

DANY LUIS JORGE

Fisioterapeuta

***INFLUÊNCIA DO SEXO E DO CICLO ESTRAL SOBRE A  
SENSIBILIDADE À DOR NA ATM DE RATOS  
(TESTE DA FORMALINA NA ATM).***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração Fisiologia Oral.

PIRACICABA  
2002

DANY LUIS JORGE

Fisioterapeuta

***INFLUÊNCIA DO SEXO E DO CICLO ESTRAL SOBRE A  
SENSIBILIDADE À DOR NA ATM DE RATOS  
(TESTE DA FORMALINA NA ATM).***

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCEG-01/2003  
CPG 021 / 05/02  
Assinatura de Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração Fisiologia Oral.

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Volpato

PIRACICABA

2002

DE 30  
LIVRARIA TI UNICAMP  
J7681  
EX  
3 BCI 50128  
16-837102  
DZ  
3 R\$ 11,00  
31107102  
ID

100171079-4

ID 249028

### Ficha Catalográfica

J768i Jorge, Dany Luis.  
Influência do sexo e do ciclo estral sobre a sensibilidade à dor na ATM de ratos (teste da formalina na ATM). / Dany Luis Jorge. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.  
xii, 104p. : il.

Orientadora : Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Dor. 2. Articulação temporomandibular. I. Veiga, Maria Cecília Ferraz de Arruda. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

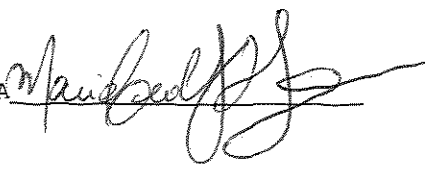
Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

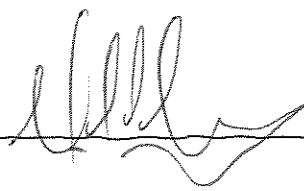


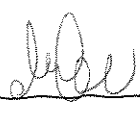
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 05 de Março de 2002, considerou o candidato DANY LUIS JORGE aprovado.

1. Profa. Dra. MARIA CECILIA FERRAZ ARRUDA VEIGA 

2. Prof. Dr. MIGUEL ARCANJO AREAS 

3. Profa. Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO 

2023/1973

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos  
meus pais, João e Hélia  
e meus irmãos, Melissa e Felipe,  
cujo amor e compreensão  
deram-me força constantemente.*

## AGRADECIMENTOS

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga, obrigado pela orientação deste trabalho e por ter ouvido com paciência minhas críticas e idéias sobre o mesmo. Muito obrigado pelos conselhos de vida, que com certeza ajudaram-me a tomar decisões importantes sobre o meu futuro.

Professoras Cláudia Herrera Tambeli e Fernanda Klein Marcondes, obrigado por contribuírem para o desenvolvimento deste trabalho e por aconselharem-me nos momentos de indecisão.

Aos professores dos outros departamentos pelas aulas ministradas.

Ao senhor Carlos Alberto Feliciano, senhora Shirley Rosana Sbravati Moreto e às senhoritas Kelly Roberta de Souza Cunha e Daniele Antônio, pelo auxílio.

A todos os meus amigos e amigas de outros departamentos pelo companheirismo e momentos agradáveis.

Agradeço, especialmente, aos meus amigos Franco, Alexandre, Eduardo, Marcelo e Leonardo pelos bons momentos que tivemos aqui em “Pirrrracicaba”, pelo apoio nos momentos de dificuldade e por terem sido durante esses dois anos a minha família.

Agradeço, especialmente, à Daniela e Ana Paula pela amizade, apoio e companheirismo.

Agradeço, especialmente, à Patrícia pelos momentos agradáveis, pelo apoio, companheirismo e amizade.

Ao senhor Wilson Antônio Macari e senhora Rinalda de Campos Macari por terem gentilmente me recebido em sua família.

À dona Zezé, por ter sempre me tratado como um filho.

Às minhas amigas Charisse, Gabriele e Betânia por sempre me apoiarem. Aos meus amigos Douglas, Ricardo Bueno, Ricardo Martinelli e Luciano por estarem, mesmo que distantes, sempre presentes.

A todos os meus familiares, por compreenderem a minha ausência.

Aos meus pais e meus irmãos, pelo amor, apoio e respeito.

A FOP-Unicamp e, em especial, ao departamento de Ciências Fisiológicas, por me darem esta oportunidade e todas as condições necessárias para que este trabalho fosse realizado.

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

	Páginas
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>01</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>03</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>05</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>07</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1. Mecanismos neurobiológicos básicos da dor.....	17
orofacial.	
2.2. Diferenças sexuais na dor.....	28
2.3. O teste da formalina na ATM.....	37
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>43</b>
3.1 Delineamento experimental.....	43
3.2 Animais.....	44
3.3 Determinação das fases do ciclo estral.....	45
3.4 Análise comportamental.....	46
3.5 Confirmação do local de aplicação da formalina.....	48
3.6 Soluções utilizadas.....	49
3.7 Análise estatística.....	50



4. RESULTADOS.....	51
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	97
APÊNDICE.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ATM – Articulação temporomandibular  
SNC – Sistema nervoso central  
SST – Sistema sensitivo trigeminal  
NTE – Núcleo do trato espinhal do nervo trigêmeo  
ON – Óxido Nítrico  
FSH – Hormônio folículo estimulante  
LH – Hormônio luteinizante  
i.p. – injeção intraperitoneal

## RESUMO

A diferença sexual na dor orofacial é ainda pouco compreendida. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar se há influência do sexo e do ciclo estral sobre a sensibilidade à dor na ATM de ratos. Foram submetidos ao teste da formalina na ATM, ratos Wistar de ambos os sexos: machos, fêmeas em estro e fêmeas em proestro. Os primeiros grupos experimentais receberam a injeção de 50 $\mu$ l de formalina 1,5% ou NaCl 0,9% (controle) na região da ATM. Posteriormente, foram realizados grupos adicionais, que receberam sulfato de morfina (4mg/Kg) ou NaCl 0,9% (controle) (i.p) 30 minutos antes da administração periarticular de formalina 1,5%. Foram avaliados os comportamentos nociceptivos de coçar a região orofacial, levantar rapidamente a cabeça e tombar a cabeça para o lado injetado durante 45 minutos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial de *Tratamento X Sexo/Ciclo Estral* e as comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Tukey. Os resultados deste trabalho mostraram que as fêmeas em estro são mais sensíveis ao teste da formalina na ATM do que os machos e as fêmeas em proestro, o que foi confirmado pela administração de morfina. Não houve diferença entre os grupos de fêmeas em proestro e de machos. Pode-se

concluir que o sexo e ciclo estral podem alterar a sensibilidade à dor no teste da formalina na ATM.

## ABSTRACT

Sex difference in relation to orofacial pain is still poorly understood. Therefore, the aim of this work was to investigate in rats whether there is any influence of gender and estrous cycle on the sensitivity of pain in the TMJ. Wistar rats of both genders: male, female at estrus and at proestrus were submitted to the TMJ formalin test. The first experimental groups were injected with 50  $\mu$ L of 1.5% formalin or 0.9% NaCl (control) into the TMJ region. Afterwards, additional groups received morphine (4mg/kg) or 0.9% NaCl (control) (i.p) 30 minutes prior to the periarticular injection of 1.5% formalin. The nociceptive behavioral responses characterized by rubbing the orofacial region, flinching the head quickly and tumbling the head to the injected side were evaluated during 45 minutes. Data were analyzed by the Two-Way analyses of variance, factor 1 being *Treatment* and factor 2 *Gender/Estrous Cycle*. Tukey test was used to carry out the multiple comparisons. Results in the present study showed that female rats at estrus are more sensitive to the TMJ formalin test than male and female rats at proestrus, which was confirmed by the morphine administration. No differences were observed between female at proestrus and male rats. In conclusion, gender and estrous cycle can alter the pain sensitivity in the TMJ formalin test.

## 1. INTRODUÇÃO

Ferindo a carne ou a alma, acompanhando gerações e incapacitando pessoas, a dor talvez seja um dos mais discutidos e retratados problemas da humanidade.

Encarada de diferentes modos, pelos mais distintos povos, das mais remotas épocas, a dor influenciou culturas e marcou de modo peculiar diversos momentos da história. Retratos dessa história podem ser encontrados em antigas escrituras, como na mais pura das representações: a arte, seja como pintura ou escultura.

Na própria arte a dor se confunde, observando-se desde sua apresentação moral, como o sofrimento pela perda de um ser querido ou outro estímulo que vá além da estimulação de nociceptores, até sua representação física (FIG. 1 e 2) (CASTILLO OJUGAS, 1999).

Os conceitos primitivos de dor e seus tratamentos datam de milhares de anos antes de Cristo e suas explicações eram mais do que físicas, pois o

homem a compreendia nas forças divinas e na própria energia que regia o corpo humano.



FIGURA 1 – DOR MORAL. Virgem de Niccoló dell' Arca. Faz parte de um grupo de esculturas, “Pranto sobre Costo Morto”, que se encontra na Igreja de Santa Maria della Vita, em Bolonha, datada de 1485.

FIGURA 2 – DOR FÍSICA. Gerrit Von Honthorst (1590 – 1656). “El Sacamuelas” (O Tira-Dentes). Museu do Louvre, Paris. O tira-dentes ainda não começou a arrancar o dente e o paciente já faz um gesto de dor.

FONTE – CALTILLO OJUGAS, 1999. p. 3 e 4.

Os antigos chineses (2600 a.C.) já conheciam e seguiam os conceitos do Yin e do Yang, afirmando que qualquer desequilíbrio entre essas duas forças resulta em doença ao corpo e, conseqüentemente, em dor (BONICA 1990).

Hipócrates (460 – 360 a.C.), o pai da medicina, considerava que o corpo era constituído de quatro elementos fundamentais à vida: calor, frio,

umidade e secura, e por quatro humores: muco, bile amarela, bile negra e o sangue. Ao ocorrer uma desarmonia entre esses elementos (discrasia) surge a dor, tendo o cérebro importante papel neste processo, pois era considerado por esse filósofo e cientista o centro do pensamento e, talvez, o das sensações (CAILLIET, 1999; CASTILLO OJUGAS, 1999).

Em alguns povos, como os do antigo Egito e da Índia, os fenômenos dolorosos eram atribuídos aos deuses e aos espíritos dos mortos. Entretanto, um outro conceito, o de que o coração era o centro da vida e das sensações, começava a surgir e com Platão (427 – 347 a.C.) e Aristóteles (384 – 322 a.C.), na Grécia, ganhou força para ser reconhecido por mais de 2000 anos (BONICA, 1990). A importância desse fato foi de tamanha imensidão que mesmo depois de 1400 anos d.C. são encontradas expressões artísticas com esse tema (FIG. 3).

A teoria de que o coração era o centro das sensações não convencia Galeno (131 – 200 d.C.), um grego que residia em Roma. Ele estudou exaustivamente a fisiologia sensorial e caracterizou várias funções do sistema nervoso central e periférico. Seus achados neuroanatômicos fizeram-no classificar três tipos de nervos: um responsável pela função motora, outro pela



função sensorial e um terceiro pela sensação de dor. (BONICA, 1990; CASTILLO OJUGAS, 1999).

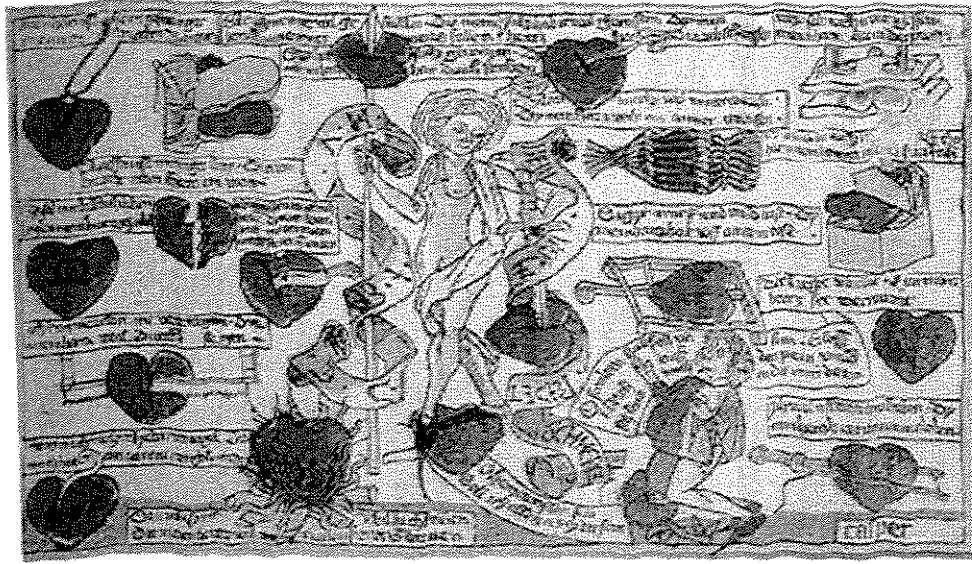


FIGURA 3 – O CORAÇÃO COMO O CENTRO DAS SENSÇÕES. Gravura alemã do século XV. Expressão dos diferentes fatores emocionais que fazem sofrer o coração dos amantes.

FONTE – CASTILLO OJUGAS, 1999, p.7.

Passaram-se muitos séculos e em 1628 William Harvey descobriu a circulação sanguínea, reafirmando que a dor era sentida no coração (BONICA, 1990). Contrariando essa idéia, Descartes (1606 – 1650) mostrou que a dor era transmitida de nervos periféricos para o cérebro (FIG. 4), condenando a teoria de Platão, Aristóteles e seus seguidores, que ainda resistiu até meados do século dezoito (BONICA, 1990).

Fortificada a teoria de que o cérebro era o centro das sensações, uma nova era começava e várias teorias para explicar a dor surgiram, destacando nomes importantes dentro da algologia (ciência que estuda a dor).

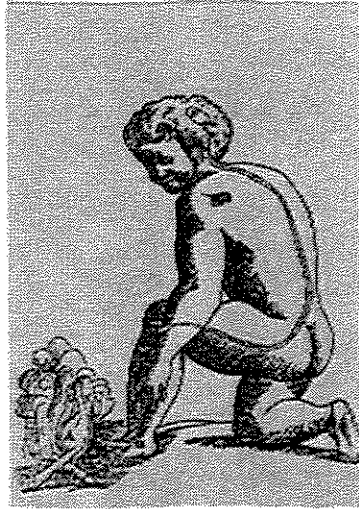


FIGURA 4 – Esquema proposto por Descartes (1596 – 1650), publicado depois de sua morte em “De Homine”(1662). A sensação dolorosa chega ao cérebro através dos nervos espinhais e da glândula pineal, morada da alma, que matiza as sensações e logo as reenvia pelo mesmo caminho para que se retire o pé que se queima pelo fogo.

FONTE – CASTILLO OJUGAS, 1999. p. 7.

Nomes como o de Schiff (1858), von Frey (final do século XIX), Erb (1874), Goldscheider (1894), Sherrington (1900), Nafe (1934), Livingston (1943), Gerard (1951), Noordenbos (1959) e outros (BONICA, 1990), marcaram a história com suas teorias, contribuindo para formulação de outras

teorias, como a importante Teoria do Controle da Dor, proposta por Melzack e Wall em 1965.

Em 1974 foi fundada a IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) que mais de uma década depois propõe a atual definição para a dor:

*“A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à injúria tecidual real ou potencial, ou descrita nesses termos” (MERSKY, 1986).*

Desde de então, com o aumento do número de congressos e revistas especializadas no assunto, além das facilidades promovidas pela internet, o fácil acesso a informações nos permitem compreender um pouco melhor as dores que afligiam nossos antepassados.

De um modo geral, a dor, seja aguda, crônica ou moral, quando desesperadora faz os homens de hoje também evocarem seus Deuses e buscarem tratamentos pouco convencionais, levando-nos a concordar com a seguinte afirmação:

*“Ante a dor reagem igualmente o homem do século XX e o das Cavernas. Buscam, no fundo, algo sobrenatural”*  
(CASTILLO OJUGAS, 1999).

A Odontologia, do mesmo modo que muitas outras profissões, tem contribuído com novos conhecimentos para os avanços da Algologia. Especificamente no que diz respeito aos mecanismos de dor orofacial, tem desempenhado um importante papel científico e, conseqüentemente, social, visto que grande parte da população mundial sofre com dores provenientes de tecidos intra e/ou extra-orais, superficiais e/ou profundos.

Dentre os tecidos craniomandibulares a articulação temporomandibular (ATM) é considerada uma das principais fontes desencadeantes de dor na região orofacial. LE RESCHE *et al.*, 1997, reportaram que 7 a 15% da população norte americana adulta é acometida por algum tipo de desordem na ATM, sendo a prevalência 1,5 a 2 vezes maior em mulheres do que em homens. Além disso, a dor na região temporomandibular é encontrada principalmente em jovens e adultos de meia-idade (18 – 44 anos), sendo explicitamente mais incidente em mulheres em idade reprodutiva

do que aquelas que estão no período pós-menopausa (LE RESCHE *et al.*, 1997).

O fato das mulheres serem mais acometidas por distúrbios na ATM, como também por uma série de outras condições dolorosas crônicas (UNRUH, 1996), sugere que os níveis de hormônios sexuais, que no sexo feminino estão sob constante variação, sejam os responsáveis por influenciar não somente o risco de determinadas patologias, como também os mecanismos neurofisiológicos envolvidos no desenvolvimento da experiência dolorosa.

Sabe-se que a dor é uma experiência complexa, que pode ser influenciada por fatores endógenos (biopsíquicos) e exógenos (sócio-culturais), sendo por esses motivos de difícil avaliação. O estudo da dor pode ser feito por diferentes modelos experimentais. Em animais são freqüentemente utilizadas as análises eletrofisiológica, que consiste no registro da atividade neuronal, eletromiográfica, na qual registra-se a atividade muscular e comportamental.

O método comportamental consiste na avaliação de respostas comportamentais estereotipadas, que são originadas a partir da administração

de agentes irritantes (por exemplo: formalina, óleo de mostarda, etc) em animais conscientes.

Especificamente para o estudo da dor na ATM foi desenvolvido por ROVERONI *et al.*, 2001, um modelo experimental para análise comportamental da dor a partir da injeção de formalina na ATM de ratos: o teste da formalina na ATM.

Considerando-se que dados epidemiológicos mostram que a dor na ATM é mais frequente no sexo feminino do que no masculino e que a literatura sugere, embora não se conheçam precisamente os mecanismos, que os hormônios sexuais têm a capacidade alterar o processamento da informação dolorosa, este trabalho teve como objetivo:

- Investigar se há influência do sexo e do ciclo estral sobre a sensibilidade à dor na ATM de ratos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS BÁSICOS DA DOR OROFACIAL

Informações sensoriais provenientes dos tecidos cutâneos, intraorais (mucosa e polpa dental), profundos (articulação e músculos) e cerebrovasculares chegam, por meio de fibras nervosas aferentes, ao sistema sensitivo trigeminal (SST). Estímulos neurais advindos de outros pares de nervos cranianos (VII, IX, X e XII) e de nervos cervicais superiores também podem chegar ao SST, caracterizando-o como uma grande estação receptora e transmissora de impulsos neurais (SESSLE, 1996).

Tratando-se dos estímulos dolorosos, sua captação e processamento determinam o caráter multidimensional da experiência dolorosa, dos quais fazem parte os aspectos sensório-discriminativo, cognitivo, afetivo e motivacional (LUND *et al.*, 2001). Para que esse processo ocorra de forma harmoniosa, deve existir uma perfeita inter-relação do sistema nervoso periférico com o sistema nervoso central.

O complexo neuroanatômico periférico necessário para a captação e transmissão de informações dolorosas provenientes da região orofacial é constituído das seguintes estruturas: os receptores sensoriais, as fibras nervosas e os neurônios de primeira ordem, cujos corpos celulares estão localizados no gânglio trigeminal (MACHADO, 1993).

Os receptores sensoriais responsáveis pela captação de estímulos nocivos mecânicos, químicos, térmicos ou elétricos nos tecidos periféricos são denominados nociceptores. Os nociceptores são terminações nervosas livres que estão presentes em vários tecidos orofaciais, tais como: pele, mucosa oral, polpa dental, periodonto, periósteo, articulação temporomandibular e músculos (AGHABEIGI, 1992; SESSLE, 1996).

Quando ativados, os nociceptores desencadeiam potenciais de ação que se propagam pelos axônios de neurônios com os quais estão relacionados. Essa descarga de impulsos para o sistema nervoso central (SNC) permite que o cérebro processe as características de intensidade, duração, qualidade e localização do estímulo nocivo (SESSLE, 2000). A intensidade e duração do estímulo nociceptivo são determinadas pela frequência e tempo de excitação da fibra aferente nociceptiva. A qualidade do estímulo está relacionada com o padrão de resposta da fibra aferente a um estímulo nocivo particular. Já a



localização do estímulo depende de uma característica periférica importante que é o campo receptivo da fibra (área de pele, mucosa ou tecidos profundos a partir do qual uma fibra aferente ou neurônio central e os receptores com que estão associados podem ser excitados por um estímulo limiar) (SESSLE, 2000).

As fibras aferentes por onde trafegam esses estímulos nociceptivos correspondem às fibras de pequeno diâmetro e baixa velocidade de condução C (amielinizada) e A-delta (mielinizada), responsáveis por prover ao cérebro informações sobre as características temporal e espacial do estímulo doloroso. Além de estímulos nocivos, essas fibras respondem também ao frio, calor e tato (SESSLE, 1996).

Há ainda uma outra fibra de grosso calibre e alta velocidade de condução denominada A-beta (mielinizada), por onde são conduzidas informações táteis e que está envolvida no processo de modulação do estímulo doloroso (AGHABEIGI, 1992; LUND *et al.*, 2001).

Essas fibras entram no SNC pela ponte e fazem sinapses com neurônios localizados no núcleo do trato espinhal do nervo trigêmeo (NTE), que é composto de três subnúcleos denominados de oral, interpolar e caudal (SESSLE, 1996).

Em sua totalidade, o complexo trigeminal é constituído por um conjunto de núcleos que abrange toda a extensão do tronco cerebral, desde o bulbo até o mesencéfalo, dentre os quais fazem parte o núcleo motor do nervo trigêmeo, núcleo mesencefálico e os núcleos que compõem o SST. Do SST fazem parte o núcleo sensitivo principal e o NTE.

Do NTE o subnúcleo caudal é o que está localizado na porção mais inferior, estendendo-se até o corno dorsal da medula espinhal cervical, fundindo-se com a mesma. Além disso, esse subnúcleo possui características semelhantes ao corno dorsal da medula espinhal, pois ambos são estruturas laminadas e apresentam uma organização quase que idêntica de seus neurônios (DUBNER, 1986; HU *et al.*, 1997; BEREITER *et al.*, 2000).

As fibras nervosas de pequeno diâmetro C e A-delta, por onde se propagam os impulsos nociceptivos, terminam nas lâminas I, II, V e VI do subnúcleo caudal. Em contraste, a fibra A-beta projeta-se para as lâminas III a VI, como também para o subnúcleo oral (SESSLE, 1995).

O subnúcleo caudal possui dois tipos de neurônios nociceptivos: os específicos, que recebem impulsos das fibras C e A-delta e respondem somente a estímulos nocivos, e os convergentes ou multirreceptivos, que recebem aferências tanto das fibras do tipo A de pequeno e grande diâmetro,

como também das fibras C e podem ser excitados por estímulos nocivos e não-nocivos (tátil). Ambos os neurônios nociceptivos específicos e convergentes estão concentrados nas lâminas superficiais (I/II) e profundas (V/VI) do subnúcleo caudal, de onde se projetam para áreas envolvidas na transmissão ou no controle do impulso doloroso (ex: tálamo ventrobasal, formação reticular, etc) (YU *et al.*, 1993; SESSLE, 1996).

Os neurônios nociceptivos do subnúcleo caudal recebem aferências de diferentes tecidos, como da pele, mucosa, ATM, músculos da mastigação, língua e dura-máter, sendo essa extensiva convergência uma das possíveis explicações tanto para a localização imprecisa de estímulos nocivos originados em tecidos profundos, como para a dor referida relacionada a esses tecidos (HU *et al.*, 1994).

A confirmação de que o subnúcleo caudal é a principal região receptora e transmissora de informações nociceptivas do SST pode ser feita a partir da apresentação de dados clínicos (SESSLE, 2000) e laboratoriais (HU *et al.*, 1994; HU *et al.*, 1997; TSAI *et al.*, 1999).

Estudos eletromiográficos têm caracterizado o envolvimento do subnúcleo caudal em respostas reflexas nociceptivas. Conexões desse subnúcleo com centros reflexos do tronco cerebral têm determinado, após a

administração de agentes irritantes na ATM, a co-contracção de músculos mastigatórios antagonísticos, como o masséter e o digástrico. Essa co-contracção pode ser uma das explicações para a diminuição da amplitude de movimento articular observada em condições patológicas que afetam a ATM e/ou os músculos da mastigação (YU *et al.*, 1994; HU *et al.*, 1994; HU *et al.*, 1997; TSAI *et al.*, 1999). Porém, quando a atividade reflexa é desencadeada por estímulos nocivos peri-orais ou intra-orais, estudos têm demonstrado um maior envolvimento dos componentes mais rostrais do NTE (SESSLE, 1996).

Certamente o subnúcleo caudal, dentre os outros subnúcleos do NTE, é o mais estudado. No entanto, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de caracterizar o envolvimento dos subnúcleos interpolar e oral nos mecanismos de dor orofacial.

Lesões nas regiões mais rostrais do NTE podem interferir no comportamento nociceptivo de ratos desencadeado por estímulos nocivos nos tecidos periorais e intraorais (SESSLE, 1995). Além disso, muitas aferências nociceptivas, provenientes tanto da polpa dental como dos tecidos cutâneos, chegam a esses subnúcleos (SESSLE, *et al.*, 1996).

Sabe-se que após a estimulação nociva periférica há o surgimento da proteína Fos nos neurônios pós-sinápticos do corno dorsal da medula espinhal

(MUNGLANI & HUNT, 1995) e no NTE (HATHAWAY *et al.*, 1995). Estudos têm utilizado esse conhecimento para determinar a localização de regiões receptoras de informações nociceptivas, como também para determinar o sítio de ação de drogas. Essa metodologia tem ajudado a reafirmar a importância dos subnúcleos interpolar e oral no processamento de informações nociceptivas advindas da região orofacial.

Com relação ao subnúcleo interpolar, HATHAWAY *et al.*, 1995, utilizaram a expressão de proteína Fos, após estimulação química nociva da ATM de ratos, para quantificar o número e a distribuição de grupos de neurônios em diferentes regiões do NTE, encontrando-os na região inferior do subnúcleo interpolar e no subnúcleo caudal, como também no corno dorsal da medula espinhal cervical superior.

BEREITER & BENETTI, 1996, através da aplicação do agente irritante óleo de mostarda na ATM de ratos – seletivo para fibras nervosas de pequeno diâmetro – demonstraram a ocorrência da liberação aguda de glutamato e aspartato dentro do pólo ventrolateral da região de transição entre o subnúcleo interpolar e o subnúcleo caudal. E em 2000, BEREITER & BEREITER, observaram que a administração central ou periférica de morfina é capaz de reduzir a expressão da c-fos, produzida pela injeção de óleo de

mostarda na ATM de ratos, na área de transição entre o subnúcleo interpolar e o subnúcleo caudal.

O componente mais rostral do NTE é o subnúcleo oral e, como dito anteriormente, tem sido caracterizado em diversos trabalhos como um elemento essencial para o processamento de impulsos dolorosos originados em tecidos periorais e intraorais (SESSLE, 1995). Fundamentos para tal importância podem ser encontrados em estudos comportamentais (YOUNG & PERRYMAN, 1984), anatômicos (FUJIYOSHI *et al.*, 2000; HE *et al.*, 2000) e eletrofisiológicos (RABOISSON *et al.*, 1995; DALLEL *et al.*, 1996).

Após serem processadas no NTE, as informações dolorosas são retransmitidas para diversas áreas do SNC, como formação reticular, núcleo do trato solitário, tálamo, córtex cerebral, córtex cerebelar, hipotálamo, etc (SESSLE, 1996). Por exemplo, sinapses com a formação reticular e estruturas adjacentes no tronco cerebral são determinantes para o desencadeamento de respostas autonômicas reflexas perante estímulos nocivos, tais como: alterações de frequência respiratória e cardíaca e mudanças na pressão arterial (SESSLE, 2000).

Apesar do grande número de intercomunicações existente entre todo o complexo trigeminal e áreas adjacentes no tronco cerebral, a principal área

de projeção do SST é o tálamo contralateral. A região talâmica ventrobasal é a responsável por receber e transmitir informações somatossensoriais provenientes dos tecidos orofaciais (SESSLE, 1996). Essa região contém neurônios nociceptivos específicos e convergentes, funcionalmente similares aos existentes no subnúcleo caudal, que ao se projetarem para áreas específicas do córtex cerebral determinam o caráter multidimensional da experiência dolorosa (SESSLE, 2000; LUND *et al.*, 2001).

Acredita-se que os neurônios que se projetam para a região cortical somatossensorial primária (S1) desempenham um importante papel na localização e discriminação do estímulo doloroso, enquanto que os que se projetam para outras áreas como hipotálamo e córtex cingulado anterior determinam o componente motivacional e afetivo da dor (SESSLE, 2000; LUND *et al.*, 2001).

A origem da sensação dolorosa, desde a captação do estímulo nocivo até a sua interpretação, depende da interação do complexo neuroanatômico periférico e central, anteriormente descrito, com um conjunto de substâncias neuroquímicas, essenciais para que todo esse mecanismo seja funcional.

Ao ocorrer uma lesão tecidual, como por exemplo na ATM, imediatamente uma série de respostas são desencadeadas pelo organismo por intermédio da liberação de substâncias, tais como: bradicinina, prostaglandinas, substância P, serotonina, histamina, fator de crescimento neural, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e outras, acarretando em alterações neuroplásticas periféricas e centrais (DRAY, 1995; SWIFT *et al.*, 1998).

Periféricamente, ao se difundirem, essas substâncias alteram o limiar de excitabilidade dos nociceptores, sendo também as responsáveis pela inflamação de tecidos adjacentes e irradiação da dor a partir do sítio de lesão. Esse processo é denominado sensibilização periférica e é considerado o principal fator que contribui para os estados de alodinia, resposta dolorosa provocada por estímulo não-nocivo e hiperalgesia, que é uma resposta aumentada perante estímulos que normalmente são dolorosos (CODERRE *et al.*, 1993; HU *et al.*, 1994).

Semelhantemente, no SNC, o aumento da liberação dessas substâncias químicas na sinapse entre as fibras periféricas e os neurônios do subnúcleo caudal, ou do corno dorsal da medula espinhal, podem promover um aumento na excitabilidade, no campo receptivo e na atividade espontânea



desses neurônios, levando ao processo conhecido por sensibilização central (SESSLE, 1995; WOOLF, 1996). Relaciona-se a esse processo a hiperalgesia secundária e as manifestações de dor difusa e referida, associadas à injúria tecidual ou à inflamação de tecidos profundos (HU *et al.*, 1994).

Um outro mensageiro intracelular envolvido nos mecanismos nociceptivos e que tem despertado grande interesse no meio científico é o óxido nítrico (ON), um gás derivado do endotélio vascular, que é formado a partir da L-arginina pela ação das ON-sintetases (YAMAMOTO *et al.*, 1993).

Na literatura o papel do ON na nocicepção é controverso, pois há autores que o relacionam com o aumento (YAMAMOTO *et al.*, 1993; HOLTHUSEN & ARNDT, 1994) ou redução da dor (DUARTE *et al.*, 1990 e 1992 a e b; FERREIRA *et al.*, 1991; BERRAZUETA *et al.*, 1993).

Todos os mecanismos neurofisiológicos até o momento apresentados estão ainda sob influência de uma série de fatores sócio-culturais e biológicos, que tomam o estudo da dor complexo, mas também bastante interessante. Entre esses fatores, tem-se direcionado grande atenção às diferenças sexuais na percepção da dor.

## 2.2. DIFERENÇAS SEXUAIS NA DOR

As diferenças sexuais na percepção da dor têm recebido nos últimos anos atenção especial por parte da comunidade científica. Além da alta prevalência do sexo feminino em uma série de condições dolorosas crônicas (UNRUH, 1996), a dor na mulher parece assumir características peculiares, sendo mais intensa, mais freqüente e de maior duração em comparação aos homens (RILEY III *et al.*, 1998; ROBINSON *et al.*, 1998). O limiar e a tolerância à dor também são menores no sexo feminino, demonstrando uma maior sensibilidade a estímulos nocivos (LAUTENBACKER & ROLLMAN, 1993; FILLINGIM & MAIXNER, 1995; FILLINGIM & NESS, 2000).

BERKLEY, 1997, sugeriu que essas diferenças seriam relativamente pequenas e de pouca significância clínica. Outros autores a relatam com moderação (RILEY *et al.*, 1998) e há grupos que defendem a idéia de que essas diferenças são expressivas (FILLINGIM & MAIXNER, 1995). A dificuldade em afirmar com veracidade qual é a opinião correta é apenas reflexo de um tema cujos processos de avaliação estão subjugados a interação de uma série de fatores endógenos (biopsíquicos) e exógenos (sócio-culturais), inerentes à própria característica multidimensional da experiência dolorosa.

Em estudos realizados em seres humanos são evidentes as influências causadas por esses fatores. O tipo de estímulo utilizado (LAUTENBACHER & ROLLMAN, 1993; FILLINGIM *et al.*, 1997; RILEY III *et al.*, 1998), o local do corpo a ser estimulado (LAUTENBACHER & ROLLMAN, 1993; FILLINGIM *et al.*, 1998), a influência do sexo do experimentador sobre o voluntário (LEVINE & DESIMONE, 1991; FILLINGIM *et al.*, 1999), a presença ou não de uma doença de base (KUCZMIERCZYK & ADAMS, 1986; HAPIDOU & DeCANTAZARO, 1988;), a pressão arterial (FILLINGIM & MAIXNER, 1996; GUASTI *et al.*, 1999), a dieta do voluntário (ZMARTY *et al.*, 1997), além de outros fatores, podem afetar a percepção e avaliação da dor.

Do mesmo modo, em estudos com animais, muitas das disparidades encontradas na literatura são provenientes de uma série de variáveis conhecidas por alterar o comportamento nociceptivo. Dentre esses fatores, deve-se considerar a idade (BODNAR *et al.*, 1988; TENG & ABBOTT, 1998), o peso (MARCKS *et al.*, 1972), a raça (DELEO & RUTKOWSKI, 2000) e a dieta do animal (FRYE *et al.*, 1992 e 1993), o teste comportamental empregado (dor de longa ou curta duração), a intensidade e o local de estimulação (MARTINEZ-GOMEZ *et al.*, 1994), o horário do dia em que são

realizados os experimentos (MARTINEZ-GOMEZ *et al.*, 1994), a temperatura ambiente (ROSLAND, 1991) e a familiarização do animal com o ambiente experimental (ALOISI *et al.*, 1994).

Porém, as maiores discussões têm sido feitas com ênfase no tipo de estímulo utilizado e na fase do ciclo ovariano da mulher (ciclo menstrual) e da rata (ciclo estral). Por esse motivo, é válida uma breve revisão sobre as variações dos níveis hormonais durante o ciclo menstrual e estral.

O ciclo ovariano da mulher dura em média 28 dias e pode ser dividido em três fases: fase folicular (ou fase pós-menstrual), fase ovulatória e fase lútea (ou fase pré-menstrual) (GUYTON, 1992; BERNE & LEVY, 1996).

A fase folicular começa com o início da menstruação. Um a dois dias antes da menstruação os níveis de FSH (hormônio foliculo estimulante) e, posteriormente, o de LH (hormônio luteinizante) começam a subir. Durante a menstruação as concentrações de FSH são maiores do que a de LH, porém ambos apresentam-se em níveis moderados durante a primeira metade da fase folicular (GUYTON, 1992; BERNE & LEVY, 1996). Estimulado pela elevação do FSH, o estrógeno começa a aumentar gradativamente, enquanto que a progesterona permanece relativamente baixa até momentos antes da ovulação. Durante a segunda metade da fase folicular os níveis de FSH caem

modestamente, enquanto que os de LH continuam a subir lentamente. Ao mesmo tempo, a secreção de estrógeno aumenta rapidamente, atingindo o seu pico imediatamente antes da ovulação (GUYTON, 1992; BERNE & LEVY, 1996).

Durante a fase ovulatória ocorre o pico de LH e FSH simultaneamente à queda dos níveis de estrógeno e também há uma leve aumento dos níveis de progesterona.

Na fase lútea a progesterona aumenta bruscamente, enquanto que as concentrações de LH e de FSH começam a declinar até atingirem os níveis mais baixos próximo do final do ciclo. Se não ocorrer fecundação, o ciclo menstrual termina quando os níveis dos esteróides sexuais atingem seus valores mais baixos e os níveis de FSH começam novamente a subir até ocorrer a menstruação (BERNE & LEVY, 1996).

Nas ratas o ciclo ovariano é constituído por quatro fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II) (FREEMAN, 1988).

Os níveis de LH, FSH e prolactina permanecem baixos durante quase todo o ciclo estral, aumentando somente na tarde do proestro. O aumento da secreção de estrógeno tem início no metaestro, atinge o pico no proestro e retorna aos valores basais no estro. Já o padrão de secreção da

progesterona é caracterizado por dois picos principais. O primeiro começa na tarde do metestro e estende-se até a manhã do diestro, enquanto que o segundo pico somente ocorre no final da tarde e noite do proestro (KALRA & KALRA, 1974; SMITH *et al.*, 1975).

Com a caracterização das variações hormonais durante o ciclo estral e menstrual, muitos trabalhos relacionados à dor têm sido desenvolvidos, gerando resultados relevantes, mas também controversos.

Alguns autores têm encontrado maior sensibilidade à dor na fase ovulatória (FILLINGIM *et al.*, 1997; GIAMBERARDINO *et al.*, 1997), outros na fase lútea (HAPIDOU & De CATANZARO, 1988; FILLINGIM *et al.*, 1997), enquanto outros durante a fase folicular (GIAMBERARDINO *et al.*, 1997; HAPIDOU & ROLLMAN, 1998). Há, também, trabalhos que não encontraram diferenças na percepção da dor através das fases do ciclo menstrual (VEITH *et al.*, 1984; KUCZMIERCZYK & ADAMS, 1986), como há aqueles que, sem considerar a fase do ciclo menstrual, reportaram maior sensibilidade à dor nas mulheres (ROBINSON *et al.*, 1998; FILLINGIM *et al.*, 1998 e 1999). Pode-se dizer que um dos principais motivos para a grande variabilidade de resultados encontrados na literatura é o tipo de estímulo

utilizado. A tabela 1 mostra os diferentes estímulos utilizados pelos autores acima citados.

RILEY III *et al.*, 1999, em um trabalho de revisão (meta-análise) mostraram que para diferentes modalidades de estímulos (pressóricos, térmicos e isquêmicos) os maiores limiares à dor em mulheres são encontrados na fase folicular quando comparada com as outras fases. Interessantemente, esse padrão não corresponde aos estímulos elétricos, onde os maiores limiares foram encontrados na fase lútea.

TABELA 1: Estímulos dolorosos em humanos.

AUTORES	ESTÍMULOS UTILIZADOS
VEITH <i>et al.</i> , 1984	Elétrico; Pressórico (gelado)
KUCZMIERCZYK & ADAMS, 1985	Pressórico
HAPIDOU & De CATANZARO, 1988	Pressórico (gelado)
FILLINGIM <i>et al.</i> , 1997	Térmico; Isquêmico
GIAMBERARDINO <i>et al.</i> , 1997	Elétrico
HAPIDOU & ROLLMAN, 1998	Pressórico
FILLINGIM <i>et al.</i> , 1998	Térmico
FILLINGIM <i>et al.</i> , 1999	Térmico

Em animais, a utilização das fases do ciclo estral das ratas como meio de investigação das diferenças sexuais na dor também têm gerado dados

conflitantes. O aumento da sensibilidade à dor tem sido encontrado durante as diferentes fases do ciclo estral: proestro (DRURY & GOLD, 1977; FRYE *et al.*, 1992; KAYSER *et al.*, 1996; VINCLER *et al.*, 2001), estro (DRURY & GOLD, 1978; MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 1994; KAYSER *et al.*, 1996), metaestro (LEER *et al.*, 1988; MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 1994; BRADSHAW *et al.*, 1999) e diestro (LEER *et al.*, 1988; BRADSHAW *et al.*, 1999). Esses resultados também parecem variar de acordo com o estímulo doloroso empregado (TAB. 2).

TABELA 2: Estímulos dolorosos em ratos.

AUTORES	ESTÍMULO UTILIZADO
DRURY & GOLD, 1977	Elétrico
LEER <i>et al.</i> , 1988	Elétrico
FRYE <i>et al.</i> , 1992	Térmico
MARTÍNEZ-GÓMEZ <i>et al.</i> , 1994	Térmico
KAYSER <i>et al.</i> , 1996	Pressórico
BRADSHAW <i>et al.</i> , 1999	Mecânico (distensão vaginal e uterina)
VINCLER <i>et al.</i> , 2001	Elétrico

Em decorrência dessa grande discrepância de dados encontrados na literatura, alguns trabalhos de revisão deixam claro a dificuldade em afirmar



com qual fase do ciclo ovariano da mulher e da rata está associada a maior sensibilidade a estímulos nocivos (DAO & LeRESCHE, 2000; FILLINGIM & NESS, 2000).

A influência de hormônios exógenos (HE) sobre as respostas dolorosas em humanos também tem sido investigada.

LeRESCHE *et al.*, 1997, em um estudo epidemiológico, observaram que com o uso de diferentes formas de hormônios exógenos (contraceptivos orais e reposição hormonal) há o aumento do risco de desordens na ATM.

Em 1998, DAO *et al.* avaliaram o padrão de dor miofascial nos músculos da mastigação durante três ciclos menstruais consecutivos entre mulheres que utilizavam ou não contraceptivos orais. No grupo que fazia uso de pílulas a dor foi mais constante e com baixa variação. Por outro lado, as mulheres que não tomavam o medicamento apresentavam, freqüentemente, picos alternados de dor e sem dor.

Em animais, a gonadectomia e a reposição hormonal têm permitido estabelecer relações interessantes entre os sistemas nociceptivo, opióide e hormonal.

Tem-se demonstrado que a reposição hormonal, em animais gonadectomizados, causa alterações no limiar de dor, podendo aumentá-lo

(BEATTY & FESSLER, 1976; DRURY & GOLD, 1977; MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 1993), diminuí-lo (DRURY & GOLD, 1977; FRYE *et al.*, 1992; DEXHEIMER & TEREZI, 2001) ou mantê-lo inalterado (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 1993 ; DEXHEIMER & TEREZI, 2001). Entretanto, essas alterações são dependentes da dose, do tempo de tratamento e do tipo de hormônio utilizado (RATKA & SIMPKINS, 1991).

Há ainda uma série de discussões a respeito da variação das respostas analgésicas com relação ao sexo.

Vários autores têm demonstrado que o sistema de analgesia no sexo feminino é mais sensível que o masculino quando são utilizados analgésicos  $\kappa$ -opióides (GORDON *et al.*, 1995; GEAR *et al.*, 1996; BINDER *et al.*, 2000). Já o sexo masculino parece ser mais sensível aos efeitos antinociceptivos da morfina (GORDON *et al.*, 1995; CICERO *et al.*, 1996 e 1997). Acredita-se que os hormônios sexuais femininos sejam os responsáveis por ativar sistema  $\kappa$ -opióide (DAWSON-BASOA & GINTZLER, 1996; CHANG *et al.*, 2000), além de alterar a sensibilidade à morfina (RATKA & SIMPKINS, 1991; ALI *et al.*, 1995).

A atual compreensão dos vários mecanismos que envolvem e influenciam o processamento do estímulo doloroso, somente tornou-se

possível a partir do desenvolvimento de modelos experimentais, tanto em animais como em humanos, nas diversas áreas de interesse do estudo da dor.

Na odontologia, principalmente através de modelos experimentais em animais, tem-se conseguido, cada vez mais, adquirir informações a respeito dos mecanismos neurofisiológicos da dor orofacial.

Para a aquisição de tais informações constata-se na literatura uma vasta utilização de técnicas eletromiográficas e eletrofisiológicas, mas a obtenção de dados também pode ser feita a partir de modelos comportamentais direcionados à região orofacial.

### **2.3. O TESTE DA FORMALINA NA ATM**

Considerado um modelo de dor inflamatória tônica e sensível a várias classes de drogas analgésicas (HUNSKAAR & HOLE, 1987; TJOLSEN *et al.*, 1992), o teste da formalina tem sido amplamente utilizado e adaptado para estudos em diferentes regiões do corpo de ratos.

Originalmente descrito por DUBUISSON e DENNIS em 1977, o teste da formalina surgiu a partir da administração subcutânea de formaldeído diluído em solução salina (formalina) na região dorsal da pata traseira de

ratos. Após a injeção da formalina foram observados comportamentos nociceptivos estereotipados, caracterizados pelos atos de lambe e levantar rapidamente a pata. Constatou-se que esses comportamentos obedecem a um padrão de respostas bifásico (WHEELER-ACETO *et al.*, 1990; TENG & ABBOTT, 1998), com um período inicial de dor intensa e de curta duração (primeira fase, 7-10 minutos) e uma segunda fase de dor moderada e persistente (1 hora).

Entre essas fases existe um período de relativa inatividade denominado de interfase (HENRY, *et al.*, 1999). Esse período de baixa atividade comportamental é atribuído a redução momentânea da atividade das fibras nervosas aferentes (PUIG & SORKIN, 1995; MCCALL, *et al.*, 1996) e a ação de mecanismos inibitórios descendentes (FRANKLIN & ABBOTT, 1993).

Associa-se a primeira fase de respostas à estimulação química direta dos nociceptores pela formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987; PUIG & SORKIN, 1995). Porém, a comprovação experimental de que nessa fase inicial há a participação de mediadores endógenos, como a bradicinina, histamina, serotonina e a substância P, questionam essa idéia (SHIBATA *et al.*, 1989; CORREA & CALIXTO, 1993; PARADA *et al.*, 2001). Já a segunda

fase parece estar relacionada com desenvolvimento do processo inflamatório local e com a sensibilização dos neurônios nociceptivos no SNC (CODERRE *et al.*, 1990; TJOlsen *et al.*, 1992).

Em 1989 CLAVELOU e colaboradores adaptaram o teste da formalina para o estudo da dor orofacial e observaram que a injeção de formalina no lábio superior de ratos é capaz de desencadear o comportamento nociceptivo de coçar a região orofacial com as patas dianteiras e às vezes com a pata traseira ipsilateral. Como no teste da formalina na pata, dois períodos de alta atividade também foram observados: primeira fase (0 a 3 minutos) e segunda fase (18 a 42 minutos após a injeção).

Apesar de ser um teste que tem sua validade garantida pela literatura científica (DALLEL *et al.*, 1995; EISENBERG *et al.*, 1996), o teste da formalina no lábio impossibilita a aquisição de conhecimentos relativos à dor proveniente de tecidos profundos, como por exemplo o muscular e o articular. Além disso, deve-se lembrar que estudos epidemiológicos comprovam que são esses tecidos as principais fontes desencadeantes de dor na região orofacial (LERESCHE *et al.*, 1997; RILEY III, *et al.*, 1998).

Considerando tais evidências, ROVERONI *et al.*, 2001, propuseram o teste da formalina na ATM. A injeção de formalina na ATM desencadeia os

comportamentos nociceptivos de coçar a região orofacial, levantar rapidamente a cabeça e tombar a cabeça para o lado injetado. Esses comportamentos foram significativamente reduzidos pela administração intraperitoneal de morfina (4mg/Kg) 30 minutos antes da injeção de formalina e pela co-administração de lidocaína, QX-314 (2%), com a formalina.

Diferentes concentrações foram testadas nesse modelo (0,5%, 1,5%, 2,5% e 5%) e os resultados mostraram que as respostas comportamentais foram maiores quando utilizadas as concentrações de 1,5% e 2,5%, que não diferiram entre si.

Tem sido descrito na literatura (WHEELER-ACETO & COWAN, 1993; ABBOT *et al.*, 1995; TAYLOR *et al.*, 1995) que a simples soma de mais de um comportamento parece ser a forma mais adequada de avaliar as respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina, uma vez que pode haver uma integração entre os comportamentos. ROVERONI *et al.*, 2001, perceberam que os animais que foram submetidos ao teste da formalina na ATM emitiram os comportamentos de coçar a região orofacial e de levantar rapidamente a cabeça de forma alternada, ora coçando, ora levantando rapidamente a cabeça. Estes comportamentos aparentemente se apresentavam de forma complementar, ou seja, os animais que ao longo do

período de observação passavam maior parte do tempo coçando a região orofacial apresentavam o comportamento de levantar rapidamente a cabeça em uma frequência proporcionalmente menor e vice-versa. Diante disso, essas respostas foram avaliadas conjuntamente, somando-se o período de tempo que os animais emitiram o comportamento de coçar com o número de vezes que os animais emitiram o comportamento de levantar a cabeça ao longo do período de observação. Para isto, estabeleceu-se que cada movimento caracterizado pelo ato de levantar rapidamente a cabeça equivaleria a um segundo.

Embora os testes da formalina na pata e no lábio sejam bifásicos, o teste da formalina na ATM apresenta uma única fase de resposta, visto que há a necessidade, mesmo que rapidamente, de anestésiar o animal com halotano para a injeção. Justifica-se a anestesia pela dificuldade de acesso a ATM, o que seria praticamente impossível de ser realizado com o animal acordado, e por ser, eticamente, o procedimento mais aceitável.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para verificar se há influência do sexo e do ciclo estral sobre a sensibilidade à dor na ATM foram realizados os seguintes grupos experimentais:

- Inicialmente os animais receberam a injeção de 50  $\mu$ L de formalina 1,5% (GRUPO I – machos; GRUPO II – fêmeas em proestro; GRUPO III – fêmeas em estro; n=10/grupo) ou NaCl 0,9% (controle) (GRUPO IV – machos; GRUPO V – fêmeas em proestro; GRUPO VI – fêmeas em estro; n=10/grupo) na ATM direita.
- Posteriormente, em grupos adicionais, foi administrado sulfato de morfina (4mg/Kg) (GRUPO VII – machos; GRUPO VIII – fêmeas em proestro; GRUPO IX – fêmeas em estro; n=5/grupo) ou NaCl 0,9% intraperitonealmente (GRUPO X– machos; GRUPO XI – fêmeas em proestro; GRUPO XII – fêmeas em estro; n=5/grupo) no volume



10mL/Kg (CLAVELOU et al., 1989), 30 minutos antes da injeção de formalina 1,5 % na ATM.

### 3.2. ANIMAIS

Os procedimentos realizados neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia/UNICAMP (CEEA - protocolo nº 136-1) (ANEXO 1).

Para o desenvolvimento deste trabalho foram submetidos ao teste da formalina na ATM (ROVERONI et al., 2001) ratos Wistar de ambos os sexos, pesando entre 200 e 350 g e com 3 a 5 meses de idade.

Os animais (provenientes da ANILAB / Paulínia - SP) foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba em gaiolas plásticas contendo maravalha (5 por gaiola) e em ambiente controlado (temperatura de  $\pm 23$  °C; ciclo claro/escuro de 12 h, com as luzes acendendo às 6:00h). Durante esse período receberam água e ração à vontade.

### 3.3. DETERMINAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL

Com relação às fêmeas foram escolhidas duas diferentes fases do ciclo estral: proestro (altos níveis hormonais) e estro (baixos níveis hormonais). A determinação dessas fases foi feita diariamente, entre 12:00 e 13:00 h, pelo método modificado do esfregaço vaginal (MARCONDES *et al.*, 2002) e somente as ratas que apresentaram ciclos regulares de 4 ou 5 dias foram utilizadas (SMITH *et al.*, 1975).

Durante no mínimo oito dias consecutivos os animais foram levados para a sala de análise comportamental e a secreção vaginal foi coletada com o auxílio de uma pipeta com ponteira plástica contendo 10  $\mu\text{L}$  de soro fisiológico. Utilizando-se de um microscópio óptico (aumento de 10 vezes) o material coletado foi observado a fresco e, a partir da proporção entre o número de células queratinizadas, epiteliais e leucócitos, foram classificadas as fases do ciclo estral (MARCONDES *et al.*, 2002).

Caracterizou-se como proestro a fase com predomínio de células epiteliais, enquanto que a fase estro foi identificada pela presença em maior proporção de células queratinizadas (HOAR & HICKMAN, 1975). As fases de metaestro (proporção semelhante dos três tipos celulares) e diestro (maior proporção de leucócitos) não foram utilizadas nesse experimento.

Para minimizar qualquer tipo de influência do estresse sobre os tratamentos acima descritos, os machos foram previamente manipulados no ambiente experimental pelo pesquisador durante 7 dias, enquanto que no caso das fêmeas o próprio esfregaço vaginal serviu como manipulação.

### 3.4. ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Os procedimentos experimentais foram realizados entre 13:00 e 17:00h em sala silenciosa e com temperatura mantida em aproximadamente 23°C (ROSLAND, 1991). Durante o teste comportamental os animais não tiveram acesso à água ou à comida.

Para a análise comportamental foi utilizada uma câmara de observação (30 cm x 30cm x 30 cm) com base e laterais espelhadas e frente de vidro. Primeiramente, cada animal era mantido nessa câmara por 30 minutos para familiarizar-se ao ambiente (ALOISE *et al.*, 1994). Após esse período de adaptação o animal era retirado da caixa e anestesiado com halotano para injeção na ATM.

A administração de NaCl 0,9% ou formalina 1,5% na ATM direita (50 µL) foi feita através de uma cânula (agulha 0,4 mm x 13 mm ligada a um

tubo de polietileno P<sub>50</sub>) conectada a uma seringa Hamilton (50 µL). A borda pósterio-inferior do arco zigomático era palpada e a agulha inserida na porção inferior da mesma, sendo avançada em direção anterior até contactar o côndilo (ROVERONI *et al.*, 2001).

Realizada a injeção, o animal era recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais nociceptivas caracterizadas pelos atos de coçar a região orofacial (segundos) e levantar rapidamente a cabeça (número de vezes) foram quantificadas por 45 minutos (15 blocos de 3 minutos) com o auxílio de um cronômetro e um contador de células, respectivamente. Avaliou-se também a incidência do comportamento de tombar a cabeça para o lado injetado nos diferentes grupos experimentais (ROVERONI *et al.*, 2001).

Os animais que são submetidos à administração de formalina na região da ATM apresentam o comportamento de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça de forma alternada, ou seja, ora coçam a região orofacial, ora levantam a cabeça. Este fato indica que existe uma forte correlação entre esses comportamentos (ROVERONI *et al.*, 2001). Assim sendo, em uma análise inicial esses dois comportamentos foram avaliados separadamente e, considerando que cada levantar de cabeça segue um padrão

uniforme de aproximadamente 1 segundo de duração, esses comportamentos também foram somados e avaliados conjuntamente (ROVERONI *et al.*, 2001). Ressalta-se que para os grupos tratados com morfina a análise foi realizada considerando-se somente a soma dos comportamentos.

### 3.5. CONFIRMAÇÃO DO LOCAL DE APLICAÇÃO DA FORMALINA

Após o término de cada análise comportamental era feita a confirmação visual do local de administração da formalina (*pos-mortem*). Para esse procedimento anestesiava-se o animal com ketamina (0,1 mL/100g) e xilazina (0,05 mL/100g) e, em seguida, o corante azul de Evans era injetado, intracardiacamente, na concentração de 1% (5mg/kg). Após dez minutos, realizava-se a perfusão cardíaca do animal com soro fisiológico para facilitar a visualização da região da ATM.

Como o azul de Evans tem a capacidade de se ligar às proteínas plasmáticas, provenientes do extravasamento plasmático induzido pela formalina, torna-se possível a confirmação visual do sítio de aplicação (HASS *et al.*, 1992).

### 3.6. SOLUÇÕES UTILIZADAS

- **Formalina 1,5%:** sempre preparada imediatamente antes do início do experimento e consiste na diluição de formaldeído a 37% em NaCl 0,9%.

↳ Solução de cloreto de sódio (NaCl 0.9%) - HALEXISTAR<sup>®</sup>.

↳ Formaldeído a 37% - SIGMA<sup>®</sup>.

- **Morfina:** 1mL de sulfato de morfina era diluído em 24mL de NaCl 0,9%. A solução era armazenada na geladeira, protegida da luz e era utilizada por, no máximo, uma semana. Ressalta-se que esta solução somente era utilizada após atingir a temperatura ambiente.

↳ Solução de cloreto de sódio (NaCl 0.9%) - HALEXISTAR<sup>®</sup>.

↳ Sulfato de morfina: Dimorf<sup>®</sup> (10mg/mL) – CRISTÁLIA.

- **Ketamina (0,1%):** Dopalen<sup>®</sup> - AGRIBRANDS

- **Xilazina (2%):** Rompun<sup>®</sup> - BAYER

- **Halotano<sup>®</sup>** - CRISTÁLIA

- **Azul de Evans<sup>®</sup>** - SIGMA.

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados foi usada a análise de variância para delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial de *Tratamento X Sexo/Ciclo Estral*. Comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Tukey e para todos os testes o nível de significância foi de 5%. Os programas utilizados para a realização dos cálculos estatísticos foram: SAS e SANEST.

Os dados referentes ao comportamento de coçar a região orofacial e à soma dos comportamentos, condizentes à primeira fase do trabalho, foram elevados a potência 0,5 (raiz quadrada) e transformados. Com relação aos grupos morfina e respectivos grupos controle foi realizada a transformação logarítmica dos dados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. INFLUÊNCIA DO SEXO E DO CICLO ESTRAL SOBRE A SENSIBILIDADE À DOR NA ATM DE RATOS

#### 4.1.1. Comportamento de coçar a região orofacial.

A análise de variância revelou que os efeitos dos fatores *Tratamento* e *Sexo/Ciclo Estral* sobre o comportamento de coçar a região orofacial foram significativos e que não houve interação entre esses dois fatores (ANEXO 2).

Com relação ao fator *Tratamento*, a administração de formalina 1,5% exacerbou de forma significativa o comportamento de coçar a região orofacial em relação à injeção de NaCl 0,9% ( $p < 0,05$ ; TAB. 3 e FIG. 5). Este efeito foi independente do sexo e da fase do ciclo estral do animal.

Quanto à influência do *Sexo/Ciclo Estral*, as fêmeas em estro apresentaram maior frequência do comportamento de coçar a região orofacial quando comparadas com as fêmeas em proestro e com os machos ( $p < 0,05$ ; TAB.4 e FIG. 6). Não houve diferença estatística entre as fêmeas em



proestro e os machos ( $p > 0,05$ ). Este efeito foi independente do tratamento empregado.

TABELA 3. Efeito do *Tratamento* sobre o comportamento de coçar a região orofacial (s). Médias com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

Tratamento	Média $\pm$ EPM	n
Controle	68,982 $\pm$ 6,49 A	30
Formalina	335,14 $\pm$ 25,36 B	30

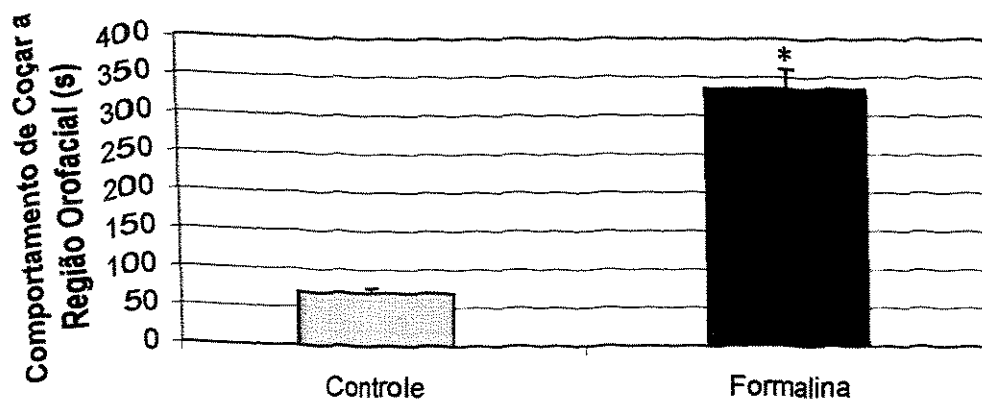


FIGURA 5. Efeito do *Tratamento* sobre o comportamento de coçar a região orofacial. Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM do período de tempo que os animais coçaram a região orofacial. \* Indica diferença estatística significativa em relação ao grupo controle.

TABELA 4. Influência do *Sexo/Ciclo Estral* sobre o comportamento de coçar a região orofacial (s). Médias com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

Sexo/Ciclo Estral	Média ± EPM	n
Fêmeas em Estro	259,06 ± 57,93 A	20
Machos	180,00 ± 40,25 B	20
Fêmeas em Proestro	166,93 ± 37,33 B	20

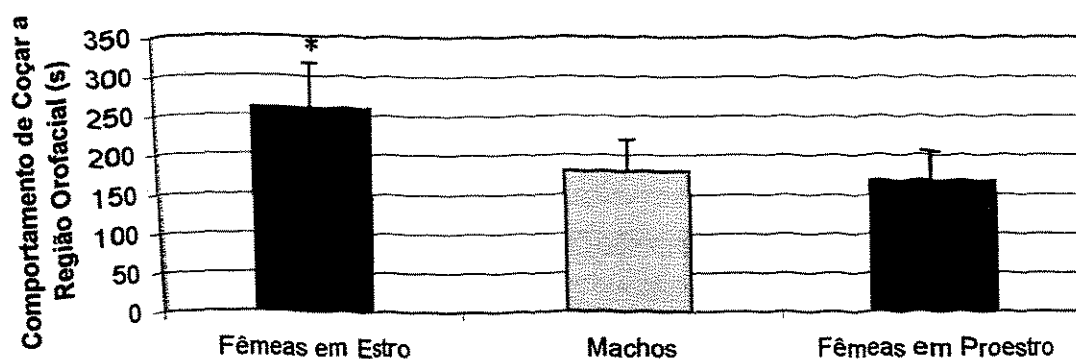


FIGURA 6. Influência do *Sexo/Ciclo Estral* sobre o comportamento de coçar a região orofacial. Cada coluna representa a média ± EPM do período de tempo que os animais coçaram a região orofacial. \* Indica diferença estatística significante em relação aos grupos de machos e fêmeas em proestro.

#### 4.1.2. Comportamento de levantar rapidamente a cabeça.

A variável levantar a cabeça não apresentou variação no grupo controle, visto que a soma de todas as contagens, efetuadas ao longo dos 45 minutos de observação, foi igual a zero. Como este comportamento somente foi evidenciado nos grupos tratados com formalina 1,5 %, a análise foi exclusivamente atribuída ao fator *Sexo/Ciclo Estral*.

A análise de variância não revelou indícios de que exista diferença estatística significativa entre as médias do comportamento de levantar rapidamente a cabeça com relação ao fator *Sexo/Ciclo Estral* ( $p = 0,3268$ ) (ANEXO 3; TAB. 5 e FIG. 7).

TABELA 5. Influência do *Sexo/Ciclo Estral* sobre o comportamento de levantar rapidamente a cabeça. Média  $\pm$  EPM do número de vezes que os animais levantaram rapidamente a cabeça.

10/Grupo	Fêmeas em Estro	Fêmeas em Proestro	Machos
NaCl 0,9%	0	0	0
Formalina 1,5%	27,3 $\pm$ 8,9	49,2 $\pm$ 13,6	46,1 $\pm$ 9,9

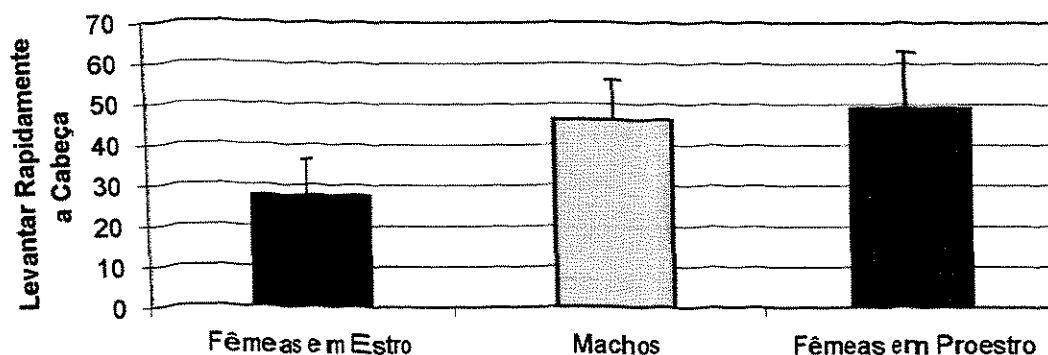


FIGURA 7. Influência do *Sexo/Ciclo Estral* sobre o comportamento de levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM do número de vezes que os animais levantaram rapidamente a cabeça.

#### 4.1.3. Avaliação da dor induzida pela administração de formalina na região da ATM de ratos através da soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

A análise de variância revelou que os efeitos dos fatores *Tratamento* e *Sexo/Ciclo Estral* sobre a soma dos comportamentos foram significativos e que não houve interação entre esses dois fatores (ANEXO 4).

Com relação ao fator *Tratamento*, observa-se que a média do grupo tratado com formalina 1,5% foi significativamente maior do que a média do grupo controle ( $p < 0,05$ ; TAB. 6 e FIG. 8).

Quanto à influência do fator *Sexo/Ciclo Estral*, a média do grupo de fêmeas em estro foi significativamente maior do que as médias dos grupos de fêmeas em proestro e de machos ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre o grupo de fêmeas em proestro e o grupo de machos ( $p > 0,05$ ; TAB. 7 e FIG. 9).

TABELA 6. Efeito do *Tratamento* sobre a soma dos comportamentos (s). Médias com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

Tratamento	Média $\pm$ EPM	n
Controle	69,0 $\pm$ 12,6 B	30
Formalina	375,9 $\pm$ 68,6 A	30

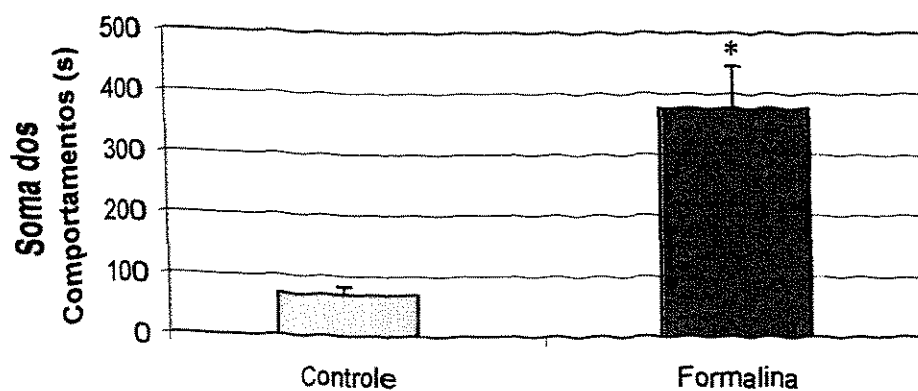


FIGURA 8. Efeito do *Tratamento* sobre a soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM da soma dos comportamentos. \* Indica diferença estatística significante em relação ao grupo controle.

TABELA 7. Influência do *Sexo/Ciclo Estral* sobre a soma dos comportamentos (s). Médias com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

Sexo/Ciclo Estral	Média ± EPM	n
Fêmeas em Estro	272,7 ± 61,0 A	20
Machos	203,1 ± 45,4 B	20
Fêmeas em Proestro	191,5 ± 42,3 B	20

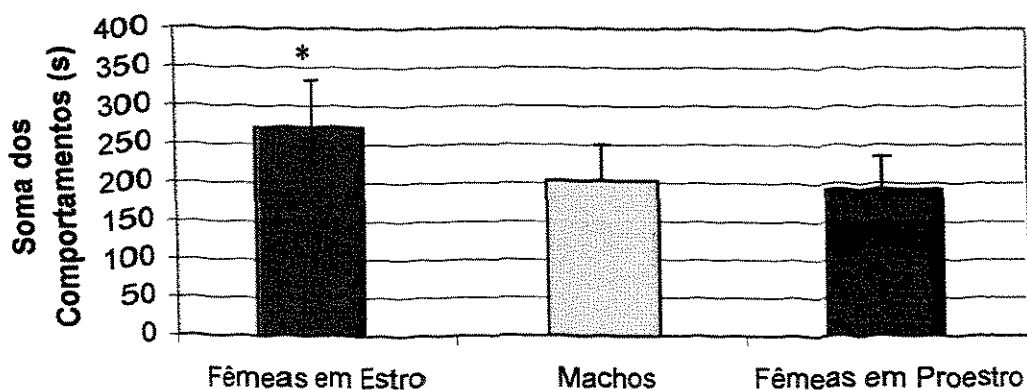


FIGURA 9. Influência do *Sexo/Ciclo Estral* sobre a soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna representa a média ± EPM da soma dos comportamentos. \* Indica diferença estatística significativa em relação aos grupos de machos e fêmeas em proestro.

#### 4.1.4. Incidência do comportamento de tombar a cabeça para o lado injetado.

Nenhum animal submetido à administração de NaCl 0,9% (50 $\mu$ L) na região da ATM apresentou o comportamento de tombar a cabeça para o lado injetado. Por outro lado, 100% dos animais submetidos à injeção de formalina 1,5% apresentaram esse comportamento (TAB. 8).

TABELA 8. Incidência do comportamento de tombar a cabeça para o lado injetado.

Grupos	Incidência	n
Controle	0%	30
Formalina 1,5%	100%	30

#### 4.1.5. Efeito da administração de morfina sobre a soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

A análise de variância revelou que houve interação entre os fatores *Tratamento e Sexo/Ciclo Estral* (ANEXO 5).

Todos os grupos que receberam a administração intraperitoneal de morfina 4mg/Kg (10ml/Kg) apresentaram redução significativa da dor induzida pela injeção de formalina 1,5% na região da ATM ( $p < 0,05$ ; TAB. 9 e FIG. 10).

Com relação ao fator *Sexo/Ciclo Estral*, as fêmeas em estro apresentaram 77% de redução do comportamento nociceptivo, enquanto que nos machos e nas fêmeas em proestro essa redução foi de 44% e 40%, respectivamente (TAB. 9 e FIG. 10).

Ressalta-se que em relação ao fator *Sexo/Ciclo Estral* não foi constatada diferença estatística significativa entre os grupos morfina ( $p < 0,05$ ).

TABELA 9. Efeito do *Tratamento* e do *Sexo/Ciclo Estral* sobre a soma dos comportamentos (s) (média  $\pm$  EPM). Médias na vertical com letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey.

5/Grupo	Fêmeas em Estro	Fêmeas em Proestro	Machos
<b>Controle</b>	548,43 $\pm$ 83,3 A	255,76 $\pm$ 28,4 A	360,39 $\pm$ 42,3 A
<b>Morfina</b>	128,34 $\pm$ 23,1 B	152,11 $\pm$ 15,9 B	205,6 $\pm$ 34,2 B



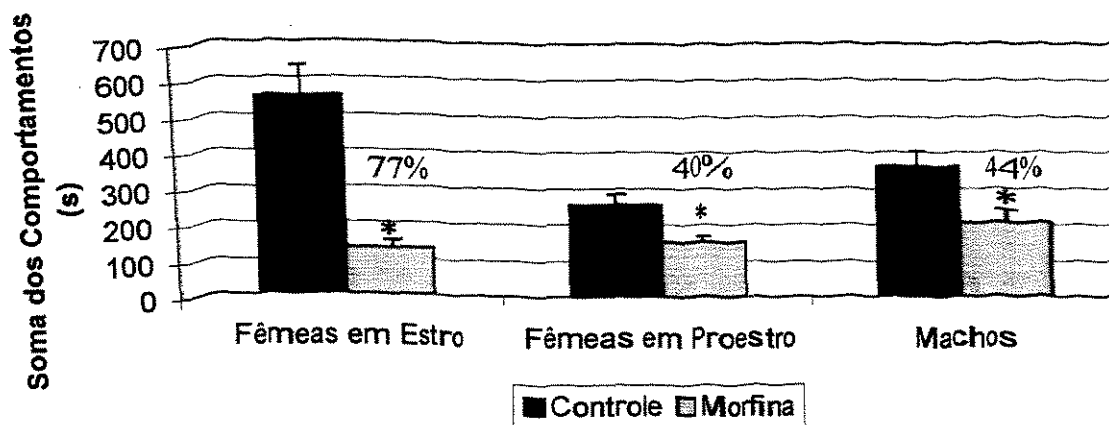


FIGURA 10. Influência do *Tratamento* e do *Sexo/Ciclo Estral* sobre a soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM da soma dos comportamentos. \* Indica diferença estatística significativa em relação aos respectivos grupos controle.

#### 4.1.6. Incidência do comportamento de tombar a cabeça para o lado injetado nos grupos tratados com morfina.

Nenhum animal submetido à administração de sulfato de morfina apresentou o comportamento de tombar a cabeça para o lado injetado após a injeção de formalina 1,5% na região da ATM. Por outro lado, 100% dos animais submetidos à injeção intraperitoneal de NaCl 0,9% (controle) apresentaram esse comportamento (TAB. 10).

TABELA 10. Incidência do comportamento de tombar a cabeça para o lado injetado.

<b>Grupos</b>	<b>Incidência</b>	<b>N</b>
Controle	100%	15
Morfina	0%	15

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que as fêmeas em estro são mais sensíveis à administração de formalina 1,5% na região da ATM do que os machos e as fêmeas em proestro, que não diferiram entre si. Os nossos dados concordam com os de outros autores que encontraram diferença na percepção da dor entre machos e fêmeas (ALOISE *et al.*, 1994; BRADSHAW *et al.*, 2000), sendo que entre as fêmeas a maior sensibilidade foi observada durante a fase estro (DRURY & GOLD, 1977; MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 1994) e a menor na fase proestro (DRURY & GOLD, 1977; FRYE *et al.*, 1992 e 1993; MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 1994).

A administração de formalina 1,5% na região da ATM produziu comportamentos nociceptivos estereotipados, caracterizados pelos atos de tombar a cabeça para o lado injetado, levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial.

O comportamento de coçar a região orofacial variou significativamente em função do sexo e do ciclo estral. As fêmeas em estro, independente do *Tratamento* empregado (formalina 1,5% ou NaCl 0,9% na

ATM), coçaram mais a região orofacial do que os machos e as fêmeas em proestro, não havendo diferença entre esses dois últimos grupos.

Para explicarmos como as fêmeas em estro apresentaram maior atividade desse comportamento, devemos primeiramente distinguir o que foi observado no grupo que recebeu NaCl 0,9% do que foi desencadeado no grupo tratado com formalina 1,5%.

O comportamento de coçar e lamber (*grooming*) em mamíferos, que não está relacionado à resposta dolorosa (injeção de NaCl 0,9 %), consiste de episódios altamente organizados de cuidado com a pelagem, que também são responsáveis pela homeostasia e sobrevivência do animal (JOLLES *et al.*, 1979; MOORING *et al.*, 1996; VOSS *et al.*, 1998). No caso dos roedores o ato de coçar é realizado no sentido rostrocaudal, iniciando-se na região orofacial com seqüências estereotipadas e simétricas, transitando de uma região do corpo para outra (VOSS *et al.*, 1998). Tem-se demonstrado que em ratos esse comportamento é exacerbado nas fêmeas em estro, quando comparada com as outras fases, e que essa variação na intensidade de resposta pode ser atribuída às alterações morfofuncionais que ocorrem em regiões específicas do SNC, como, por exemplo, no hipotálamo (SCIMONELLI *et al.*, 1999).

Já o comportamento de coçar, quando desencadeado por estímulos nocivos, apresenta uma organização diferente da descrita acima. Os animais direcionam esse ato principalmente à região do corpo com dor (DUBUISSON & DENNIS, 1977; CLAVELOU *et al.*, 1989) com o objetivo aparente de remover a causa da dor. No caso do teste da formalina, seja no lábio (CLAVELOU *et al.*, 1989) ou na ATM (ROVERONI *et al.*, 2001), os animais coçam a região orofacial de forma assimétrica com a pata dianteira, freqüentemente acompanhada da pata contralateral e eventualmente com a pata traseira ipsilateral. Deve-se considerar também que o comportamento de coçar relacionado a estímulos não nocivos ocorre aleatoriamente durante o período de observação. Diferentemente, no teste da formalina no lábio e na ATM a freqüência com que ocorre esse comportamento obedece a um padrão de evolução temporal bastante organizado (CLAVELOU *et al.*, 1989; ROVERONI *et al.*, 2001).

Acreditamos que os baixos níveis de hormônios ovarianos durante a fase estro (SMITH *et al.*, 1975) sejam os responsáveis pela maior freqüência do comportamento nociceptivo de coçar a região orofacial durante esta fase. Muitas especulações têm sido feitas com relação ao papel dos esteróides sexuais nos processos de nocicepção e antinocicepção. Entretanto, os

mecanismos pelos quais esses processos interagem com o sexo e com as diferentes fases do ciclo menstrual ou estral ainda não estão bem definidos (FILLINGIM & NESS, 2000).

Como o comportamento nociceptivo de coçar a região orofacial nos machos não diferiu das fêmeas em proestro, pode-se sugerir que os hormônios sexuais têm a capacidade de modular essa resposta. Trabalhos realizados com machos mostraram que a orquidectomia causa redução do limiar de dor, que é restituído com a reposição desse hormônio (BEATY *et al.*, 1976) e reduz a analgesia opióide e não-opióide induzida por estresse (MOGIL *et al.*, 1993). Observa-se também que o limiar de dor em ratas está aumentado quando os níveis de hormônios ovarianos estão elevados (como durante a gravidez) e que esta redução de sensibilidade é abolida quando se administra o antagonista opióide naltrexone, sugerindo que este sistema é opióide-dependente (GINTZLER & BOHAN, 1990).

Há ainda outros estudos que indicam que, em situações como a gravidez, são os receptores kapa e delta opióide os responsáveis pela antinocicepção e que o estrógeno e a progesterona são os responsáveis por modular esses receptores, como também a concentração da dinorfina ( $\kappa$ -opióide endógeno) na medula espinhal (MEDINA *et al.*, 1993a ; DAWSON-

BASOA & GINTZLER, 1996 e 1998). Além disso, recentemente foi demonstrado que o tratamento prolongado de machos com estrógeno e progesterona produz antinocicepção (LIU & GINTZLER, 2000).

Embora ratos de ambos os sexos, quando tratados com estrógeno e progesterona, apresentem respostas antinociceptivas análogas, o substrato neurobiológico e o mecanismo envolvido nesse processo apresentam diferenças significativas. Nas ratas esse efeito antinociceptivo é dependente da ativação simultânea dos sistemas opióides kapa e delta e é potencializado pela ativação de receptores  $\alpha_2$  noradrenérgicos. Já nos ratos é necessária a ativação de receptores opióides kapa e mu, que agem independentemente e aditivamente para contribuir com a antinocicepção. (LIU & GINTZLER, 2000).

O comportamento de tombar a cabeça para o lado injetado foi constatado em todos os animais submetidos à administração de formalina na região da ATM e abolido nos grupos tratados com morfina, caracterizando-o como uma resposta exclusivamente dolorosa. Sabe-se que os animais emitem este comportamento de forma lenta e progressiva ao longo do experimento, o que impossibilita avaliá-lo de um outro modo que não seja pela incidência (ROVERONI *et al.*, 2001). Porém, a análise do comportamento de tombar a

cabeça apenas pela incidência não permite detectar diferenças em relação ao sexo e/ou ciclo estral.

Quanto ao comportamento de levantar rapidamente a cabeça, embora o mesmo tenha sido emitido apenas pelos animais tratados com formalina, caracterizando-o também como uma resposta exclusivamente dolorosa, a análise estatística não revelou diferenças com relação ao sexo e ciclo estral. A frequência com que esse comportamento se manifesta parece estar associada a fatores intrínsecos e individuais, pois os valores individuais da amostra variaram significativamente em torno da média, resultando num alto coeficiente de variação (85%). Esse foi um dos principais fatores para não se ter encontrado diferença estatística entre os diferentes grupos. Os nossos dados concordam com a observação feita por ROVERONI *et al.*, 2001, de que os animais que passavam mais tempo coçando a região orofacial apresentavam o comportamento de levantar rapidamente a cabeça em uma frequência proporcionalmente menor e vice-versa. Como descrito acima, o comportamento nociceptivo de coçar a região orofacial foi significativamente mais evidente nas fêmeas em estro ( $259,06 \pm 57,93$  s), grupo este que emitiu menos vezes o comportamento de levantar rapidamente a cabeça ( $27,3 \pm 8,9$  vezes). O mesmo tipo de relação ocorreu com os grupos de fêmeas em



proestro ( $166,93 \pm 37,33s$  versus  $49,2 \pm 13,6$  vezes) e de machos ( $180,00 \pm 40,25$  s versus  $46,1 \pm 9,9$  vezes), evidenciando que estas respostas se apresentam de forma complementar e que a análise isolada de um único comportamento não é a forma mais adequada de se avaliar o quanto foi intensa a experiência dolorosa para o animal.

Tem sido descrito na literatura (WHEELER-ACETO & COWAN, 1993; ABBOT *et al.*, 1995; TAYLOR *et al.*, 1995) que a simples soma de mais de um comportamento parece ser o modo mais adequado de avaliar as respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina, uma vez que pode haver uma interação entre os comportamentos.

Pela análise conjunta dos comportamentos nociceptivos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça, constatamos que as fêmeas em estro foram mais sensíveis ao teste da formalina na ATM que os machos e as fêmeas em proestro, o que foi comprovado pelos grupos tratados com morfina.

O comportamento nociceptivo (soma), induzido pela administração periarticular de formalina 1,5%, foi significativamente reduzido nos grupos de machos e fêmeas (estro e proestro) pelo pré-tratamento com a morfina. Há outros trabalhos em animais que confirmam a capacidade da morfina reduzir

significativamente comportamentos nociceptivos desencadeados na região orofacial pela injeção de formalina (CLAVELOU *et al.*, 1989; EISENBERG *et al.*, 1996; ROVERONI *et al.*, 2001).

Em relação ao sexo e ciclo estral não houve diferença significativa na comparação dos grupos tratados com morfina, ou seja, a dose empregada foi capaz de reduzir a resposta comportamental (soma), em todos os grupos, a níveis semelhantes. Este resultado sugere que provavelmente a dose de morfina utilizada tenha sido alta, embora seja mais baixa que a dose utilizada por CLAVELOU *et al.*, 1989, que administrou formalina no lábio, um tecido superficial. Entretanto, sabe-se que esta dose não tem a capacidade de comprometer a atividade locomotora do animal (DUBUISSON & DENNIS, 1977), o que nos garante que toda a redução comportamental observada está relacionada a processos estritamente dolorosos. Diante disso, podemos afirmar que as fêmeas em estro são mais sensíveis ao teste da formalina na ATM por terem apresentado maior resposta dolorosa (avaliada pela soma dos comportamentos) e maior redução dessa resposta pela morfina (77% de redução), quando comparadas com os machos (44%) e as fêmeas em proestro (40%).

A maior redução da resposta comportamental nociceptiva pela morfina no grupo de fêmeas em estro nos dá indícios de que nessa fase do ciclo estral as ratas sejam mais sensíveis às propriedades antinociceptivas desta droga.

Neste trabalho as sessões experimentais foram realizadas entre 13:00 e 18:00 horas. Sabe-se que durante esse período, no proestro, ocorre o pico pré-ovulatório de LH (KALRA & KALRA, 1974; SMITH *et al.*, 1975). Associa-se a esse pico de LH a dessensibilização dos receptores opióides do tipo mu e, em menor intensidade, dos receptores do tipo delta (BERLUNG *et al.*, 1988). Efeitos similares foram encontrados em ratas ovariectomizadas tratadas seqüencialmente com estrógeno e progesterona para induzir variações na concentração de LH semelhantes às encontradas na tarde do proestro (BERLUNG & SIMPKINS, 1988). Como nas fêmeas em estro são encontrados os níveis mais baixos de LH, esse talvez seja o motivo pelo qual nessa fase a morfina tenha sido mais eficaz.

Um outro mecanismo que poderia explicar uma menor sensibilidade à morfina nas fêmeas em proestro, enquanto que o oposto nas fêmeas em estro, baseia-se na idéia de que o aumento do conteúdo de dinorfina, que está associado aos elevados níveis de estrógeno e progesterona (GINTZLER &

BOHAN, 1990; MEDINA, 1993a e b), possa desencadear o mecanismo de ação antianalgésico dos receptores kapa opióides proposto por PAN e colaboradores em 1997.

Estudos eletrofisiológicos têm identificado em regiões do tronco cerebral relacionadas com o sistema de modulação da dor, populações de neurônios denominados de primários e secundários e que esses neurônios estão associados aos receptores kapa e mu, respectivamente (PAN *et al.*, 1997; VAUGHAN *et al.*, 1999). Os neurônios primários contêm serotonina e quando ativados resultam em antinocicepção, entretanto, recebem impulsos inibitórios dos neurônios secundários (impulsos GABAérgicos) (PAN *et al.*, 1993). Os neurônios secundários facilitam a transmissão da dor e podem ser diretamente inibidos por agonistas de receptores mu opióides, o que conseqüentemente levaria a excitação dos neurônios primários, por minimizar o efeito inibitório do sistema GABAérgico. (VAUGHAN *et al.*, 1999; FIG. 11).

PAN *et al.*, 1997, em um estudo comportamental (tail-flick - estímulos térmicos) desenvolvido em ratos, demonstraram que o agonista opióide kapa U69593 atenua significativamente a analgesia produzida pelo agonista opióide mu DAMGO, pois além de inibir diretamente os neurônios primários, também reverte a desinibição e analgesia produzida via receptor

mu. Além disso, nesse mesmo trabalho em um estudo eletrofisiológico, foi proposto que os neurônios primários podem ser hiperpolarizados pela ação da dinorfina.

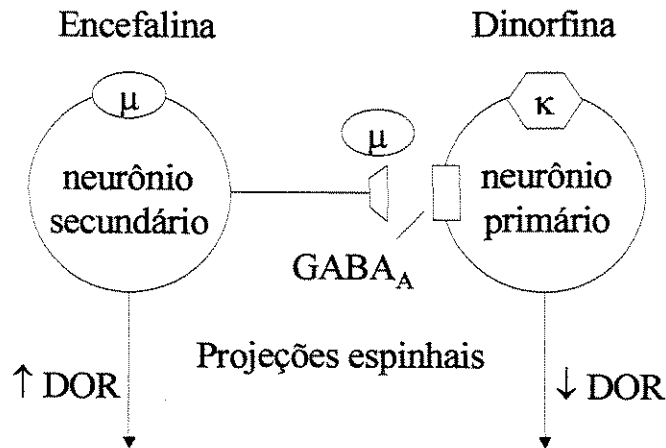


FIGURA 11. Sistema de interação oposta entre receptores agonistas opióides mu e kapa..

FONTE: PAN *et al.*, 1997, p. 384.

Entretanto, TERSHNER *et al.*, 2000, utilizando-se do mesmo modelo comportamental (*tail-flick*) em ratos de ambos os sexos, encontraram que nas fêmeas a administração do agonista opióide kapa U69593 além de não ser capaz de antagonizar o efeito antinociceptivo do DAMGO (agonista seletivo para receptor mu), o potencializa. Porém, esses autores não consideraram as fases do ciclo estral e decorrentes alterações hormonais, o que seria de grande importância, visto que experimentos têm demonstrado que o

efeito analgésico da morfina é reduzido em ratas ovariectomizadas submetidas à reposição hormonal com estrógeno e/ou progesterona (RATKA & SIMPKINS, 1991; ALI *et al.*, 1995) e em ratas na fase de proestro (VINCLER *et al.*, 2001). Além disso, sabe-se que a expressão dos receptores kapa e mu pode ser influenciada pelas variações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral (CASULARI *et al.*, 1987; MAGGI *et al.*, 1993; CHANG *et al.*, 2000)

O fato de que o número de receptores opióides kapa (CHANG *et al.*, 2000) e mu (CASULARI *et al.*, 1987; MAGGI *et al.*, 1993) é maior durante o proestro e estro do que nas outras fases do ciclo estral, que no grupo de fêmeas em estro não há pico do LH (SMITH *et al.*, 1975) e que o conteúdo de dinofirina está associado a elevados níveis hormonais (MEDINA, 1993a e b), poderia justificar uma maior sensibilidade à morfina nas fêmeas em estro.

Entretanto, para comprovar como o sexo e ciclo estral interferem na sensibilidade à morfina, seria necessário um estudo complementar que envolvesse diferentes concentrações de morfina. Com isso, seria obtida uma curva dose-resposta que permitiria uma análise quantitativa mais adequada.

De um modo geral, observamos que o teste da formalina na ATM é um modelo que permite detectar diferenças nociceptivas em função do sexo e do ciclo estral. Além disso, levando-se em consideração que os dados

encontrados na literatura a respeito das diferenças sexuais na dor são provenientes de estudos direcionados à região de tronco e membros, o teste da formalina na ATM surge como uma válida opção para o desenvolvimento de futuras pesquisas que visem esclarecer os mecanismos pelos quais o sexo e as variações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral interferem nos processo de modulação da dor orofacial.

## **6. CONCLUSÃO**

- Este estudo mostrou que o teste da formalina na ATM permite detectar diferenças na sensibilidade à dor em função do sexo e do ciclo estral.
- As fêmeas em estro são mais sensíveis ao teste da formalina na ATM.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

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

AGHABEIGI, B. The pathophysiology of pain. **Br Dent J**, London, v.173, n.3, p.91-96, Aug. 1992.

ALI, B.H.; SHARIF, S.I.; ELKADI, A. Sex difference and the effect of gonadectomy on morphine-induced antinociception and dependence in rat and mice. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, Victoria, v.22, p.342- 344, 1995.

ALOISI, A.M.; ALBORNETTI, M.E.; CARLI, G. Sex differences in the behavioural response to persistent pain in rats. **Neurosci Lett**, Limerick, v.179, p.79-82, Aug. 1994.

BEATY, W.W.; FESSLER, R.G. Gonadectomy and Sensitivity to electric shock in the rat. **Physiol Behav**, Elmsford, v.19, p.1-6, 1976.

BEREITER, D.A.; BENETTI, A.P. Excitatory amino release within spinal trigeminal nucleus after mustard oil injection into the temporomandibular joint region of the rat. **Pain**, Amsterdam, v.67, n.2/3, p.451-459, Oct. 1996.

BEREITER, D.A.; BEREITER, D.F. Morphine and NMDA receptor antagonism reduce c-fos expression in spinal trigeminal nucleus produced by acute injury to the TMJ region. **Pain**, Amsterdam, v 85, p.65-77, Sept. 2000.

---

\* Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

BEREITER, D.A.; HIRATA, H.; HU, J.W. Trigeminal subnucleus caudalis: beyond homologies with the spinal dorsal horn. **Pain**, Amsterdam, v.88, p.221-224, 2000.

BERLUNG, L. A.; DERENDORF, H.; SIMPKINS, J. W. Desensitization of brain opiate receptor mechanisms by gonadal steroid treatments that stimulate luteinizing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 122, n. 6, p. 2718 – 2726, 1988.

BERGLUND, L.A.; SIMPKINS, J.W. Alterations in brain opiate receptor mechanism on proestrous afternoon. **Neuroendocrinology**, Basel, v.48, p.394-400, 1988.

BERKLEY, K.J. Sex difference in pain. **Behav Brain Sci**, Cambridge, v.20, n.3, p.371-380, Sept. 1997.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. As glândulas reprodutoras. *In*: BERBE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**: 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, cap. 51, p. 920 – 961.

BERRAZUETA, R.J. *et al.* Acción analgésica periférica del donador exógeno de óxido nítrico: nitroglicerina. Estudio control frente a placebo de la acción de la nitroglicerina transdérmica sobre la sensibilidad dolorosa en el antebrazo. **Rev Esp Cardiol**, Barcelona, v.46, p.10-14, 1993.

BINDER, W.; CARMODY, J.; WALKER, J. Effect of gender on anti-inflammatory and analgesic actions of two  $\kappa$ -opioids. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimore, v.292, n.1, p.303-309, 2000.

BODNAR, T.J.; TOMERO, M.T.; KRAMER, E. Organismic variables and pain inhibition: role of gender and aging. **Brain Res Bull**, New York, v.21, p.947-953, 1988.

BONICA, J. J. History of pain concepts and therapies. *In*: BONICA, J. J. **The management of pain**. 2. ed. Philadelphia: LEA & FEBIGER 1990, 1990. Section A – Fundamental Considerations, n. 1, p. 2 – 17.

BRADSHAW, H.B. *et al.* Estrous variations in behavioral responses to vaginal and uterine distention in the rat. **Pain**, Amsterdam, v.82, n.2, p.187-197, Aug. 1999.

BRADSHAW, H. *et al.* Sex difference and phases of estrous cycle alter the response of spinal cord dynorphin neurons to peripheral inflammation and hyperalgesia. **Pain**, Amsterdam, v.85, n.1/2, p.93-99, Mar. 2000.

CAILLIET, R. **Dor**: mecanismos e tratamentos. 1. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. 312 p.

CASTILLO OJUGAS, A. **A dor através da história e da arte**: 1. ed. Cleveland: Atlas Medical Publishing Ltd, 1999. 159 p.

CASULARI, L.A. Effect of oestrous cyclicity on the number of brain opioid mu receptors in the rat. **Horm Metab Res**, Stuttgart, v.19, p.549-554, 1987.

CHANG, C.P.; AICHER, S.A.; DRAKE, C.T. Kappa opioid receptors in rat spinal cord vary across the estrous cycle. **Brain Res**, Amsterdam, v.861, p.168-172, 2000.

CICERO, T.J.; NOCK, B.; MEYER, E.R. Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimore, v.272, n.2, p.767-773, 1996.

- CICERO, T.J.; NOCK, B.; MEYER, E.R. Sex-related differences in morphine's antinociception activity: relationship to serum and brain morphine concentrations. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimore, v.282, n.2, p.939-934, 1997.
- CLAVELOU, P. *et al.* Applications of the formalin test the study of orofacial pain in the rat. **Neurosci Lett**, Limerick, v.103, n.3, p.349-353, Sept. 1989.
- CODERRE, T.J. *et al.* Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Res**, Amsterdam, v.535, n.1, p.155-158, Dec. 1990.
- CODERRE, T.J. *et al.* Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, Amsterdam, v.52, n.3, p.259-258, Mar. 1993.
- CORREA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B1 and B2 receptors in formalin-induced nociceptive response in mouse. **Br J Pharmacol**, London, v.110, p.193-198, 1993.
- DALLEL, R. *et al.* Effects of systemic morphine on the activity of convergent neurons of spinal trigeminal nucleus oralis in the rat. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.314, p.19-25, 1996.
- DALLEL, R. *et al.* Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**, Amsterdam, v.61, p.11-16, 1995.
- DAO, T.T.; KNIGHT, K.; Ton-THAT, V. Modulation of myofacial pain by the reproductive hormones: a preliminary report. **J Prosthet Dent**, Saint Louis, v.79, n.6, p.663-670, 1998.

DAO, T.T.; LeRESCHÉ, L. Gender differences in pain. **J Orofac Pain**, Carol Stream, v.14, n.3, p.169-184, Summer 2000.

DAWSON-BASOA, M.E.; GINTZLER, A.R. Estrogen and progesterone activate spinal kappa-opiate receptor analgesic mechanisms. **Pain**, Amsterdam, v.64, p.169-177, 1996.

DAWSON-BASOA, M.E.; GINTZLER, A.R. Gestational and ovarian sex steroid antinociception: synergy between spinal  $\kappa$  and  $\delta$  opioid system. **Brain Res**, Amsterdam, v.794, p.51-67, 1998.

DELEO, J.A.; RUTCOWSKI, M.D. Gender differences in rat neuropathic pain sensitivity is dependent on strain. **Neurosci Lett**, Limerick, v.282, p.197-199, 2000.

DEXHEIMER, J.; TERENCE, M. G. Efeito dos hormônios gonadais no limiar nociceptivo em ratas ovariectomizadas. In: FeSBE, 2001, Caxambu. **Anais...Caxambu**, 2001. Resumo 01.138.

DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.186, p.289-293, 1990.

DUARTE, I.D.G.; FACCIOLI, L.H.; FERREIRA, S.H. Blockade of the peripheral pain sensory system via the L-arginine: nitric oxide: cyclic GMP pathway. In: INTERNATIONAL MEETING ON THE BIOLOGY OF NITRIC OXIDE, 2., 1991, London. **Proceedings...** London : Portland Press, 1992a p.258-260.

DUARTE, I.D.G. *et al.* Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.217, p.225-227, 1992b.

DUBNER, R. Pain control in dentistry: anatomic and physiologic basis of orofacial pain. **Pain**, Amsterdam, v.8, n.6, p.408-416, June 1986.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, Amsterdam, v.4, n.2, p.161-174, 1977.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth**, London, v.75, p.125-131, 1995.

DRURY, R.A.; GOLD, R.M. Differential effects of ovarian reactivity to electric footshock in the rat. **Physiol Behav**, Elmsford, v.20, p.187-191, 1978.

EISENBERG, E.; VOS, B.P.; STRASSMAN, A.M. The peripheral antinociceptive effect of morphine in a rat model of facial pain. **Neuroscience**, Washington, v.72, n.2, p.519-525, 1996.

FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulations of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.201, p.121-122, 1991.

FILLINGIM, R.B.; MAIXNER, E. Gender differences in response to noxious stimuli. **Pain Forum**, London, v.4, p.209-221, 1995.

FILLINGIM, R.B.; MAIXNER, W. The influence of resting blood pressure and gender on pain responses. **Psychosom Med**, Baltimore, v.58, n.4, p.326-332, July/Aug. 1996.

FILLINGIM, R.B.; NESS, T.J. Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. **Neurosci Biobehav Rev**, New York, v.24, p.485-501, 2000.

FILLINGIM, R.B. *et al.* Ischemic but not thermal pain sensitivity varies across the menstrual cycle. **Psychosom Med**, Baltimore, v.59, n.5, p.512-520, Sept./Oct. 1997.

FILLINGIM, R.B. *et al.* Sex differences in temporal summation but not sensory-discriminative processing of thermal pain. **Pain**, Amsterdam, v.75, p.121-127, 1998.

FILLINGIM, R.B. *et al.* The relationship of sex and clinical pain to experimental pain responses. **Pain**, Amsterdam, v.83, p.419-425, 1999.

FRANKLIN, K.B.J.; ABBOTT, F.V. Pentobarbital, diazepam and ethanol abolish the inter-phase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABA<sub>A</sub> receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, New York, v.46, p.661-666, 1993.

FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of rat. *In*: KNOBIL, E.; NEILL, J. *et al.* **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1988. chap.45, p.1898-1919.

FRYE, C.A.; BOCK, B.C.; KANAREK, R.B. Hormonal milieu affects tailflick latency in female rats and may be attenuated by access to sucrose. **Physiol Behav**, Elmsford, v.52, p.699-706, 1992.

FRYE, C.A.; CUEVAS, C.A.; KANAREK, R.B. Diet and estrous cycle influence pain sensitivity in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, New York, v.45, p.255-260, 1993.

FUJIYOSHI, Y. *et al.* The difference in temporal distribution of c-Fos immunoreactive neurons between the medullary dorsal horn and the trigeminal subnucleus oralis in the rat following experimental tooth movement. **Neurosci Lett**, Limerick, v.283, p.205-208, 2000.

GEAR, R.W. *et al.* Kappa-opioids produce significantly greater analgesia in women than in men. **Nat Med**, New York, v.2, n.11, p.1248-1250, Nov. 1996.

GIAMBERARDINO, M.A. *et al.* Pain threshold variations in somatic wall tissues as a function of menstrual cycle, segmental site and tissue depth in nondysmenorrheic women, dysmenorrheic women and men. **Pain**, Amsterdam, v.71, p.187-197, 1997.

GINTZLER, A.R.; BOHAN, M.C. Pain threshold are elevated during pseudopregnancy. **Brain Res**, Amsterdam, v.507, p.312-316, 1990.

GORDON, N.C. *et al.* Enhancement of morphine analgesia by GABA agonist baclofen. **Neuroscience**, Washington, v.69, p.345-349, 1995.

GUASTI, L. *et al.* Relationship between a genetic predisposition to hypertension, blood pressure levels and pain sensitivity. **Pain**, Amsterdam, v.82, p. 311-317, 1999.

GUYTON, A. C. Fisiologia feminina antes da gravidez e hormônios femininos. In: GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**: 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 81, p.792 – 805.

HAPIDOU, E.G.; CANTAZARO, D.D. Sensitivity to cold pressor pain in dysmenorrheic and non-dysmenorrheic women as a function of menstrual cycle phase. **Pain**, Amsterdam, v.34, p.277-283, 1988.



- HAPIDOU, E.G.; ROLLMAN, G.B. Menstrual cycle modulation of tender points. **Pain**, Amsterdam, v.77, p.151-161, 1998.
- HASS, D. A. Development of an orofacial modelo of acute inflammation im rat. **Arch Oral Biol, Oxford**, v. 37, n.5, p. 417 – 322, 1992.
- HATHAWAY, C.B.; HU, J.W.; BEREITER, D.A. Distribution of Fos-like imunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the temporomandibular joint. **J Comp Neurol**, New York, v.335, n.3, p.444-456, June 1995.
- HE, Y.; ICHIKAWA, H.; SUGIMOTO, T. The effect of neonatal capsaicin on the c-Fos-like immunoreactivity induced in subnucleus oralis neurons by noxious intraoral stimulation. **Brain Res**, Amsterdam, v.860, p.203-207, 2000.
- HENRY, J.L. *et al.* Physiological evidence that the “interphase” in the formalin test is due to active inhibition. **Pain**, Amsterdam, v.82, p.56-63, 1999.
- HOAR, W.; HICKMAN, C. P. **General and comparative physiology**, 260 – 265, Prentice-Hall, New Jersey, USA, 1975.
- HOLTHUSEN, H.; ARNDT, J.O. Nitric oxide evokes pain in human intracutaneous injection. **Neurosci Lett**, Limerick, v.165, p.71-74, 1994.
- HU, J.M. *et al.* Electromiographic and trigeminal brainstein neuronal changes associated with inflammatory irritation of superficial and deep craniofacial tissues in rats. *In*: GEBHART, G.F.; HAMMOND, D.L.; IENSEN, T.S. (Ed.) **Proceedings of the 7<sup>th</sup> World Congress on Pain** : progress in pain research and managment. Seattle : IASP Press, 1994. v.2

HU, J.W. *et al.* Deep craniofacial pain: involvement of trigeminal subnucleus caudalis and its modulation. *In: JENSEN, T.S.; TURNER, J.A.; WIESENFELD-HALLIN, Z. (Ed.) Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Congress on Pain : progress in pain research and managment.* Seattle : IASP Press, 1997. v.8

HUNSKARR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, Amsterdam, v.30, n.1, p.104-114, July 1987.

JOLLES, J.; ROMPA-BARENDREGT, J.; GISPEN, W.H. Novelty and grooming behavior in the rat. **Behav Neural Biol**, New York, v.23, p.563-572, 1979.

KALRA, S.P.; KALRA, P.S. Temporal interrelationships among circulating levels of estradiol, progesterone and LH during the rat estrous cycle: effects of exogenous progesterone. **Endocrinology**, Baltimore, v.95, n.6, p.1711-1718, 1974.

KAYSER, V. *et al.* Estrous and sex variations in vocalization threshold to hindpaw and tail pressure stimulation in the rat. **Brain Res**, Amsterdam, v.742, p.352-354, 1996.

KUCZMIERCZYK, A.R.; ADAMS, H.E. Autonomic arousal and pain sensitivity in women with premenstrual syndrome at different phases of the menstrual phases of the menstrual cycle. **J Psychosom Res**, Oxford, v.30, n.4, p.421-428, 1986.

- LAUTENBACHER, S.; ROLLMAN, G.B. Sex differences in responsiveness to painful and non-painful stimuli are dependent upon the stimulation method. **Pain**, Amsterdam, v.53, p.255-264, 1993.
- LEER, M.N. *et al.* Elevated shock threshold in sexually receptive female rats. **Physiol Behav**, Elmsford, v.42, p.617-620, 1988.
- LeRESCHE, L. Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v.8, n.3, p.291-305, 1997.
- LeRESCHE, L. *et al.* Use of exogenous hormones and risk of temporomandibular disorder pain. **Pain**, Amsterdam, v.69, p.153-160, 1997.
- LEVINE, F.M.; DE SIMONE, L.L. The effects of experimenter gender on pain report in male and female subjects. **Pain**, Amsterdam, v.44, p.69-72, 1991.
- LIU, N.; GINTZLER, A.R. Prolonged ovarian sex steroid treatment of male rats produces antinociception: identification of sex-based divergent analgesic mechanisms. **Pain**, Amsterdam, v.85, p.273-281, 2000.
- LUND, J. P. *et al.* **Orofacial Pain**: from basic science to clinical management. 1. ed. Carol Stream: Quintessence Books, 2001. 300 p.
- MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1993. 364 p.
- MAGGI, R. *et al.* Binding characteristics of hypothalamic mu opioid receptors throughout the estrous cycle in the rat. **Neuroendocrinology**, Basel, v.58, p.366-372, 1993.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, no prelo, 2002.

MARKS, H.E.; FARGASON, B.D.; HOBBS, S.H. Reactivity to aversive stimuli as a function of alterations in body weight in normal and gonadectomized female rats. **Physiol Behav**, Elmsford, v.9, p.539-544, 1972.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, M. *et al.* Assessing pain threshold in the rat: changes with estrus and time of day. **Physiol Behav**, Elmsford, v.55, n.4, p.651-657, 1994.

MCCALL, W.D. *et al.* Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neurosci Lett**, Limerick, v.208, p.45-48, 1996.

MEDINA, V.M.; DAWSON-BASOA, M.E.; GINTZLER, A.R. 17- $\beta$ -estradiol and progesterone positively modulate spinal cord dynorphin: relevance to the analgesia of pregnancy. **Neuroendocrinology**, Basel, v.58, p.310-315, 1993a.

MEDINA, V.M.; WANG, L.; GINTZLER, A.R. Spinal cord dynorphin: positive region-specific modulation during pregnancy and parturition. **Brain Res**, Amsterdam, v.623, p.41-46, 1993b.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanism: a new theory. **Science**, Washington, v.150, p.971-978, Nov. 1965.

MERSKY, H. Classification of the chronic pain: syndromes and definitions of pain terms. **Pain**, Amsterdam, v.3, Supplement, p.S1, 1986.

MOGIL, J. S. *et al.* Sex differences in the antagonism of stress-induced analgesia: effects of gonadectomy and estrogen replacement. **Pain**, Amsterdam, v. 53, p. 17-25, 1993.

MOORING, M.; McKENZIE, A.; HART, B. Grooming in Impala: role of oral grooming in removal of ticks and effects of ticks in increasing grooming rate. **Physiol Behav**, Elmsford, v.59, p.965-971, 1996.

MUNGLANI, R.; HUNT, P. S. Molecular biology of pain. **Brit J Anaesth**, v. 75, p. 186 – 192, 1995.

PAN, Z.Z.; TERSHNER, S.A.; FIELDS, H.L. Cellular mechanism for anti-analgesic action of agonists of the  $\kappa$  - opioid receptor. **Nature**, London, v.389, p.382-384, Sept. 1997.

PAN, Z.Z.; WESSENDORF, M.W.; WILLIAN, J.T. Modulation by serotonin of the neurons in rat nucleus raphe magnus in vitro. **Neuroscience**, Washington, v.54, p.421-429, 1993.

PARADA, C.A. *et al.* The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v.102, n.4, p. 937-944, 2001.

PUIG, S.; SORKIN, L.S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, Amsterdam, v.64, p.345-355, 1995.

RABOISSON, P. *et al.* Effects of subcutaneous formalin on the activity of trigeminal brainstem nociceptive neurones in the rat. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.73, n.2, p.496-505, 1995.

RATKA, A.; SIMPIKINS, J.W. Effects of estradiol and progesterone on the sensitivity to pain and on morphine-induced antinociception in female rats. **Horm Behav**, New York, v.25, p.217-228, 1991.

RILEY III, J.L. *et al.* A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. **Pain**, Amsterdam, v.81, p.225-235, 1999.

RILEY III, J.L. *et al.* Orofacial pain symptom prevalence: selective sex differences in the elderly? **Pain**, Amsterdam, v.76, p.97-104, 1998.

ROBINSON, M.E. *et al.* Sex differences in response to cutaneous anesthesia: a double blind randomized study. **Pain**, Amsterdam, v.77, p.143-149, 1998.

ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, Amsterdam, v.45, n.2, p.211-216, May 1991.

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

SCIMONELLI, T.; MARUCCO, M.; CELIS, M.E. Age-related changes in grooming behavioral and motor activity in female rats. **Physiol Behav**, Elmsford, v.66, n.3, p.481-484, 1999.

SESSLE, B.J. Brainstem mechanisms underlying craniofacial pain and its modulation. **Adv Pain Res Ther**, Philadelphia, v.22, p.413-421, 1995.

SESSLE, J.B. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v.11, n.1, p.57-91, 2000.

SESSLE, J.B. Mechanism of trigeminal and occipital pain. **Pain Rev**, London, v.3, p. 91-116, 1996.

SHIBATA, M. *et al.* Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, Amsterdam, v.38, p.347-352, 1989.

SMITH, M.S.; FREEMAN, M.E.; NEILL, J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, Baltimore, v.93, p.756-758, 1975.

SWIFT, J.Q. *et al.* Effect of intra-articular versus systemic anti-inflammatory drugs in a rabbit model of temporomandibular joint inflammation. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v.56, p.1288-1295, 1998.

TAYLOR, B.K.; PETERSON, M.A.; BASBAUM, A.I. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive response to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J Neurosci**, New York, v.15, p.7575-7584, 1995.

TENG, C.J.; ABBOTT, F.V. The formalin test: a dose-response analysis at three developmental stages. **Pain**, Amsterdam, v.76, p.337-347, 1998.

TERSNER, S.A.; MITCHELL, J.M.; FIELDS, H.L. Brainstem pain modulating circuit is sexually dimorphic with respect to mu and kappa opioid receptor function. **Pain**, Amsterdam, v.85, p.153-159, 2000.

TJOLSEN, A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, Amsterdam, v.51, p.5-17, 1992.

TSAI, C.M. *et al.* Involvement of trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) in craniofacial nociceptive reflex activity. **Pain**, Amsterdam, v.81, p.115-128, 1999.

UNRUH, A.M. Gender variations in clinical pain experience. **Pain**, Amsterdam, v.65, p.123-167, 1996.

VAUGHAN, C.V.; MCGREGOR, I.S.; CHRISTIE, M.J. Cannabionoid receptor activation inhibits GABAergic neurotransmission in rostral ventromedial medulla neurons in vitro. **Br J Pharmacol**, London, v.127, p.935-940, 1999.

VEITH, J.L. *et al.* Plasma beta-endorphin, pain threshold and anxiety levels across the human menstrual cycle. **Physiol Behav**, Elmsford, v.32, p.31-34, 1984.

VINCLER, M. *et al.* Estrous cycle modulation of nociceptive behaviors elicited by electrical stimulation and formalin. **Pharmacol Biochem Behav**, New York, v.69, p.315-324, 2001.

VOS, P. B.; HANS, G.; ADRIAHENSE, H. Behavioral assessment of facial pain in rats: face grooming patterns after painful and non-painful sensory disturbances in the territory of the rat's infraorbital nerve. **Pain**, Amsterdam, v. 76, n. 1 – 2, p. 173 – 178, May 1998.

WALKER, J.L.; CARMODY, J.J. Experimental pain in healthy human subjects: Gender differences in nociception and response to Ibuprofen. **Anesth Analg**, Baltimore, v.86, p.1257-1262, 1998.



WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Naloxone causes apparent antinociception and pronociception simultaneously in the rat paw formalin test. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.236, p.193-199, 1993.

WHEELER-ACETO, H.; PORRECA, F.; COWAN, A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. **Pain**, Amsterdam, v.40, p.229-238, 1990.

WOOLF, C.J. Windup and central sensitization are not equivalent. **Pain**, Amsterdam, v.66, p.105-108, 1996.

YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. **Anesth Analg**, Baltimore, v.77, p.886-890, 1993.

YOUNG, R.F.; PERRYMAN, K.M. Pathways for orofacial pain sensation in the trigeminal brain-stem nuclear complex of the Macaque monkey. **J Neurosurg**, Baltimore, v.61, p.563-568, 1984.

YU, X.M. *et al.* Differential effects of cutaneous and deep application of inflammatory irritant on mechanoreceptive field properties of trigeminal brain stem nociceptive neurons. **J Neurophysiol**, Bethesda, v.70, n.4, p.1704-1707, Oct. 1993.

YU, X.M. *et al.* Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. **Pain**, Amsterdam, v.60, p.143-149, 1994.

ZMARTZY, S.A.; WELLS A.S.; READ, N.W. The influence of food on pain perception in healthy human volunteers. **Physiol Behav**, Elmsford, v.62, n.1, p.185-191, 1997.

# ANEXO 1



INSTITUTO DE BIOLOGIA  
UNICAMP

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
Instituto de Biologia  
Universidade Estadual de Campinas  
CEEA-IB-UNICAMP

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 136-1, sobre "Influência de Sexo e do Ciclo Estral nas Respostas Comportamentais Induzidas pela Administração de Formulina na Articulação Temporomandibular de Ratos" sob a responsabilidade de Danny Luis Jorge

..... está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 16.1.06.2000. Este certificado expira em 16.10.6.2001.

Campinas, 16 de junho de 2000.

## CERTIFICATE

We certify that the work described in the manuscript ".....", is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Institute of Biology/UNICAMP Ethics Committee for Animal Research (CEEA) on 06.1.16.2000 protocol nº 136-1. This certificate expires on 06.10.2001.

Campinas 06/16/2000

Alba R. M. Souza Brito

Prof(a) Dr(a)  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Alba R. M. Souza Brito

## ANEXO 2

Fernando Serres - Filho

Prof(a) Dr(a)  
Secretário(a) - CEEA/IB/UNICAMP

## ANEXO 2

Análise de variância referente ao comportamento de coçar a região orofacial. Coeficiente de variação = 23%. Transformação das observações: raiz quadrada.

Causa da Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Valor de F	Pr > F
Tratamento	1	1449,83	1449,83	164,29	0,0001
Sexo/Ciclo Estral	2	96,24	48,12	5,45	0,0070
Trat.*Sexo/Ciclo Estral	2	44,91	22,46	2,54	0,0879
Resíduo	54	476,54	8,83		
Total corrigido	59	2067,53			

## ANEXO 3

Análise de variância referente ao comportamento levantar rapidamente a cabeça. Coeficiente de variação = 85%.

Causa da Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Valor de F	Pr > F
Sexo/Ciclo Estral	2	2808,87	1404,43	1,17	0,3268
Resíduo	27	32522,6	1204,54		
Total corrigido	29	35331,47			

## ANEXO 4

Análise de variância referente à soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Coeficiente de variação = 18%. Transformação das observações: raiz quadrada.

Causa da Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Valor de F	Pr > F
Tratamento	1	1850,57	1850,57	296,98	0,0001
Sexo/Ciclo Estral	2	66,27	33,14	5,23	0,0078
Trat.*Sexo/Ciclo Estral	2	24,88	12,44	2,00	0,1457
Resíduo	54	336,49	6,23		
Total corrigido	59	2278,21			

## ANEXO 5

Grupo morfina: análise de variância referente à soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça. Coeficiente de variação = 6%. Transformação das observações: logarítmica.

Causa da Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	Valor de F	Pr > F
Tratamento	1	5,49	5,49	53,68	0,00001
Sexo/Ciclo Estral	2	0,57	0,28	2,78	0,0070
Trat.*Sexo/Ciclo Estral	2	1,40	0,70	6,85	0,0047
Resíduo	24	2,45	0,1		
Total corrigido	29	9,91			

## APÊNDICE

Tabelas referentes aos valores individuais da amostra.

TABELA1. Efeito da administração de formalina 1,5% ou NaCl 0,9% (controle) na região ATM de ratos sobre o comportamento de coçar a região orofacial. Soma do período de tempo (s) que os animais gastaram coçando a região orofacial durante o período de observação de 45 minutos.

Animais	Fêmeas em estro		Fêmeas em proestro		Machos	
	Controle	Formalina	Controle	Formalina	Controle	Formalina
1	37,22	404,8	23,41	267,94	76,25	146,49
2	23,84	309,64	18,04	162,1	70,46	460,5
3	77,12	303,97	80,87	321,8	51,91	276,57
4	66,96	629,62	69,03	430,13	35,19	225,39
5	77,18	437,88	94,32	269,27	132,57	281,51
6	172,18	495,33	52,51	355,94	79,31	512,61
7	93,52	316,28	118,64	75,02	28,28	313,47
8	78,86	538,47	101,56	353,57	53,81	215,89
9	101,52	606,26	28,22	369,03	23,71	256,04
10	68,16	342,48	85,41	61,75	49,4	310,57

TABELA 2. Efeito da administração de formalina 1,5% ou NaCl 0,9% (controle) na região ATM de ratos sobre o comportamento levantar rapidamente a cabeça. Soma do número de vezes que os animais levantaram rapidamente a cabeça durante o período de observação de 45 minutos.

Animais	Fêmeas em estro		Fêmeas em proestro		Machos	
	Controle	Formalina	Controle	Formalina	Controle	Formalina
1	0	24	0	31	0	50
2	0	36	0	94	0	33
3	0	77	0	2	0	23
4	0	8	0	69	0	75
5	0	6	0	35	0	4
6	0	10	0	32	0	5
7	0	4	0	49	0	70
8	0	5	0	29	0	95
9	0	27	0	7	0	72
10	0	76	0	144	0	34

TABELA 3. Soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

Animais	Fêmeas em estro		Fêmeas em proestro		Machos	
	Controle	Formalina	Controle	Formalina	Controle	Formalina
1	37,22	428,8	23,41	298,94	76,25	196,49
2	23,84	345,64	18,04	256,1	70,46	493,5
3	77,12	380,97	80,87	323,8	51,91	299,57
4	66,96	637,62	69,03	499,13	35,19	300,39
5	77,18	443,88	94,32	304,27	132,57	285,51
6	172,18	505,33	52,51	387,94	79,31	517,61
7	93,52	320,28	118,64	124,02	28,28	383,47
8	78,86	543,47	101,56	382,57	53,81	310,89
9	101,52	633,26	28,22	376,03	23,71	328,04
10	68,16	418,48	85,41	205,75	49,4	344,67

TABELA 4. Grupos morfina e controle: soma dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

<b>Animais</b>	<b>Fêmeas em estro</b>		<b>Fêmeas em proestro</b>		<b>Machos</b>	
	Controle	Morfina	Controle	Morfina	Controle	Morfina
<b>1</b>	570,39	128,57	157,1	169,96	401,75	229,62
<b>2</b>	556,95	94,01	333,73	180,46	254,28	143,96
<b>3</b>	842,83	81,76	281,12	175,69	259,75	326,9
<b>4</b>	425,2	121,76	243,59	140,38	438,58	135,84
<b>5</b>	346,77	215,62	263,25	94,07	447,59	191,68