, we developed a semi-synthetic product - [4",5"] dihydro-obovatin – which we then patented under the registration number BR1020130287938 at the National Institute of Industrial Property in Brazil.

The literature reports plant-derived semi-synthetic molecules that exert different pharmacological effects such as osteoporosis protection [14], doxorubicin-induced cardio toxicity reduction [15], liver detoxification [16], gastro protection and antimicrobial effects [17], anti-fungal and anti-cancer activity [18-19]. There was, nevertheless, no semi-synthetic molecules such ours used in a pain or inflammation experimental model.

The increase in the biological activity of any drug can be attributed to their membrane penetrating capacity. Lipophilic profile, electronic and steric parameters, molecular weight and geometry can be a target when the synthesis of new molecules is required [20-21]. This study demonstrates that the obovatin molecule hydrogenation improves the antinociceptive and anti-inflammatory profile of obovatin due to an increase in its liposolubility.

Moreover, it is the motor performance modification of animals in studies on drugs that interfere with the nociceptive transmission and this is the main reason for methodological errors of such studies. As such, antinociceptive compounds should to be evaluated regarding the possibility of motor alteration rather than antinociceptive effects, which could lead to false-positive results [22]. Hence, to exclude such possibility, we evaluated whether [4",5"] dihydro-obovatin would cause motor impairment in the rota-rod test. The administration of [4",5"] dihydro-obovatin (*per os*) did not alter motor performance, proving that the increase in the nociceptive threshold occurred because of the antinociceptive action of the drug rather than a motor impairment.

When designing novel therapeutics, not only is effectiveness highly regarded, but also a low toxicity profile is required. Toxicological studies applied to laboratory animals allow determination of possible effects of substances in humans. To evaluate the safety of [4",5"] dihydro-obovatin, toxicity parameters were assessed in mice. Body mass alteration, biochemical parameters such as ALT, AST, and creatinine levels, organ weight and histopathological analysis of them were measured as relevant indexes of side-effects of drugs [23].

This study showed no change in biochemical parameters, body mass, and vital organ analysis. The LD₅₀ was also determined using the doses of 1, 10, and 100 mg/kg (*per os*; *i.p.*) and no toxic effect was observed. A study demonstrated that the LD₅₀ was 2g/kg for isoflavones when chronically administered (*i.v.*) to rats [24]. The absence of any deleterious signals with the oral dose denotes a low toxicity profile for this drugs when administered in a single dose scheme [25].

To summarize, we demonstrated the antinociceptive and anti-inflammatory effects of [4",5"] dihydro-obovatin on the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats. It was safe at the tested doses, not altering motor performance. Considering the semi-synthetic molecule effects, we hope to add a novel therapeutic approach to the TMJ inflammatory conditions, bringing on superior benefits to the already-existing palliative treatment of this pathology.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflict of interest regarding the publication of this study.

REFERENCES

1. Graff-Radford SB, Abbott JJ. Temporomandibular Disorders and Headache. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2016; 28:335-49.
2. Chaves HV, Ribeiro RA, Souza AM, Silva AAR, Gomes AS, Vale ML. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: Role of nitric oxide and neutrophils. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2001–2011.
3. Cairns BE. Pathophysiology of TMD pain – basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. *J Oral Rehabil.* 2010; 37:391–410.
4. Lima ABL, Paixão MS, Melo M, Santana MT, Damascena MP, Dias AS. Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* salmz ex Benth. *Journal of Ethnopharmacol.* 2013;146: 192–97.
5. Arriaga AMC, Lima JQ, Vasconcelos JN, Oliveira MCF, Andrade-Neto M, Santiago MGP. Unequivocal assignments of flavonoids from *Tephrosia* sp. (Fabaceae). *Magn Reson Chem.* 2009; 47:537-40.
6. Chen Y, Yan T, Gao C, Cao W, Huang R. Natural products from the genus *tephrosia*. *Molecules* 2014;19;1432-58.
7. Plioukas M, Gabrieli C, Lazari D, Kokkalou E. Phytochemical analysis with the antioxidant and aldose reductase inhibitory capacities of *Tephrosia humilis* aerial parts' extracts. *Nat Prod Res.* 2015; 24; 1-7.
8. Hassan LE, Dahham SS, Fadul SM, Umar MI, Majid AS, Khaw KY. Evaluation of in vitro and in vivo anti-inflammatory effects of (-)-pseudosemiglabrin, a major phytoconstituent isolated from *Tephrosia apollinea* (Delile) DC. *J Ethnopharmacol.* 2016;193; 312-20.
9. Val DR, Bezerra MM, Silva AAR, Pereira KMA, Rios LC, Lemos JC. *Tephrosia toxicaria* Pers. reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception: The involvement of the HO-1 pathway. *Eur J Pain* 2014;18; 1280- 89.
10. Gothai S, Ganesan P, Park SY, Fakurazi S, Choi D, Arulselvan P. Natural Phyto-Bioactive Compounds for the Treatment of Type 2 Diabetes: Inflammation as a Target. *Nutrients.* 2016;8 doi: 10.3390/nu8080461.
11. DeCorte BL. Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. *J Med Chem* 2016;59;9295-9304.

12. Xiao X, Wang X, Gui X, Chen, Huang B. Natural flavonoids as promising analgesic candidates: a systematic review. *Chem Biodivers*. 2016;13;1427-40.
13. Eghbaliferiz, S., Iranshahi, M., 2016. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phytother Res*. 2016;9;1379-91.
14. Xu F, Ding Y, Guo Y, Liu B, Kou Z, Xiao W Anti-osteoporosis effect of Epimedium via an estrogen-like mechanism based on a system-level approach. *J Ethnopharmacol*. 2016: 177;148-60.
15. Jacobs H, Peters R, den Hartog GJ, van der Vijgh WJ, Bast A, Haenen GR. Identification of the metabolites of the antioxidant flavonoid 7-mono-O-(β -hydroxyethyl)-rutoside in mice. *Drug Metab Dispos*. 2011;39;750-56.
16. Mossa AT, Heikal TM, Belaiba M, Raoelison EG, Ferhout H, Bouajila J. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Cedrelopsis grevei* on cypermethrin induced oxidative stress and liver damage in male mice. *BMC Complement Altern Med*. 2015;15;251. doi: 10.1186/s12906-015-0740-2
17. Haque S, Nawrot DA, Alakurti S, Ghemtio L, Yli-Kauhaluoma J, Tammela P. Screening and characterisation of antimicrobial properties of semisynthetic betulin derivatives. *PLoS One*. 2014;9(7):e102696. doi: 10.1371/journal.pone.0102696.
18. Gidaro MC, Alcaro S, Secci D, Rivanera D, Mollica A, Agamennone M, Giampietro L, 2016. Identification of new anti-*Candida* compounds by ligand-based pharmacophore virtual screening. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31;1703-06.
19. Ehlers T, Furness S, Robinson TP, Zhong HA, Goldsmith D, Aribser J, Bowen JP. Methionine AminoPeptidase Type-2 Inhibitors Targeting Angiogenesis. *Curr Top Med Chem*. 2016;13;1478-88.
20. Badr-Eldin SM, Ahmed OA. Optimized nano-transfersomal films for enhanced sildenafil citrate transdermal delivery: ex vivo and in vivo evaluation. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10;1223-33.
21. Foye WO, Lemke TL, Williams DA. Principles of Medicinal Chemistry, 6th ed. Philadelphia; 2008:1377-1400.
22. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999;57; 1-164.

23. Desmarchelier C, Gurm A, Cicia G, Giulietti A. Ritual and medicinal plants of the Ese'ejas of the Amazonian rainforest (Madre de Dios, Peru). *J Ethnopharmacol.* 1996;52;45-51.
24. Meotti FC, Ardenghi JV, Pretto JB, Souza MM, d' Avila Moura J, Junior AC. Antinociceptive properties of coumarin, steroid and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58;107-12.
25. Silva AAR, Bezerra MM, Chaves HV, Pereira KMA, Aguiar JA, Pinto VPT. Protective effect of *Chresta martii* extract against indomethacin-induced gastric lesions in mice. *J Nat Med.* 2013;67;143-51.
26. Denadai-Souza A, Camargo LL, Ribela MT, Keeble JE, Costa SK, Muscará MN. Participation of peripheral tachykinin NK receptors in the carrageenan -induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur J Pain* 2009;13;812–19.
27. Miller LC, Tainter ML. Estimation of the ED₅₀ and its error by means of logarithmic-probity graph paper. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1944;57;261–64.
28. Cha HJ, Kim YJ, Jeon SY, Kim YH, Shin J, Yun J, Han K, Park HK, Kim HS. Neurotoxicity induced by alkyl nitrites: Impairment in learning/memory and motor coordination. *Neurosci Letters* 2016;619;79-85.
29. Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc.* 1957;46;208–9.

Figure Captions

Figure 1. Effects of three compounds isolated from the ethanolic extract of *Tephrosia toxicaria* Pers. on the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats. Pre-treatment with (A) deguelin (1.0 mg kg⁻¹), (B) 12a-hydroxi- α -toxicarol (1.0 and 10 mg kg⁻¹), and (C) obovatin (1.0 and 10 mg kg⁻¹) increased the nociceptive threshold. Wistar rats received intra-articular injection of zymosan (2 mg; 40 μ L) or saline solution into the left TMJ. Data are represented as the means $\pm$ SEM (n=6). #*p* < 0.05 in relation to Sham group, **p* < 0.05 in relation to zymosan group (ANOVA, Bonferroni).

Figure 2. Effects of three compounds isolated from the ethanolic extract of *Tephrosia toxicaria* Pers. on the total leukocyte counting in the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats. Pre-treatment with (A) deguelin (1.0 mg kg⁻¹),

(B) 12a-hydroxi- α -toxicarol (1.0 and 10 mg kg⁻¹), and (C) obovatin (1.0 and 10 mg kg⁻¹) reduced the total number of leukocytes in the TMJ synovial lavage. Wistar rats received intra-articular injection of zymosan (2 mg; 40 μ L) or saline solution into the left TMJ. Data are represented as the means $\pm$ SEM (n=6). $^{\#}p < 0.05$ in relation to Sham group, $^{*}p < 0.05$ in relation to zymosan group (ANOVA, Bonferroni).

Figure 3. Isolated compounds and the semi-synthetic molecule from *Tephrosia toxicaria* (1) obovatin, (2) 12a-hydroxi- α -toxicarol, (3) deguelin, (4) [4'',5''] dihydro-obovatin, which was obtained from the hydrogenation of compound 1.

Figure 4. Effects of [4'',5''] dihydro-obovatin on the zymosan-induced TMJ inflammatory hypernociception in rats. (A) [4'',5''] dihydro-obovatin (0.1 and 1.0 mg/kg) increased the head-withdrawal nociceptive threshold of animals. (B) [4'',5''] dihydro-obovatin (0.1 and 1.0 mg/kg) reduced the total number of leukocytes in the TMJ synovial lavage. Data are represented as the means $\pm$ SEM (n=6). $^{\#}p < 0.05$ in relation to Sham group, $^{*}p < 0.05$ in relation to zymosan group (ANOVA, Bonferroni).

Figure 5. Body mass variation in mice treated with [4'',5''] dihydro-obovatin for 14 days. Animals received [4'',5''] dihydro-obovatin (per os; 0.01 mg/kg) or saline solution for 14 days and were weighed daily.

Figure 6. Histopathological evaluation of mouse organs after sub-chronic treatment with [4'',5''] dihydro-obovatin (0.01 mg/kg) for 14 days. **(A)** Liver presenting typical cellular binucleation (black arrows) surrounded by sinusoid capillary vessels. **(B)** Heart showing normal cardiomyocytes ($\times$) and preserved basophilic nuclei. **(C)** Kidney cortical region exhibiting renal corpuscle formed by the renal glomeruli and renal capsule (thin arrows), hyperemic blood capillaries (white arrows), and the macula densa (black arrow) within the normal morphological pattern. **(D)** Spleen showing lymphatic nodes (LN) and central arteriole (black arrows) surrounded by sinusoid capillary vessels (white arrows). Tissue sections were observed under microscope using 400X-magnification and HE-staining technique.

Figure 7. Effect of [4",5"] dihydro-obovatin acute administration on the rota-rod test. (A) [4",5"] dihydro-obovatin (0.01 mg/kg) increased the latency time of animals in the rota-rod test. (B) [4",5"] dihydro-obovatin (0.01 mg/kg) reduced the number of falls of animals in the rota-rod test. Data are represented as the means $\pm$ SEM (n=5). * $p < 0.05$ in relation to saline group (ANOVA, T-Student).

Figure 1

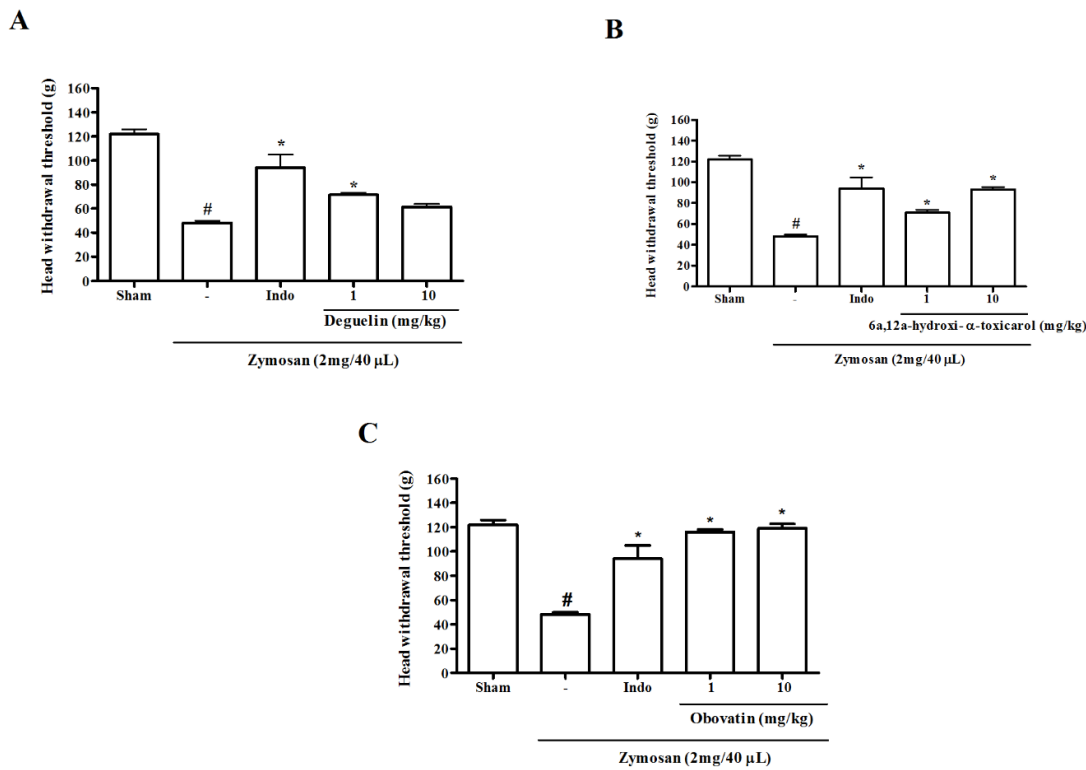


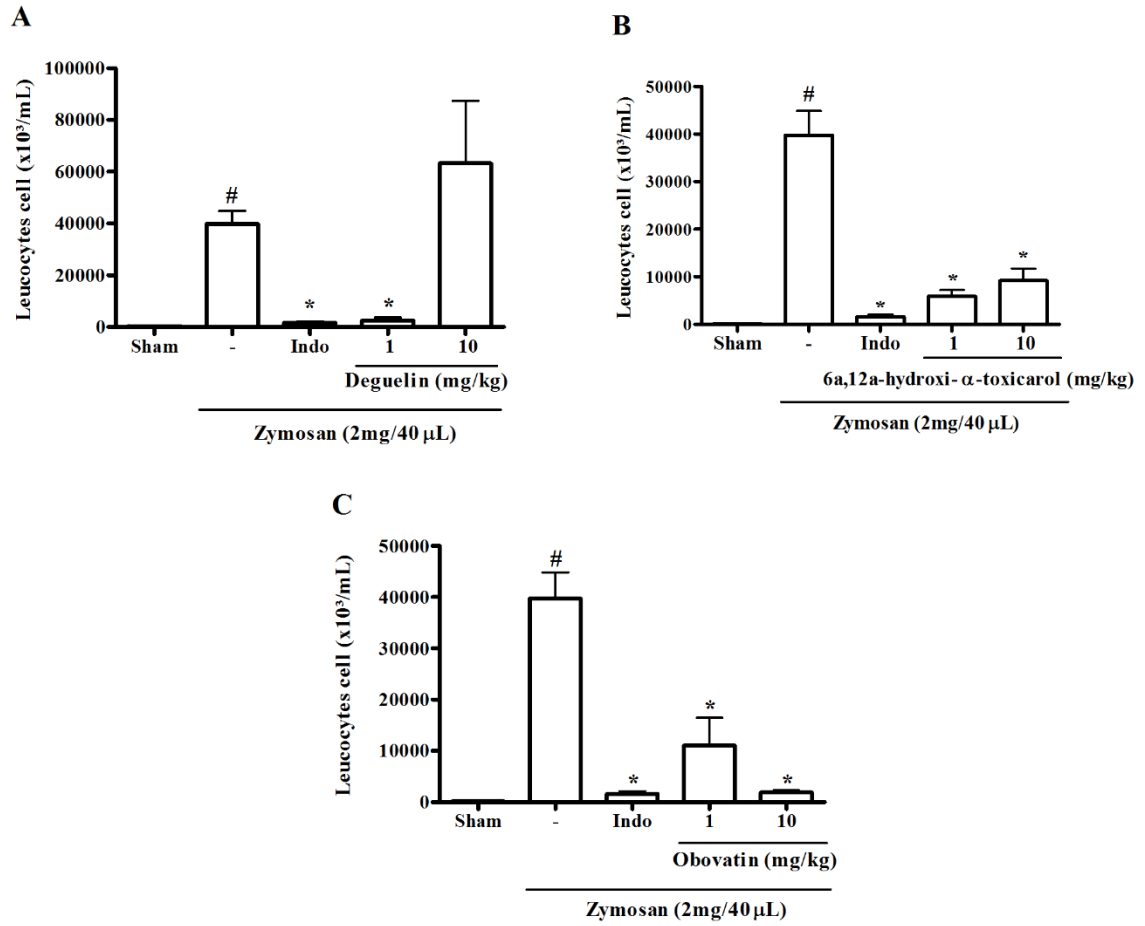
Figure 2

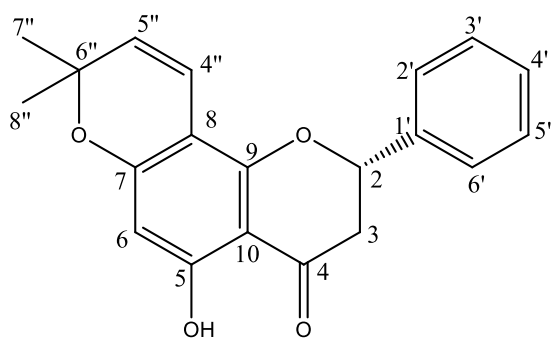
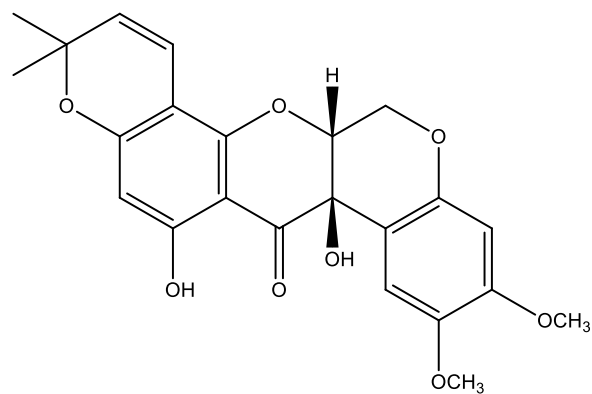
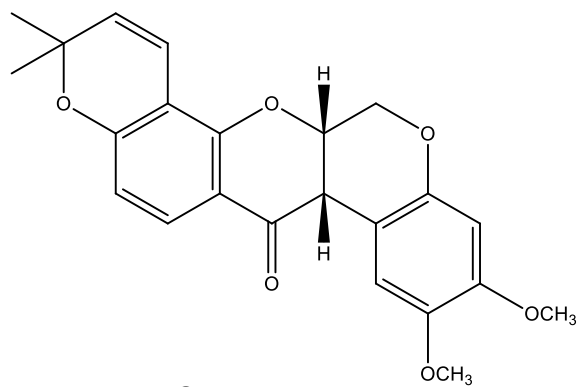
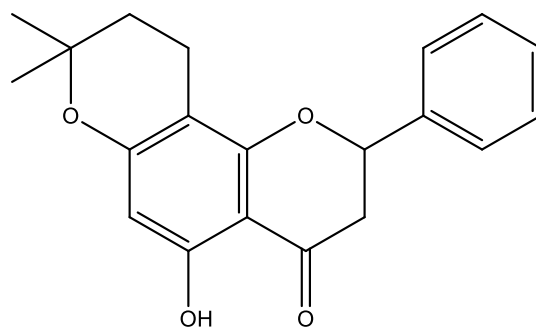
Figure 3**1****2****3****4**

Figure 4

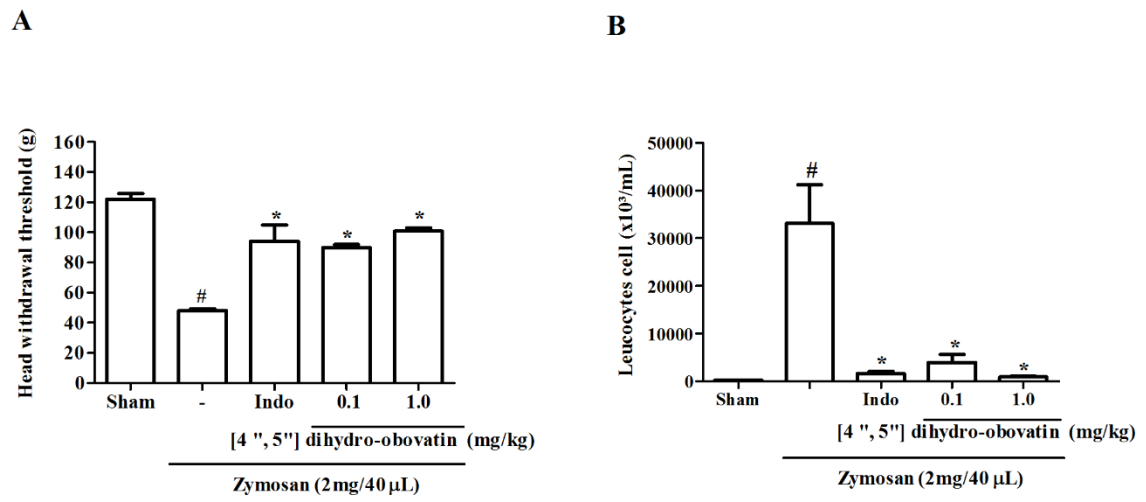


Figure 5

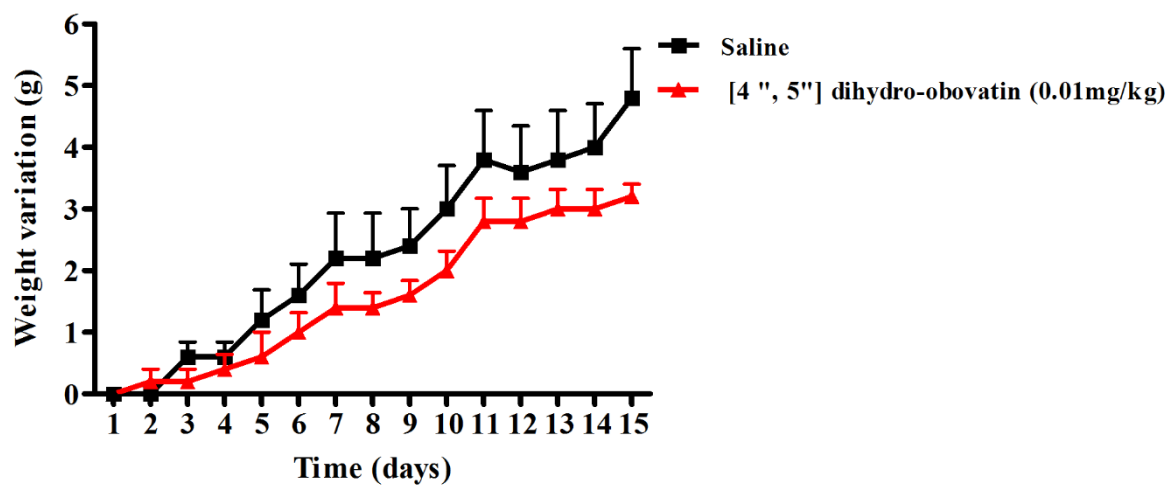
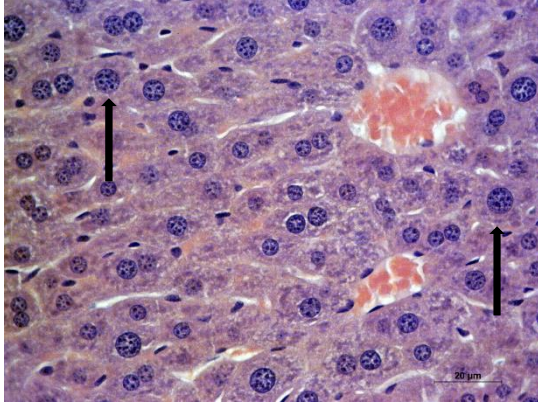
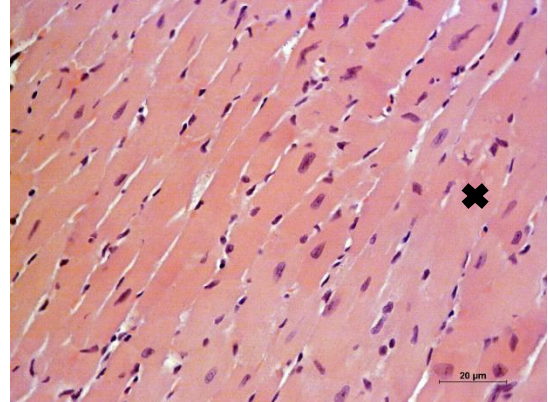


Figure 6

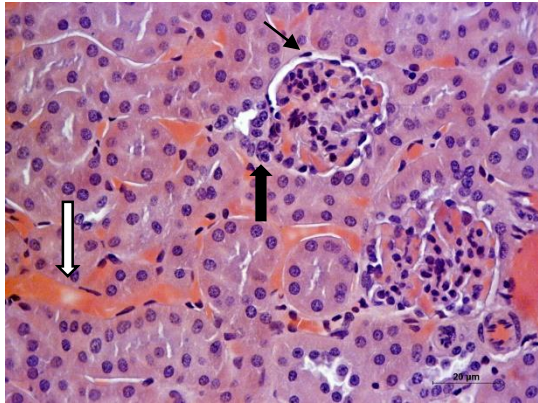
A



B



C



D

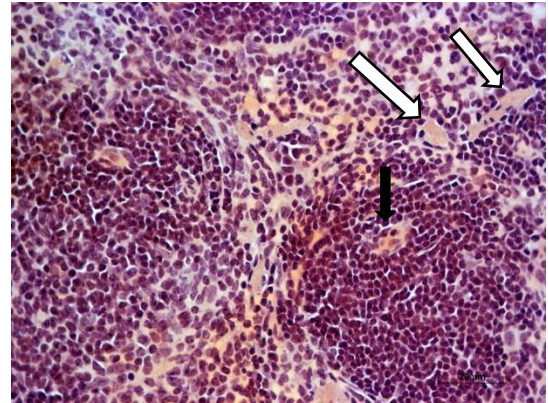


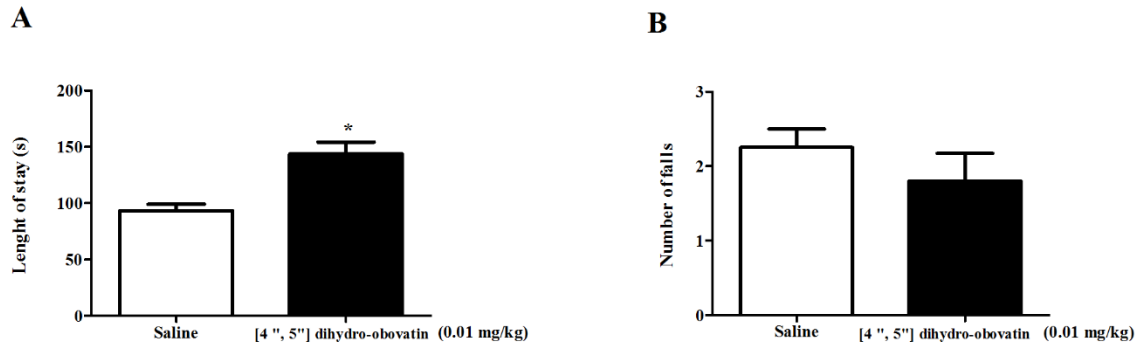
Figure 7

Table 1. Systemic effects of [4",5"] dihydro-obovatin on mice.

Organs	Control	[4",5"] dihydro-obovatin
Liver	1,64± 0,07	1,58±0,05
Heart	0,22± 0,03	0,16±0,01
Kidney	0,47± 0, 04	0,52± 0,04
Spleen	0,09± 0,009	0,08± 0,01
AST (TGO)	64,22 ± 19,8	25,00 ± 4,5
ALT (TGP)	58,96 ± 21,6	71,32 ± 7,5
Creatinine	0,52 ± 0,11	0,60 ± 0,10

Animals were weighted and received a single dose per day for 14 consecutive days of [4",5"] dihydro-obovatin. After the 14-day treatment, blood samples were collected for biochemical dosages (AST, ALT, and creatinine). After euthanasia, the weight of fresh organs was determined. Results are expressed as the means ± SEM. * $p < 0.05$ in relation to control group (ANOVA, T-Student).

HIGHLIGHTS

- TMJ disorders limit daily activities and lead to pain-related disability
- There have been growing interests in alternative therapies for TMJ disorders
- *Tephrosia toxicaria* Pers extracts have shown anti-inflammatory activity
- [4'',5''] di-hydro-obovatin was synthesised from obovatin
- [4'',5''] di-hydro-obovatin reduced hypernociception and did not cause toxic effects

FUNDING BODY

This work was supported by Brazilian grants from Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico(CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Instituto de Biomedicina do Semi-Árido Brasileiro (INCT).

A Semi-Synthetic Molecule, [4 ", 5"] Dihydro-Obovatin, Isolated from *Tephrosia Toxicaria* Pers Reduces Zymosan-Induced Temporomandibular Joint Inflammatory Hypernociception in Rats

Danielle Rocha do Val ^a, Hellíada Vasconcelos Chaves ^{b*}, Francisco Isaac Fernandes Gomes ^b, Rodrigo da Silva Santos ^b, Antonio Mateus Gomes Pereira ^b, Igor Iuco de Castro Silva ^b, Vicente de Paulo Teixeira Pinto ^b, Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar ^b, Norma Maria Barros Benevides ^c, Francisca Renata Lopes da Silva ^d, Jair Mafezoli ^d, Jackson Nunes e Vasconcelos ^e, Marcos Reinaldo da Silva ^d, Raimundo Braz Filho ^d, Mirna Marques Bezerra ^b, Ângela Martha Campos Arriaga ^d, Maria Bernadete de Sousa Maia ^a

a Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, North-eastern Biotechnology Network, Av. Prof Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária. Zip Code 50670-091, Recife, Pernambuco, PE, Brazil. (danielleval@hotmail.com, mbsm@ufpe.br)

b Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil. (helliadachaves@yahoo.com.br, ffer9352@uni.sydney.edu.au, rodrigossantos74@hotmail.com, mathewsgomes20@gmail.com, igoriuco@gmail.com, pinto vicente@gmail.com, lissiana_m@yahoo.com.br, renatinha.ruiva@yahoo.com.br, mirnabrayner@gmail.com)

c Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, CE, Brazil. (nmabb@ufc.br)

d Department of Organic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, CE, Brazil. (jmafez@uol.com.br, reisilva_ce@yahoo.com.br, brazfilho@uenf.br, angelamcarriaga@yahoo.com.br)

e Federal Institute of Ceará, Tinguá, Ceará, Brazil. (jackson_nv@yahoo.com.br)

***Corresponding author:**

Professor Hellíada Vasconcelos Chaves
Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará
Avenida Comandante Maurocéllo Rocha Pontes, 100
CEP: 62.042-280
Sobral - Ceará - Brazil
Phone: +55 88-3611-2202 - Fax: +55 88-3611- 8000
E-mail: helliadachaves@yahoo.com.br

APÊNDICE B – Comprovante de Submissão do Artigo

Manuscript Details

Manuscript number	PHAREP_2017_14
Title	A Semi-Synthetic Molecule, [4'', 5''] Dihydro-Obovatín, Isolated from <i>Tephrosia Toxicaria Pers</i> Reduces Zymosan-Induced Temporomandibular Joint Inflammatory Hypernociception in Rats
Short title	[4'', 5''] Dihydro-Obovatín Reduces TMJ Hypernociception in Rats
Article type	Original article
Abstract	Background: Arthritis possesses inflammatory components and flavonoids of well known structures exert anti-inflammatory activity. Here, we aim to evaluate the effects of [4'', 5''] dihydro-obovatin and three structurally-defined flavonoids from <i>Tephrosia toxicaria Pers</i> roots on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats as well as their toxicity. Material and Methods: Rats were pre-treated with the flavonoids (1 and 10 mg/kg) and [4'', 5''] dihydro-obovatin (0.1 and 1.0 mg/kg) one hour before intra-articular zymosan-injection (2 mg, 40 µL). Von Frey test was used to evaluate the nociceptive threshold at the 4th hour after zymosan-injection. Six hours after zymosan-injection, synovial lavage was collected for total cell counting. Acute toxicity assay for [4'', 5''] dihydro-obovatin (1, 10, 100 mg/kg) were performed along with the sub-chronic toxicity assay by administering [4'', 5''] dihydro-obovatin (0.01 mg/kg) or saline solution for 14 consecutive days and the rota-rod test was carried out to determine whether [4'', 5''] dihydro-obovatin would impair motor functions. Results: The tested flavonoids and [4'', 5''] dihydro-obovatin increased nociceptive threshold and reduced the cell counting in the synovial lavage in the temporomandibular joint compared with the zymosan group. [4'', 5''] dihydro-obovatin did not induce toxic effects as well as did not alter the motor function in the rota-rod test. The flavonoids and [4'', 5''] dihydro-obovatin exerted antinociceptive and anti-inflammatory effects on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats and the latter did not show significant toxic effects. Conclusion: [4'', 5''] dihydro-obovatin would be a promising anti-inflammatory and antinociceptive agent.
Keywords	<i>Tephrosia toxicaria Pers</i> ; [4'', 5''] dihydro-obovatin; temporomandibular joint; hypernociception.
Corresponding Author	Helliada Helliada
Corresponding Author's Institution	Universidade Federal do Ceará
Order of Authors	Helliada Helliada, Danielle do Val, Francisco Isaac Fernandes Gomes, Rodrigo da Silva Santos, Antonio Mateus Gomes Pereira, Igor Iuço de Castro Silva, VICENTE DE PAULO TEIXEIRA PINTO, Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar, Norma Maria Barros Benevides, Francisca Renata Lopes da Silva, Jair Mafezoli, Jackson Nunes e Vasconcelos, Marcos Reinaldo da Silva, Raimundo Braz Filho, Mirna Marques Bezerra, Ângela Martha Campos Arriaga, Maria Bernadete de Sousa Maia
Suggested reviewers	DELANE GONDIM, Mariana Lima Vales, Gerly Anne Brito, Vilma Lima

APÊNDICE C – Comprovante Depósito de Patente

< Uso exclusivo do INPI >


INPI
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PROTOCOLO DE REGISTRO

013130000366
08/11/2013 10:39 DECE

BR 10 2013 028793 8

Espaço reservado para o protocolo
Espaço reservado para a etiqueta
Espaço reservado para o código QR


INPI
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

 DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**
 - 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 - 1.2 Qualificação: INSTITUIÇÃO DE ENSINO SUPERIOR
 - 1.3 CNPJ/CPF: 07272636000131
 - 1.4 Endereço Completo: AV. DA UNIVERSIDADE 2853, BENFICA
 - 1.5 CEP: 60020180
 - 1.6 Telefone: 85-33669434
 - 1.7 Fax: 85-33669941
 - 1.8 E-mail: selma@ufc.br

☐ continua em folha anexa

2. **Natureza:**

☒ Invenção
☐ Modelo de Utilidade
☐ Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**

" EFEITO ANALGÉSICO DE (-)-5-HIDROXI-6", 6"-DIMETILCROMANO-[2", 3": 7, 8]-FLAVANONA

☐ continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão: do pedido Nº** **Data de Depósito:**

5. **Prioridade:**

☐ Interna (66)
☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

☐ continua em folha anexa