

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS GONADAIS NA SENSIBILIDADE À
DOR NO TESTE DE FORMALINA EM RATOS CASTRADOS:
DIFERENÇAS SEXUAIS NO LIMAR NOCICEPTIVO E NA
ANALGESIA POR OPIÓIDES μ E κ .**

JULIANE DEXHEIMER

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina, para obtenção
do grau de Mestre em Neurociências.**

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Graciela Terenzi

FLORIANÓPOLIS, 2002

**"INFLUÊNCIA DOS HORMÔNIOS GONODAIS NA SENSIBILIDADE
À DOR NO TESTE DE FORMALINA EM RATOS CASTRADOS:
DIFERENÇAS SEXUAIS NO LIMIAR NOCICEPTIVO E NA
ANALGESIA POR OPIÓIDES μ E k"**

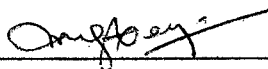
JULIANE DEXHEIMER

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

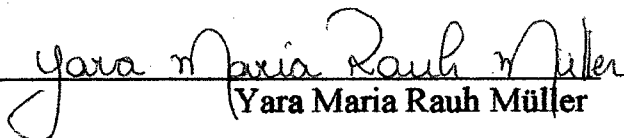
na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientadora



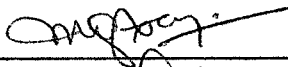
Mariana Graciela Terenzi

Coordenadora do Curso

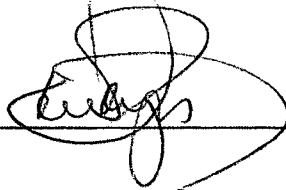


Yara Maria Rauh Müller

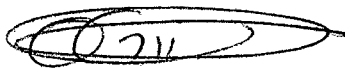
Banca Examinadora



Mariana Graciela Terenzi (Presidente)



Carlos Rogério Tonussi



Odival Cezar Gasparotto

Mude,

mas comece devagar,
porque a direção é mais importante
que a velocidade.

Sente-se em outra cadeira,
no outro lado da mesa.
Mais tarde, mude de mesa.

Quando sair,
procure andar pelo outro lado da rua.
Depois, mude de caminho,
ande por outras ruas,
calmamente,
observando com atenção
os lugares por onde
você passa.

Tome outros ônibus.
Mude por uns tempos o estilo das roupas.
Dê os teus sapatos velhos.
Procure andar descalço alguns dias.

Tire uma tarde inteira
para passear livremente na praia,
ou no parque,
e ouvir o canto dos passarinhos.

Veja o mundo de outras perspectivas.
Abra e feche as gavetas
e portas com a mão esquerda.

Durma no outro lado da cama...
depois, procure dormir em outras camas.

Assista a outros programas de tv,
compre outros jornais...
leia outros livros,
Viva outros romances.

Não faça do hábito um estilo de vida.
Ame a novidade.
Durma mais tarde.
Durma mais cedo.

Aprenda uma palavra nova por dia
numa outra língua.
Corrija a postura.
Coma um pouco menos,
escolha comidas diferentes,
novos temperos, novas cores,
novas delícias.

Tente o novo todo dia.
o novo lado,
o novo método,
o novo sabor,
o novo jeito,
o novo prazer,
o novo amor.
a nova vida.

Tente.
Busque novos amigos.
Tente novos amores.
Faça novas relações.

Almoce em outros locais,
vá a outros restaurantes,
tome outro tipo de bebida
compre pão em outra padaria.

Almoce mais cedo,
jante mais tarde ou vice-versa.

Escolha outro mercado...
outra marca de sabonete,
outro creme dental...
tome banho em novos horários.

Use canetas de outras cores.
Vá passear em outros lugares.
Ame muito,
cada vez mais,
de modos diferentes.

Troque de bolsa,
de carteira,
de malas,
troque de carro,
compre novos óculos,
escreva outras poesias.

Jogue os velhos relógios,
quebre delicadamente
esses horrorosos despertadores.

Abra conta em outro banco.
Vá a outros cinemas,
outros cabeleireiros,
outros teatros,
visite novos museus.

Se você não encontrar razões para ser livre,
invente-as.
Seja criativo.

E aproveite para fazer uma viagem despreziosa,
longa, se possível sem destino.

Experimente coisas novas.
Troque novamente.
Mude, de novo.
Experimente outra vez.

Você certamente conhecerá coisas melhores
e coisas piores do que as já conhecidas,
mas não é isso o que importa.
O mais importante é a mudança,
o movimento,
o dinamismo,
a energia.
Só o que está morto não muda !

Repito por pura alegria de viver:
a salvação é pelo risco, sem o qual a vida não
vale a pena!!!!

(Clarice Lispector)

Aos meus pais, Lothar e Mirna, pela vida, pelo carinho, amor e por serem sempre os maiores incentivadores de todos os meus projetos de vida, meu agradecimento especial e gratidão eterna.

**Ao Jorge, pelo amor, compreensão e
respeito.**

**À Profa. Mariana Graciela Terenzi, meu
agradecimento especial pela orientação,
apoio constante e pela maneira tranqüila
e carinhosa de me ajudar nos momentos
de dificuldades.**

Agradecimentos

Aos professores do curso de neurociências, obrigado pelos ensinamentos e críticas construtivas ao longo destes dois anos.

À Profa. Dra. Sílvia Modesto Nassar pela orientação e cooperação para realização da análise estatística deste trabalho.

Às amigas de longa data, Graziela C. Giordani e Jaqueline Lunelli, pela amizade.

Aos funcionários do laboratório de fisiologia e do Curso de Pós-Graduação em Neurociências pelo auxílio.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	
1. Considerações gerais	
3	
2. Hormônios gonadais e os ciclos menstrual e estral	5
2.1. Ciclo menstrual	5
2.2. Ciclo estral	7
2.3. Função dos hormônios gonadais	8
3. Diferenças sexuais na resposta à dor	9
4. Analgesia induzida pela administração de opióides: modulação pelos hormônios gonadais	
12	
5. Testes algesimétricos	14
6. Justificativa	16
7. Objetivo geral	17
8. Objetivos específicos	
17	
MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Animais	18
2. Protocolos Experimentais	18
2.1. Experimento I	18
2.1.a Fêmeas	19
2.1.b Machos	19
2.2. Experimento II	20
2.2.a Fêmeas	20
2.2.b Machos	20
3. Cirurgias	21
3.1. Ovariectomia	21
3.2. Orquiectomia	21
3.3. Cirurgia estereotáxica	21
4. Microinjeção intracerebroventricular	22
5. Teste de formalina	23
6. Análise histológica	24
7. Análise estatística	25
RESULTADOS	
Experimento I: Efeito dos hormônios gonadais na sensibilidade a diferentes concentrações de formalina	27
Experimento II: Efeito dos hormônios gonadais na analgesia opióide	
40	
DISCUSSÃO	

1.Efeito dos hormônios gonadais na sensibilidade a diferentes concentrações de formalina	51
1.1. Análise das reações comportamentais ao teste de formalina.	51
1.2. Efeito da progesterona e estradiol na sensibilidade à dor nas fêmeas.	53
1.3. Efeito da testosterona na sensibilidade à dor nos machos.	57
1.4. Diferenças sexuais na sensibilidade à dor.	58
2. Efeito dos hormônios gonadais na analgesia opióide.	62
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito do tratamento sistêmico de longa duração com hormônios gonadais sobre o limiar nociceptivo basal (experimento I) e o efeito antinociceptivo dos agonistas opióides μ e κ injetado icv (experimento II) em ratos machos e fêmeas gonadectomizadas. O teste algosimétrico usado foi o teste de formalina e as respostas comportamentais foram analisadas como descrito por Coderre e cols (1993), índice de dor 1 (ID1), e Watson e cols (1997), ID2. Segundo estes autores, o ID2 é menos variável e mais específico para comportamentos nociceptivos. O ID2 pode, portanto, ser um melhor índice para detectar diferenças de gênero, as quais tendem a ser sutis e variáveis.

No experimento I, machos (250 g) e fêmeas (200 g) de ratos Wistar foram anestesiados com tiopental (50mg/Kg, ip) e suas gônadas removidas. Um dia depois da cirurgia, as fêmeas foram divididas em 4 grupos de 24 ratas cada e injetadas com 1 μ g estradiol (E), 1 mg progesterona (P), 1 mg P + 1 μ g E (P+E) ou 0,1 ml de óleo vegetal (OF) como controle. Os machos foram divididos em dois grupos de 24 ratos e injetados com 250 μ g testosterona (T) ou 0,1 ml óleo (OM) como controle. O volume injetado foi 0,1 ml por animal, sc, em intervalos de 48 h durante 14 dias. No 14^o dia, cada animal foi avaliado no teste de formalina e as reações comportamentais para o estímulo nocivo foram avaliadas durante a primeira fase (primeiros 10 min) e 10 min mais tarde, durante a segunda fase (por 30 min). Foram construídas curvas de dose-resposta para o estímulo nocivo usando formalina 1%, 2% e 5% (0,05 ml sc na superfície plantar da pata posterior direita). Fêmeas foram mais sensíveis do que os machos para formalina 2% e 5%, elas foram também mais sensíveis para dose aplicada, embora os machos tenham sido mais responsivos na dose de 1%. Nas fêmeas, o tratamento combinado P+E aumentou o ID1 e o ID2, comparado ao grupo controle, com formalina 1% e 2% embora este efeito tenha sido significativo somente quando o ID2 foi medido. Os animais tratados com E ou P não manifestaram comportamento diferente do grupo O. Os hormônios femininos estradiol e progesterona atuam sinergicamente para aumentar a sensibilidade no teste de formalina. O efeito foi melhor observado com estímulo nocivo de baixa intensidade o que sugere uma discreta participação destes hormônios no processamento nociceptivo. T, nos machos, tendeu a aumentar a resposta para dor na formalina 5%.

No experimento II, machos (250 g) e fêmeas (200 g) ratos Wistar foram anestesiados com xilazina (10 mg/Kg, im) e tiopental (50 mg/Kg, ip), colocados no aparelho estereotáxico e uma cânula guia foi implantada no ventrículo lateral direito. Suas gônadas também foram removidas. Um dia depois da cirurgia, as fêmeas foram divididas em 4 grupos de 24 ratas e injetadas com 1 μ g E, 1 mg P, 1 mg P + 1 μ g E (P+E) ou 0,1 ml óleo vegetal (OF) como controle. Os machos foram divididos em dois grupos de 24 ratos e injetados com 250 μ g testosterona (T) ou 0,1 ml óleo (OM) como controle. O protocolo para os tratamentos hormonais e o teste de formalina foi similar ao experimento I exceto que somente formalina 5% foi injetada. Além disto, 5 min antes do teste de formalina, cada animal recebeu uma microinjeção icv de 0,5 μ l de DAGO (2 μ g) ou (-)U50488 (50 μ g) ou salina (0,9% NaCl). Fêmeas tratadas com P sozinho ou em combinação com E (P+E) foram mais sensíveis para o efeito analgésico do agonista μ (DAGO) mas somente na primeira fase da resposta a formalina (o ID1 foi similar ao ID2). Todavia, uma forte analgesia independente do tratamento hormonal foi observada na segunda fase. O agonista κ (U50488) também reduziu a resposta comportamental para formalina com um grande efeito no grupo P+E na primeira fase. Este mesmo grupo foi também o menos responsivo para o U50488 na segunda fase, sugerindo uma modulação diferencial da analgesia opióide por hormônios gonadais dependendo do tipo de dor (nociceptiva ou inflamatória). Ratos machos foram mais sensíveis para o DAGO do que as fêmeas independente do estado hormonal.

ABSTRACT

The aim of the present studies was to determine the effect of long-term systemic treatment with gonadal hormones on the basal nociceptive threshold (experiment I) and on the antinociceptive effect of a μ and a κ opioid agonist injected icv (experiment II) in gonadectomised female and male rats. The algometric test used was the formalin test and the resulting behavioural responses were analysed as described by Coderre *et al.* (1993), the nociceptive index 1 (NI1), and Watson *et al.* (1997), NI2. According to the latter authors, NI2 is less variable and more specific for nociceptive behaviours. NI2 should, therefore, be a better index for detecting gender differences, which tend to be subtle and variable.

In experiment I, male (250 g) and female (200 g) Wistar rats were anaesthetised with thiopental (50 mg/Kg, ip) and their gonads removed. One day after this surgery, the females were divided into 4 groups of 24 rats each and injected with either 1 μ g oestradiol (E), 1 mg progesterone (P), 1 μ g E + 1 mg P (P+E) or 0.1 ml vegetable oil (OF) as a control. The males were divided into two groups of 24 rats and injected with 250 μ g testosterone (T) or 0.1 ml oil (OM) as a control. The volume injected was 0.1 ml per animal, sc, at 48 h intervals for 14 days. On the 14th day, each animal was tested with the formalin test and the behavioural reactions to the noxious stimulus were assessed during the 1st phase (first 10 min) and 10 min later, during the 2nd phase (for a further 30 min). Dose-response curves to the noxious stimulus were constructed using formalin at 1%, 2% and 5% (0.05 ml sc in the plantar surface of the right hindpaw). Females were more sensitive than males to 2 and 5% formalin, they were also sensitive to the dose applied, whereas the male rats were already maximally responsive at the 1% dose. In female rats, the combined treatment P+E increased the NI1 and the NI2, compared to the control group, with 1% and 2% formalin although this effect was significant only when NI2 was measured. Animals treated with E or P did not behave differently to the O group. The female hormones oestradiol and progesterone act synergistically to increase pain sensitivity in the formalin test. This effect was best observed with low intensity noxious stimulation which suggests a discrete role of these hormones in nociceptive processing. T, on the other hand, tended to increase the pain response to 5% formalin in the males.

In experiment II, male (250 g) and female (200 g) Wistar rats were anaesthetised with xylazine (10 mg/Kg, im) and thiopental (50 mg/Kg, ip), placed in a stereotaxic frame and implanted with steel guide cannulae in the right lateral ventricle. Their gonads were also removed. One day after this surgery, the females were divided into 4 groups of 24 rats each and injected with either 1 μ g E, 1 mg P, 1 μ g E + 1 mg P (P+E) or 0.1 ml vegetable oil (OF) as a control. The males were divided into two groups of 24 rats and injected with 250 μ g testosterone (T) or 0.1 ml oil (OM) as a control. The protocol for hormonal treatments and the formalin test were similar to experiment I except that only 5% formalin was injected. In addition, 5 min before the formalin test, each animal received a 0.5 μ l icv microinjection of either DAGO (2 μ g) or (-)-U50488 (50 μ g) or saline (0.9% NaCl). Females treated with P alone or in combination with E (P+E) were more sensitive to the antinociceptive effect of the μ agonist (DAGO) but only in the 1st phase of the response to formalin (NI1 was similar to NI2). However, a hormone-independent stronger analgesia was observed in the 2nd phase. The κ agonist (U50488) also reduced the behavioural responses to formalin with a greater effect on the P+E group in the 1st phase. Interestingly, this same group was also the least responsive to U50488 on the 2nd phase, suggesting differential modulation of opioid analgesia by gonadal hormones depending on the type of pain (nociceptive or inflammatory). Male rats were more sensitive to DAGO than females independently of their hormonal status.

INTRODUÇÃO

1. Considerações Gerais:

A sobrevivência de um indivíduo depende de muitos fatores externos e internos, incluindo condições ambientais, disponibilidade de nutrientes, habilidade para prevenir invasão de microorganismos e a presença de um perfeito sistema reprodutivo operante que permita a reprodução do indivíduo e a perpetuação da espécie e, por fim, sistemas que permitam ao indivíduo interagir com seus semelhantes e com o meio ambiente em que ele vive.

O comportamento reprodutivo, como todas as formas de comportamento, depende da plasticidade do desenvolvimento do cérebro. A variedade de comportamentos é geneticamente determinada, mas os comportamentos particulares resultam das interações entre os organismos em desenvolvimento e o ambiente.

Machos e fêmeas diferem em muitos aspectos anatômicos, fisiológicos e comportamentais, e este dimorfismo sexual inicia-se ainda na vida intra-uterina, onde as gônadas influenciam o ambiente hormonal do feto em desenvolvimento. Tecidos específicos se desenvolvem ao longo de linhas sexualmente dimórficas em resposta à combinação de hormônios sexuais aos quais são expostos (Genuth, 2000b).

A transição do estado não reprodutor para reprodutor depende da maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonádico. Esta maturação ocorre gradualmente durante o desenvolvimento. Os hormônios hipotalâmicos regulam a secreção dos hormônios hipofisários LH e FSH. O hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) são glicoproteínas que atuam modulando o desenvolvimento, o crescimento, a maturação, os processos de reprodução e a secreção dos hormônios sexuais nas gônadas. A regulação da secreção de LH e FSH ocorre de modo pulsátil, periódico, cíclico e relacionado

ao estágio da vida. A secreção de LH e FSH é estimulada pelo hormônio hipotalâmico denominado de hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH ou GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas). Os hormônios esteróides gonádicos, testosterona nos machos e estradiol e progesterona nas fêmeas são os mais importantes hormônios sexuais e sua regulação é diferente nos machos e nas fêmeas (Genuth, 2000a e 2000b).

Nos machos, com a aproximação da puberdade, ocorre um padrão pulsátil amplificado do LHRH e a relação de LH e FSH sobe à medida que aumenta a frequência dos pulsos e aumenta a responsividade das células gonádicas. Os níveis de testosterona aumentam bruscamente e inicia-se o processo de maturação dos órgãos e processos reprodutivos, bem como as características masculinas físicas e comportamentais da vida adulta, até atingir o climatério (andropausa) onde ocorre um declínio gradual na responsividade gonádica à estimulação pela gonadotropina (Genuth, 2000b).

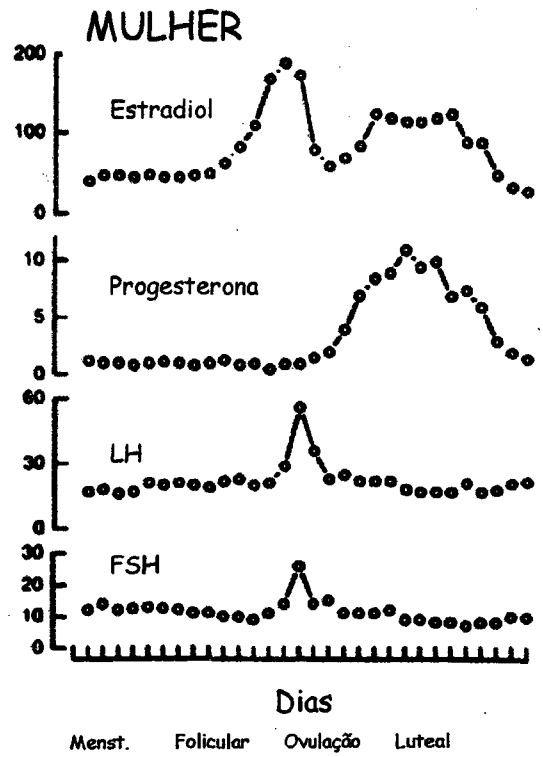
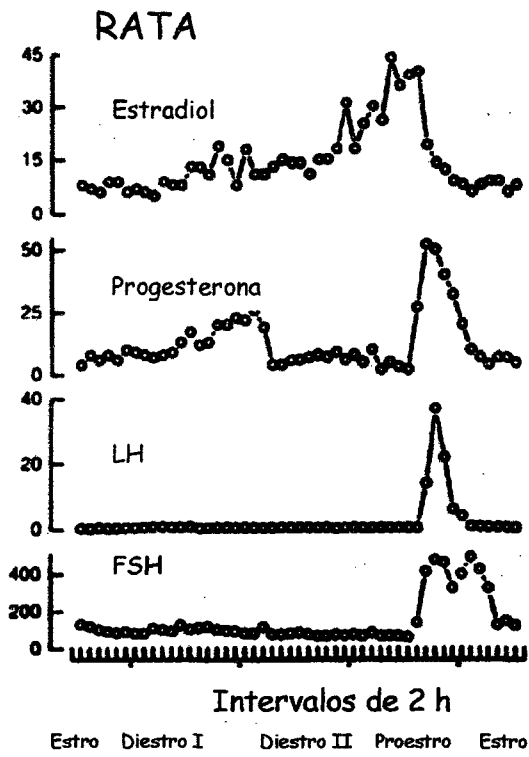
Nas fêmeas, com a chegada da puberdade ocorre um padrão pulsátil hormonal, porém, diferente dos machos. As fêmeas desenvolvem episódios cíclicos de duração variável dependendo da espécie. Nas mulheres este ciclo é mensal, ao passo que nas ratas estas alterações hormonais ocorrem a cada quatro ou cinco dias. Nas fêmeas também ocorrem dramáticas alterações hormonais durante a gestação, parto e amamentação. Estas alterações hormonais podem ocorrer enquanto a fêmea possui capacidade reprodutiva plena e normal. No fim da vida reprodutiva, semelhante ao que acontece no macho, ocorre diminuição da responsividade hormonal nas fêmeas (menopausa) e em ambos os sexos uma contínua retroalimentação negativa resulta em níveis plasmáticos elevados de gonadotrofinas (Genuth, 2000b).

2. Hormônios Gonadais e os Ciclos Menstrual e Estral:

Os hormônios gonadais naturalmente flutuam através do ciclo menstrual feminino e o análogo para o ciclo menstrual humano nos roedores é o ciclo estral (ver figura).

2.1. Ciclo Menstrual:

Os hormônios gonadotrópicos FSH e LH secretados pela hipófise controlam o ciclo menstrual feminino (Genuth, 2000b). Depois da menstruação, na fase folicular do ciclo, FSH e LH são secretados constantemente em níveis baixos ou moderados. Nesta fase ainda, o estradiol gradualmente aumenta com um pico anterior à ovulação enquanto a progesterona permanece níveis em baixos aumentando ligeiramente até a metade do ciclo. Aproximadamente um dia antes da ovulação, os altos níveis de estradiol exercem uma retroalimentação positiva sobre o LH e o FSH e estes aumentam dramaticamente, levando à ruptura do folículo. Depois da ovulação, forma-se o corpo lúteo, que secreta grandes quantidades de estradiol e progesterona durante a chamada fase lútea. O pico de progesterona ocorre no meio da fase lútea ao passo que o do estradiol ocorre antes da ovulação. Os níveis aumentados de estradiol e progesterona fornecem a retroalimentação negativa para o hipotálamo e a hipófise, resultando na diminuição da secreção de LH e FSH ao longo da fase lútea. Devido a degeneração do corpo lúteo e a menstruação, a secreção diminuída de estradiol e progesterona remove, neste momento, a retroalimentação negativa da hipófise, permitindo o aumento da secreção de LH e FSH, iniciando um novo ciclo ovariano (Genuth, 2000b).



Padrão de secreção hormonal no ciclo estral (rata) e menstrual (mulher). FSH = hormônio foliculo estimulante, LH = hormônio luteinizante, Menst. = menstruação. Filligim e Ness, 2000.

2.2. Ciclo Estral:

O ciclo reprodutivo da rata não é sazonal, de ovulação espontânea e poliéstrica (Long e Evans, 1922; Freeman, 1994). A luminosidade periódica tem um papel relevante na incidência e duração dos estágios do ciclo ovariano. Cada ciclo estral dura de quatro a cinco dias e é dividido em:

Proestro: tem duração de 12-14 horas, durante este período ocorre pico do hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), estradiol, e na fase tardia depois da ovulação ocorre um pico de progesterona. Nesta fase ocorre o estro comportamental (cio).

Estro: tem duração de 25-36 horas e no início estradiol e progesterona ainda estão elevados e LH e FSH estão em baixos níveis.

Diestro I ou metaestro: tem duração de 6-8 horas, neste período a progesterona está elevada em função do corpo lúteo deste ciclo, enquanto que os níveis de estradiol e LH estão baixos e inicia-se o desenvolvimento dos folículos do próximo ciclo.

Diestro II: duração de 24-36 horas, os níveis de progesterona estão mais baixos enquanto que os níveis de estradiol estão aumentando com o desenvolvimento dos folículos.

O período pré-ovulatório do ciclo estral é caracterizado pelo crescimento dos folículos ovarianos e concomitante elevação da secreção de estradiol, este aumento é contínuo através do diestro 2 e proestro para alcançar valores de pico no meio do proestro. À semelhança da mulher, o hormônio luteinizante (LH) é secretado de modo pulsátil e os pulsos são desencadeados a nível hipotalâmico pelo LHRH dentro do sistema porta hipofisário que abastece a hipófise. Durante o ciclo estral ocorre retroalimentação positiva e negativa do LH dependendo dos hormônios gonadais. O LH está baixo do final do estro até início do proestro como resultado da secreção de estradiol e progesterona secretados pelo folículo ovariano, sendo que o estradiol é mais potente para inibir a secreção de LH. A concentração de estradiol

até um determinado limiar durante o diestro é inibitória. Logo após, no proestro, os níveis de estradiol elevam-se e este é o estímulo positivo para secreção de LH induzindo a ovulação. Se ocorrer a fecundação, a fase lútea persiste pelo período de prenhez de 20-22 dias e o corpo lúteo proporciona o equilíbrio necessário dos esteróides gonádicos, que otimizam as condições para implantação do óvulo fertilizado e a subsequente manutenção do zigoto, embriões e fetos. Na ausência de fertilização o óvulo desintegra-se e um novo grupo de oócitos intrafoliculares iniciam a maturação no próximo proestro quatro dias mais tarde. Na rata não acasalada o corpo lúteo persiste morfológicamente por 12-14 dias e é referido como não funcional, pois não secreta suficiente progesterona para apoiar a reação de descamação do endométrio, não ocorrendo menstruação (Long e Evans, 1922; Freeman, 1994).

2.3. Função não reprodutiva dos Hormônios Gonadais:

Além de seus efeitos na maturação sexual e reprodução, os hormônios gonadais têm numerosos efeitos sobre o cérebro, começando durante a fase embrionária e continuando durante a idade adulta (Pilgrim e Hutchinson 1994; McEwen e Alves 1999).

Muitas destas ações também envolvem áreas do cérebro que não estão envolvidas primariamente com a reprodução, como no processo de memória e suas alterações durante o envelhecimento e doenças neurodegenerativas. Por exemplo, estudos mostram que terapia de reposição hormonal com estrógenos induz a expressão das enzimas de síntese da acetilcolina nos neurônios da parte basal do cérebro que inervam o córtex cerebral e o hipocampo, participando do aprendizado e da memória (ver Garcia-Segura e cols, 2001). Estudos clínicos e experimentais apontam para um papel de neuroproteção do estradiol, sugerindo que o estradiol diminui o risco e progressão da doença de Alzheimer e esquizofrenia e pode melhorar a recuperação de injúrias neurológicas traumáticas (ver Garcia-Segura e cols, 2001).

Estudos realizados em camundongos, ratos e em humanos indicam que os esteróides gonadais têm também um importante papel na modulação da dor. Assim, estudos sobre os mecanismos da dor, bem como tratamentos na prática clínica humana e veterinária devem agora considerar as diferenças de sexo nos mecanismos neurais mediando dor e analgesia (ver Unruh, 1996; Fillingim e Ness, 2000 e Garcia-Segura e cols, 2001).

3. Diferenças sexuais na resposta à dor:

Vários estudos clínicos e em animais de experimentação mostram que existem diferenças no limiar nociceptivo entre indivíduos de sexos diferentes. Machos apresentam limiares à dor mais altos que as fêmeas da mesma espécie em teste de dor aguda (limiar de escape, 'jump threshold' ou 'jump test'), reação de escape ao choque elétrico nas patas (Kepler e cols, 1989). No entanto, no teste de retirada da cauda, ('tail-flick') um reflexo espinhal o qual é realizado mediante a aplicação de um estímulo térmico de 50-55°C na cauda, os machos reagiram mais rápido do que as fêmeas (Forman e cols, 1989; Kepler e cols, 1989; Molina e cols, 1994). No teste de formalina, um modelo de dor mais persistente, onde foram avaliados duração de lambertura, flexão e frequência de sacudidas na pata injetada com 50 µl de formalina 10% sc, também foram observadas diferenças sexuais. O estímulo nocivo resultou em mais tempo de lambertura e flexão (mais dor) nas fêmeas do que nos machos, enquanto que a frequência de sacudida foi semelhante em ambos os sexos (Aloisi e cols, 1994).

No teste de escape que avalia dor fásica através de estímulos eletrocutâneos, a amplitude da flexão do membro, latência, e vocalização variaram durante o ciclo estral, sendo que as ratas foram mais sensíveis durante o proestro e diestro. Todavia, o ciclo estral não alterou comportamentos nociceptivos provocados pela formalina a 1% (Vincler e cols, 2001). Na clínica médica as mulheres apresentam maior incidência de dor crônica com síndromes

degenerativas como a fibromialgia, associadas a um limiar menor e mais pontos de dor, quando comparado com os homens. Os dados foram obtidos através de escores de dolorimetria em 391 pessoas na população em geral, subdivididos em cinco grupos de acordo com a sua dor (Wolfe e cols, 1995). Nas mulheres ocorre maior incidência de doenças autoimunes, como artrite reumatóide; elas relatam significativamente mais pontos de dor, dor mais intensa, mais frequente e de longa duração, em uma variedade de desordens como dor de cabeça, dor orofacial, dor musculoesquelética, dor abdominal e dor primariamente de origem psicológica. Mulheres apresentam um maior risco de incapacidade relacionada com a dor e mais atividades associadas com os cuidados com a saúde (Unruh, 1996). Em um estudo que avaliou a relação entre o sexo e dor clínica na resposta de dor experimental (em 117 mulheres e 92 homens adultos jovens saudáveis) através de questionários relatando sintomas relacionados com a dor nos meses que antecederam o estudo e depois submetidos à avaliação para dor térmica, as mulheres apresentaram um grande número de pontos de dor e mais cuidados com a saúde nos meses que precederam a sessão experimental. Neste estudo as mulheres apresentaram significativamente menor limiar para calor, dor térmica e tolerância à dor térmica e estas diferenças permaneceram significantes depois de corrigidos fatores psicológicos como hipervigilância e expectativa do papel sexual (Fillingim e cols, 1999). Em ratos já foi mostrado que as fêmeas são mais susceptíveis a desenvolver alodinia e hiperpatia em um modelo de neuropatia periférica, no qual foi realizado ligadura do nervo ciático; o limiar foi medido com estímulo inócuo usando filamentos de peso sobre a pata lesada para verificar a sensibilidade mecânica (Coyle e cols, 1995) porém mostram reduzida autotomia (relacionada à nocicepção) em outro modelo (crioneurólise, Wagner e cols, 1995).

Estas diferenças sexuais podem estar relacionadas a diferentes cargas de hormônios gonadais entre machos e fêmeas, e em particular, a testosterona. Este hormônio está associado

a maior tolerância à dor encontrada nos machos, visto que a castração causa redução no limiar nociceptivo no teste de retirada da cauda, que pode ser revertido pela administração de testosterona (Forman e cols, 1989). Os mesmos efeitos foram observados na resposta da placa quente (limiar determinado pela latência para lambedura ou salto na placa quente) (Forman e cols, 1989). Nas fêmeas, a remoção dos ovários diminuiu o limiar para a dor no teste de retirada da cauda, o qual foi revertido pelo estradiol. Na placa quente a ovariectomia diminuiu o tempo de reação e o estradiol diminuiu ainda mais a latência (Forman e cols, 1989). Em outro estudo, a depleção de testosterona, em machos gonadectomizados, resultou em um aumento na duração de flexão da pata na resposta induzida pela formalina 5%, ao passo que tratamento com estradiol icv aumentou a duração de lambedura e diminuiu a frequência de sacudida durante a dor fásica. Na segunda fase do teste, estradiol aumentou o tempo de lambedura somente nos machos intactos (Aloisi e Ceccarelli, 2000). Fêmeas tratadas com testosterona desde o nascimento de forma a torná-las androgenizadas mostram limiares de resposta à dor semelhante aos machos normais no teste de imersão da cauda (Molina e cols, 1994). Ratos fêmeas mostram alterações no limiar nociceptivo associados a flutuações hormonais, como no ciclo estral, gravidez e lactação, sendo que no estro, diestro I, parte do período de gestação e no período após o parto ocorre maior sensibilidade à dor no teste de retirada da cauda do que nos períodos de diestro II e proestro; na última fase de gestação (no dia do parto) ocorre um aumento abrupto do limiar nociceptivo (Martinez-Gómez e cols, 1994; Cruz e cols, 1994). Em ratos, fêmeas na última fase da gestação apresentam limiares nociceptivos mais altos do que fêmeas não gestantes, quando avaliadas pelo limiar de escape ao choque elétrico nas patas (Gintzler, 1980). Este fenômeno é modulado por um perfil gestacional de estradiol e progesterona (Dawson-Basoa e Gintzler, 1993) dependente dos níveis de opióides endógenos (Sander e cols, 1988).

4. Analgesia induzida por administração de opióides: modulação pelos hormônios gonadais:

A morfina é um analgésico mais potente em machos do que em fêmeas (Kepler e cols 1989 e 1991). Ratos machos falso-operados mostraram significativamente maior magnitude de analgesia do que as fêmeas falso-operadas no teste de retirada da cauda após administração icv de DAGO (opióide agonista de receptor μ), mas não de DSLT (opióide agonista de receptor δ). No entanto, no teste de limiar de escape não foram observadas diferenças de gênero para o DAGO e DSLT (Kepler e cols, 1991). Em outro estudo, tanto a analgesia provocada pelo nado forçado contínuo quanto pelo nado forçado intermitente foram significativamente menores nas fêmeas do que nos machos e, em ambos os sexos, a castração reduziu a magnitude das respostas para as duas formas de analgesia, mas somente nos machos (castrados ou não) o bloqueio dos receptores opióides com naloxona reduziu a analgesia seguinte ao nado intermitente (Bodnar e cols, 1988).

Em fêmeas, a sensibilidade ao efeito analgésico da morfina durante o proestro foi menor do que nas outras fases do ciclo estral (Vincler e cols, 2001). Da mesma forma, a analgesia com morfina no teste de retirada da cauda varia com o estado reprodutivo. Em períodos de baixa atividade secretória ovariana (diestro) a sensibilidade é maior que quando comparada ao proestro/estro. Porém, ratas ovariectomizadas e no período pós-parto apresentaram atenuada sensibilidade à morfina (revertida por tratamento com testosterona) quando comparadas a ratas ciclando normalmente ou falso-operadas no proestro (Banerjee e cols, 1983). A morfina (2,5, 5 e 10 mg/Kg, iv) produziu significativa resposta analgésica durante o diestro e pós-parto no teste de retirada da cauda, todavia no pós-parto a analgesia foi significativamente menor em todas as doses testadas do que no diestro (Janik e cols, 1992).

O limiar para dor medido através do limiar de escape ao choque elétrico aumentou gradualmente durante a gestação com aumento abrupto um a dois dias antes do parto (Gintzler, 1980). Este fenômeno, na fêmea, pode estar relacionado ao efeito dos esteróides gonadais no número de receptores opióides μ que variam durante as diferentes fases do ciclo estral, apresentando um significativo aumento no número destes receptores na manhã do pró-estro e na tarde do estro (Limonta e cols, 1989), à concentração de β -endorfina na gestação e parto (Wardlaw e Frantz, 1983) em áreas como o mesencéfalo, a amígdala e o hipotálamo. Estudos recentes (Gear e cols, 1996 e 1999) compararam a eficácia de dois agonistas do receptor opióide κ (nalbufina e butorfanol) em aliviar a dor pós-operatória em cirurgia de extração do terceiro molar ('dente do siso') em homens e mulheres. Este estudo mostra que mulheres são mais sensíveis e a analgesia induzida nelas por estes agentes é também mais prolongada. A conclusão permitida por estes estudos é que machos são mais sensíveis ao efeito analgésico de agonistas μ , e fêmeas são mais sensíveis aos efeitos dos agonistas κ .

Ratos machos falso-operados e castrados apresentaram magnitude e potência analgésica da morfina significativamente maior (injetada na substância cinzenta periaquedutal ventro lateral (SCPvl) nos testes de retirada da cauda e limiar de escape do que as fêmeas, sendo que as fêmeas no estro foram significativamente menos sensíveis para morfina do que as fêmeas ovariectomizadas (Krzanowska e Bodnar, 1999). Machos castrados tiveram significativa redução da analgesia nos testes de retirada da cauda e limiar de escape em relação aos machos intactos. Fêmeas androgenizadas tiveram aumento na analgesia provocada pela morfina na SCPvl, tornando-se semelhante aos machos intactos (Krzanowska e cols, 2002).

Em um recente estudo (Tershner e cols, 2000) mostram um circuito sexualmente dimórfico modulatório da dor. Em relação à ação dos receptores opióides μ e κ mostraram que microinjeção do agonista de receptor opióide kappa, U-69593, no bulbo ventro rostral reduziu

a analgesia no teste de retirada da cauda produzido pela ativação de receptores opióides μ localizados dentro da SCPvl, ao passo que nas fêmeas o U-69593 aumentou a analgesia no teste de retirada da cauda causado pelo DAGO na SCPvl, sugerindo nas fêmeas um efeito aditivo das drogas atuando nestes dois sítios. Liu e Gintzler (2000) mostraram que a responsividade analgésica opióide espinal associada aos esteróides ovarianos não ocorre somente nas fêmeas. Tratamento de ratos machos castrados com regime de estradiol e progesterona simulando a gestação, também induz analgesia em resposta ao choque elétrico nas patas, comparável com a observada nas fêmeas, proveniente do sinergismo entre sistemas de receptores κ/δ e $\alpha 2$ noradrenérgico, porém, nos machos, resulta de contribuições independentes de receptores opióides μ e κ que atuam de forma aditiva (Liu e Gintzler, 2000).

5. Testes Algesimétricos:

As diferenças sexuais encontradas no efeito analgésico dos opióides e na sensibilidade à dor também dependem do teste nociceptivo utilizado e da intensidade do estímulo nocivo. As características dos testes usados variam de acordo com o estímulo doloroso aplicado (térmico, elétrico ou químico) e da resposta medida (flexão, lambadura, salto ou retirada da cauda). Os estudos da dor e analgesia têm sido investigados principalmente usando testes de dor aguda como retirada da cauda (onde a dor é mediada a nível espinal) e placa aquecida e salto reflexo (mediados supraespinalmente).

A proposta deste trabalho foi comparar machos e fêmeas gonadectomizados e tratados com diferentes hormônios gonadais na sensibilidade à dor e analgesia por agonistas opióides μ e κ no modelo de teste de formalina. A primeira fase da resposta induzida pelo estímulo nocivo da formalina é considerada comparável à obtida em testes que medem dor aguda (nociceptiva)

como na retirada da cauda ('tail flick') enquanto que a segunda fase da resposta à formalina resulta de dor decorrente de uma ação inflamatória, e portanto de características diferentes.

O teste de formalina tem duas vantagens importantes sobre outros testes de dor:

1) É necessário pouca contenção do animal para aplicação do estímulo nocivo, permitindo observação completa da resposta comportamental.

2) A injeção de formalina permite a observação das fases aguda e tônica da dor. Durante a primeira fase da resposta à formalina – fase 1, registra-se a resposta aguda, um tipo de dor transiente, semelhante àquelas provocadas por exposições breves ao calor ou choque. A dor nociceptiva, fásica ou também denominada de aguda é causada por uma lesão ou injúria que ativa os nociceptores especializados em reconhecer a presença de estímulos de alta intensidade ou dano tecidual e ativam vias nervosas especializadas pelas quais o Sistema Nervoso Central recebe a informação. A resposta tônica é observada na segunda fase do teste de formalina. A dor inflamatória, persistente ou patológica, é causada por lesões com sinais de inflamação com ou sem infecção. Os sinais de inflamação provocam aumento da dor que podem aumentar a sensibilidade e a responsividade para pequenos estímulos nocivos ou que antes não causavam dor. Envolve a sensibilização dos terminais nociceptivos periféricos e facilitação da transmissão no corno dorsal e tálamo, mudanças definidas como neuroplasticidade. O componente periférico é devido a ação de mediadores atuando nos terminais nervosos. A liberação de K⁺, bradicinina, serotonina, histamina e prostaglandina liberados perto dos terminais nociceptivos após a lesão do tecido ou durante a inflamação produz sensibilização e os nociceptores tornam-se mais responsivos, respondendo vigorosamente ao estímulo nocivo porque seu limiar para ativação é menor, amplificando e sustentando a reação inflamatória e acompanhando a ativação de fibras aferentes nociceptivas. Portanto dois valores de índice de dor são registrados: o primeiro que corresponde à dor aguda ou nociceptiva, e o segundo que

corresponde à dor tônica de origem inflamatória e em ambas as fases a dor pode ser mediada espinalmente e supraespinalmente.

O teste de formalina é um conveniente método para produzir e quantificar a dor, pois a intensidade da dor é inferida de categorias comportamentais objetivas facilmente distinguíveis em cada animal do experimento.

Neste estudo foi calculado o índice de dor segundo Coderre e cols (1993), D1, e o índice de dor segundo Watson e cols (1997), D2, para observar se no delineamento experimental usado poderíamos encontrar diferenças significativas entre D1 e D2. Também verificar se a inclusão da categoria 1 na D1 causa uma variabilidade maior como detectaram Abbott e cols (1995) e se D2 representa maior sensibilidade e especificidade que o índice D1.

6. Justificativa:

O conhecimento detalhado das variações na sensibilidade à dor e ao efeito analgésico dos opióides entre os sexos, assim como a interação entre os níveis de hormônios gonadais e os sistemas opióides endógenos, são de importância extrema na procura de melhores tratamentos analgésicos e o aperfeiçoamento daqueles já existentes tanto em seres humanos quanto em animais.

7. Objetivo Geral:

Usando o rato como animal de experimentação, a proposta deste trabalho foi determinar as diferenças sexuais e a influência dos hormônios gonadais à dor e ao efeito antinociceptivo da microinjeção intracerebroventricular dos agonistas opióides (μ e κ).

8. Objetivos Específicos:

1. Determinar a diferença na sensibilidade à dor no teste algesimétrico da formalina (em três doses diferentes) entre machos e fêmeas de ratos gonadectomizados e tratados a longo prazo com diferentes hormônios gonadais (estradiol e progesterona em fêmeas e testosterona em machos).

2. Verificar o efeito de microinjeção icv de agonistas opióides (μ , DAGO e κ , (-) U50488) em machos e fêmeas de ratos gonadectomizados e tratados a longo prazo com diferentes hormônios gonadais (estradiol e progesterona em fêmeas e testosterona em machos) para determinar a diferente sensibilidade ao efeito analgésico destes peptídeos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais:

Foram utilizados ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, tipo Wistar, de ambos os sexos; as fêmeas com peso de 180 a 220 g e os machos 220 a 260 g. Os animais foram mantidos em grupos de quatro por caixa (40 x 30 x 15 cm), no biotério setorial do departamento de Ciências Fisiológicas, com água e ração *ad libitum*. A iluminação foi mantida artificialmente através de lâmpadas fluorescentes com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, o período de escuro iniciando-se às 19 horas.

Cada animal foi submetido uma única vez ao teste de formalina, para minimizar o sofrimento do mesmo, de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pelo COBEA (1991).

Após o teste de formalina, os animais foram imediatamente, ou até um período máximo de 48 horas, sacrificados com superdose de tiopental. Os animais não sacrificados logo após o teste, receberam ácido acetil salicílico (Melhoral infantil, Sanofi Winthrop Farmacêutica Ltda.) por via oral na dose de 2 mg/0,3 ml de água destilada, por animal.

Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina CEUA, nº de protocolo 23080-001091/2001-42.

2. Protocolos Experimentais:

2.1. Experimento I:

Efeito dos Hormônios Gonadais na Sensibilidade a Diferentes Concentrações de Formalina:

2.1.a. Fêmeas:

Foram utilizadas 96 fêmeas castradas e tratadas com hormônios gonadais, divididas em três grupos de 32 animais. Cada grupo foi submetido ao teste algesimétrico de formalina na concentração de 1%, 2% ou 5%. Cada grupo foi subdividido aleatoriamente em 4 subgrupos de 8 ratas e cada subgrupo recebeu um tratamento hormonal, conforme segue:

1) Grupo O: 0,1 ml, de óleo vegetal, sc, como controle.

2) Grupo E: 1 µg de hexahidrobenzoato de estradiol (Benzoginoestril AP, SARSA), dissolvido em 0,1 ml de óleo vegetal, sc.

3) Grupo P: 1 mg de progesterona (SIGMA) dissolvida em 0,1 ml de propilenoglicol, sc.

4) Grupo P + E: 1 mg/0,1 ml de progesterona + 1 µg/0,1 ml de estradiol, sc.

Todas as injeções foram aplicadas em intervalos de 48 h, sempre às 16:00 h começando um dia após a cirurgia e terminando 14 dias depois (7 doses) na véspera do teste de formalina.

2.1.b. Machos:

Foram utilizados 48 machos castrados e tratados com hormônios gonadais, divididos em três grupos de 16 animais. Cada grupo foi submetido ao teste algesimétrico de formalina em concentração de 1%, 2% ou 5%. Cada grupo foi subdividido aleatoriamente em 2 subgrupos de 8 ratos e cada subgrupo recebeu um tratamento hormonal, conforme segue:

1) Grupo O: 0,1 ml de óleo vegetal, sc, como controle.

2) Grupo T: 250 µg de testosterona (Durateston, Organon) diluído em 0,1 ml de óleo vegetal, sc.

As injeções foram aplicadas conforme descrito no item 2.1.a.

2.2. Experimento II:

Efeito dos Hormônios Gonadais na Analgesia Opióide:

2.2.a. Fêmeas:

Foram utilizadas 96 fêmeas castradas e submetidas à cirurgia estereotáxica (item 3.3.), divididas aleatoriamente em três grupos de 32 animais. Cada grupo foi subdividido em 4 grupos de 8 animais e cada subgrupo recebeu o tratamento hormonal conforme item 2.1.a. Cada subgrupo recebeu microinjeção intracerebroventricular de um agonista opióide (μ =DAGO ou κ (-)U 50488) ou salina (controle) e foi submetido ao teste de formalina 5%.

O teste de formalina foi realizado usando concentração de 5% porque quando esta concentração foi usada no experimento I a maioria dos animais não apresentou diferença significativa na sensibilidade à dor nos diferentes tratamentos hormonais.

2.2.b. Machos:

Foram utilizadas 48 machos castrados e submetidos à cirurgia estereotáxica (item 3.3.), divididos aleatoriamente em três grupos de 16 animais. Cada grupo foi subdividido em 2 grupos de 8 animais e cada subgrupo recebeu o tratamento hormonal conforme item 2.1.b. Cada subgrupo recebeu microinjeção intracerebroventricular de um agonista opióide (μ =DAGO ou κ (-)U 50488 ou salina (controle) e submetido ao teste de formalina 5%.

3. Cirurgias:

3.1. Ovariectomia:

Ovariectomias foram realizadas sob anestesia com Tiopental sódico 50 mg/kg, ip (Thionembusal, Laboratório Abbott), sob adequadas condições de assepsia. As castrações foram realizadas através de abordagem abdominal dorso-lateral após ligadura dos vasos, isolamento e remoção dos ovários e gordura ovariana. A sutura interna das camadas musculares foi contínua com fio de algodão e a sutura externa da pele com pontos isolados e fio de algodão. Após este procedimento, na incisão, foi aplicado solução de iodo povidona (Povidine, Johnson) para evitar infecção no local.

3.2. Orquiectomia:

Orquiectomias foram realizadas sob anestesia com Tiopental sódico 50 mg/kg, ip (Thionembusal, Laboratório Abbott), sob adequadas condições de assepsia. As castrações foram realizadas através de incisão de 2 cm na região central escrotal, após ligadura dos vasos e remoção dos testículos e gordura testicular. A sutura externa foi realizada com pontos isolados e fio de algodão, e aplicado iodo povidona para evitar infecção no local.

3.3. Cirurgia Estereotáxica:

O procedimento para a implantação de cânulas-guia foi realizado sob anestesia com Tiopental Sódico 35 mg/kg, ip (Thionembusal, Laboratório Abbott) e Cloridrato de Xilazina 10 mg/kg, im (Virbaxil, Laboratório Virbac), sob adequadas condições de assepsia.

Para a implantação das cânulas-guia, os ratos foram anestesiados e colocados em um aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos, Brasil) com a cabeça fixada por intermédio de

barras posicionadas nos condutos auditivos e incisivos superiores. Na região de acesso cirúrgico ao crânio, uma incisão longitudinal foi realizada, removendo a pele, de forma a expor a calota craniana. A porção exposta foi raspada. Em seguida, foi marcada a posição para a perfuração e implantação da cânula-guia seguindo as coordenadas descritas no atlas estereotáxico de Kruger e cols. (1995) de 0,4 mm posterior ao bregma; 1,5 mm à direita do bregma e 4,5 mm ventral à superfície óssea. Nesta posição foi feito um orifício de 1 mm de diâmetro no crânio, com auxílio de uma broca esférica de uso odontológico (Insight Equipamentos, Brasil). Para assegurar a estabilidade do implante, parafusos de níquel-prata (tamanho 1,4 mm, nº 218) foram fixados à calota craniana, próximo à cânula-guia, sendo este conjunto envolvido por acrílico autopolimerizável (Policron), formando uma estrutura sólida capaz de resistir aos eventuais choques na gaiola.

Cânulas-guia foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (G23 Becton Dickinson), com 0,6 mm de diâmetro externo (DE) e 12 mm de comprimento.

4. Microinjeção intracerebroventricular:

As injeções intracerebroventriculares (icv) foram realizadas por meio de uma agulha injetora (G30 Becton Dickinson) com 13 mm de comprimento, introduzida na cânula-guia e conectada a um tubo de polietileno (Portex; 0,28 mm DI e 0,61 mm DE) e este a uma microseringa Hamilton de 10 µl. O volume injetado foi de 5 µl administrados em um período de 60 s. O teste de formalina foi iniciado 5 min após a injeção icv.

Foram administradas por via icv, as seguintes drogas, diluídas no dia do teste:

1) DAGO: (acetato, SIGMA; agonista de receptor opióide μ) 2 µg/5 µl diluído em salina.

2) (-)-U-50488: (cloreto, TOCRIS; agonista de receptor opióide κ) 50 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ diluído em salina.

3) Salina: 5 μl de 0,9% NaCl, como controle.

5. Teste de Formalina:

O animal foi levado para o laboratório 24 h antes do teste para ambientação. No dia do teste o animal foi transferido a uma caixa de vidro de 30x25x40 cm por um período mínimo de 15 minutos. Em seguida, o animal foi contido e injetado na pata posterior direita com 0,05 ml (sc) de solução de 1%, 2% ou 5% de formalina em salina (0,9%) e imediatamente devolvido à caixa de vidro para a observação e registro de suas reações à injeção do agente nocivo. Durante um período inicial de 10 minutos, registrou-se a resposta aguda (primeira fase da resposta à formalina - fase 1). A resposta tônica (segunda fase do teste de formalina - fase 2) foi medida a partir do tempo 20 minutos após a injeção, que é quando esta resposta começa a surgir, e por um período de 30 minutos de observação. Portanto dois valores de índice de dor foram registrados: o primeiro que corresponde à dor aguda, nociceptiva, e o segundo que corresponde à dor tônica de origem inflamatória. O índice de dor para cada fase do teste foi calculado através de uma média ponderada considerando-se o tempo gasto em cada um dos comportamentos induzidos pelo agente nocivo e o tempo total de cada fase do teste. Os comportamentos observados e registrados foram:

0 (zero): o animal usa a pata injetada normalmente,

1 (um): o animal apóia a ponta dos dígitos no chão da caixa, favorecendo a pata injetada.

2 (dois): o animal claramente eleva a pata e a mantém junto do corpo, sem apoiá-la, e

3 (três): o animal lambe, morde e agita a pata injetada

O teste de formalina foi desenvolvido e apresentado por Dubuisson e Dennis (1977) como um detalhado método para a avaliação de respostas comportamentais à dor o qual permite a quantificação da intensidade de dor nos animais, através da atribuição de pesos aos comportamentos registrados. Coderre e cols, em 1993 avaliaram os pesos descritos por Dubuisson e Dennis (1977), validando este método como adequado para medir a intensidade da dor. O índice de dor, neste caso é obtido através da média ponderada do tempo gasto nas categorias comportamentais 1, 2 e 3, as quais respectivamente são atribuídos pesos 1, 2 e 3, sendo que o comportamento 1 representa um grau de dor menor que o comportamento 2 e este, por sua vez, sendo de menor intensidade que o comportamento 3.

Em 1997, Watson e cols. revisaram os pesos das categorias comportamentais preservando a relação ordinal de categorias e pesos, propondo uma nova quantificação ótima (resultado de dor composta) medindo somente categorias de dor bem definidas que são as categorias 2 e 3, atribuindo-se pesos 1 e 2 respectivamente, somados e divididos pelo tempo total da fase do teste.

Neste projeto foi calculado o índice de dor segundo Coderre e cols (1993), D1, e também o índice de dor segundo Watson e cols (1997), D2.

6. Análise Histológica:

Após os testes, os animais foram sacrificados com superdose de tiopental, e realizada dissecação por abordagem abdominal para analisar o útero nas fêmeas e próstata nos machos como parâmetro da eficácia do tratamento hormonal. Os animais usados no experimento II, tiveram os cérebros removidos e colocados em formol/salina 1:4, durante 48 h para fixação. Após este período foram realizados cortes coronais para verificar a correta localização da cânula no ventrículo lateral.

7. Análise Estatística:

O Teste Paramétrico MANOVA, não pode ser usado porque os dados obtidos não satisfizeram os quesitos de homocedasticidade (Ho: variâncias iguais) e normalidade (Ho: distribuição normal).

A análise estatística foi realizada usando o teste não Paramétrico da Mediana, que utiliza como medida de tendência central a mediana, calculada dispondo os valores de D1 ou D2 (machos e fêmeas) em ordem ordinal sem considerar a origem do resultado. A mediana é o valor em que 50% dos resultados estão acima e 50% abaixo deste. Este teste permite analisar com que frequência os resultados obtidos acima e abaixo da mediana diferem da mediana esperada, para aceitar ou rejeitar a hipótese nula de acordo com o nível de significância previamente escolhido de 5%.

O teste de Kruskal-Wallis (KW) foi usado para analisar os postos dos dados significativos ou com tendência à significância no Teste da Mediana. O teste não-paramétrico de KW analisa a soma de postos. Cada resultado obtido é ordenado e atribuído a ele um posto, isto é, para cada índice de dor (machos e fêmeas) sem considerar a amostra dos resultados, é dado um posto, ao menor valor por exemplo atribui-se o posto 1, ao seguinte o posto 2, e assim sucessivamente. Feito isto, determina-se a soma dos postos de cada amostra e de acordo com os valores p, define-se se a hipótese nula é rejeitada ou aceita.

Para comparar os pares de resultados obtidos entre os tratamentos hormonais, as concentrações de formalina e os analgésicos opióides, utilizou-se o teste de Mann-Whitney com a Correção de Bonferroni para o nível de significância. Para as comparações entre os tratamentos hormonais esse nível foi de $p < 0,00333$ e para comparar as concentrações de formalina e analgesia o nível foi de $p < 0,016667$.

O índice de dor D1 foi analisado separadamente do índice de dor D2.

Os resultados do Experimento I foram analisados de forma separada aos do Experimento II.

RESULTADOS

Experimento I:

Efeito dos Hormônios Gonadais na Sensibilidade a Diferentes Concentrações de Formalina:

Os tratamentos realizados com progesterona (P), estradiol (E), progesterona + estradiol (P+E), óleo nas fêmeas O (F), testosterona (T) e óleo nos machos O (M) (Fig. 1, 2 e 5A), não alteraram o D1 ($\chi^2=3,9800$, $p=0,55$). O teste de Kruskal-Wallis (KW) confirmou a ausência de efeito dos tratamentos hormonais na sensibilidade à formalina ($H(5)=9,9450$, $p>0,768$, fêmeas $H(3)=4,9372$, $p>0,1765$ e machos $H(1)=2,983$, $p>0,0870$). Por outro lado, o índice de dor D1 foi sensível às concentrações de formalina ($\chi^2=31,7637$, $p<0,00001$), (Fig. 7A), sendo que somente as fêmeas foram sensíveis e a dor aumentou conforme a intensidade do estímulo nocivo (KW, $H(2)=41,2970$, $p<0,00001$). O teste de Mann-Whitney (MW) detectou diferença entre 1% e 2% ($Z=-2,8547$, $p<0,004312$), 1% e 5% ($Z=-5,89$, $p<0,00001$) e entre 2% e 5% ($Z=-3,3574$, $p<0,00078$).

Também não houve diferença na mediana do índice de dor D2 (Fig. 5B) pelos tratamentos nas fêmeas e nos machos, porém ocorreu tendência no sentido de as fêmeas serem mais sensíveis do que os machos (Fig. 6B) ($\chi^2=10,446$, $p>0,0636$), confirmada pelo teste de KW $H(5)=17,375$, $p<0,0038$). A diferença ocorreu entre o grupo de fêmeas tratadas com P+E e os machos tratados com óleo (MW $Z=4,1487$, $p<0,0000335$) (Fig. 5B), nas concentrações de 2% e 5% (Fig. 3 e 4). Os tratamentos hormonais não alteraram o D2 entre o grupo das fêmeas (KW $H(3)=5,57$, $P>0,1345$) e tampouco entre o grupo dos machos (KW $H(1)=2,2$, $p>0,1377$). Nas fêmeas, apesar dos tratamentos não causarem diferença no índice de dor D2, elas mostraram tendência do grupo P+E ser mais sensível que o grupo óleo correspondente nas

concentrações mais baixas de 1% e 2%, principalmente na primeira fase (Fig. 3A), e a dor induziu uma resposta dependente da intensidade do estímulo nocivo (Fig. 7) (KW $H(2)=38,2369$, $p<0,00001$); as diferenças foram significativas entre as concentrações 1% e 2% (MW $Z=-2,4252$, $p<0,01153$), 1% e 5% (MW $Z=-4,8204$, $p<0,000001$) e 2% e 5% (MW $Z=-2,7602$, $p<0,00577$).

O sexo, independente dos tratamentos hormonais, não alterou a mediana do D1 (Fig. 6A, $\chi^2=1,5631$, $p>0,2112$ e KW $H(1)=1,5745$, $p>0,2096$). No entanto, quando a mediana do D2 (Fig. 6B) foi analisada esta mostrou diferença entre os sexos, sendo que as fêmeas manifestaram mais dor ($\chi^2=6,6748$, $p<0,0098$), confirmado pelo teste de KW ($H(1)=8,9643$, $p<0,0028$).

As fases foram diferentes entre os grupos. Na fase 2 (Fig. 8A), o índice de dor D1 foi maior que o da primeira fase tanto nas fêmeas como nos machos ($\chi^2=66,1537$, $p<0,00001$; KW $H(1)=71,3161$, $p<0,00001$; fêmeas KW $H(1)=58,1027$, $p<0,00001$, machos KW $H(1)=12,7120$, $p<0,00004$). Na segunda fase, na concentração de 2%, no grupo P+E o D1 foi significativamente maior que o grupo O(M) (Fig. 1B e 2B) (MW $Z=3,1330$, $p<0,001730$). Da mesma forma (Fig. 8B), na segunda fase do teste de formalina o D2 foi maior que na primeira fase ($\chi^2=18,0034$, $p<0,00001$), confirmada pelo KW ($H(1)=19,9007$, $p<0,00001$). A diferença no D2 entre as fases ocorreu somente nas fêmeas, como mostra a soma dos postos na tabela 2 (KW $H(1)=35,009$, $p<0,00001$). As tabelas 1 e 2 mostram os resultados analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e resumem os achados experimentais.

Nos machos, as diferentes concentrações de formalina não alteraram o D1 (KW $H(2)=3,7025$, $p>0,1571$) (Fig. 2A e 2B) e não alteraram o D2 (KW $H(2)=3,8853$, $p>0,1433$) (Fig. 4A e 4B), porém, na concentração de 1%, um estímulo de baixa intensidade, os machos manifestaram maior sensibilidade do que as fêmeas. Medido pelo D1 e D2, o tratamento com T

tendeu a sensibilizar os animais para estímulos de alta intensidade como na formalina 5% (Fig. 2 e 4).

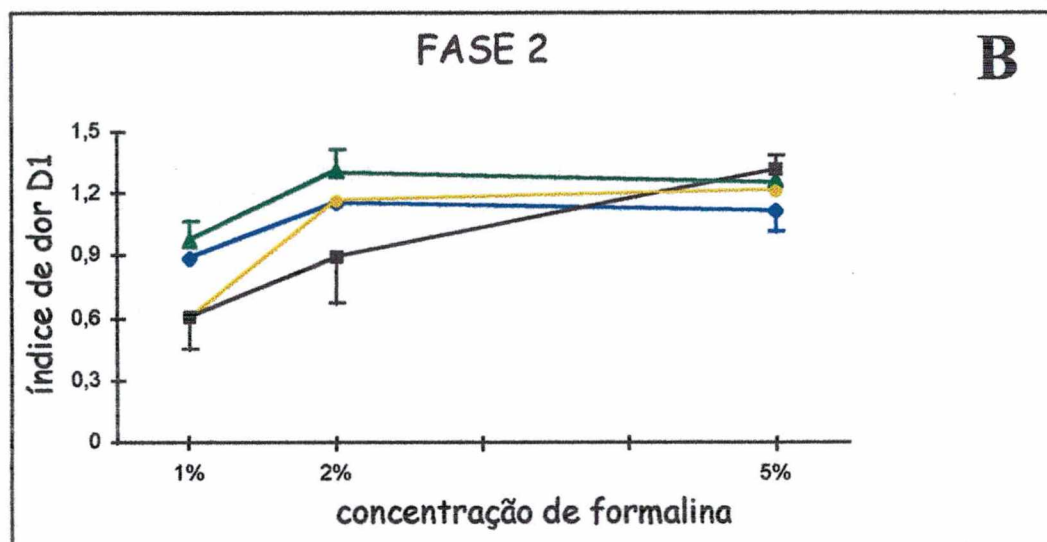
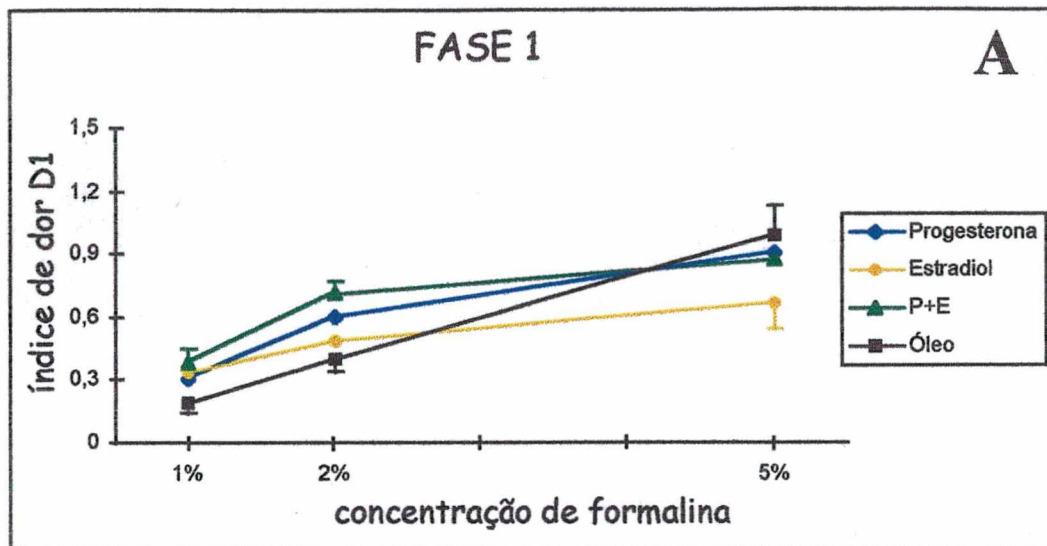


Figura 1

Efeito dos hormônios gonadais na sensibilidade a diferentes concentrações de formalina em fêmeas ovariectomizadas. (A) Primeira fase da resposta à formalina. (B) Segunda fase da resposta à formalina. Cada ponto das curvas dose-resposta representa a média \pm erro padrão do índice de dor D1, $n=8$ para cada média.

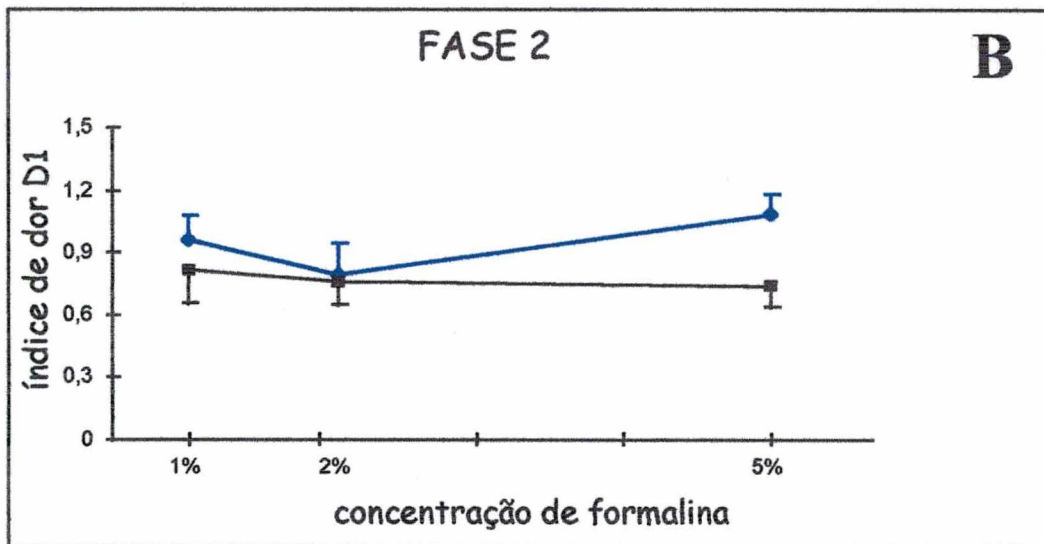
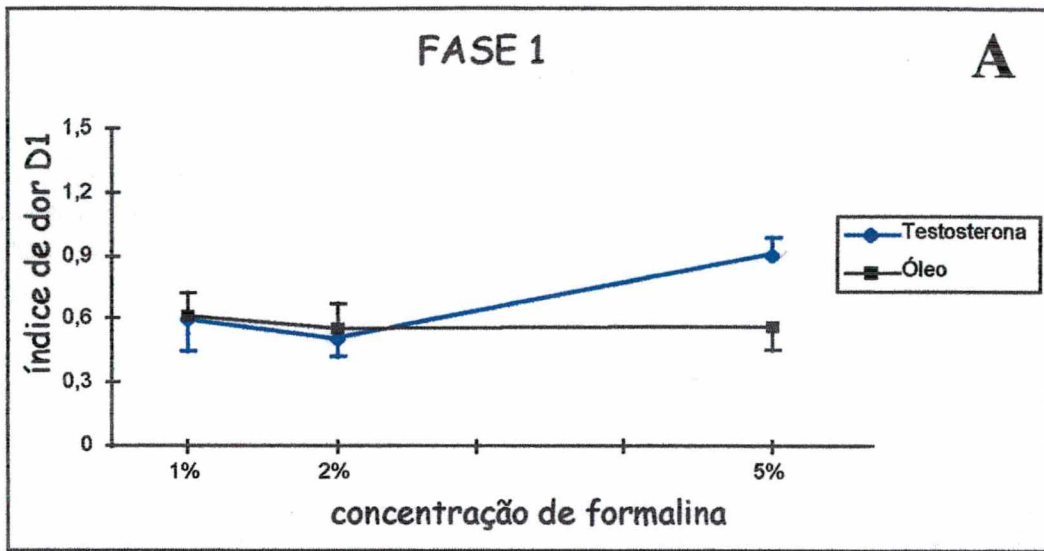


Figura 2

Efeito dos hormônios gonadais na sensibilidade a diferentes concentrações de formalina em machos orquiectomizados. (A) Primeira fase da resposta à formalina. (B) Segunda fase da resposta à formalina. Cada ponto das curvas dose-resposta representa a média \pm erro padrão do índice de dor D1, $n=8$ para cada média.

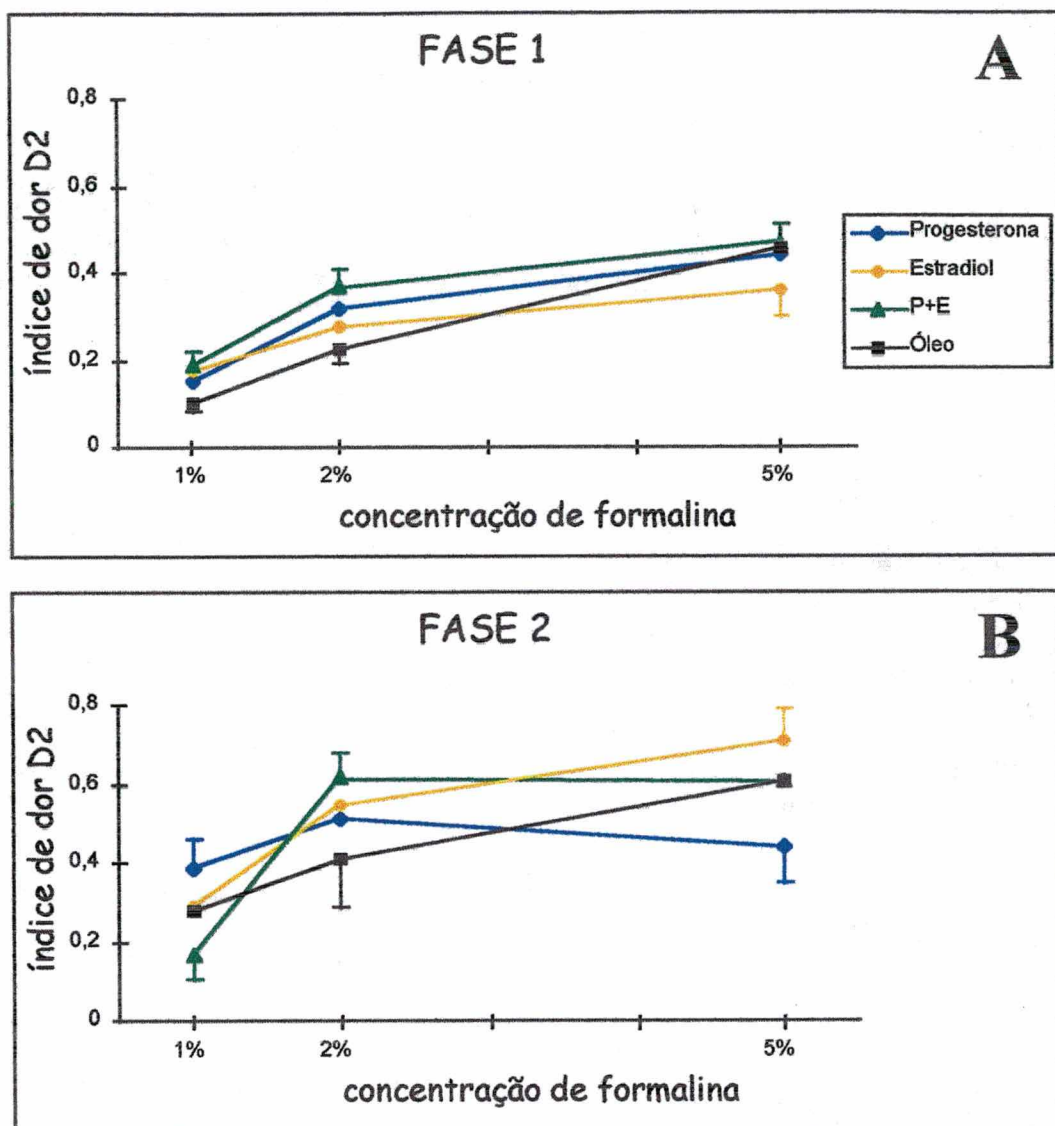


Figura 3

Efeito dos hormônios gonadais na sensibilidade a diferentes concentrações de formalina em fêmeas ovariectomizadas. (A) Primeira fase da resposta à formalina. (B) Segunda fase da resposta à formalina. Cada ponto das curvas dose-resposta representa a média \pm erro padrão do índice de dor D2, $n=8$ para cada média.

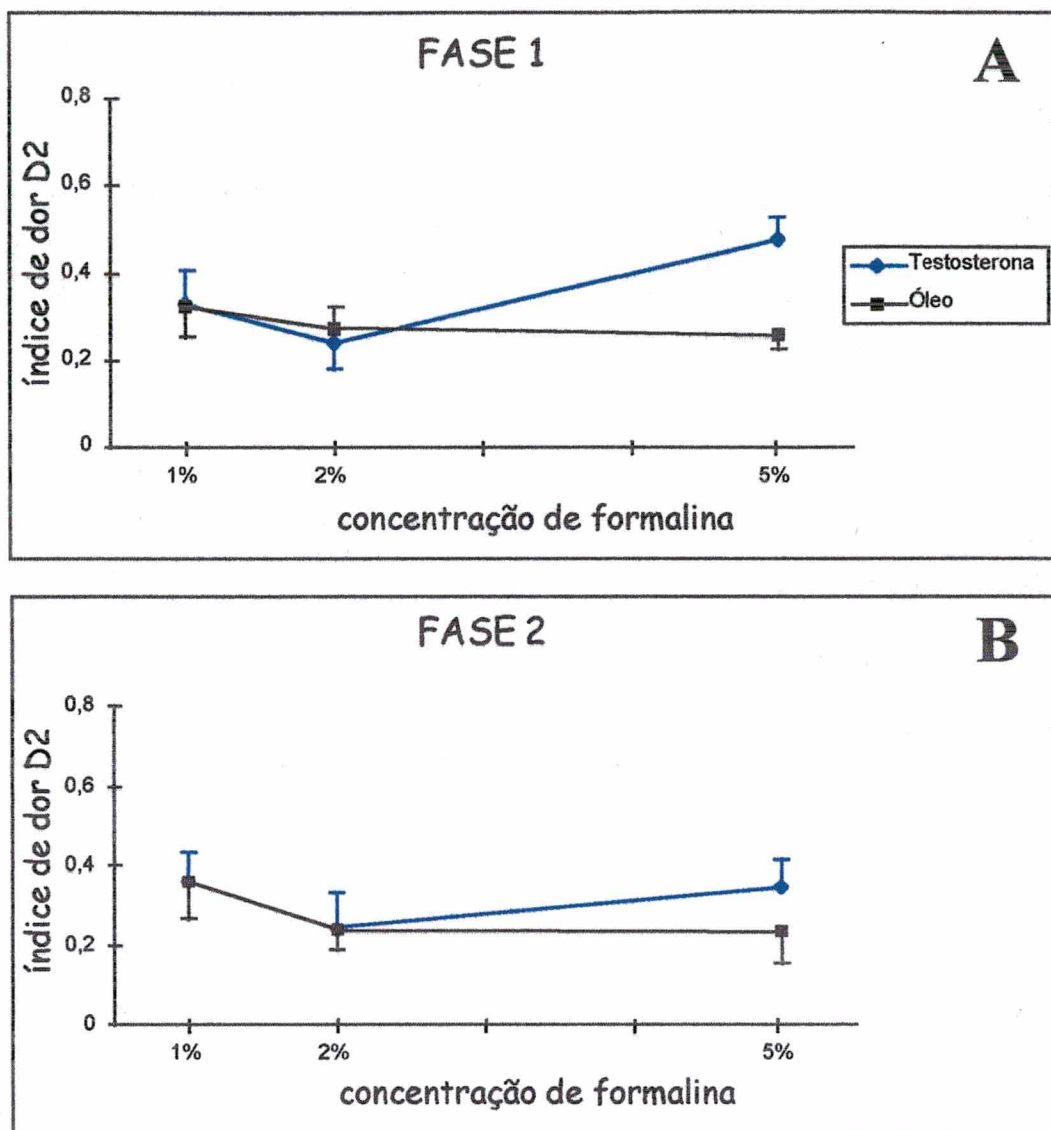


Figura 4

Efeito dos hormônios gonadais na sensibilidade a diferentes concentrações de formalina em machos orquiectomizados. (A) Primeira fase da resposta à formalina. (B) Segunda fase da resposta à formalina. Cada ponto das curvas dose-resposta representa a média \pm erro padrão do índice de dor D2, $n=8$ para cada média.

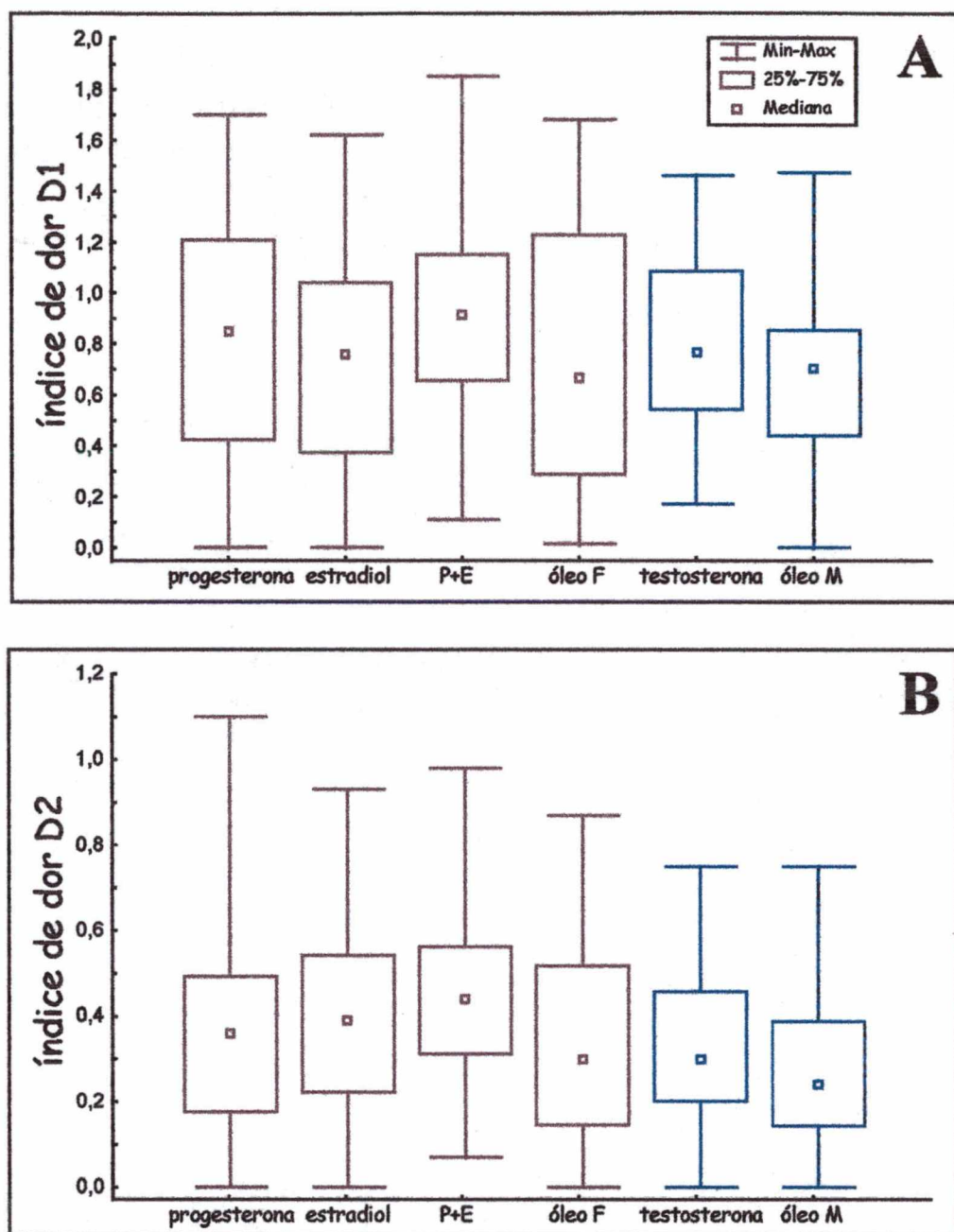


Figura 5

Efeito dos hormônios gonadais na sensibilidade ao teste de formalina em fêmeas (F) e machos (M) gonadectomizados e tratados com terapia hormonal substitutiva. (A) Índice de Dor D1. (B) Índice de dor D2. Cada ponto representa a mediana +/- valores mínimo e máximo, n=24 por grupo.

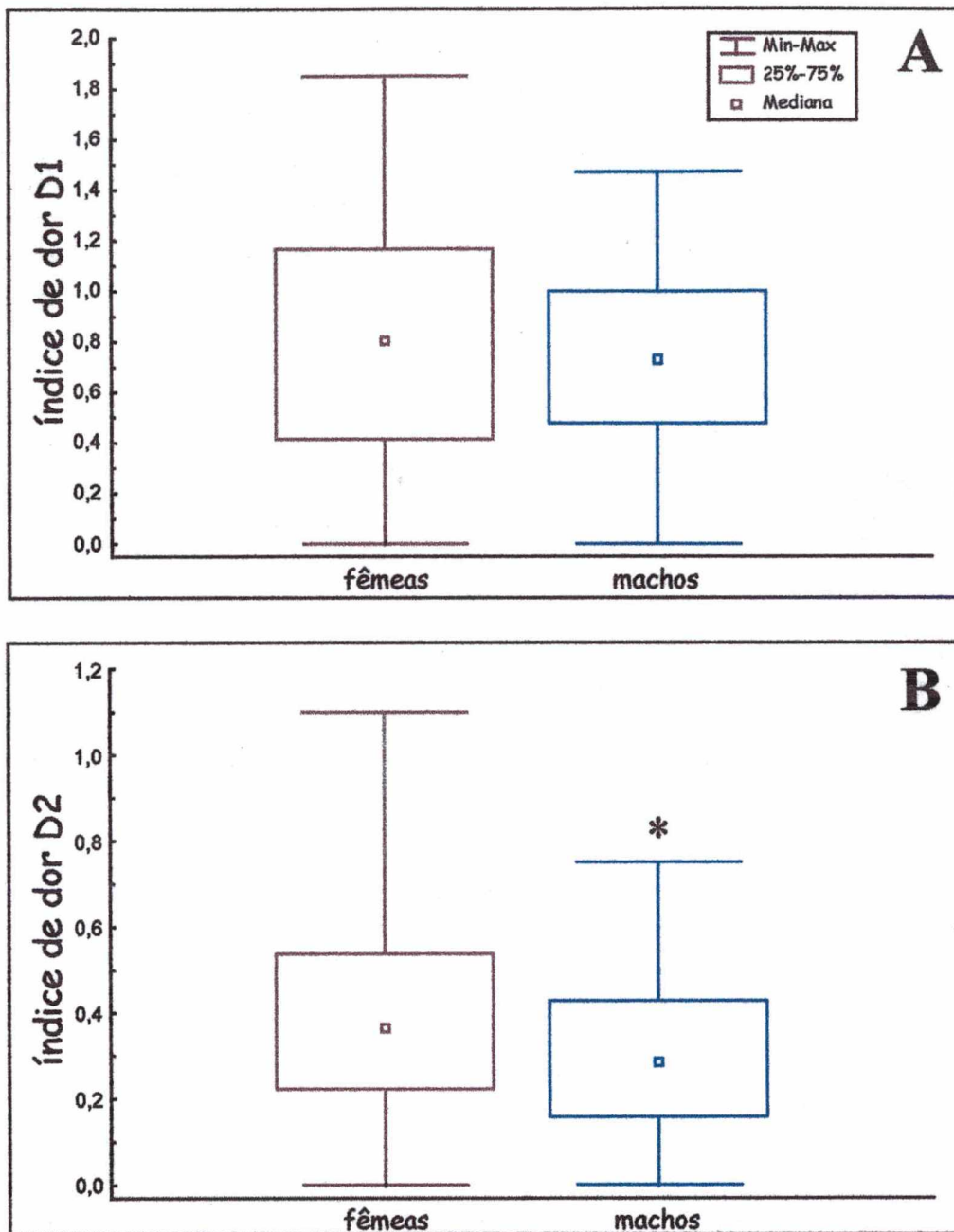


Figura 6

Efeito do sexo na sensibilidade ao teste de formalina em fêmeas (n=96) e machos (n=48) gonadectomizados e tratados com terapia hormonal substitutiva. (A) Índice de Dor D1. (B) Índice de dor D2. Cada ponto representa a mediana +/- valores mínimo e máximo. * $p < 0,05$.

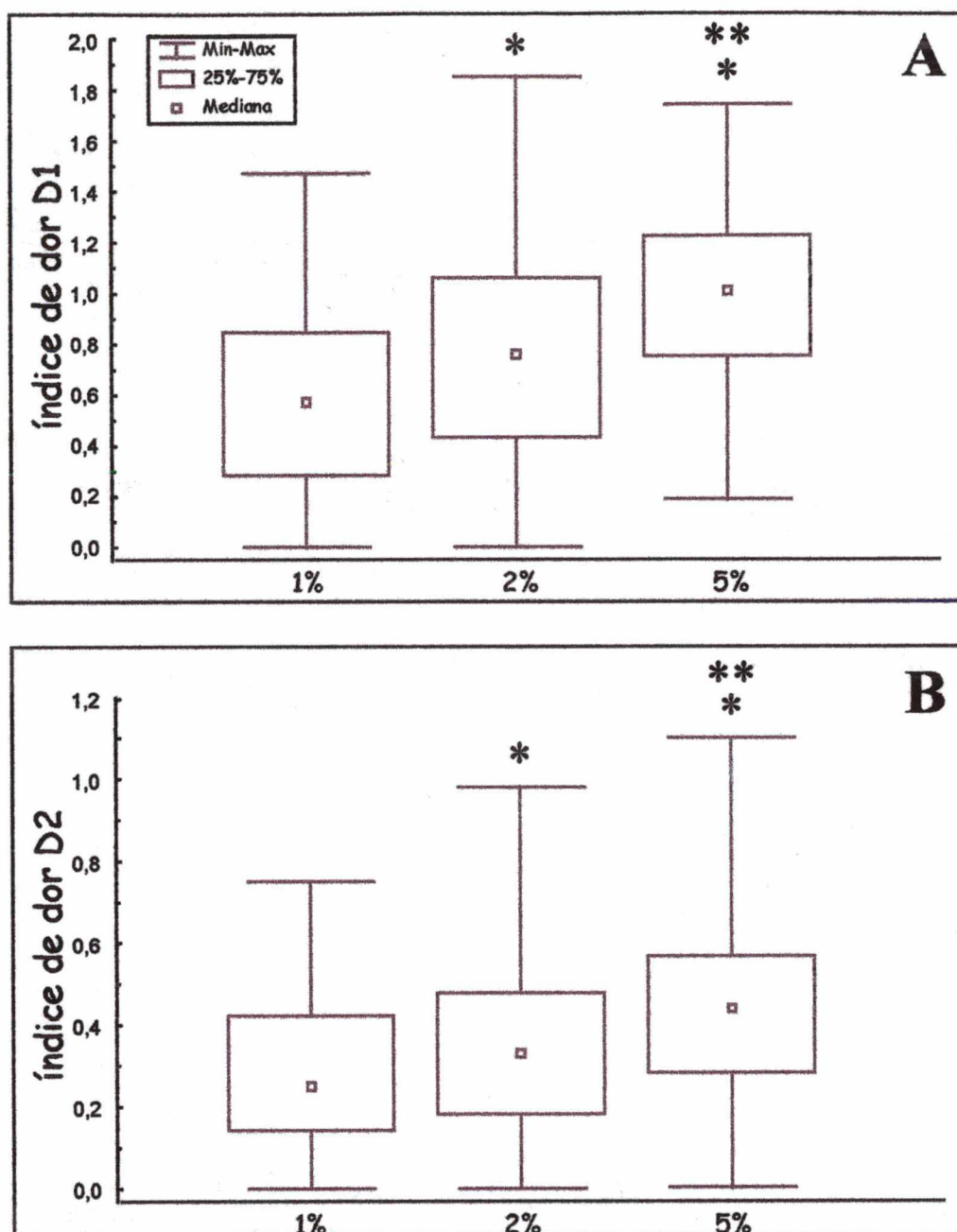


Figura 7

Efeito da concentração de formalina no índice de dor em ratos gonadectomizados e tratados com terapia hormonal substitutiva. (A) Índice de Dor D1. (B) Índice de dor D2. Cada ponto representa a mediana +/- valores mínimo e máximo (n=48 para cada concentração). *p<0,05 comparado a 1%, ** p<0,05 comparado a 2%.

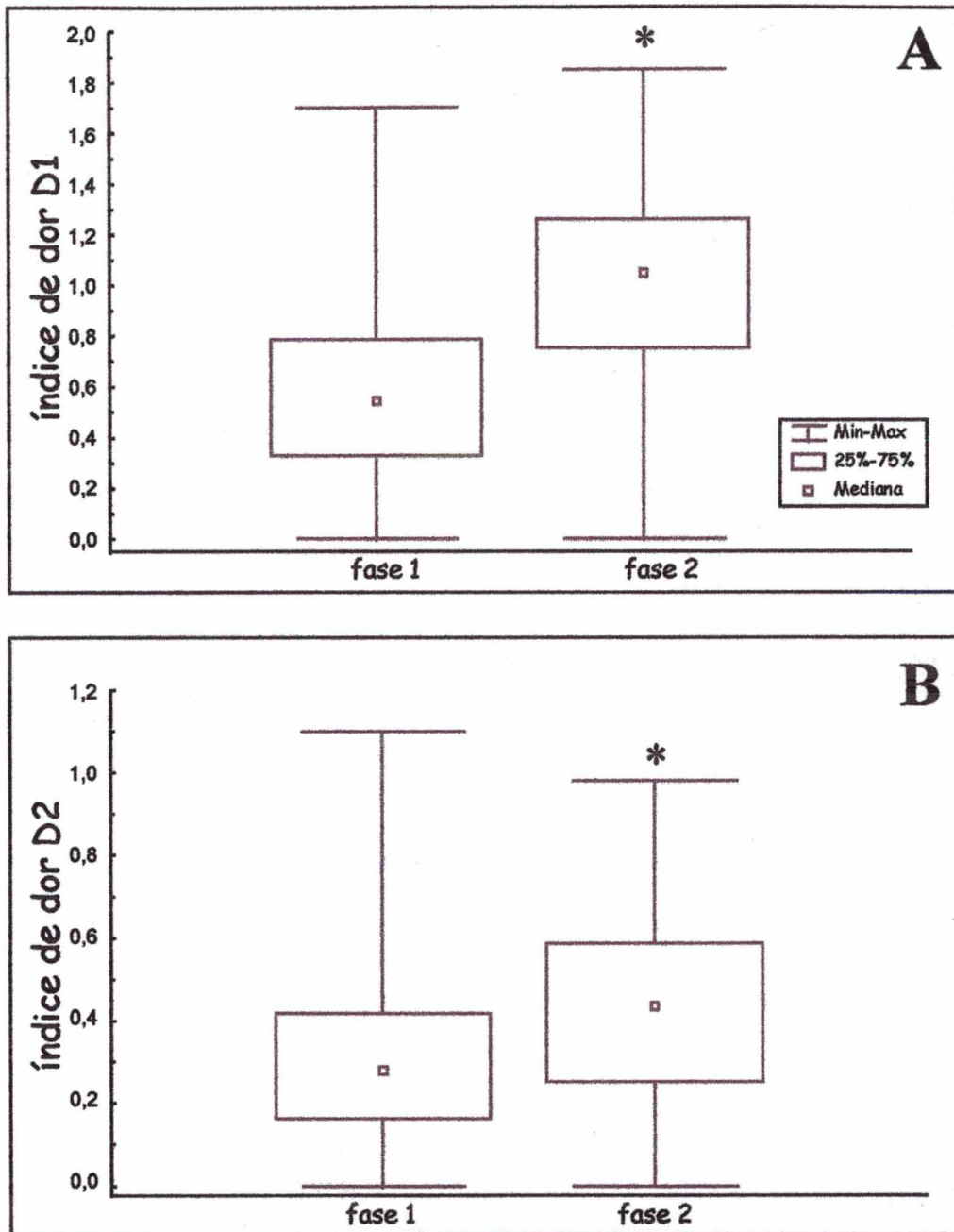


Figura 8

Respostas à formalina durante a primeira fase (pico 1) e a segunda fase (pico 2) em ratos gonadectomizados. (A) Índice de Dor D1. (B) Índice de dor D2. Cada ponto representa a mediana +/- valores mínimo e máximo (n=144 para cada pico). * $p < 0,05$.

TABELA 1: Soma dos postos dos resultados pelo Teste de Kruskal-Wallis do índice de dor D1 no experimento I em relação ao sexo, tratamento hormonal, concentração de formalina e as fases.

VARIÁVEIS	FÊMEAS E MACHOS	FÊMEAS	MACHOS
SEXO		28580 (1)	13036
TRATAMENTO HORMONAL			
P	6562,5	4261	-
E	7343,5	4747	-
P+E	8209,5 (2)	5283,5	-
O(F)	6464,5	4261	-
T	7155	-	2561,5
O(M)	5881	-	2094,5
CONCENTRAÇÃO DE FORMALINA			
5%	17432 (3)	8054 (4)	1770,5 (5)
2%	13678,5	6435	1342
1%	10105,5	4039	1543,5
FASES			
1	14840,5	6329,5	1841,5
2	267775,5 (6)	12180,5	2814,5

Os dados da tabela 1 mostram que ocorreram diferenças entre os seguintes resultados:

1. As fêmeas tenderam a sentir mais dor do que os machos.
2. Na classificação geral dos resultados, as fêmeas tratadas com P+E mostraram uma tendência a apresentar mais dor do que os machos tratados com óleo.
3. As diferentes concentrações de formalina alteraram significativamente o índice de dor, sendo que, de modo geral 5%>2%>1%.
4. As fêmeas foram sensíveis à intensidade do estímulo nocivo, e apresentaram diferenças significativas com 5%>2%>1%.
5. Os machos tenderam a ser sensíveis ao estímulo nocivo de maior intensidade (5%).
6. Na segunda fase, machos e fêmeas tiveram significativamente mais dor que na primeira fase.

TABELA 2: Soma dos postos dos resultados pelo Teste de Kruskal-Wallis do índice de dor D2 no experimento I em relação ao sexo, tratamento hormonal, concentração de formalina e fases.

VARIÁVEIS	FÊMEAS E MACHOS	FÊMEAS	MACHOS
SEXO		29738,5 (1)	11877,5
TRATAMENTO HORMONAL			
P	6642,5	4610,5	-
E	7371	4410	-
P+E	8612,5 (2)	5364,5	-
O(F)	7112,5	4143	-
T	6520,5	-	2530,5
O(M)	5357	-	2125,5
CONCENTRAÇÃO DE FORMALINA			
5%	16790 (3)	7924,5 (4)	1640,5
2%	13743	6520	1302
1%	11083	4083,5	1713,5 (5)
FASES			
1	17656 (6)	6983,5	2440
2	23960	11544,5 (7)	2216

Os dados da tabela 2 mostram que ocorreram diferenças entre os seguintes resultados:

1. As fêmeas manifestaram significativamente mais sensibilidade do que os machos.
2. Na classificação geral dos resultados, as fêmeas tratadas com P+E mostraram tendência a mostrarem mais dor do que as fêmeas e os machos tratados com óleo.
3. As diferentes concentrações de formalina alteraram o índice de dor, sendo que, de modo geral D2 foi 5%>2%>1%.
4. As fêmeas foram sensíveis à intensidade do estímulo nocivo, e apresentaram diferenças significativas sendo que 5%>2%>1%.
5. Os machos foram mais sensíveis ao estímulo de baixa intensidade (1%>2%).
6. Na primeira fase, os animais manifestaram dor menor que na segunda fase.
7. As fêmeas mostraram significativamente mais dor na segunda fase do que na primeira fase.

Experimento II:

Efeito dos Hormônios Gonadais na Analgesia Opióide.

Os tratamentos hormonais realizados com progesterona (P), estradiol (E), progesterona + estradiol (P+E), óleo nas fêmeas O(F), testosterona (T) e óleo nos machos O(M) tiveram efeito significativo no D1 entre as fêmeas e os machos (Fig. 11A), ($\chi^2=32,5000$, $p<0,00001$; KW H(5)=47,8843, $p<0,00001$), sobre a analgesia produzida pelos opióides DAGO e U-50488 e o controle salina. Porém, entre os grupos das fêmeas não houve alteração no D1 (KW, H(3)=2,7931, $p>0,4246$) e tampouco entre o grupo dos machos (KW, H(1)=2,3503, $p>0,1253$). As diferenças ocorreram entre os grupos que receberam os seguintes tratamentos: P+E e T (MW Z=4,0056, $p<0,000062$), P+E e O (M) (MW Z=5,7936, $p<0,0000070$), P e O (M) (MW Z=4,3798, $p<0,000012$), P e T (MW Z=3,2106, $p<0,00133$), O (F) e O (M) (MW Z=4,8889, $p<0,000006$), E e O (M) (MW Z=4,2667, $p<0,00005$), como mostrado na tabela 3.

Da mesma forma foi alterado o índice da dor D2 (Fig. 11B) ($\chi^2=20,2370$, $p<0,0011$) e (KW, H(5)=25,0186, $p<0,0001$). No D2 (Tabela 4) a diferença na dor manifestada ocorreu entre os grupos P+E e T (MW Z=3,07986, $p<0,00207$), P+E e O (M) (MW Z=4,6608, $p<0,000003$), P e O (M) (MWZ=3,07048, $p<0,00214$), E e O (M) (MWZ=3,3283, $p<0,00087$). Os tratamentos hormonais não alteraram a dor entre os grupos das fêmeas (KW, H(3)=24,1884, $p>0,2418$) e nem entre os grupos dos machos (KW, H(1)=1,8470, $p>0,1741$) (Tabela 4).

Como apresentado na Fig. 12A o sexo alterou a mediana do índice de dor D1 e as fêmeas mostraram mais dor ($\chi^2=25,0000$, $p<0,00001$; KW H(1)=42,2907, $p<0,00001$). Da mesma forma quando a mediana do índice de dor D2 (Fig. 12B) foi analisada, as fêmeas

também manifestaram dor mais intensa ($\chi^2=15,3410$, $p<0,0001$), confirmado pelo teste de KW ($H(1)=18,2955$, $p<0,00001$).

A administração dos diferentes analgésicos opióides (DAGO, U-50488) e salina alterou o D1 (Fig. 13A) ($\chi^2=36,8629$, $p<0,00001$; KW $H(2)=51,0101$, $p<0,00001$; fêmeas $H(2)=36,3377$, $p<0,00001$ e machos $H(2)=32,4097$, $p<0,00001$). O teste de Mann Whitney aplicado para comparação entre os dados obtidos no grupo controle, DAGO e U-50488, mostrou que o tratamento com o agonista μ reduziu de modo significativo a dor (MW $Z=5,7816$, $p<0,000001$), da mesma forma, o agonista κ reduziu a dor e apresentou efeito analgésico (MW $Z=6,5525$, $p<0,00001$). Nas fêmeas, no grupo tratado com DAGO, a melhor analgesia ocorreu no grupo P ($D1=0,76\pm 0,18$) em relação aos grupos E ($D1=1,05\pm 0,23$), P+E ($D1=1,00\pm 0,11$) e O ($D1=1,03\pm 0,17$). O opióide U-50488, na primeira fase, teve melhor efeito analgésico nos grupos P ($D1=0,85\pm 0,10$) e P+E ($D1=0,88\pm 0,07$) (Fig. 9). Na segunda fase do teste o grupo P+E reduziu ($D1=0,93\pm 0,08$) o efeito analgésico do U-50488 (Fig. B).

O índice de dor D2 (Fig. 13B) também foi afetado pelos analgésicos ($\chi^2=36,0000$, $P<0,00001$) e (KW, $H(2)=54,3613$, $p<0,00001$; fêmeas $H(2)=26,6423$, $p<0,00001$; machos $H(2)=36,4684$, $p<0,00001$). No teste de MW, os resultados mostraram que DAGO e U-50488 reduziram significativamente a dor em relação ao grupo controle (MW, $Z=6,7721$, $p<0,000001$ e $Z=3,9879$, $p<0,000006$, respectivamente). No D2, o DAGO, teve melhor efeito analgésico do que o U-50488 (MW $Z=-4,5688$, $p<0,000004$). Das fêmeas que receberam DAGO, a melhor analgesia foi no grupo P ($D2=0,26\pm 0,11$), quando comparado com os grupos E ($D2=0,47\pm 0,12$), P+E ($D2=0,41\pm 0,06$) e O ($D2=0,31\pm 0,11$). No grupo tratado com U-50488, E mostrou o menor efeito analgésico na fase 1 ($D2=0,39\pm 0,05$), enquanto que os grupos P+E, P e O(F) tiveram o melhor efeito analgésico ($D2=0,46\pm 0,06$; $0,43\pm 0,06$ e $0,39\pm 0,07$ respectivamente) (Fig. 10A).

Não houve diferença entre as fases medidas pelo D1 (Fig. 14A) ($\chi^2=1,3888$, $p<0,2386$). Já quando o D2 foi calculado (Fig. 14B) na segunda fase do teste algesimétrico, de modo geral, a dor manifestada foi menor ($\chi^2=5,0141$, $p<0,0251$ e KW, $H(1)=12,0048$, $p<0,0005$). Porém somente as fêmeas, mostraram na segunda fase um melhor efeito dos analgésicos, como mostra a figura 10 e tabela 4 (KW $H(1)=10,1414$, $p<0,0015$). No D2, na segunda fase do teste de formalina, no grupo DAGO, os tratamentos hormonais aumentaram o efeito analgésico em relação a primeira fase (D2: $E=0,24\pm 0,12$, $P=0,26\pm 0,09$, $P+E=0,24\pm 0,09$ e $O=0,18\pm 0,08$). No grupo U-50488 o tratamento P+E diminuiu o efeito analgésico ($D2=0,41\pm 0,07$) em relação os outros tratamentos hormonais.

Nos machos não ocorreu diferença entre as fases (KW, $H(1)=2,4715$, $p>0,1159$) (Tabela 4) quando calculados pelo D1 ou D2.

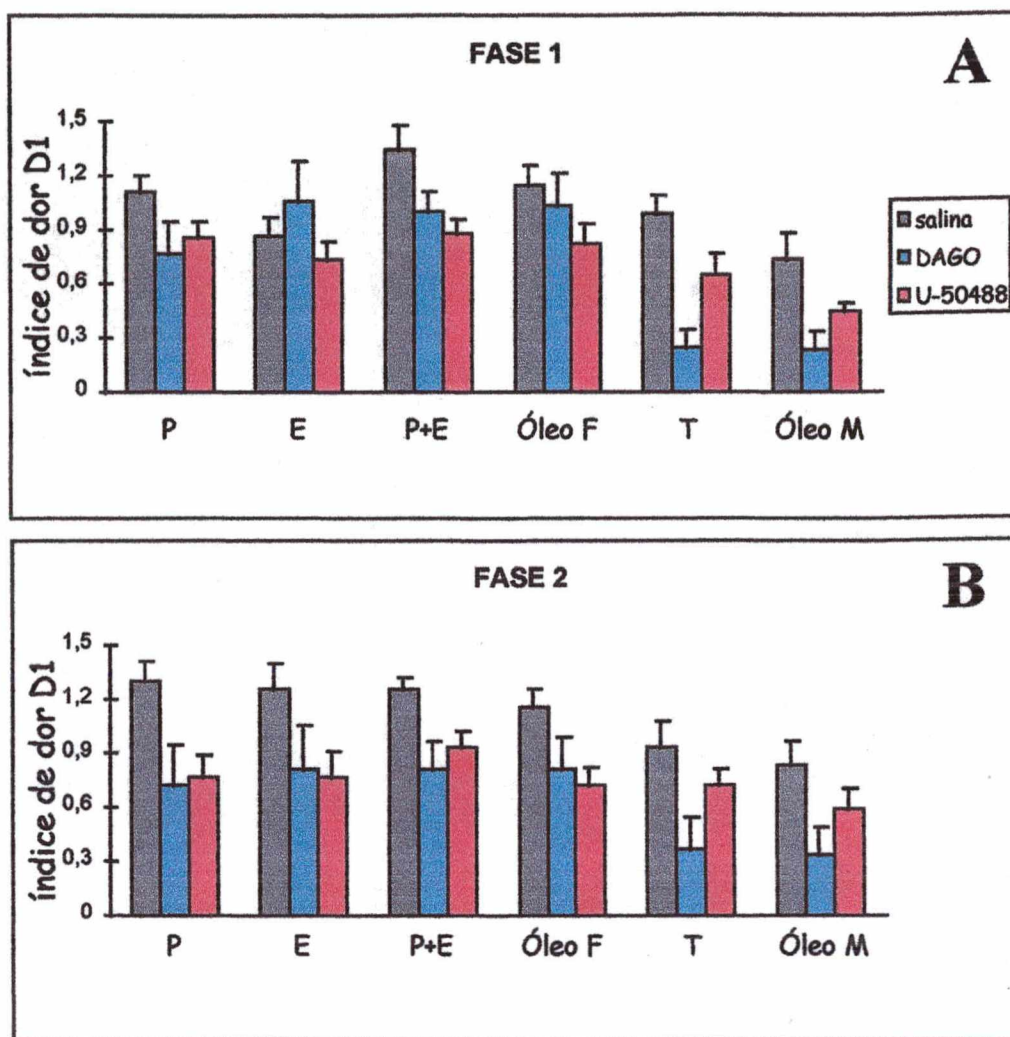


Figura 9

Efeito dos hormônios gonadais na sensibilidade ao efeito antinociceptivo dos agonistas opióides DAGO e U-50488 em machos e fêmeas gonadectomizados e tratados com terapia hormonal substitutiva P=progesterona, E=estradiol e T=testosterona. (A) Primeira fase da resposta à formalina. (B) Segunda fase da resposta à formalina. Cada barra representa a média +/- erro padrão do índice de dor D1, n=8 para cada média.

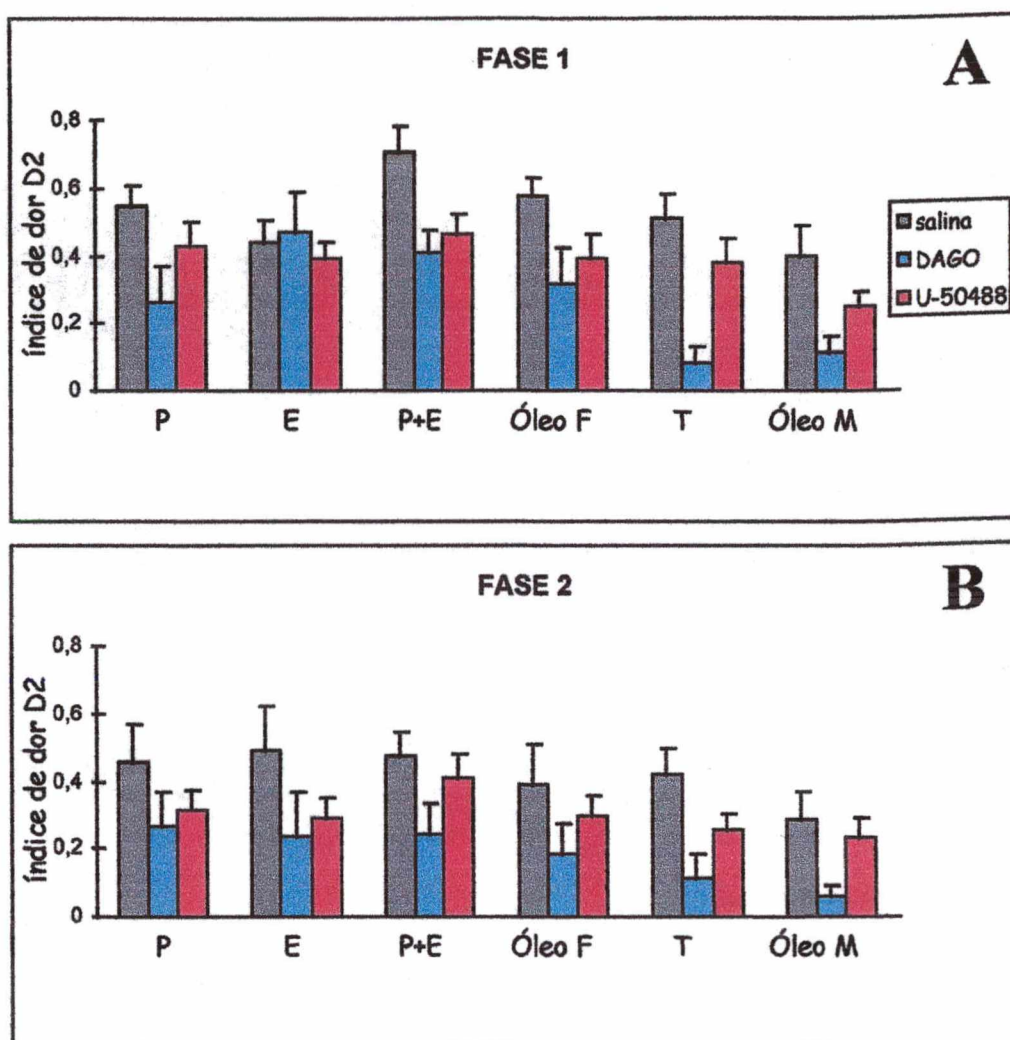


Figura 10

Efeito dos hormônios gonadais na sensibilidade ao efeito antinociceptivo dos agonistas opióides DAGO e U-50488 em machos e fêmeas gonadectomizados e tratados com terapia hormonal substitutiva P=progesterona, E=estradiol e T=testosterona. (A) Primeira fase da resposta à formalina. (B) Segunda fase da resposta à formalina. Cada barra representa a média +/- erro padrão do índice de dor D2, n=8 para cada média.

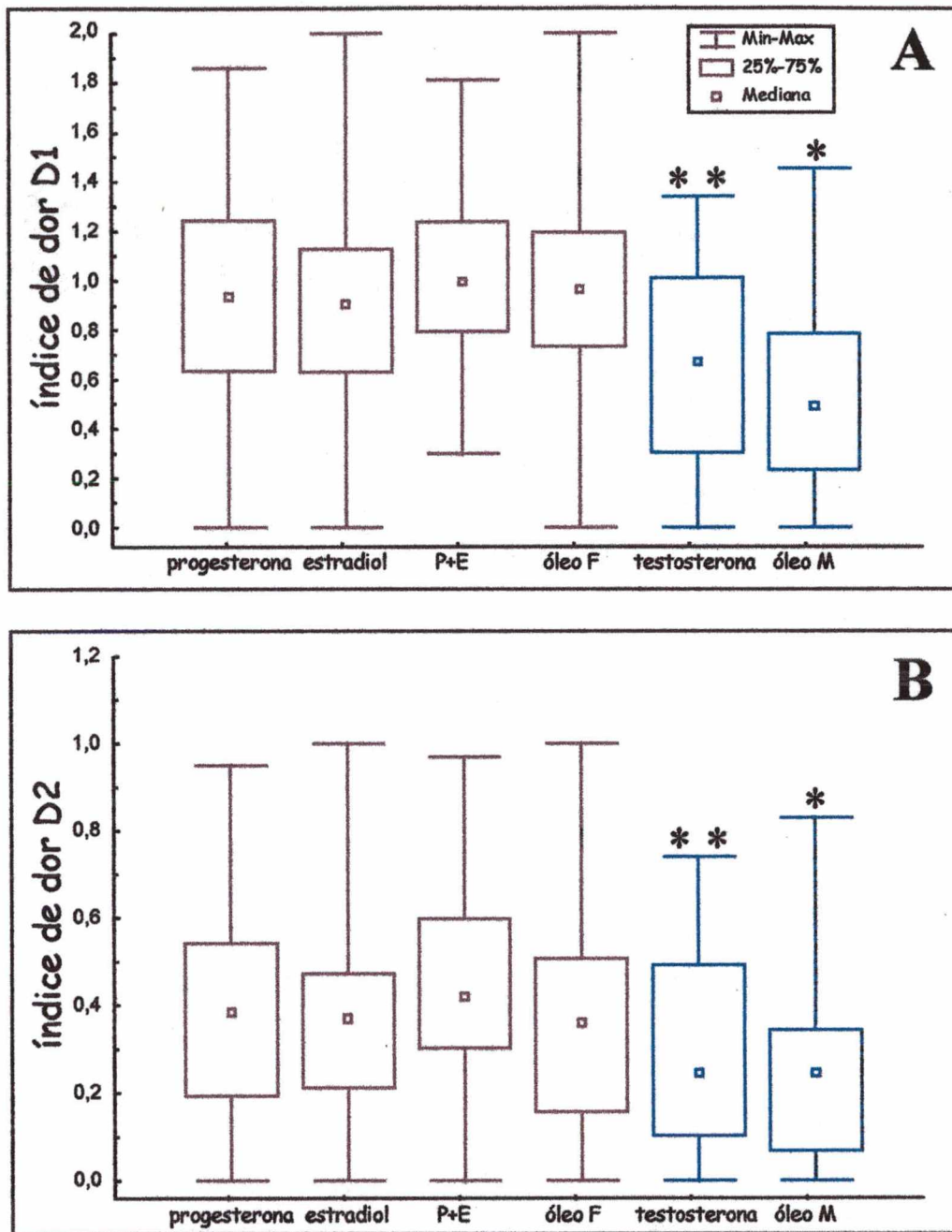


Figura 11

Efeito dos hormônios gonadais na sensibilidade à analgesia opióide no teste de formalina em fêmeas (F) e machos (M) gonadectomizados e tratados com terapia hormonal substitutiva. (A) Índice de Dor D1 *O(M) < P, E, P+E e O(F) $p < 0,05$; **T < P ou P+E, $p < 0,05$. (B) Índice de dor D2 *O(M) < P, E e P+E $p < 0,05$; **T < P+E, $p < 0,05$. Cada ponto representa a mediana +/- valores mínimo e máximo, $n = 24$ por grupo.

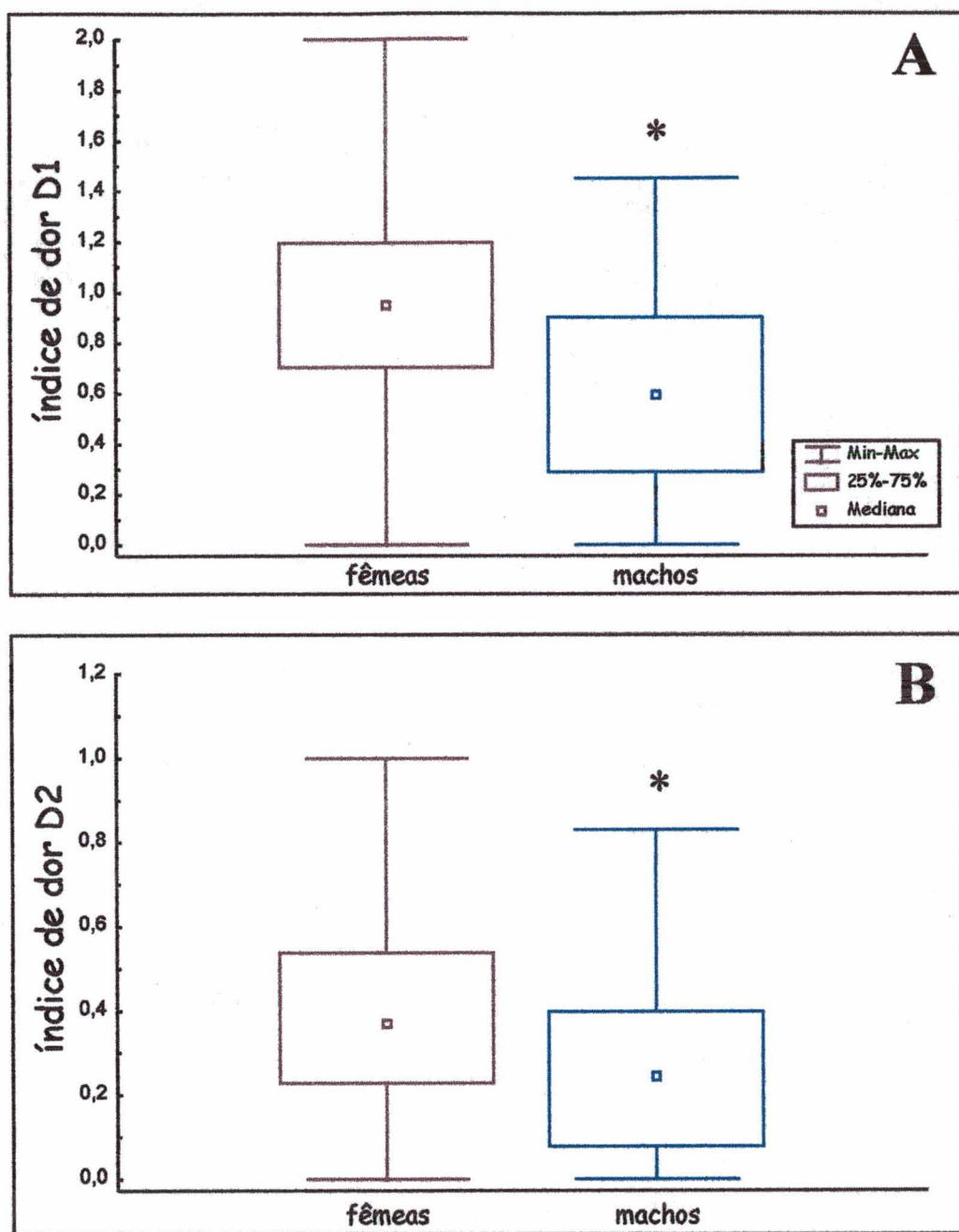


Figura 12

Efeito do sexo na sensibilidade à analgesia opióide no teste de formalina em fêmeas (n=96) e machos (n=48) gonadectomizados e tratados com terapia hormonal substitutiva. (A) Índice de Dor D1. (B) Índice de dor D2. Cada ponto representa a mediana +/- valores mínimo e máximo. * $p < 0,05$.

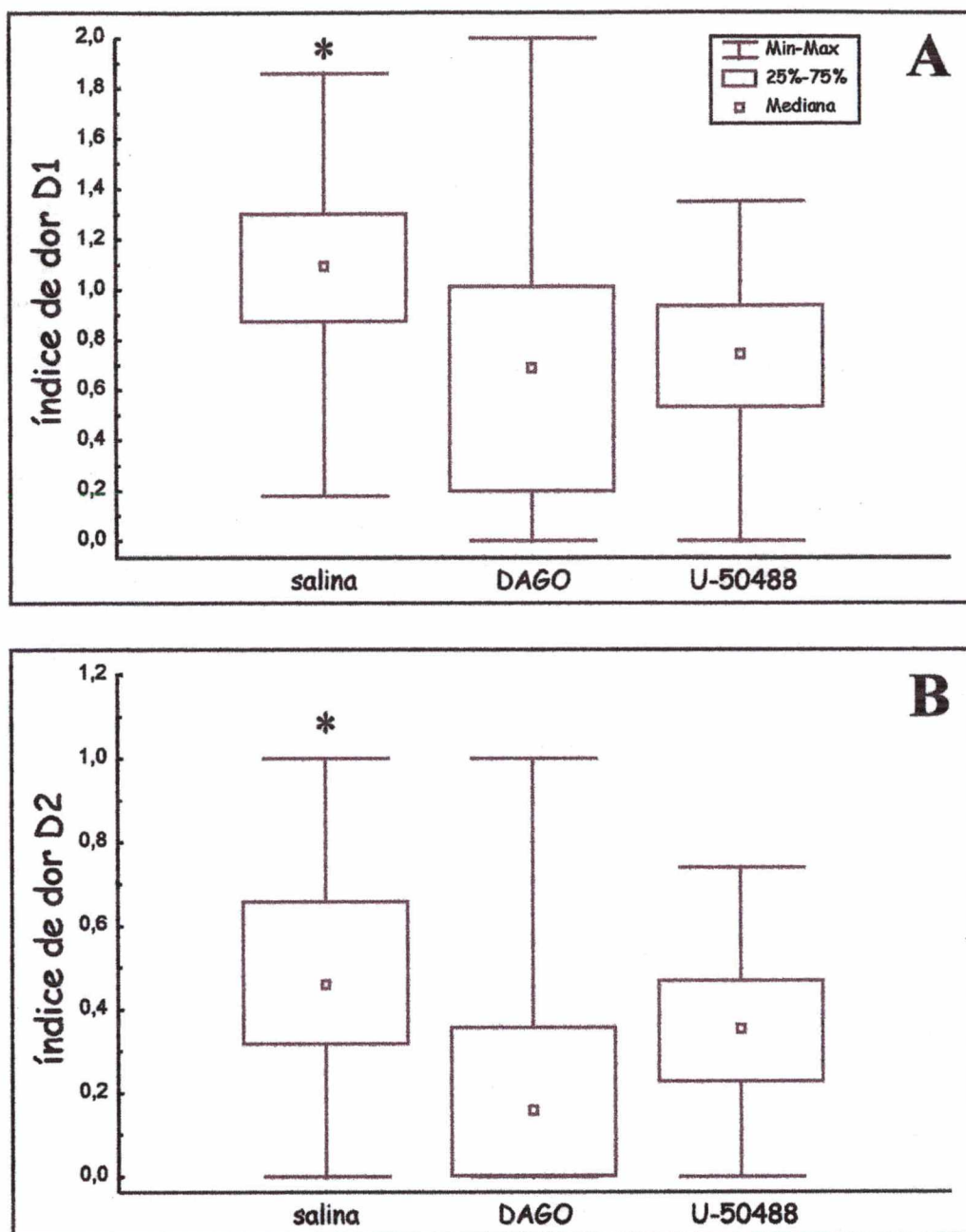


Figura 13

Efeito antinociceptivo dos agonistas opióides mu (DAGO) e kappa (U-50488) no índice de dor em ratos gonadectomizados e tratados com terapia hormonal substitutiva. (A) Índice de Dor D1. (B) Índice de dor D2. Cada ponto representa a mediana +/- valores mínimo e máximo (n=48 para cada concentração). *p<0,05 comparado a DAGO ou U-50488.

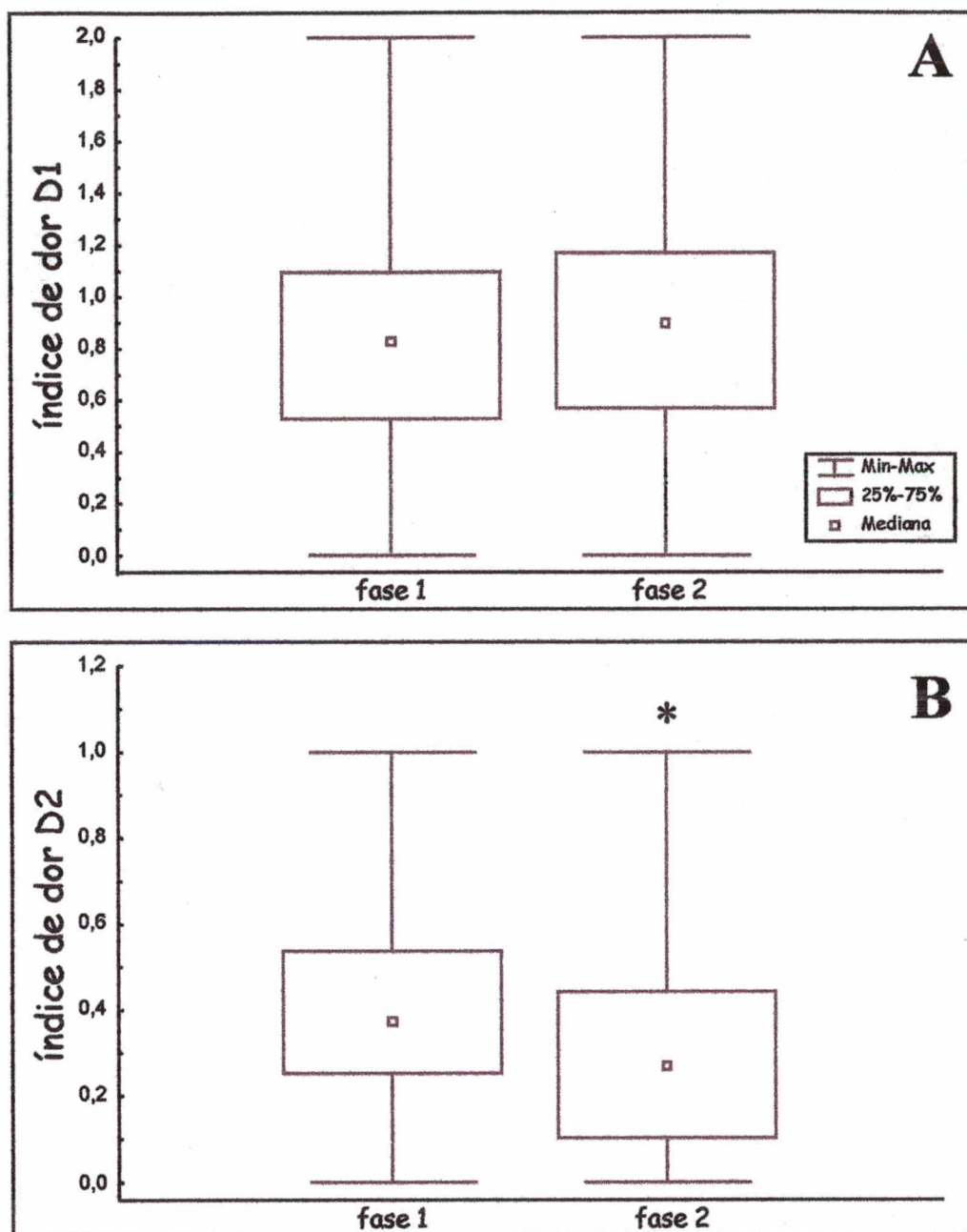


Figura 14

Respostas aos agonistas opióides no teste de formalina durante a primeira fase (pico 1) e a segunda fase (pico 2) em ratos gonadectomizados. (A) Índice de Dor D1. (B) Índice de dor D2. Cada ponto representa a mediana +/- valores mínimo e máximo (n=144 para cada pico). * $p < 0,05$.

TABELA 3: Soma dos postos dos resultados pelo Teste de Kruskal-Wallis do índice de dor D1 no experimento II em relação ao sexo, tratamento hormonal, opióides (μ , κ) e as fases.

VARIÁVEIS	FÊMEAS E MACHOS	FÊMEAS	MACHOS
SEXO		32076	9540
TRATAMENTO HORMONAL			
P	7476	4270	-
E	7794	4503	-
P+E	8788 (1)	5147	-
O (F)	8018	4609	-
T	5540	-	2537
O (M)	4090 (2)	-	2270
OPIÓIDES			
S	18619,5 (3)	8312	2168
D	11229	5518	902
U	11767,5	4698	1586
FASES			
1	22391,5 (4)	9192	2186,5
2	21224,5	9336	2469,5

1. O D1 foi maior no grupo P+E que no O (M) ou no T.
2. O D1 foi menor no O (M) que no P, E ou O (F)
3. O grupo salina, de modo geral, apresentou maior dor. Nas fêmeas, o analgésico U-50488 foi mais eficiente, já nos machos o DAGO apresentou melhor analgesia.
4. Na soma geral o D1 foi maior na primeira fase, no entanto separadamente, as fêmeas e machos mostraram mais dor na segunda fase.

TABELA 4 Soma dos postos dos resultados pelo Teste de Kruskal-Wallis do índice de dor D2 no experimento II em relação ao sexo, tratamento hormonal, opióides e as fases.

VARIÁVEIS	FÊMEAS E MACHOS	FÊMEAS	MACHOS
SEXO		30591,5	11024,5
TRATAMENTO HORMONAL			
P	7464	4504	-
E	7460	4523	-
P+E	8641 (1)	5282	-
O (F)	7027	4504	-
T	6142	-	2513
O (M)	4883	-	2143
OPIÓIDES			
S	18008,5 (2)	7848	2139,5
D	9515,5	4609,5	820,5
U	14092	6070,5	1696
FASES			
1	23254,5 (3)	10489,5	2542
2	18361	8038,5	2114

1. O D2 foi maior no grupo P+E que no T ou no O (M). O D2 foi menor no O(M) que no E ou P.
2. O grupo salina manifestou maior dor e tanto nas fêmeas como nos machos o melhor efeito analgésico foi com DAGO.
3. De modo geral a dor na fase 1 foi maior, sendo que apenas nas fêmeas o D2 foi significativamente maior na fase 1.

DISCUSSÃO

Efeito dos Hormônios Gonadais na Sensibilidade às Diferentes Concentrações de Formalina.

1.1 Análise das reações comportamentais ao teste de formalina:

Uma questão relevante no estudo da dor é como transformar a experiência subjetiva da dor em dados objetivos para análise. Alguns estudos têm usado o teste de formalina e os resultados representam um valor numérico proveniente de cada categoria comportamental, nas diferentes fases do teste, que refletem a intensidade do nível de dor. Estes estudos têm usado diferentes protocolos para registrar as respostas incluindo parâmetros simples de registros como tempo de lambedura e flexão da pata injetada ou a avaliação das diversas respostas manifestadas através das diferentes categorias de comportamento no teste de formalina. Nos experimentos aqui apresentados escolhemos calcular, analisar e comparar os índices de dor D1 e o D2. O índice de dor D1 (Coderre e cols, 1993) representa respostas comportamentais que envolvem manifestações sutis como o comportamento 1 no qual o animal apenas apóia a superfície com a ponta dos dedos que pode estar representando dor ou apenas uma sensação de desconforto e também os comportamentos 2 e 3. O índice de dor D2 (Watson e cols, 1997) envolve apenas os comportamentos 2 e 3 que são categorias bem definidas de dor.

Coderre e cols, em 1993 avaliaram a validade e confiabilidade da técnica descrita por Dubuisson e Dennis (1997), de associar determinados pesos aos resultados. O estudo foi realizado administrando diferentes concentrações de formalina na pata posterior (porque o animal raramente limpa a pata posterior em comparação com a pata anterior, diminuindo a possibilidade de confundir comportamento de limpeza com respostas de dor) validando este método como adequado para medir a intensidade da dor. O índice de dor obtido foi reconhecido como sendo confiável porque os resultados demonstraram que aumentando

progressivamente as concentrações de formalina, aumentaram significativamente as respostas de dor.

Abbott e cols (1995), avaliaram os resultados dos comportamentos de dor obtidos através do teste de formalina (50 µl/formalina 0,05%, 1%, 1,5% ou 2,5%, sc na superfície plantar da pata posterior). Foram avaliadas correlações entre medidas comportamentais para a primeira e segunda fase do teste de formalina e correlações entre primeira e segunda fase do teste de formalina para cada medida comportamental das categorias 1, 2 e 3 já descritas por Dubuisson e Dennis (1997). Estas correlações foram feitas para determinar qual medida, ou combinações, melhor representam o aumento da dor associado ao aumento das concentrações de formalina, então as correlações entre doses de formalina e comportamentos foram examinadas. Abbott e cols (1995) encontraram que elevação e lambedura da pata explicaram 67% da variância na primeira fase e 71% na segunda fase (categorias 2 e 3). O favorecimento (categoria 1) não foi relacionado com a concentração de formalina na primeira fase e foi negativamente relacionado na segunda fase. Os autores sugeriram que o favorecimento pode estar associado a comportamento de desconforto mais do que dor e que combinações de comportamentos (elevação e lambedura) são medidas mais robustas e melhores para avaliar dor do que avaliação de comportamento simples como apenas tempo e frequência de lambedura.

Em 1997, Watson e cols revisaram os pesos das categorias comportamentais validadas por Coderre e cols (1993) preservando a relação ordinal de categorias e pesos, propondo uma nova quantificação ótima (resultado de dor composta) medindo-se somente categorias de dor bem definidas que são as categorias 2 e 3, atribuindo-se pesos 1 e 2 respectivamente, somados e dividido pelo tempo total da fase do teste (diferente de Dubuisson e Dennis (1997) que incluem varias categorias de comportamentos de dor, desde o favorecimento da pata injetada

que reflete pouca dor, flexão que representa dor média e lambadura que reflete dor intensa). Esta nova categoria de pesos foi sugerida baseada nos resultados do estudo de Abbott e cols. (1995).

1.2. Efeito da progesterona e estradiol na sensibilidade à dor nas fêmeas:

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que os tratamentos hormonais realizados nas fêmeas, não alteraram o D1 ou o D2. Nas concentrações de 1% e 2% o grupo P+E tendeu a ser mais sensível comparando com o grupo O, na primeira fase do teste de formalina. Na fase tônica, tanto no D1 quanto no D2 não ocorreram diferenças significativas.

Vincler e cols (2001) avaliaram os efeitos dos hormônios ovarianos circulantes no comportamento nociceptivo usando o teste de escape e o teste de formalina. Os autores mostraram que as ratas testadas na tarde do proestro (depois da ovulação, quando P+E estão altos) apresentaram uma menor latência do reflexo de escape comparando com diestro I (semelhante ao grupo P). Vincler e cols (2001) também concluíram que as diferentes fases do ciclo estral não alteraram os comportamentos nociceptivos produzidos pela formalina 1% na fase aguda e na fase tônica do teste (foram registrados o número de flexões e sacudidas e o tempo de duração de mordedura e lambadura da pata injetada; categorias comportamentais 2 e 3 de Dubuisson e Dennis, 1977). Baseados nestes resultados estes autores sugerem que os hormônios ovarianos possam atuar de modo diferenciado modulando comportamentos associados com dor física e dor tônica. Nos nossos resultados, é interessante observar ao analisar o índice de dor D2, que o grupo P+E, na formalina 1%, manifestou a menor dor em relação aos demais tratamentos. Na formalina 2%, o P+E apresentou maior sensibilidade que o controle. Ao compararmos os resultados do teste de escape de Vincler e cols (2001) com os nossos dados da primeira fase do teste, com formalina 2%, pode-se pensar também, que os

mecanismos envolvidos na supressão da dor física possam ser mais sensíveis à modulação inibitória dos hormônios ovarianos quando estes atuam concomitantemente. Na segunda fase do teste, é possível que os diferentes comportamentos nociceptivos manifestados pelo grupo P+E, à formalina 1% entre D1 e D2, seja porque no índice D1 está incluída a categoria 1 que pode representar dor, mas também apenas desconforto (o qual pode ser causado por dor, coceira ou ardência), pois no D2 o grupo P+E mostrou a menor dor. Já que na formalina 2% o tratamento com P+E, tendeu a sensibilizar as ratas no D1 e D2, assim, é possível que para dor tônica ou inflamatória os mecanismos modulatórios da dor sejam menos sensíveis aos hormônios ovarianos para estímulos de baixa intensidade e mais sensíveis para estímulos de média intensidade.

Em outro estudo Limonta e cols (1989) mostraram que o número de receptores μ varia durante as diferentes fases do ciclo estral, com significativo aumento na manhã do proestro. O número de receptores μ no proestro pode aumentar devido à influência do estradiol secretado em grande quantidade nesta fase. O declínio no número de receptores μ no fim do proestro e início do estro pode ser devido à secreção concomitante de progesterona e estradiol nestas fases. Com base neste resultado, talvez seja possível pelo menos em parte explicar a tendência das ratas tratadas com P+E de serem mais sensíveis à dor do que nos outros tratamentos e a menor sensibilidade na total ausência de hormônios gonadais (grupo óleo) a 1% e 2%. A aumentada sensibilidade do grupo óleo na formalina 5%, apresentando uma curva dose-resposta com tendência a elevar-se e a igualar-se aos demais tratamentos hormonais, pode ser porque a estimulação intensa sobrepuja a capacidade modulatória opióide endógena.

Martínez-Gomes e cols (1994) relataram diminuição significativa no limiar do reflexo nociceptivo durante o período de estro e diestro I comparadas com proestro e diestro II. Estas diferenças podem ser explicadas pelo tipo de teste algosimétrico aplicado, no teste de retirada

da cauda (tail flick), uma modalidade de estímulo elétrico, no qual o animal tem controle sobre o tempo do estímulo na cauda, possíveis diferenças na determinação dos estágios do ciclo estral, e também grau de estresse para o qual os animais foram submetidos que podem ativar mecanismos opióides e não opióides na modulação da dor.

Na segunda fase, que representa dor inflamatória, tanto o índice de dor D1 como o D2 foram significativamente maiores nas fêmeas, mostrando que neste tipo de dor, ocorre maior sensibilidade para o estímulo nocivo, possivelmente em decorrência de substâncias sensibilizantes como produtos da inflamação, isquemia ou neurotransmissores presentes neste período.

A transmissão da dor envolve eventos do sistema nervoso central e periférico e os hormônios gonadais podem interagir com estes sistemas em múltiplos níveis. Por exemplo aferentes silenciosos são fibras nervosas aferentes primárias que tipicamente não respondem para estimulação sensorial, mas tornam-se ativos na presença de substância sensibilizante. Hormônios gonadais podem servir como fatores sensibilizantes. Por exemplo, aferentes chegando do útero parecem ser menos sensíveis no diestro I e II e mais sensíveis no proestro/estro (Berkley e Sato, 1988).

Outra possibilidade de mecanismos para os efeitos sensibilizantes dos hormônios nos aferentes primários podem ser relacionadas com fator de crescimento neural (NGF) e alta afinidade dos receptores trka sugerindo que sua ligação está envolvida na sensibilização dos aferentes primários e que durante o proestro (aumentada sensibilidade nas ratas) a expressão do trka é superregulada nos neurônios do gânglio da raiz dorsal. NGF também leva ao crescimento de neuritos e estes parecem ser mais sensíveis para o estímulo nocivo (Fillingim e Ness, 2000).

As diferentes concentrações de formalina foram administradas para averiguar se os animais são sensíveis às diferentes intensidades do estímulo nocivo, se afeta de forma diferente os machos e fêmeas e se as manipulações hormonais afetaram as respostas comportamentais nas diferentes concentrações. As fêmeas mostraram uma curva dose-resposta na primeira e na segunda fase do teste, manifestando aumento significativo tanto no índice de dor D1 quanto no D2 conforme aumentou a intensidade do estímulo nocivo nos diferentes tratamentos hormonais.

A tendência à menor sensibilidade à dor na fase 2 que ocorreu nas fêmeas tratadas com progesterona foi similar aos resultados obtidos no estudo de Ren e cols (2000) que mostraram que níveis plasmáticos elevados e constantes (como na fase de lactação das ratas), semelhante ao componente de progesterona da fase lútea no ciclo menstrual humano, atenuam a hiperalgesia inflamatória (inflamação provocada pelo *Mycobacterium* na pata traseira e depois estímulo quente) envolvendo inibição da ativação do receptor do N-metil D-aspartato (NMDA). A diminuição da hiperalgesia foi positivamente correlacionada com o aumento de progesterona. Agonistas dos receptores NMDA nos roedores são nociceptivos ou algésicos e a resposta à injeção i.t. de NMDA foi dramaticamente atenuada nas ratas lactantes e revertida pelo antagonista NMDA, o AP-5, sugerindo que o efeito analgésico da progesterona inclui depressão da ativação do receptor NMDA na medula espinhal.

Os resultados sugerem que a progesterona atenua o desenvolvimento de dor persistente e hiperalgesia, na resposta para inflamação tecidual, pelo menos em parte, via mecanismos espinhais do receptor NMDA, mostrando que um alto nível plasmático persistente de progesterona, na ausência de estradiol, produz potente efeito analgésico.

Resumindo, no D1, as fêmeas tenderam a sentir mais dor do que os machos, enquanto que no D2 as fêmeas significativamente sentiram mais dor. No D1 e D2 as fêmeas tratadas com

P+E mostraram significativamente mais dor do que os machos tratados com óleo e elas foram sensíveis às diferentes concentrações de formalina, apresentando uma curva dose-resposta dependente da intensidade do estímulo nocivo e mostraram significativamente mais dor na segunda fase.

1.3. Efeito da testosterona na sensibilidade à dor nos machos:

Nos machos, a intensidade do estímulo nocivo não afetou o D1 nem o D2, na primeira fase ou na segunda fase do teste de formalina, não ocorrendo um efeito dose-resposta na faixa de concentração estudada. Com estímulo de baixa intensidade (formalina 1%) os machos tenderam a manifestar mais dor do que as fêmeas. Estes dados estão de acordo com Aloisi e cols (1995), os quais também relatam que em concentrações de 0,1% (um estímulo de baixa intensidade) a tendência é de mais respostas de dor dos machos, mostrando que para estímulos de baixa intensidade os machos são mais sensíveis do que as fêmeas.

No estudo de Kepler e cols (1989) o limiar para dor fásica foi menor em machos gonadectomizados, (similar aos nossos resultados na fase 1, na formalina 1%) e aumentou nas fêmeas castradas (semelhante ao nosso experimento, na fase 1, formalina 1% e 2% no grupo óleo nas fêmeas) em relação aos animais intactos (Kepler e cols, 1989). Este resultado sugere um papel hiperalgésico do estradiol e hipoalgésico da testosterona.

Aloisi e Cecarelli (2000) mostraram que gonadectomia e naloxona aumentaram o tempo de flexão da pata e que nos machos castrados estradiol icv aumentou lambadura e diminuiu a frequência de sacudida na dor fásica. Na fase inflamatória, o estradiol aumentou a lambadura somente nos ratos intactos. Este aumento induzido pode ser devido a regiões de processamento nociceptivo superiores ativadas por estradiol que, através do eixo

hipotalálamo-hipófise-adrenal, aumenta os níveis plasmáticos de corticosteróides nos animais pré-tratados com estradiol.

Testosterona e estradiol são os principais hormônios gonadais nos machos e fêmeas respectivamente. Nos machos a maioria dos efeitos induzidos pela testosterona durante o desenvolvimento e fase adulta são mediados pelo estradiol resultante da aromatização da testosterona (Pilgrim e Hutchinson, 1994). É possível que nos nossos experimentos a tendência dos machos tratados com testosterona a serem mais sensíveis na formalina 5%, seja devido à alta dose hormonal administrada cronicamente que sofrendo aromatização poderia gerar altos níveis de estradiol.

O índice de dor D1 foi maior na fase 2, que representa a dor inflamatória. No entanto, pelo índice de dor D2, não ocorreu diferença na dor manifestada entre a primeira e a segunda fase. Como o D2 envolve apenas categorias de dor bem definidas e a dor não aumentou na fase inflamatória, é possível que os machos, pelo menos para estímulos de baixa e média intensidade sejam menos sensíveis à modulação da dor pelo hormônio testosterona e também às substâncias resultantes do processo inflamatório como bradicinina e prostaglandina conhecidas por sensibilizar as vias nociceptivas.

1.4. Diferenças sexuais na sensibilidade à dor:

A ausência de resposta significativa, entre o grupo das fêmeas e entre o grupo dos machos com os diferentes tratamentos hormonais foi inesperada. Estudos realizados em nosso laboratório com machos intactos e fêmeas nas diferentes fases do ciclo estral (Segatto e cols 2001), os quais foram utilizados como grupo controle com níveis fisiológicos hormonais para comparar com este experimento (no qual os animais foram castrados e tratados com terapia hormonal substitutiva com doses elevadas), mostraram que em ratos submetidos a formalina

1%, 2% e 5%, os machos apresentaram menor sensibilidade em relação às fêmeas, sendo esta diferença significativa entre machos e fêmeas em estro, no primeiro pico, com as concentrações de 2% e 5%.

O sexo não alterou o índice de dor D1. No entanto, quando o índice de dor D2 foi analisado, diferenças entre os sexos foram encontradas, sendo que as fêmeas, tratadas com terapia hormonal substitutiva, de modo geral, manifestaram mais dor do que os machos. Estes resultados estão de acordo com Aloisi e cols (1995) que mostraram que na dor persistente, com formalina 10%, as fêmeas apresentaram níveis mais altos de lambedura e flexão na pata injetada. Nos nossos experimentos, os machos, com estímulo de baixa intensidade tenderam a ser mais sensíveis que as fêmeas. Aloisi e cols (1995) também mostraram que com concentrações de formalina de 0,1% a tendência é de mais respostas de dor nos machos. A diferença na responsividade de machos e fêmeas para altas e baixas concentrações de formalina sugere que a intensidade é um fator relevante na determinação do padrão e duração das respostas nociceptivas nos dois sexos.

Aloisi e cols (1994) mostraram que ratos machos e fêmeas exibiram comportamentos nociceptivos diferentes em resposta à injeção de formalina 10%. O tempo gasto em flexão e lambedura (categorias 2 e 3) foi maior nas fêmeas (o ciclo estral não foi controlado) do que nos machos. O número de sacudidas da pata (comportamento 3) foi similar nos machos e fêmeas. Nossos dados são similares às diferenças comportamentais relatadas por Aloisi e cols (1994) e nós também constatamos que, de modo geral, na formalina 2% e 5%, as fêmeas manifestaram mais dor do que os machos no D2. No nosso experimento (dados não ilustrados), na formalina 5%, em todos os tratamentos as fêmeas permaneceram mais tempo nos comportamentos 2 e 3 do que os machos. Estas diferenças sexuais podem ser devidas a diferentes circuitos neurais envolvidos na modulação nociceptiva. Lambedura e flexão são

processados a níveis supra espinhais em estruturas que oferecem múltiplos alvos para ação de diferentes neuro-moduladores incluindo hormônios sexuais e opióides endógenos, enquanto que sacudida resulta de circuitaria neural espinhal menos complexa do que lambertura e flexão.

Outra possibilidade para as fêmeas apresentarem mais dor do que os machos seria uma provável maior responsividade para os procedimentos laboratoriais (manuseio, familiarização e o teste de formalina), o que as tornaria mais responsivas ao estímulo doloroso.

Em outro estudo, Forman e cols (1989), encontraram diferenças sexuais, nos ratos machos e fêmeas, nos quais a castração resultou em significante redução no tempo de reação no teste de retirada da cauda. Administração de esteróides aumentou a latência nos animais em ambos os sexos. No teste de limiar de escape, a reposição hormonal produziu efeito oposto nos machos castrados comparando com as fêmeas, nelas estradiol reduziu ainda mais o tempo de reação no limiar de escape mostrando diferença no desconforto somático, sendo possível que estes diferentes resultados sejam devidos a que o estradiol afeta as fêmeas de forma diferente nos testes de retirada da cauda e limiar de escape. Estes resultados podem também ser atribuídos à habilidade dos esteróides gonadais em modular a atividade de neurotransmissores que participam na analgesia bem como refletindo o efeito dos esteróides gonadais nos componentes neuromusculares e esta circuitaria parece diferir entre os sexos e afetar o teste de limiar de escape mais intensamente.

A fase 1 que reflete a dor física e a fase 2 que representa dor inflamatória foram diferentes entre os grupos. O D1 da fase 2 foi maior nas fêmeas e nos machos. O D2 da fase 2 foi também maior, mas apenas nas fêmeas, sugerindo que as fêmeas são mais sensíveis a dor proveniente de alterações inflamatórias e que os hormônios gonadais femininos podem realçar esta sensibilidade.

O protocolo utilizado neste experimento mostrou duas diferenças importantes entre as fêmeas e os machos:

1. A diferença em sensibilidade à intensidade do estímulo nocivo nos machos e nas fêmeas.

O uso das diferentes concentrações de formalina, representando estímulo nocivo de baixa, média e alta intensidades, mostrou que existem diferenças na sensibilidade entre os sexos em relação a intensidade do estímulo nocivo. As fêmeas, quando analisadas no D1 e D2 mostraram que elas foram sensíveis às concentrações de formalina apresentando uma curva dose-resposta nos dois índices. Nos machos, as diferentes concentrações de formalina não afetaram D1 nem D2, mostrando que os machos não foram sensíveis à intensidade do estímulo nocivo.

2. A constatação de que dependendo do índice de dor utilizado (D1 ou D2), diferentes resultados podem ser obtidos nos parâmetros avaliados.

Nos resultados obtidos nos nossos experimentos, o índice de dor D2 representa maior especificidade já que somente comportamentos bem definidos de dor são registrados; menor variabilidade, observada pelos menores valores de erro-padrão comparando com os valores encontrados em D1 e maior capacidade para detectar variações sutis na sensibilidade à formalina, pois o D2 foi capaz de detectar diferenças entre os sexos, não detectadas com o índice de dor D1, e também, na segunda fase do teste de formalina, o D2 detectou maior dor somente nas fêmeas.

2. Efeito dos Hormônios Gonadais na Analgesia Opióide

No experimento II, de modo geral, as fêmeas tratadas com salina icv tenderam a manifestar índice de dor D1 e D2 maiores que as fêmeas do experimento I, comparando as respostas na formalina 5%. Um fator importante que diferencia os animais do experimento II é que estes foram submetidos à cirurgia estereotáxica duas semanas antes do teste de formalina e é possível que este procedimento e a presença da cânula icv tenha atuado como uma situação estressante hiperalgésica na experiência dolorosa ao novo estímulo nocivo. Unruh (1996), encontrou que estresse e depressão estão mais associados com dor nas mulheres do que nos homens; dor intensa em pacientes com artrite reumatóide foi relacionada com altas frequências de depressão e que mulheres adultas jovens, mães que trabalham, indivíduos com baixa renda, negros e hispânicos relatam mais dor e desordens de humor.

O opióide DAGO, apresenta como um de seus efeitos indesejáveis a catalepsia que é caracterizada pela redução dos reflexos. O mesmo não foi observado com U-50488. Catalepsia foi observada em 1 fêmea tratada com P, 5 com E, 4 com P+E e 4 com óleo. Das fêmeas, o grupo tratado com P foi o mais sensível ao efeito analgésico do DAGO pelos índices de dor D1 e D2 na fase 1, ao passo que P foi o menos sensível para o efeito cataléptico do DAGO. Estradiol foi o mais sensível para o efeito cataléptico e tendeu ser menos sensível para o efeito analgésico na fase 1 no D1 e D2. Nos machos tratados com T seis animais tiveram catalepsia e dois tratados com óleo, os dados mostram que T sensibiliza os animais para o efeito cataléptico, mas não alterou a dor em relação ao controle no D1, porém no D2, T tendeu sensibilizar para o efeito analgésico na fase 1 enquanto que na fase 2 a dor tendeu a aumentar. Estes dados sugerem que o efeito cataléptico não está correlacionado à analgesia.

Os resultados mostram que os tratamentos hormonais nas fêmeas não tiveram efeito significativo sobre a analgesia produzida pelos opióides DAGO ou U-50488, tanto no índice de dor D1 quanto no D2. Estudos de Banerjee e cols (1983) mostraram que a sensibilidade para a morfina (agonista μ e κ) varia nos diferentes estágios do ciclo estral no teste de retirada da cauda e relataram que ocorreu aumento da sensibilidade para morfina na tarde do diestro I e II. Estes dados são em parte similares aos nossos resultados, quando por exemplo o tratamento com progesterona (similar à fase de diestro I) teve a melhor analgesia na fase I e também a ausência de analgesia no grupo tratado com E, porém contraria o efeito analgésico obtido no nosso experimento quando os animais foram tratados com progesterona combinado com estradiol (P+E), sugerindo o envolvimento da atividade ovariana modulando a sensibilidade para a ação dos opióides.

Limonta e cols (1989), mostraram variações no número de receptores μ durante o ciclo estral, e detectaram que o número de receptores é baixo na manhã do diestro I, no dia do diestro II e um significativo aumento ocorre na manhã do proestro seguido por um declínio no número de receptores no fim do proestro (depois da ovulação) e início do estro e então novamente aumenta na tarde do estro. Estas variações podem explicar, no nosso experimento, a diminuída sensibilidade ao DAGO do grupo tratado com P+E na fase inflamatória do teste, mas não explicam a menor sensibilidade do grupo tratado com estradiol, na fase da dor aguda do teste.

Nos machos, também, os comportamentos em resposta à formalina tenderam a ser mais intensos. Por exemplo, comparando o grupo óleo tratado com salina do experimento II com o grupo formalina 5% do experimento I, o grupo óleo do experimento II foi mais sensível na primeira fase nos índices de dor D1 e D2.

O sexo dos animais foi um importante fator na analgesia. Na análise do índice de dor D1 e D2 o efeito analgésico dos opióides foi significativamente melhor nos machos do que nas fêmeas. O analgésico DAGO teve significativamente melhor efeito nos machos, tanto no D1 quanto no D2. No D1 o opióide U50488 tendeu a produzir melhor efeito nas fêmeas.

Outros estudos também mostram que as fêmeas são mais responsivas do que os machos ao efeito analgésico das drogas opióides com atividade agonista κ (Gear e cols, 1996) e machos mais responsivos aos agonistas μ (Kepler e cols, 1991).

Nossos resultados também estão de acordo com dados apresentados por Fillingim e Ness (2000) que mostram que, de forma geral, condições caracterizadas por estradiol elevado ou acompanhado por progesterona estão associadas com aumentada resposta ao estímulo doloroso e diminuída resposta analgésica para situações de estresse e farmacoterapia opióide. No trabalho de Baamonde e cols (1989) ratos machos demonstraram grande sensibilidade para morfina comparada com fêmeas ciclando normalmente ou ovariectomizadas ou hiperestrogênicas, mas os três grupos de fêmeas não diferiram entre si. Todavia, na gravidez, os níveis altos de hormônios gonadais (Dawson-Basoa e Gintzler 1993), podem inibir respostas nociceptivas e potencializar a analgesia opióide de agonista κ .

Krzanowska e Bodnar (1999), através de microinjeção de morfina intracerebral na substância cinzenta periaquedutal (SCP) mostraram que machos intactos ou castrados apresentaram significativamente maior sensibilidade à morfina do que as fêmeas em testes de dor física. O padrão de analgesia induzido pela morfina não foi afetado pela gonadectomia nos machos. Nos nossos resultados a sensibilidade à morfina também não foi alterada no grupo tratado com óleo. Estes resultados sugerem que o hormônio sexual masculino não é essencial para total expressão da analgesia. Estes autores mostraram também, que as fêmeas em estro (quando P e E estão altos) foram significativamente menos sensíveis para morfina do que as

ovariectomizadas. As fêmeas castradas tratadas com altas doses de morfina tiveram analgesia maior do que as intactas e em baixas doses de morfina não diferiram de fêmeas fora do estro, sugerindo que os hormônios femininos sozinhos ou combinados em altos níveis podem inibir a analgesia pela morfina microinjetada na substância cinzenta periaquedutal (SCP). Nos nossos resultados também os hormônios gonadais inibiram a analgesia pelo DAGO nas fêmeas. Os hormônios circulantes podem também prevenir a expressão total da analgesia através de mudanças na responsividade para os opióides na SCP que pode ser muito sensível em estágios em que os hormônios gonadais estão em atividade máxima.

No índice de dor D2 o DAGO, mostrou potente efeito analgésico nos machos. Nas fêmeas, no D2 o DAGO também teve melhor efeito analgésico do que o agonista kappa. Segatto e cols (2001) encontraram que os machos intactos foram menos sensíveis do que as fêmeas em estro e que o analgésico DAGO teve melhor efeito nas fêmeas em estro do que em diestro e os autores sugeriram que o efeito analgésico deste opióide é melhor quando a concentração dos hormônios gonadais femininos está mais elevada. Este fato leva a uma conclusão paradoxal, visto que o aumento da concentração hormonal pode induzir a uma maior sensibilidade à dor em ratas intactas ou castradas e tratadas com P+E, contudo em ratas tratadas com o opióide DAGO elas mostram diminuição nesta sensibilidade a dor se comparadas às ratas com menor concentração hormonal, ou seja, se por um lado as ratas em estro apresentaram menor limiar nociceptivo em relação às ratas em diestro, por outro lado elas são também favorecidas por um melhor efeito analgésico quando as concentrações hormonais estão elevadas.

Suarez-Roca e Maisner (1993) mostraram que a ativação de receptores κ opióides e ou receptores NMDA por opióides agonistas κ (nalbufina) em aferentes contendo substância P

podem contribuir para antianalgesia ou alodinia. Assim é possível que agonistas de receptores κ (U-50488) possuam propriedades algésicas sob certas condições.

Em um estudo com humanos, Gear e cols (1999) encontraram que agonistas de opióides κ apresentaram melhor efeito analgésico, em todas as doses, nas mulheres do que nos homens após remoção do dente do siso, sendo que as mulheres mostraram melhor resposta e estas respostas foram diferentes dependendo da dose (dose ótima 10 mg) e sugeriram que os homens (que na dose de 5 mg tiveram mais dor que o placebo) tem diminuída habilidade para se beneficiar desta classe de analgésico opióide.

Em relação às fases do teste de formalina, a melhor analgesia na segunda fase do teste, nas fêmeas, pode ter ocorrido por diferenças entre o início e duração do efeito analgésico durante o teste algésimétrico, já que na fase 1 a sensibilidade foi menor em relação aos machos, talvez o início do efeito analgésico demore um pouco mais para acontecer nas fêmeas em relação aos machos. Como a melhor analgesia nas fêmeas ocorreu na fase 2 no índice D2, isto sugere que apesar de retardar o início do efeito, o analgésico atenuou respostas de dor bem definidas representadas pelo D2. Todavia, a potência analgésica nas fêmeas nas duas fases foi menor que a dos machos.

Tanto o D1 quanto o D2 foi significativamente afetado pelos analgésicos opióides, sendo que a dor diminui nas fêmeas e nos machos. DAGO e U50488 reduziram significativamente a dor em relação ao grupo controle e além disto, o opióide DAGO, pelo índice de dor D2 teve efeito analgésico melhor que o opióide U50488. Os resultados mostram que quando a analgesia foi analisada pelo D2 que avalia comportamentos bem definidos de dor observou-se diferença significativa entre os opióides DAGO e U50488, mostrando que o DAGO foi mais eficiente para aliviar a dor intensa, e produziu uma resposta analgésica mais robusta nos machos.

CONCLUSÕES

1. O índice D2 foi melhor para detectar diferenças entre os grupos que o D1.
2. As fêmeas foram mais sensíveis que os machos à formalina nas concentrações de 2% e 5% e em ambas as fases da resposta à formalina.
3. O grupo tratado com P+E foi o mais sensível, principalmente às baixas concentrações de formalina (1% e 2%) o que sugere uma participação discreta destes hormônios no processamento nociceptivo.
4. A testosterona aumentou a sensibilidade à dor no teste de formalina a 5%, isto poderia ser devido a uma possível aromatização da testosterona em estradiol no sistema nervoso central.
5. O tratamento com P+E aumenta o efeito antinociceptivo do agonista κ icv na primeira fase da resposta à formalina, no entanto, o grupo P+E na segunda fase do teste teve a menor analgesia. O efeito do agonista μ não foi alterado pelos hormônios femininos.
6. A testosterona não afetou a resposta aos analgésicos μ ou κ , porém os machos foram mais sensíveis que as fêmeas aos efeitos do agonista μ .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbot F V, Franklin K B J e Westbrook R F (1995) The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats, *Pain*, 60:91-102.
- Aloisi A M, Albonetti M E e Carli G (1994) Sex differences in the behavioural response to persistent pain in rats, *Neurosci. Lett*, 179: 79-82.
- Aloisi A M, Sacerdote P, Albonetti M E e Carli G (1995) Sex-related effects on behaviour and β -endorphin of different intensities formalin pain in rats, *Brain Res*, 699:242-249.
- Aloisi A M e Ceccarelli I (2000) Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration, *Neuroscience* 95(2): 559-566.
- Banerjee P, Chatterjee T K e Ghosh J J (1983) Ovarian steroids and modulation of morphine-induced analgesia e catalepsy in female rats, *Eur J Pharmacol*, 96: 291-294.
- Baamond A I, Hidalgo A e Andres T F (1989) Sex differences in the effects of morphine and stress on visceral pain, *Neuropharmacology*, 28:967-970.
- Berglund L A, Derendorf H e Simpkins J W (1988) Desensitization of brain opiate receptor mechanisms by gonadal steroid treatments that stimulate luteinizing hormone secretion, *Endocrinology*, 122(6):2718-2726.
- Berkley K J e Sato Y (1988) Afferent fibres supplying the uterus in the rat, *J. Neurophysiol*, 59:142-163.
- Bodnar R J, Romero M T e Kramer E (1988) Organismic variables and pain inhibition: roles of gender and aging, *Brain Res Bull*, 21: 947-953.

- Coderre T J, Fundytus M E, Mckenna J E, Dalal S e Melzack R (1993) The formalin test: a validation of the weighted-scores method of behavioural pain rating, *Pain* 54: 43-50.
- Coyle D E, Sehlhorst C S e Mascari C (1995) Female rats are more susceptible to the development of neuropathic pain using the partial sciatic nerve ligation (PSNL) model, *Neurosci. Lett*, 186: 135-138.
- Cruz Y, Martínez-Gomez M, Manzo J, Hudson R e Pacheco P (1994) Changes in pain threshold during the reproductive cycle of the female rat, *Physiol Behav*, 59(3): 543-547.
- Dawson-Basoa M B e Gintzler A R (1993) 17-beta-estradiol and progesterone modulate an intrinsic opioid analgesic system, *Brain Res*, 601: 241-245.
- Dexheimer J e Terenzi M G (2001) Efeito dos hormônios gonadais no limiar nociceptivo em ratas ovariectomizadas, *Anais da XVI Reunião Anual da FESBE*, p. 147.
- Dubuisson D e Dennis S G (1977) The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brainstem stimulation in rats and cats, *Pain*, 4:161-174.
- Fillingim R B, Edwards R R e Powel T (1999) The relationship of sex and clinical pain to experimental pain responses, *Pain* 83: 419-425.
- Fillingim R B, Ness T J (2000) Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24:485-501.
- Forman L J, Tingle V, Estilow S e Cater J (1989) The response to analgesia testing is affected by gonadal steroids in the rat, *Life Sci.*, 45: 447-454.

- Freeman M E (1994) The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat, cap 46, In: Knobil E e Neill J D, (Eds.) The Physiology of Reproduction, 2° ed., Raven Press, Nova Iorque, p. 613-658.
- Frye C A e Duncan J E (1996) Estradiol Benzoate potentiates neuroactive steroids' effects on pain sensitivity, *Pharmacol., Biochem. and Behav.*, 53(1):27-32.
- Garcia-Segura L M, Azcoitia I e DonCarlos L L (2001) Neuroprotection by estradiol, *Progr. Neurobiol.*, 63: 29-60.
- Gear R W Miaskowski C, Gordon N C, Paul S M, Heller P H e Levine J D (1996) Kappa-opioids produce significantly greater analgesia in women than in men, *Nature Med.*, 2 (11): 1248-1250.
- Gear W R, Miaskowski C, Gordon N C, Paul S M, Heller P H e Levine J D (1999) The kappa opioid nalbuphine produces gender- and dose-dependent analgesia and antianalgesia in patients with post operative pain, *Pain*, 83:339-345.
- Genuth S M (2000a) Hipotálamo e Hipófise, cap 49, In: Berne R M e Levy M N, (Eds.) *Fisiologia*, 4° ed., Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro, p. 822-857
- Genuth S M (2000b) As Glândulas Reprodutoras, cap 52, In: Berne R M e Levy M N, (Eds.) *Fisiologia*, 4° ed., Guanabara – Koogan, Rio de Janeiro, p. 910-956.
- Gintzler A R (1980) Endorphin- mediated increases in pain threshold during pregnancy, *Science*, 210: 193- 195.
- Janik J, Callhan P e Rabii J (1992) Morphine-induced analgesia is attenuated in post-partum lactating rats, *Life Sci.*, 52: 271-279.

- Kepler K L, Kest B, Kiefel J M, Cooper M L e Bodnar J R (1989) Roles of gender, gonadectomy and estrous phase in the analgesic effects of intracerebroventricular morphine in rats, *Pharmacol, Biochem. and Behav.*, 34:119-127.
- Kepler K L, Standifer K M, Paul D, Kest B, Pasternak G W e Bodnar R J (1991) Gender effects and central opioid analgesia, *Pain*, 45: 87-94.
- Kruger L, Saporta S e Swanson L W Photografic (1995) *Atlas of the Rat Brain*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Krzanowska E K, Bodnar R J (1999) Morphine antinociception elicited from the ventrolateral periaqueductal gray is sensitive to sex and gonadectomy differences in rats, *Brain Research*, 821:224-230.
- Krzanowska E K, Ogawa S, Pfaff W D e Bodnar R J (2002) Reversal of sex differences in morphine analgesia elicited from the ventrolateral periaqueductal gray in rats by neonatal hormone manipulations, *Brain Res.*, 929: 1.
- Limonta P, Maggi R, Dondi D e Piva F (1989) Endocrine regulation of brain opioid receptors, In: R G Dyer e R J Bicknell (eds) *Brain Opioid System in Reproduction*, Oxford University Press, Oxford, p. 27-38.
- Liu N-J e Gintzler A R (2000) Prolonged ovarian sex steroid treatment of male rats produces antinociception: identificacion of sex based divergent analgesic mechanisms, *Pain* 85: 273-281.
- Long J A e Evans H M (1922) The oestrus cycle in the rat and its associated phenomena, *Mem. Univ. Calif.*, 6: 1-148.

- Martínez-Gomez M, Cruz Y, Salas M, Hudson R e Pacheco P (1994) Assessing pain threshold in the rat: changes with estrus and time of day, *Physiol Behav*, 55(4): 651-657.
- Mc Ewen B S e Alves S E (1999) Estrogen Action in the Central Nervous System, *Endocrine Reviews* 20(3): 279-307.
- Micevych P E, Eckersell C B, Brecha N e Holland K L (1997) Estrogen modulation of opioid and cholecystokinin systems in the limbic hypothalamic circuit, *Brain Res. Bull*, 44:335-343.
- Molina N, Bedran de Castro M T e Bedran de Castro J C (1994) Sex- related differences in the analgesic response to tail immersion test, *Braz J Med Biol Res*, 27(7):1669-1672.
- Pilgrim C e Hutchinson J B (1994) Developmental regulation of sex differences in the brain: can the role of gonadal steroids be redefined?, *Neuroscience*, 60:843-855.
- Ren K, Wei F, Dubner R, Murphy e Hoffman G E (2000) Progesterone attenuates persistent inflammatory hiperalgesia in female rats: involvement of spinal NMDA receptor mechanisms, *Brain Res*, 865:272-277.
- Sander H W, Portoghese P S e Gintzler A R (1988) Spinal κ -opiate receptor involvement in the analgesia of pregnancy: effects of intrathecal nor-binaltorphimine, a κ -selective antagonist, *Brain Res*, 474:343-347.
- Segatto F, Scalco G e Terenzi M G (2001) Diferenças sexuais no limiar nociceptivo e controle da dor em ratos; *Anais XI Seminário de Iniciação Científica da UFSC* p. 430.

- Suarez-Roca H, Maisner W (1993) Activation of Kappa opioid receptors by U50488 and morphine enhances the release of substance P from rat trigeminal nucleus slices, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 264:648-653.
- Tershner S A, Mitchell J M e Fields HL (2000) Brainstem pain modulating circuitry is sexually dimorphic with respect to mu and kappa opioid receptor function, *Pain* 85: 153-159.
- Unruh A M (1996) Gender variations in clinical pain experience, *Pain*, 65:123-167.
- Vinclair M, Maisner W, Vierck C J e Light A R (2001) Estrous cycle modulation of nociceptive behaviors elicited by electrical stimulation and formalin, *Pharmacol, Biochem e Behav*, 69:315-324.
- Wagner R, DeLeo J A, Coombs D W e Myers R R (1995) Gender differences in autotomy following sciatic cryoneurolysis in the rat, *Physiol Behav*, 58(1): 37-41.
- Wardlaw S L e Frantz A G (1983) Brain β endorphin during pregnancy, parturition, and the post-partum period, *Endocrinology*, 113: 1664-1668.
- Watson G S, Sufka K J e Coderre T J (1997) Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats, *Pain*, 70:53-58.
- Wolfe F, Ross K, Anderson J e Russell JJ (1995) Aspects of fibromyalgia in the general population: sex, pain threshold, and fibromyalgia symptoms, *J Rheumatol*, 22: 151-156.