

Franco Arsati

Influência do sexo e do ciclo estral sobre a dor e a inflamação da ATM de ratos

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de título de Doutor em Odontologia, Área de Fisiologia Oral.

**PIRACICABA
2004**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

Franco Arsati

Influência do sexo e do ciclo estral sobre a dor e a inflamação da ATM de ratos

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de título de Doutor em Odontologia, Área de Fisiologia Oral.

Exemplar foi devidamente corrigido.
Conferido com a Resolução CCPE-036/83
CPG. 12/04/04
Assinatura do Orientador

Orientador: Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade
Prof. Dr. Marco Polo Marchese
Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga
Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião
Profa. Dra. Miriam Ribeiro Campos

**PIRACICABA
2004**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	Ar 71i
V	EX
TOMBO BC/	59293
PROC.	16-117-04
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/07/04
Nº CPD	

CM00200756-6

BIB ID 318351

Ficha Catalográfica

Ar71i Arsati, Franco.
 Influência do sexo e do ciclo estral sobre a dor e a inflamação da
 ATM de ratos. / Franco Arsati. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
 vii, 73f. : il.

 Orientadora : Profª Drª Maria Cecília Ferraz de
 Arruda Veiga.

 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
 Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

 1. Articulação temporomandibular. 2. Castração. 3.
 Estrógenos. 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 DOUTORADO, em sessão pública realizada em 19 de Fevereiro de 2004, considerou o candidato FRANCO ARSATI aprovado.

1. Profa. Dra. MARIA CECILIA FERRAZ ARRUDA VEIGA

2. Prof. Dr. MARCO POLO MARCHESI

3. Profa. Dra. MIRIAM RIBEIRO CAMPOS

4. Prof. Dr. EDUARDO DIAS DE ANDRADE

5. Profa. Dra. MARIA BEATRIZ DUARTE GAVIAO

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Eliza e Giovanni, que me ensinaram o valor do estudo e me incentivaram sempre a seguir em frente;

À minha filha Bruna, pelo incentivo que sua existência me proporciona;

À minha amada esposa Ynara, pela paz de espírito que me traz, pelo amor, companheirismo e incansável apoio para meu engrandecimento pessoal e intelectual, fundamentais para a realização desse trabalho;

Ao meu amigo e querido irmão Giuliano, por sempre acreditar em mim,

dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga, pela orientação deste trabalho e pelos ensinamentos durante todo o curso.

À Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, na pessoa de seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

À FAPESP pelo auxílio à pesquisa concedido.

Ao Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP, Prof. Dr. Lourenço C. Sobrinho.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP, Profa. Dra. Maria Cristina Volpato.

Aos professores Maria Cristina Volpato, Silvana Pereira Barros, Regina Maria P. Rontani e Paulo Henrique F. Caria pela valiosa colaboração durante os exames de Pré-Qualificação e Qualificação.

À Professora Claudia Herrera Tambeli pelas sugestões dadas para a otimização desse trabalho.

À Profa. Gláucia M. Bovi Ambrosano, pelo auxílio na análise estatística dos resultados.

Ao técnico Carlos Alberto Feliciano, não só pelo apoio na realização dos procedimentos experimentais, mas principalmente pelo companheirismo ao longo dos cursos de Mestrado e Doutorado.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica Oral, José Alfredo da Silva, Mariza Soares e Waldomiro Vieira, pelo auxílio laboratorial e por tornarem o nosso dia a dia tão agradável.

À Eliete Righetto e Érica, atenciosas secretárias do Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP.

À Maria Elisa dos Santos, secretária do PPG em Odontologia da FOP.

Às secretárias da Coordenadoria de Pós Graduação da FOP, Érica Alessandra Pinho e Sônia Maria Lordello Arthur, pela boa vontade e simpatia .

À Heloísa Maria Ceccotti e Marilene Girello, responsáveis pela Biblioteca da FOP.

Ao amigo Dany pela ajuda na coleta de dados e assim como os amigos Celso e Alexandre, pelo incentivo, companheirismo e momentos de descontração.

Aos amigos do Curso de Pós, Marcelo Macari, Leonardo, Luciane, Tatiana, Ana Paula, Gustavo, Godofredo, Mitsue, Roberta Dalcico, Viviane Gomes, Nilza, Adriana, Mariana, Luciano, Beth, Eduardo e Fábio pelos momentos agradáveis da Pós-Graduação.

Sumário

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
3. PROPOSIÇÃO	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	61

RESUMO

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que as mulheres apresentam uma prevalência de disfunção têmporo-mandibular em relação aos homens na ordem de 2,5:1. Entretanto, ainda não foi totalmente esclarecida a influência dos hormônios gonadais sobre as disfunções têmporo-mandibulares nas mulheres. O objetivo desse trabalho foi verificar a influência do sexo, do ciclo estral e do hormônio 17 β -estradiol no desenvolvimento da dor e do processo inflamatório associados à articulação têmporo-mandibular (ATM). Para isso, ratos Wistar (machos, fêmeas em estro, fêmeas em proestro e fêmeas castradas com e sem reposição hormonal foram submetidos aos seguintes testes nociceptivos e inflamatórios na ATM: 1) teste da formalina na ATM; 2) teste da incapacitação mastigatória induzida pela carragenina e 3) teste do extravasamento plasmático neurogênico do tecido periarticular da ATM induzido pelo óleo de mostarda. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se os seguintes testes: t, t pareado, ANOVA e Newman-Keuls; o limite de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$). Os resultados obtidos nos três experimentos foram respectivamente: 1) as fêmeas em estro e as castradas apresentaram maior sensibilidade ao teste da formalina na ATM do que as fêmeas em proestro. Por sua vez, as fêmeas castradas com reposição de estrógeno demonstraram menor sensibilidade a esse teste em comparação às fêmeas castradas sem reposição hormonal. 2) As fêmeas em estro, em proestro e castradas apresentaram redução na ingestão alimentar de 84; 83,3 e 49,42%, respectivamente, em comparação à redução de apenas 48,30% nos machos. 3) Quanto ao extravasamento plasmático induzido pelo óleo de mostarda, não houve diferença significativa entre machos, fêmeas em estro e em proestro. Os resultados obtidos permitem concluir que, em

ratos: 1) A sensibilidade ao teste da formalina da ATM é alterada pelas oscilações hormonais do ciclo estral e pela reposição de 17 β -estradiol em fêmeas castradas; 2) a maior sensibilidade à alodinia da ATM (teste da carragenina) nas fêmeas é dependente da produção dos hormônios ovarianos e 3) o extravasamento plasmático neurogênico da ATM independe do sexo e do ciclo estral.

ABSTRACT

Epidemiological studies have demonstrated that the prevalence of temporomandibular dysfunction (TMD) for women and men is in a ratio of 2.5 to 1. However the influence of gonadal hormones over TMD in women is not completely understood yet. The aim of this study was to verify the influence of sex, estrous cycle and 17 β -estradiol hormone over pain and inflammatory process of the temporomandibular joint (TMJ). Wistar rats (males, females at estrus, females at proestrus and castrated females with and without estrogen replacement) were submitted to nociceptive and inflammatory tests: 1) TMJ formalin test, 2) masticatory incapacity induced by carrageenan and 3) neurogenic plasma extravasation of periarticular TMJ tissue induced by mustard oil test. Statistical analysis was performed using the following tests: t, paired t, ANOVA and Newman-Keuls; the limit of significance was set at 5% ($p < 0.05$). The obtained results from the three experimental tests were respectively: 1) females at estrus and castrated were more sensible to the TMJ formalin test than females at proestrus. Castrated females with estrogen replacement were less sensible than castrated females without estrogen replacement. 2) females at estrus and proestrus and castrated showed a reduction in food intake of respectively 84,0, 83,3 and 49,4%. For males, this reduction was of 48,3%. 3) In the plasmatic extravasation induced by mustard oil, there was no difference among males, females at estrus and proestrus. It can be concluded that, in rats: 1) the sensibility to the TMJ formalin test is affected by hormonal fluctuations of estrous cycle and by 17 β -estradiol replacement in the castrated females; 2) the higher sensibility to allodynia of the tmj (carrageenan test) of females than of males is due to

production of ovarian hormones and 3) neurogenic plasma extravasation of TMJ does not depend on the gender and estrous cycle.

INTRODUÇÃO

Várias desordens dolorosas acometem mais o sexo feminino do que o masculino. Artrite reumatóide, fibromialgia, enxaqueca, dor de cabeça do tipo tensional, síndrome do túnel do carpo, neuralgia occipital e as desordens têmporo-mandibulares (DTMs) são alguns exemplos (BERKLEY, 1997). De forma semelhante, o sexo feminino exibe maior sensibilidade à dor induzida experimentalmente, em comparação ao masculino (DAO & LERESCHE, 2000).

Em relação às DTMs, estudos epidemiológicos demonstram que a dor associada a essas disfunções é de 2 - 2,5 vezes mais comum no sexo feminino do que no masculino (LERESCHE *et al.*, 1997). Curiosamente, mulheres em idade reprodutiva apresentam maior prevalência de disfunção têmporo-mandibular (DTM) em comparação àquelas que se encontram na fase pré-puberal ou na menopausa (LOCKER & SLADE, 1988).

Essas informações são fortes indícios de que os hormônios gonadais femininos são os responsáveis pela maior prevalência de DTMs entre as mulheres.

Dentre os hormônios sexuais femininos, atenção maior tem sido dada ao estrógeno já que, mulheres menopausadas que fazem terapia de reposição estrogênica possuem maiores chances de desenvolver algum tipo de DTM do que mulheres menopausadas que não repõem esse hormônio (LERESCHE *et al.*, 1997). Da mesma forma, mulheres que fazem uso de contraceptivos orais (CO) à base de estrógeno são mais suscetíveis ao desenvolvimento de DTMs em comparação às

mulheres não usuárias (LERESCHE *et al.*, 1997) e, além disso, já foi demonstrado que o padrão da dor entre mulheres com DTMs, usuárias e não-usuárias de CO, difere entre si, sendo que a intensidade da dor ao longo do ciclo menstrual, é mais constante no primeiro grupo em comparação ao segundo, que apresenta oscilações (DAO *et al.*, 1998).

É extenso o número de trabalhos que procuram explicar as diferenças sexuais no processamento da dor e da inflamação, em diversas regiões do corpo, através da utilização de testes nociceptivos e inflamatórios tanto em humanos como em outras espécies (FILLINGIM & NESS, 2000). Entretanto, na região da ATM, pouco se sabe a respeito dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no processamento da sensação dolorosa e da modulação da inflamação entre os gêneros masculino e feminino.

Uma característica interessante das DTMs é que diversas substâncias químicas relacionadas com a dor e inflamação já foram identificadas no fluido sinovial de pacientes sofrendores dessas importantes entidades clínicas. Como exemplo pode-se citar as prostaglandinas E2 e os leucotrienos B4 (QUINN & BAZAN, 1990), a substância P (ARSATI & VEIGA, 2004; APPELGREN *et al.*, 1998), o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (APPELGREN *et al.*, 1995), a bradicinina (SUZUKI *et al.*, 2003), interleucinas (TAKAHASHI *et al.* 1998; KUBOTA *et al.* 1997) e o fator de necrose tumoral (SHAFER *et al.*, 1994; TAKAHASHI *et al.*, 1998). A existência de diferentes mediadores químicos da dor passíveis de estarem envolvidos na patofisiologia das DTMs poderia ser um dos fatores para a explicação do porquê pacientes disfuncionados relatarem diferentes tipos e intensidades de dor.

Nesse sentido, para melhor elucidar as diferenças sexuais na dor e inflamação da ATM, seria interessante utilizar-se de testes nociceptivos e inflamatórios que, por meio de agentes irritantes diferentes, induziriam também a liberação de mediadores químicos diferentes na ATM.

1. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta Revisão da literatura, serão abordados os seguintes temas:

- 2.1. Diferenças sexuais na dor
- 2.2. Modelos experimentais de dor e inflamação orofacial

2.1. Diferenças sexuais na dor

Existem diferenças sexuais em relação à percepção da dor?

A literatura científica não tem dúvidas que sim, entretanto, muitas controvérsias têm sido geradas para a explicação dos fatores envolvidos nessas diferenças (BERKLEY, 1997).

As mulheres são acometidas por um número maior de doenças dolorosas e reportam dores mais severas, mais freqüentes e de maior duração que os homens (DAO & LERESCHE, 2000). Ardência lingual, cefaléia cervicogênica, cefaléia do tipo tensional crônica, neuralgia occipital, neuralgia do trigêmeo, disfunções têmporo-mandibulares, síndrome do túnel do carpo, fibromialgia, artrite reumatóide, insuficiência venosa crônica, doença de Raynaud, esofagite e síndrome do cólon irritável são exemplos de doenças dolorosas mais predisponentes no gênero feminino (BERKLEY, 1997).

Outro dado interessante é que, a prevalência pelo sexo de algumas desordens dolorosas depende da idade. Por exemplo, a gota é mais prevalente no sexo feminino após os sessenta anos de idade embora seja mais comum em homens

antes desse período e, mulheres após os quarenta e cinco anos são mais acometidas pela osteoartrite do que homens na mesma idade (sendo inversa a situação antes desse tempo) (BERKLEY, 1997).

Devido ao fato de que a literatura científica a respeito da prevalência dessas desordens ser, na maioria das vezes, descritiva e os achados são na maioria das vezes encontradas em estudos delineados não originalmente para abordar os aspectos relacionados ao gênero, muitos estudos utilizando-se de modelos experimentais de dor, em humanos e outras espécies, têm sido realizados para melhor elucidar as diferenças sexuais na dor.

A utilização de modelos experimentais de dor oferece como vantagens o controle de variáveis que confundem a interpretação de alguns estudos clínicos e também possibilitam a realização de técnicas invasivas, para a investigação do fenômeno doloroso, inviáveis de serem realizadas no homem (FILLINGIM & NESS, 2000).

De um modo geral, os trabalhos na literatura que estudaram as diferenças sexuais na dor induzida experimentalmente em humanos, apontam para uma maior sensibilidade nas mulheres em relação aos homens a esse tipo de dor (FILLINGIM & MAIXNER, 1995). Em um importante artigo de revisão, BERKLEY (1997), conclui que as mulheres apresentam menores limiares para a dor, interpretam estímulos iguais como mais intensos e suportam menos a dor do que os homens.

Estudos conduzidos em animais de outras espécies, principalmente roedores, também demonstram uma maior sensibilidade dolorosa em fêmeas do que em machos (ALOISE *et al.*, 1994; BRADSHAW *et al.*, 2000).

Além das diferenças sexuais na percepção e no processamento da dor, variações também são encontradas na analgesia a agentes opióides endógenos e exógenos.

Vários autores têm demonstrado que o sistema de analgesia no sexo feminino é mais sensível que o masculino quando são utilizados analgésicos κ -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 κ -opióide (DAWSON-BASOA & GINTZLER, 1996; CHANG *et al.*, 2000), além de alterar a sensibilidade à morfina (ALI *et al.*, 1995).

Entretanto, apesar do consenso da existência de diferenças na percepção do fenômeno doloroso, muitas hipóteses e contradições têm surgido na tentativa de identificar os mecanismos biológicos que podem estar envolvidos nessas diferenças.

Alguns autores têm sugerido que as diferenças anatômicas do aparelho reprodutor masculino e feminino contribuam com essas diferenças. Uma hipótese proposta por BERKLEY (1997), é que a vagina e o canal vaginal são vias de acesso para agentes patogênicos que, a partir de fibras do tipo C que inervam essas regiões anatômicas, atingem os neurônios de segunda ordem em diversos segmentos da medula espinhal e tronco encefálico. Nesses neurônios, os agentes patogênicos poderiam induzir alterações na excitabilidade da membrana celular (sensibilização central) como a diminuição do limiar para a estimulação resultando tanto em hiperalgesia como dor espontânea. Uma vez sensibilizados, esses neurônios através

de mecanismos eferentes, induziriam a sensibilização de nociceptores periféricos em diversas regiões do corpo.

Segundo BERKLEY (1997), a fisiopatologia descrita acima, tenta explicar porque patologias que afetam a o canal vaginal podem resultar em fibromialgia, várias formas de cefaléia e dores faciais.

Outro fator que pode contribuir para as diferenças sexuais na dor, é a flutuação hormonal experimentada pelas mulheres durante o ciclo menstrual. Essa idéia é reforçada pelo fato de que em 60% das mulheres acometidas por enxaqueca, a dor piora no período pré-menstrual e em 14% dos casos, a cefaléia se manifesta somente durante o período menstrual (MARCUS, 1995). Outra evidência é que, em mulheres sofredoras de dor miofacial, o quadro se agrava nos períodos menstrual e pré-menstrual (DAO *et al.*, 1997).

O papel dos hormônios sexuais femininos na fisiopatologia da dor tem sido relatado pelo fato de que a terapia de reposição estrogênica em mulheres menopausadas pode piorar a enxaqueca (KUDROW, 1975) e aumentar as chances do desenvolvimento de DTM (LERESCHE *et al.*, 1997). Além disso, um trabalho que investigou o padrão de dor miofacial nos músculos da mastigação durante três ciclos menstruais consecutivos entre mulheres que utilizavam ou não contraceptivos orais, conclui que a dor, entre as usuárias desses medicamentos, foi mais constante e com baixa variação. Por outro lado, as mulheres que não tomavam contraceptivos orais apresentavam oscilações na intensidade da dor ao longo do ciclo menstrual (períodos alternados com dor e sem dor) (DAO *et al.*, 1998).

Para melhor compreensão das possíveis influências dos hormônios gonadais sobre a modulação e o processamento da dor, vários modelos experimentais para o estudo da dor têm sido conduzidos em mulheres nas diferentes fases do ciclo menstrual.

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 considerando-se as fases do ciclo menstrual (VEITH *et al.*, 1984; KUCZMIERCZYK & ADAMS, 1986), como há aqueles que, sem considerar a fase do ciclo menstrual, observaram maior sensibilidade à dor nas mulheres (ROBINSON *et al.*, 1998; FILLINGIM *et al.*, 1998 e 1999).

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 ciclo ovariano de roedores é denominado de ciclo estral e é constituído por quatro fases: (1) metaestro, período no qual a progesterona está elevada e o estrógeno e LH estão baixos; (2) diestro, caracterizado pelo aumento de estrógeno e queda da progesterona; (3) proestro, onde o estrógeno, a progesterona, o LH e o FSH atingem os níveis máximos; e (4) estro, período no qual as fêmeas estão sexualmente receptivas e o estrógeno, a progesterona, o LH e o FSH atingem os menores níveis (FILLINGIM & NESS, 2000).

O aumento da sensibilidade à dor tem sido encontrado durante as diferentes fases do ciclo estral: proestro (DRURY & GOLD, 1978; FRYE *et al.*, 1992; KAYSER *et al.*, 1996; VINCLER *et al.*, 2001), estro (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).

Para desvendar o possível papel dos hormônios gonadais na dor, têm sido realizados vários experimentos utilizando-se da clássica técnica de castração em animais e conseqüente reposição hormonal de um ou mais hormônios sexuais.

Tem-se demonstrado que a reposição hormonal, em animais gonadectomizados, causa alterações no limiar de dor, podendo aumentá-lo (BEATTY & FESSLER, 1976; DRURY & GOLD, 1978; MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 1994), diminuí-lo (FRYE *et al.*, 1992; DEXHEIMER & TERENCE, 2001) ou mantê-lo inalterado (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 1994 ; DEXHEIMER & TERENCE, 2001). Entretanto, essas alterações são dependentes da dose, do tempo de tratamento e do tipo de hormônio utilizado (RATKA & SIMPKINS, 1991).

Segundo FILLINGIM & NESS (2000), a variedade dos resultados encontrados na literatura não é surpreendente, já que diferentes metodologias têm sido empregadas: tipo de estímulo nocivo (térmico, químico, elétrico, pressórico), profundidade do tecido estimulado (superficial ou profundo), duração do estímulo (fásico ou tônico), comportamento nociceptivo observado (lamber a pata, reação de fuga, vocalização, contorção) e horário dos experimentos (ciclo claro-escuro). Fatores como o ambiente de experimentação, sexo do pesquisador, presença de

outras pessoas, conjunto de instruções dadas aos voluntários e o seu grau de ansiedade, também podem alterar os resultados (LERESCHE, 1995).

Apesar das possíveis variáveis envolvidas, os modelos experimentais de dor e inflamação são fundamentais para a compreensão dos mecanismos relacionados com a nocicepção e o processo inflamatório, assim como a modulação desses fenômenos por substâncias endógenas e exógenas.

2.2. Modelos experimentais de dor e inflamação orofacial

2.2.1. Teste do extravasamento plasmático neurogênico no tecido periarticular da ATM induzido pelo óleo de mostarda

Tem sido demonstrado que a inflamação neurogênica desempenha um importante papel no desenvolvimento das disfunções têmporo-mandibulares (DTMs) (MILAN & SCHMITZ, 1995). Essa inflamação é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e pelo extravasamento plasmático induzidos por neuropeptídeos liberados de fibras nervosas nociceptivas.

Atualmente, a teoria mais aceita para a explicação da inflamação neurogênica é a seguinte: uma vez estimuladas por um agente etiológico, as fibras nervosas nociceptivas deflagram potenciais de ação (despolarização) os quais se dirigem através dos axônios até o sistema nervoso central (medula espinhal ou ponte). No sistema nervoso central, ocorre um reflexo que culmina em novas despolarizações

axonais só que agora, em direção às terminações livres das fibras nervosas nociceptivas inicialmente estimuladas. Ao chegarem nas terminações livres, essas despolarizações causam a liberação de neuropeptídeos vasoativos (SLUKA *et al.*, 1995).

Os neuropeptídeos vasoativos mais importantes relacionados com a inflamação neurogênica são a substância P (SP), o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (PRGC), neurocinina A e a neurocinina B (INOUE *et al.*, 1997). Dos neuropeptídeos envolvidos com a inflamação neurogênica, a SP (ALSTERGREN *et al.*, 1995; APPELGREN *et al.*, 1995; YOSHIDA *et al.*, 1999) e o PRGC (ALSTERGREN *et al.*, 1995; APPELGREN *et al.*, 1995) já foram identificados no fluido sinovial de pacientes com DTMs, e a injeção de SP na ATM aumenta os níveis de outros mediadores inflamatórios como o neuropeptídeo γ (contido em fibras nervosas simpáticas), neurocinina A e PRGC (CARLESON *et al.*, 1996).

Uma vez que existe uma grande relação entre inflamação neurogênica e disfunção têmporo-mandibular, o desenvolvimento de modelos experimentais para o esclarecimento dos mecanismos inflamatórios neurogênicos da ATM é de grande valia.

O óleo de mostarda (OM) é um agente inflamatório que estimula seletivamente as fibras nervosas nociceptivas do tipo C e parece que induz inflamação predominantemente por mecanismos neurogênicos. Estudos em tecidos superficiais demonstraram que o OM não induz inflamação diretamente por meio da liberação dos metabólitos do ácido aracdônico, as prostaglandinas e os leucotrienos (INOUE *et al.*, 1997).

Na região orofacial, HAAS *et al.* (1992), demonstraram que a administração de OM na ATM de ratos promove um aumento gradual no extravasamento plasmático que alcança o pico máximo 30 minutos após a administração do mesmo, e induz um aumento significativo na infiltração de neutrófilos polimorfonucleares. Além do extravasamento plasmático na região da ATM, o OM induz um aumento concomitante da atividade eletromiográfica dos músculos elevadores e depressores da mandíbula. Acredita-se que essa resposta seja uma tentativa do organismo para imobilizar e proteger a mandíbula contra a injúria ou inflamação na região têmporo-mandibular (YU *et al.*, 1994).

ARSATI & VEIGA (2004), demonstraram o envolvimento de um mecanismo neurogênico para o desenvolvimento da inflamação induzida pelo OM na ATM, já que pré-tratamento de ratos com o antagonista de receptor para a SP, Win 51,708, reduziu de forma significativa o extravasamento plasmático no tecido periarticular da ATM induzido por esse agente irritante. Entretanto, esses autores descartaram a possibilidade das prostaglandinas estarem envolvidas com o desenvolvimento desse extravasamento plasmático, uma vez que o pré-tratamento dos animais com os antiinflamatórios dexametasona, indometacina e meloxicam não foi capaz de diminuí-lo.

2.2.2. O teste da formalina na ATM

O teste da formalina na ATM proposto por ROVERONI *et al.* (2001) é uma adaptação do tradicional teste da formalina (DUBUISSON & DENNIS, 1977; WHEELER-ACETO *et al.*, 1990) que consiste na aplicação de formalina no dorso da

pata traseira de ratos. Após à administração de formalina observa-se no animal uma fase inicial (primeira fase) de dor intensa, porém de curta duração (dez minutos) seguida de uma segunda fase, caracterizada por dor moderada e persistente por sessenta minutos (CODERRE *et al.*, 1990).

A dor proveniente da primeira fase do teste da formalina está relacionada à excitação química direta sobre as terminações nociceptivas (DUBUISSON & DENNIS, 1977) enquanto que a segunda fase é resultante do desenvolvimento da inflamação e da sensibilização de neurônios de segunda ordem da medula espinhal (HUNSKAR & HOLE, 1987). A intensidade da dor experimentada pelo animal é quantificada pelos comportamentos de lambear e levantar rapidamente a pata que recebeu a injeção de formalina (DUBUISSON & DENNIS, 1977).

Já no teste da formalina da ATM, a dor é quantificada pelos comportamentos de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial. Outra diferença é que, no teste da formalina da ATM, somente é possível registrar os comportamentos nociceptivos referentes à segunda fase pois a técnica de administração da formalina na ATM (por ser uma região composta por tecidos profundos de difícil acesso) exige a breve anestesia do animal com halotano. Apesar de não ser possível o registro da primeira fase do teste da formalina na ATM, sabe-se que é a segunda fase que melhor assemelha-se com a dor clínica (ROVERONI *et al.*, 2001).

Em relação aos comportamentos de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial após a administração de formalina na ATM de ratos, comprovou-se que os mesmos são relacionados a dor (comportamentos nociceptivos) já que foram abolidos em animais pré-tratados sistemicamente com morfina (4mg/Kg) ou

localmente com lidocaína (2%). Além disso, o comportamento de coçar após a administração de formalina na ATM difere do ato de coçar fisiológico do animal, essencial para a termorregulação e para a distribuição de feromônios para a sinalização social (ROVERONI *et al.*, 2001). O ato fisiológico de coçar a pelagem ocorre em longos episódios de maneira altamente organizada, simétrica e no sentido rostro-caudal. Já o comportamento de coçar a região orofacial resultante da injeção de formalina ocorre predominantemente na região orofacial, muitas vezes direcionado para a região da ATM inflamada e realizado de maneira assimétrica com a pata dianteira ipsilateral e, eventualmente, com a pata traseira (ROVERONI *et al.*, 2001).

O teste da formalina na ATM é um modelo de dor orofacial caracterizado por induzir dor contínua no animal experimental e pode ser extremamente útil para o estudo das diferenças entre os gêneros masculino e feminino na nocicepção relacionada com a ATM.

2.2.3. Teste da incapacitação mastigatória induzida pela carragenina

Embora o modelo da formalina na ATM seja de grande importância para o estudo das condições dolorosas dessa região, a sua confiabilidade depende de um cuidadoso treinamento do pesquisador. Além disso, a dor induzida pela formalina é do tipo contínua e, em se tratando das condições dolorosas da ATM, sabe-se que as mesmas podem expressar-se de forma intermitente e secundária a um estímulo não doloroso (NORDAHL *et al.*, 2000).

Esse tipo de dor é denominado alodinia e ocorre em tecidos inflamados onde os nociceptores têm seu limiar para a estimulação diminuído devido à interação com mediadores químicos liberados durante o processo inflamatório (DRAY, 1995). Uma vez sensibilizados (diminuição do limiar para a estimulação), esses nociceptores passam a responder a estímulos não-nociceptivos. Na região da ATM, a alodinia pode manifestar-se durante o ato mastigatório devido à pressão exercida nessa articulação (NORDAHL *et al.*, 2000).

Um agente irritante capaz de induzir a alodinia e muito utilizada para o estudo da dor relacionada com a inflamação é a carragenina (FERREIRA *et al.*, 1978; COSTELLO & HARGREAVES, 1989; KOCHER *et al.*, 1987; ALMANSA *et al.*, 2003; RIENDEAU *et al.*, 2001; CAMPBELL *et al.*, 2000).

Em relação ao seu mecanismo de ação, POOLE *et al.* (1999) demonstraram que a carragenina induz seus efeitos inflamatórios nos tecidos por induzir a liberação de bradicinina, do fator de necrose tumoral alfa, de interleucinas (IL-10, IL-4, IL-6, IL-1), de prostaglandinas e de aminas simpatomiméticas. Uma vez liberadas nos tecidos, as prostaglandinas interagem com os nociceptores diminuindo o limiar para a estimulação.

Tem sido proposto que as prostaglandinas sensibilizam os nociceptores por induzirem a formação de novos canais de sódio na membrana citoplasmática. Esses canais, denominados PN3, permitiriam o influxo de íons sódio no citoplasma neuronal, reduzindo dessa maneira, o limiar para a estimulação do nociceptor (AKIBA *et al.*, 2003).

O fato de que as doses de antiinflamatórios necessárias para inibir o edema de pata induzido pela carragenina, em ratos, possuem correlação com as doses clinicamente úteis no homem, demonstram a semelhança da inflamação induzida por esse agente com as doenças inflamatórias associadas ao ser humano (OTTHERNESS & MOORE, 1988).

Devido às características desse agente irritante, foi desenvolvido em nosso laboratório (PAULA *et al.*, 2000), um modelo experimental de alodinia na ATM através da aplicação de carragenina. Nesse modelo, a intensidade da dor articular é medida indiretamente pela quantidade de ração ingerida. Esse teste comportamental tem por objetivo mimetizar o comprometimento da função da ATM inflamada em pacientes portadores de DTM que podem apresentar dor durante o ato mastigatório. Além do mais, esse teste mostrou-se sensível a indometacina, demonstrando o envolvimento das prostaglandinas nesse tipo de inflamação, um mediador inflamatório encontrado no fluido sinovial de pacientes portadores de DTM (QUINN & BAZAN, 1990).

Dessa maneira, esse teste pode ser de grande relevância para o estudo dos mecanismos envolvidos na patofisiologia da alodinia da ATM.

2. PROPOSIÇÃO

Diante do exposto, para melhor compreender as hipotéticas diferenças sexuais envolvidas na dor e inflamação da ATM, os objetivos do presente trabalho foram:

1º) Verificar se as oscilações dos hormônios ovarianos decorrentes do ciclo estral são capazes de alterar a sensibilidade de ratas ao teste da formalina.

2º) Averiguar se existe diferença na sensibilidade à alodinia da ATM (induzida pela carragenina) entre ratos machos e fêmeas e ainda verificar se a produção dos hormônios ovarianos pode ter influência sobre esse tipo de dor na ATM de ratas.

3º) Investigar se o extravasamento plasmático neurogênico (induzido pelo óleo de mostarda) da ATM de ratos pode ser influenciado pelos fatores sexo e ciclo estral.

4º) Verificar a influência do estrógeno sobre a dor e a inflamação (somente nos testes que forem influenciados pelo fator ciclo estral) da ATM de ratas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, de ambos os sexos, entre dois e cinco meses de idade, pesando em média entre 240 e 260g, provenientes do Biotério da FOP-UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (05/gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luz (ciclo de claro/escuro de 12h) com alimentação e água, *ad libitum* até o início dos experimentos. Os experimentos foram realizados durante a fase clara entre 9h:00 e 17h:00 em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida na faixa de 23 a 25°C. A experimentação animal seguiu as diretrizes propostas pelo Comitê de Ética da Associação Internacional para Estudo da Dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

a) Teste da formalina na ATM

JORGE (2002) demonstrou que fêmeas em estro são mais sensíveis ao teste da formalina na ATM do que machos e fêmeas em proestro. Dessa maneira, o presente trabalho iniciou os testes da formalina na ATM comparando fêmeas em estro (baixos níveis hormonais), proestro (altos níveis hormonais) e castradas.

Para determinação da fase do ciclo estral, foi utilizada a técnica de colheita do lavado vaginal (Figura 1) (MARCONDES, 2002). Assim, a secreção vaginal foi colhida com o auxílio de uma pipeta com ponteira plástica contendo 10 µL de soro fisiológico. Utilizando-se de um microscópio de luz (aumento de 10 vezes) o material colhido foi observado a fresco e, a partir da proporção entre células queratinizadas,

epiteliais e leucócitos, foram classificadas as fases do ciclo estral. 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 (MARCONDES *et al.*, 2002).

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) (Figura 2) com base e laterais espelhadas e frente de vidro. Primeiramente, cada animal era mantido nessa câmara por 30 minutos para familiarizar-se ao ambiente. Após esse período de adaptação o animal era retirado da caixa e anestesiado com halotano para que se procedesse a injeção na ATM.

Grupos de fêmeas em estro, fêmeas em proestro e fêmeas castradas receberam 50 μ L de NaCl a 0,9% (n = 6 para as fêmeas castradas; n = 10 para as fêmeas em estro e n = 10 para as fêmeas em proestro) ou 50 μ L de formalina a 1,5% (n = 9 para as fêmeas castradas; n = 10 para as fêmeas em estro e n = 10 para as fêmeas em proestro) na ATM. Realizada a injeção de de NaCl a 0,9% ou de formalina a 1,5%, (150 μ L de Formaldeído a 37% -SIGMA® - qsp 10 mL de salina), 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 eventos, respectivamente (Figura 2) (ROVERONI *et al.*, 2001).

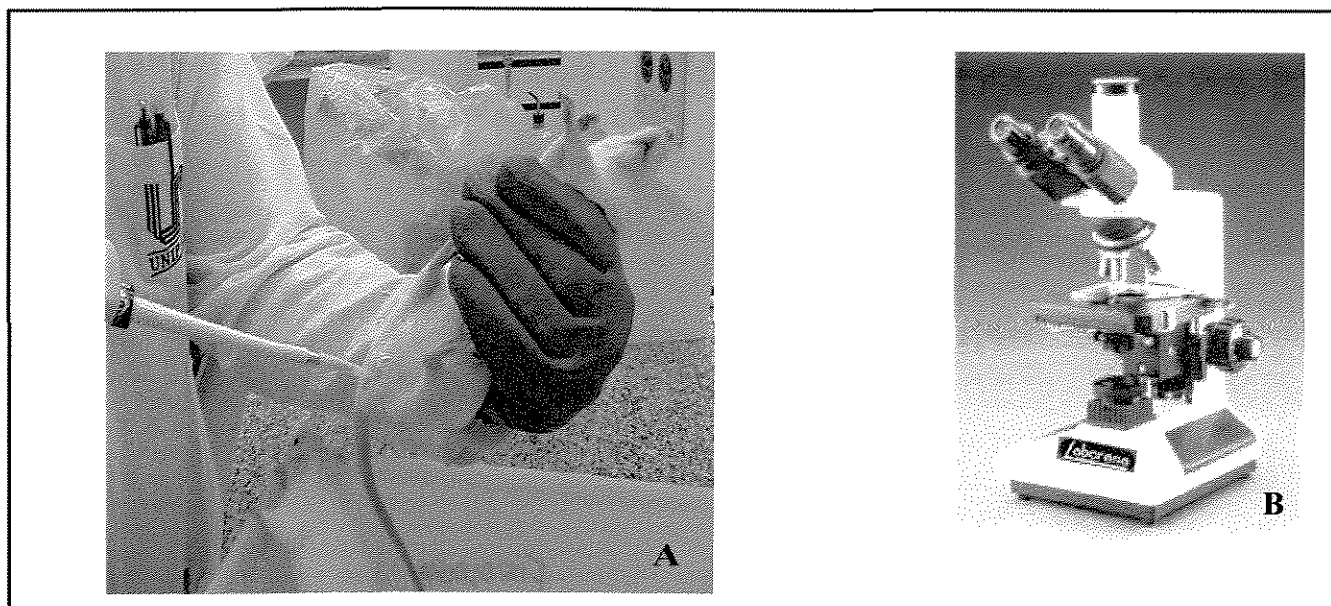


FIGURA 1: Técnica do lavado vaginal. A = colheita do fluido vaginal; B = observação no microscópio.

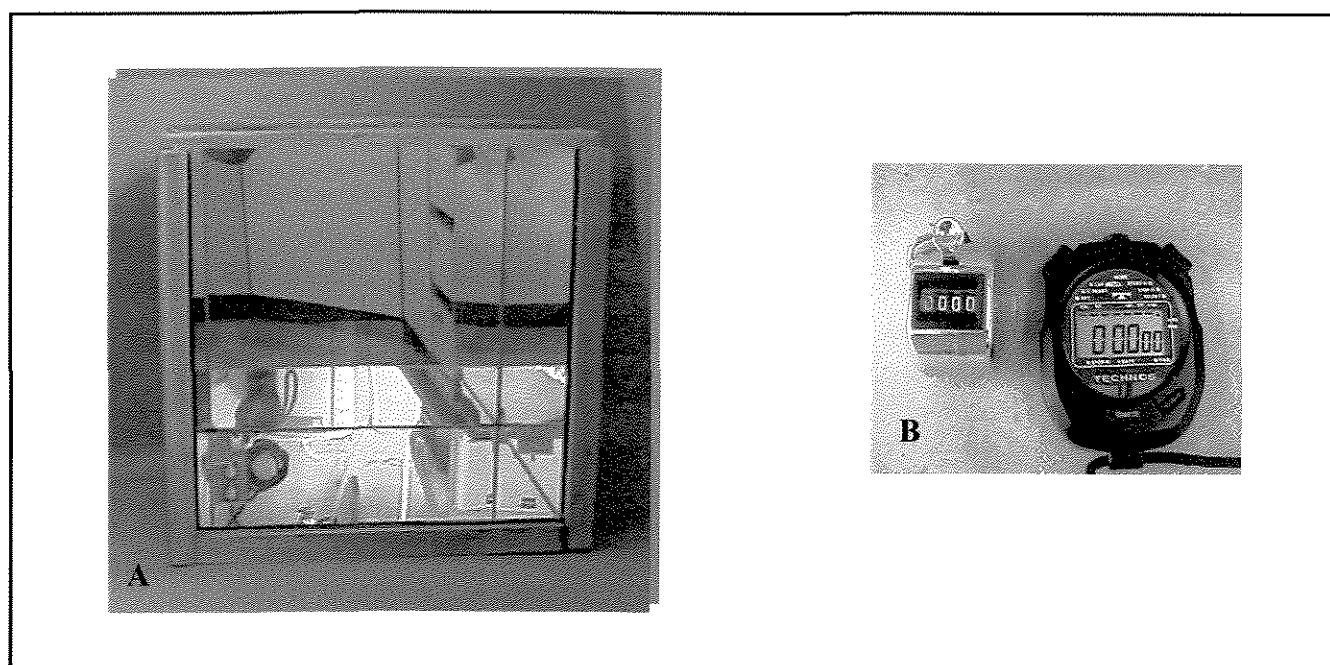


FIGURA 2: A = câmara de observação; B = contador de eventos e cronômetro.

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. Assim considerando que cada levantar de cabeça segue um padrão uniforme de aproximadamente 1 segundo de duração, esses comportamentos foram somados e avaliados conjuntamente (ROVERONI *et al.*, 2001).

Em uma segunda etapa, fêmeas castradas com reposição hormonal de 17β - estradiol (Sigma[®] - E0756 - 5mg) (em óleo mineral; s.c.; 50 μ g/kg/dia; às 9 horas; n = 10) e fêmeas castradas com aplicação subcutânea de óleo mineral (grupo controle) (0,15 - 0,2 mL/rata/dia; às 9 horas; n = 10), foram submetidas ao teste da formalina. A castração foi realizada aos dois meses de idade e tanto a reposição hormonal como a aplicação de óleo mineral, iniciaram-se após 21 dias do ato cirúrgico e teve a duração de uma semana. No sétimo dia de tratamento (estrógeno ou óleo mineral), as ratas foram submetidas ao teste da Formalina (GORDON & SOLIMAN, 1994).

b) Teste da incapacitação mastigatória induzida pela administração de carragenina na ATM

Ratos machos, fêmeas em diestro (para que após o jejum estivessem em Proestro), fêmeas em proestro (para que após o jejum estivessem em estro) e fêmeas castradas foram inicialmente mantidos em jejum de 18h em gaiolas metálicas individuais (Figura 3). Após esse período foi averiguada a fase do ciclo estral das fêmeas e, constatado que as mesmas encontravam-se em estro ou proestro, cada animal foi removido da gaiola e rapidamente anestesiado por inalação de halotano, o que permitiu a injeção na ATM direita de 50µL de salina (n = 10 para machos; n = 10 para fêmeas em proestro, n = 10 para fêmeas em estro e n = 10 para as fêmeas castradas) (grupos controles) ou 50µL de carragenina a 100µg/50µL (PAULA *et al.*, 2000) (SIGMA® - C1013 - 25g) (n = 10 para machos; n = 10 para fêmeas em proestro, n = 10 para fêmeas em estro e n = 10 para as fêmeas castradas).

Duas horas após a injeção na ATM, foi oferecido aos animais 50 gramas de ração (grãos de ração sólida na forma cilíndrica pesando aproximadamente 10g cada um) por um período de uma hora. Após esse tempo, a ração foi retirada e pesada para a quantificação da ingestão alimentar nesse intervalo de tempo. A seguir, os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical.

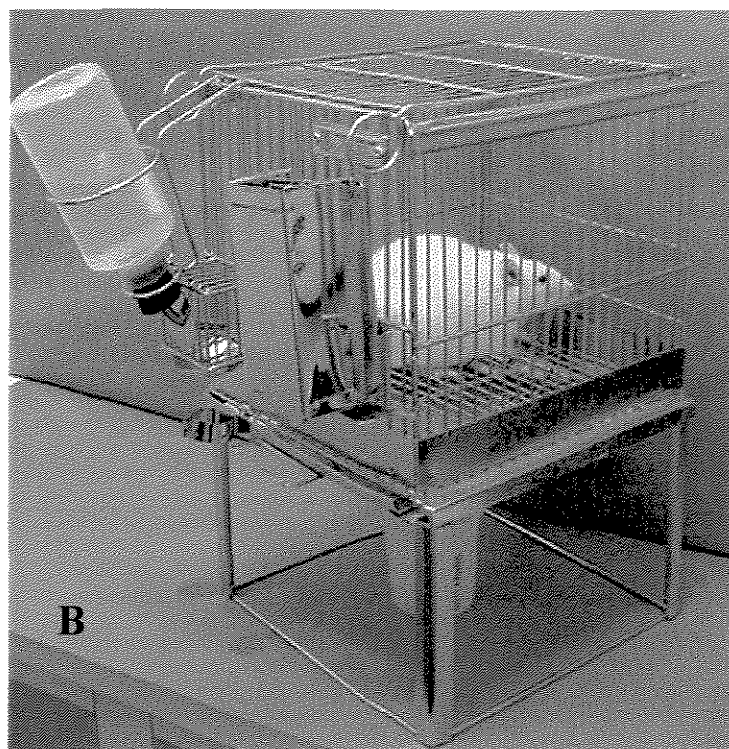


FIGURA 3: A = suporte para as gaiolas individuais; B = visão fronto-lateral de uma gaiola individual.

c) Inflamação neurogênica do tecido periarticular da ATM induzido pela administração de óleo de mostarda

Ratos machos (n = 6) e fêmeas em proestro (n = 7) e estro (n = 6) foram anestesiadas por meio da administração intraperitoneal de uma mistura de uretano e α -cloralose (HU, 1990; 100 mg/kg i.p e 50 mg/kg i.p, respectivamente) o que permitiu a entubação da traquéia (para melhorar a ventilação pulmonar do animal submetido a esse tipo de anestesia) e a canulação da veia femural esquerda (para posterior administração do corante azul de Evans).

A seguir, em cada animal, o agente inflamatório e estimulante de fibra C, óleo de mostarda (alil isoticionato, BDH, Poole, em óleo mineral, 20 μ L), na concentração de 0,25% (ARSATI & VEIGA, 2004), foi administrado na ATM direita e, imediatamente após isso, 20 μ L de óleo mineral foi administrado na ATM esquerda (controle) do mesmo animal. Para quantificar a inflamação, os animais receberam 6 mg/kg do corante Azul de Evans a 0,1% (FIORENTINO *et al.*, 1999), endovenosamente através da veia femural esquerda, vinte minutos antes de serem sacrificados. Esse corante tem a propriedade de se ligar às proteínas plasmáticas e, por conseguinte, os tecidos periarticulares previamente inflamados com o óleo de mostarda tornam-se corados, o que permite quantificar o extravasamento plasmático através de técnicas de espectrofotometria.

Os animais foram sacrificados trinta minutos após a administração do óleo mineral através da perfusão dos mesmos com 60 ml de NaCl a 0,9%. Após esse procedimento, em cada animal, o tecido periarticular tanto da ATM direita como da

esquerda foi dissecado (30 ± 5 mg) e incubado a 60°C em 1 ml de formamida por 24 h. Após esse período, as soluções resultantes foram submetidas a leituras espectrofotométricas (espectrofotômetro Anthos 2020, versão 1.2) no comprimento de onda de 620 nm. Os resultados dessas leituras foram então comparadas com os resultados das leituras de soluções com quantidades conhecidas de corante azul de Evans (μg). Finalmente, a quantidade de corante extravasado em cada solução foi dividida pelo peso (g) de seu respectivo tecido incubado. Dessa maneira, o extravasamento do corante azul de Evans foi calculado em micrograma de corante por grama de tecido periarticular dissecado. O tecido periarticular esquerdo dos animais foi utilizado como controle para a comparação da inflamação induzida na ATM direita pelo óleo de mostarda. A inflamação do tecido periarticular direito foi comparada entre todos os grupos.

d) Técnica de administração de soluções na ATM

Para a administração intra-articular das diversas soluções na ATM, foi seguida a seguinte técnica (HAAS *et al.*, 1992): cada agente irritante ou seu controle foi aplicado na ATM através de uma agulha (agulha $0,4\text{ mm} \times 13\text{ mm}$) conectada a uma microseringa de Hamilton ($50\text{ }\mu\text{L}$) por intermédio de uma cânula de polietileno PE 50 (Figura 4). Para tanto, a borda pósterio - inferior do arco zigomático da rata foi apalpada e a agulha inserida imediatamente abaixo desse ponto e aprofundada anteriormente até o côndilo ser contatado (Figura 5). Este contato ocorre aproximadamente a 3 mm de profundidade e é verificado através da movimentação conjunta da mandíbula e da agulha (Figura 5). Descartando-se a possibilidade de

uma possível introdução da agulha em um compartimento sangüíneo, através de um leve recuo do êmbolo da microseringa, o conteúdo da mesma foi injetado.

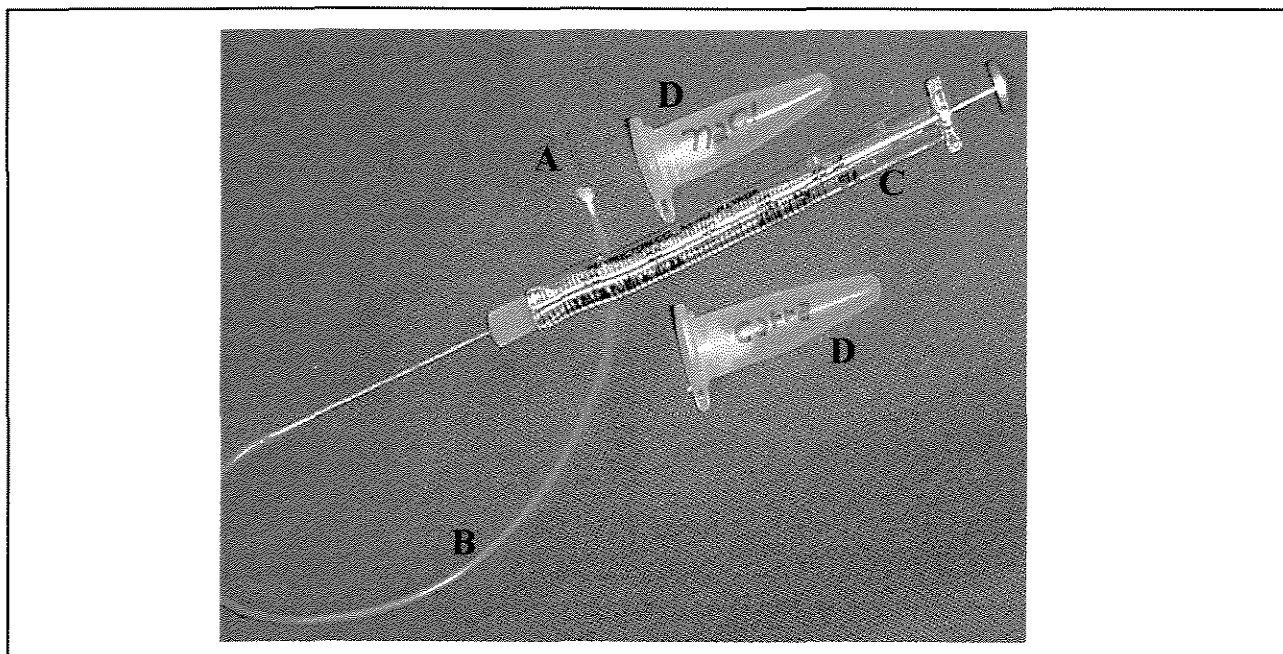


FIGURA 4: conjunto para a administração de drogas na ATM; A = agulha (0,4 mm × 13 mm); B = cânula de polietileno; C = microseringa de Hamilton; D = eppendorfs contendo as soluções a serem administradas.

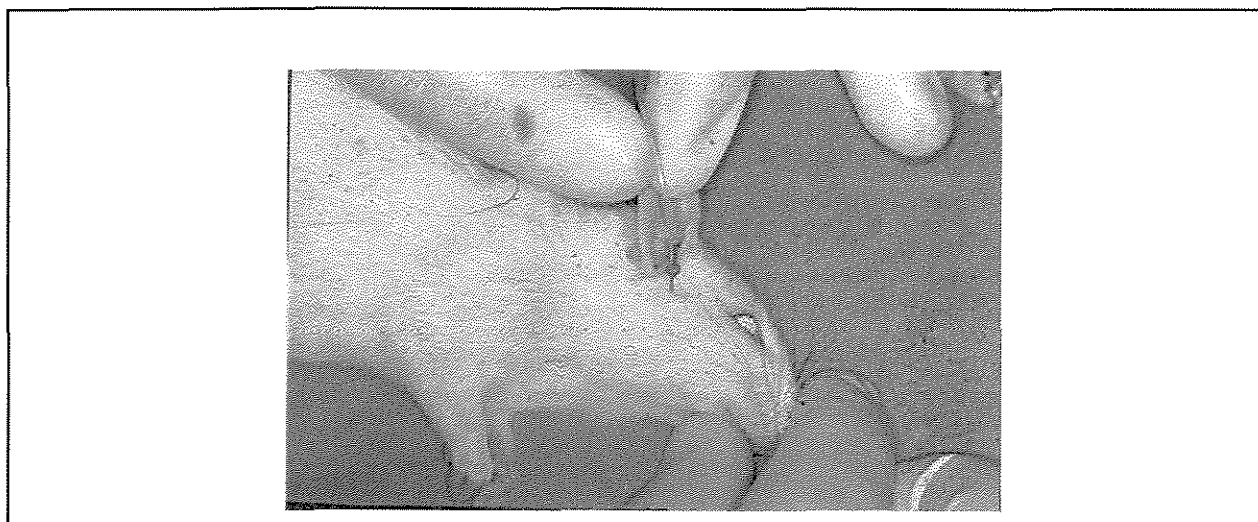


FIGURA 5: Introdução da agulha na ATM direita e verificação do contato da agulha no côndilo.

e) Verificação do correto local de aplicação dos agentes irritantes

Após o término dos experimentos, era feita a confirmação visual do local de administração dos agentes irritantes. Para esse procedimento, após os testes da formalina e da incapacitação mastigatória, os animais foram anestesiados com ketamina (0,1ml/100g) e xilazina (0,05 ml/100g) e, em seguida, o corante azul de Evans foi injetado, intracardiamente, na concentração de 1% (5mg/kg). Após dez minutos, realizava-se a perfusão cardíaca do animal com 60mL de NaCl a 0,9% 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 pelos agentes irritantes, torna-se possível a confirmação visual do sítio de aplicação (Fig. 6) (HAAS *et al.*, 1992).



FIGURA 6: Confirmação visual do local de administração dos agentes irritantes. A seta indica o côndilo da ATM. Notar o ponto de punção da agulha em vermelho no centro do côndilo e o corante extravasado em torno do mesmo.

Já no caso dos animais tratados com óleo de mostarda, a própria seqüência experimental do teste permitiu a confirmação visual do local de administração desse agente irritante.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados através do Teste t, Teste t pareado e análise de variância (ANOVA). Na presença de diferença significativa entre os grupos após a análise de variância, o teste Newman-Keuls foi aplicado. Em todas as análises foi utilizado o limite de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

a) Teste da formalina na ATM

Os dados obtidos a partir do teste da formalina na ATM estão demonstrados na Tabela 1 e ilustrados no Gráfico 1.

TABELA 1: Efeito do tratamento com formalina 1,5% e NaCl 0,9% (grupos controle) na ATM direita de ratas. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da soma (s) dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

GRUPO	TRATAMENTO			
	Formalina 1,5%	n	NaCl 0,9%	n
Fêmeas castradas	464,95 $\pm$ 179,05 a, A	10	57,99 $\pm$ 38,05 b	6
Fêmeas em proestro	315,85 $\pm$ 105,32 a, B	10	67,20 $\pm$ 35,20 b	10
Fêmeas em estro	465,77 $\pm$ 111,58 a, A	10	70,05 $\pm$ 23,53 b	10

Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na horizontal, diferem significativamente entre si (Teste t, $p < 0,05$). Médias, na vertical, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem significativamente entre si (ANOVA + Newman-Keuls, $p < 0,05$).

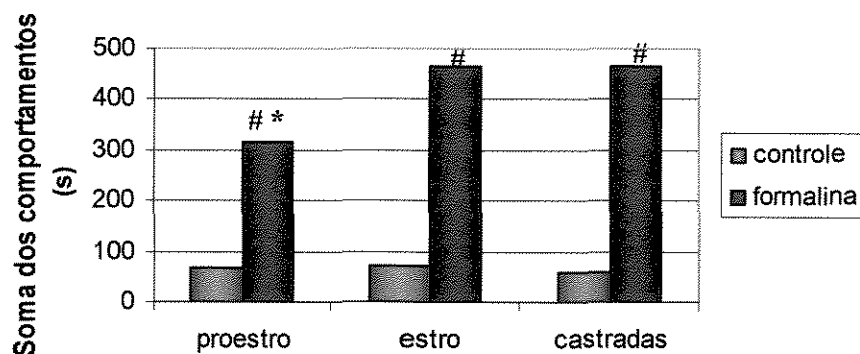


GRÁFICO 1: Efeito do tratamento com formalina 1,5% e NaCl 0,9% (grupos controle) na ATM direita de ratas sobre a soma (s) dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.

* $p < 0,05$ (ANOVA + Newman-Keuls) entre os grupos tratados com formalina 1,5%.

$p < 0,05$ (Teste t) em relação aos respectivos grupos controle.

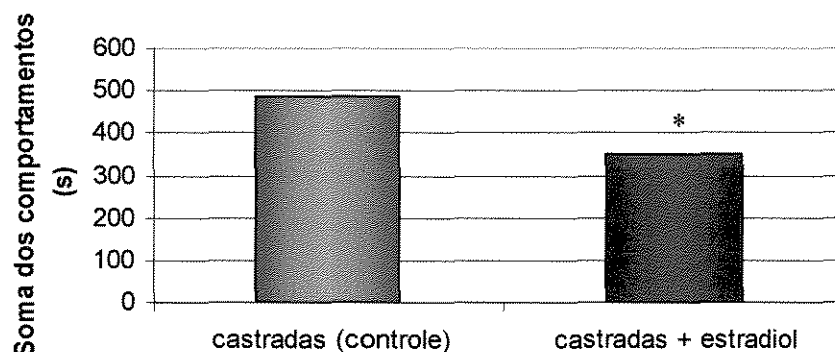


GRÁFICO 2: Efeito do tratamento com formalina a 1,5% na ATM direita de ratas sobre a soma (s) dos comportamentos de coçar a região orofacial e levantar rapidamente a cabeça.
 * $p < 0,05$ (ANOVA + Newman-Keuls).

De acordo com a Tabela 2 e a Figura 2, pode-se observar que houve uma significativa ($p < 0,05$) redução na sensibilidade ao teste da formalina na ATM nas ratas castradas com reposição de estrógeno em comparação às ratas controle (tratadas somente com óleo mineral).

b) Teste da incapacitação mastigatória induzida pela administração de carragenina na ATM

Machos, fêmeas em proestro, em estro e castradas, foram submetidos ao teste. O peso dos animais utilizados é apresentado na Tabela 3.

TABELA 3: Média $\pm$ desvio padrão do peso (g) dos ratos Wistar utilizados no teste da incapacitação mastigatória.

Grupos (n = 10/ grupo)	Peso (g)	
	Controle (salina)	Tratados (carragenina)
Machos	260,2 $\pm$ 10,8 a	260,1 $\pm$ 12,5 a
Fêmeas em estro	252,7 $\pm$ 14,8 a	247,1 $\pm$ 20,3 a
Fêmeas em proestro	248,4 $\pm$ 18,3 a	245,0 $\pm$ 11,7 a
Fêmeas castradas	250,1 $\pm$ 6,4 a	255,3 $\pm$ 17,4 a

Valores seguidos de letras iguais, na horizontal, não diferem entre si (ANOVA; $p > 0,05$).

Os dados obtidos com o teste da incapacitação mastigatória estão demonstrados na Tabela 4 e ilustrados no Gráfico 3.

TABELA 4: Efeito do tratamento com carragenina (carra) e NaCl a 0,9% (grupo controle) na ATM de ratos sobre quantidade (g) de ração ingerida. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão.

GRUPOS	TRATAMENTO				Redução (%)
	NaCl 0,9%	n	Carra	n	
Machos	3,83 $\pm$ 2,21 a	10	1,98 $\pm$ 1,45 b,B	10	48,3
Fêmeas em Proestro	1,98 $\pm$ 0,98 a	10	0,33 $\pm$ 0,42 b,A	10	83,33
Fêmeas em Estro	1,25 $\pm$ 0,67 a	10	0,2 $\pm$ 0,53 b,A	10	84
Fêmeas Castradas	3,48 $\pm$ 2,30 a	10	1,76 $\pm$ 1,38 b,B	10	49,42

Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na horizontal, diferem significativamente entre si (Teste t, $p < 0,05$). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais, na vertical, não diferem entre si (Teste t, $p > 0,05$).

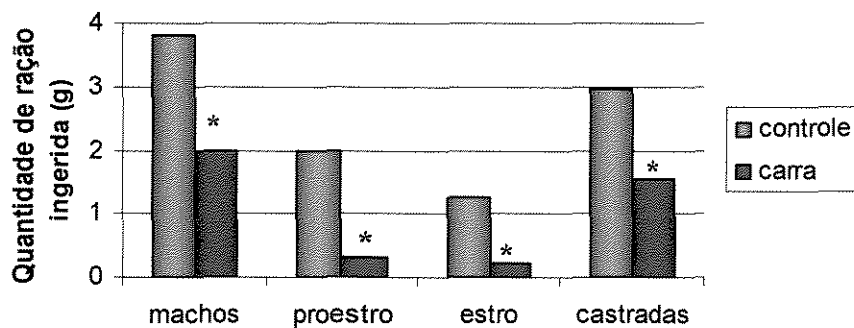


GRÁFICO 3: Quantidade (g) de ração ingerida após a administração na ATM direita de carragenina (carra) a 100µg/50µL ou NaCl a 0,9% (grupos controles).

* $p < 0,05$ em comparação aos controles.

De acordo com a Tabela 4 e a Gráfico 3, pode-se observar que houve uma redução significativa da ingestão alimentar nos grupos tratados com carragenina, em comparação aos seus respectivos grupos controle. Comparando-se as fêmeas em estro e em proestro, não houve diferença significativa em relação à quantidade de ração ingerida.

c) Inflamação neurogênica do tecido periarticular da ATM induzido pela administração de óleo de mostarda

Machos e fêmeas em proestro e estro foram submetidos a esse teste. Os resultados desse estudo estão demonstrados na Tabela 5 e ilustrados no Gráfico 4.

TABELA 5: Extravasamento plasmático ($\mu\text{g/g}$) no tecido periarticular da ATM de ratos induzido por Óleo de mostarda (ATM direita) ou Óleo Mineral (ATM esquerda – controle). Os valores estão expressos como a média $\pm$ o desvio padrão.

GRUPOS	TRATAMENTO		n
	Óleo Mineral	Óleo de Mostarda	
Machos	$3,78 \pm 1,1$ a	$24,97 \pm 7,2$ b A	6
Fêmeas em estro	$1,74 \pm 0,65$ a	$20,8 \pm 11,11$ b A	6
Fêmeas em proestro	$2,14 \pm 0,85$ a	$16,29 \pm 7,4$ b A	7

Médias seguidas de letras minúsculas distintas, na horizontal, diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$; Teste t pareado entre ATM direita e ATM esquerda). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na vertical não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$; ANOVA).

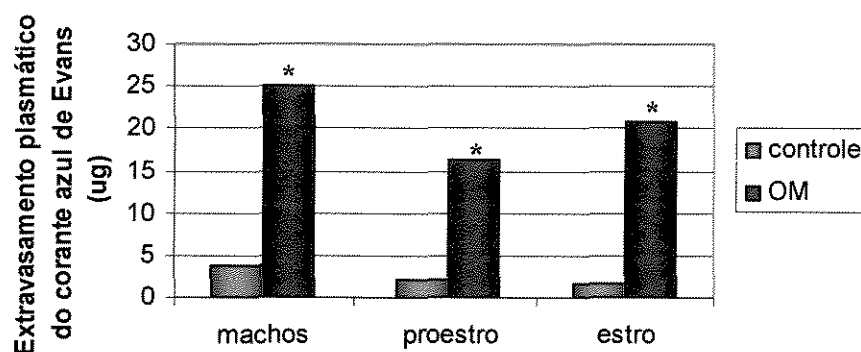


GRÁFICO 4: Extravasamento plasmático ($\mu\text{g/g}$) no tecido periarticular da ATM de ratos induzido por óleo de mostarda (OM) a 0,25% ou óleo mineral (ATM contralateral - controle).
* $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles.

De acordo com os resultados contidos na Tabela 5 e na Gráfico 4, todos os grupos tratados com OM apresentaram um significativo ($p < 0,05$) aumento do extravasamento plasmático em relação aos seus controles (ATM contralateral), mas não diferiram estaticamente entre si. Esse resultado demonstrou não haver diferença entre os fatores sexo e ciclo estral nesse teste.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o teste da formalina na ATM demonstraram que as fêmeas em proestro (maiores níveis hormonais da fase estral) apresentaram uma menor sensibilidade a esse teste do que as fêmeas em estro (menores níveis hormonais da fase estral) e castradas (ausência dos hormônios ovarianos), as quais não diferiram entre si. A reposição de 17β -Estradiol nas ratas castradas reduziu de forma estatisticamente significativa a dor na ATM induzida pela administração intra-articular de formalina.

São poucos os trabalhos que compararam as diferenças sexuais na sensibilidade à dor induzida pelo agente irritante formalina, e na região da ATM, há somente um estudo (JORGE, 2002). Esse autor verificou que as fêmeas em estro codificam com maior intensidade a dor induzida pela injeção de formalina na ATM do que machos e fêmeas em proestro.

Esses resultados aliados aos nossos reforçam a hipótese, sugerida por outros autores (DRURY & GOLD, 1978; FRYE *et al.*, 1992 e 1993; MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 1994) de que os níveis hormonais aumentados característicos da fase proestro do ciclo estral de ratas são de algum modo os responsáveis pela diminuição da sensibilidade dolorosa.

O fato da reposição de 17β -Estradiol em ratas castradas ter diminuído de forma significativa a dor na ATM, sugere que esse hormônio possa estar envolvido na modulação da nocicepção nas fêmeas em proestro durante o teste da formalina na ATM.

Uma hipótese para explicar a menor sensibilidade à dor nas fêmeas em proestro e nas castradas com reposição de 17β -Estradiol é a interação dos hormônios ovarianos com o sistema endógeno da modulação de dor.

AMANDUSSON *et al.* (1999) demonstraram que ratas castradas apresentam acentuada redução na formação do RNAm responsável pela produção de encefalina na medula espinhal e que a reposição hormonal de estrógeno induz rápido aumento na expressão desse RNA. Como se sabe, os neurônios encefalinérgicos da lâmina superficial da medula espinhal e ao nível do complexo trigeminal do tronco encefálico, são importantes componentes do sistema de modulação endógeno da dor. Eles realizam inibição pré-sináptica e pós-sináptica nos neurônios de transmissão da dor e são ativados por fibras aferentes primárias nociceptivas e não nociceptivas, além de fibras provenientes de regiões do encéfalo relacionadas à modulação da dor (AMANDUSSON *et al.*, 1999).

Além disso, ratas castradas diminuem o número de receptores do tipo μ -opióide (JOSHI *et al.*, 1993) enquanto que a reposição de estrógeno aumenta a quantidade de RNAm específico para esse receptor nos núcleos hipotalâmicos ventromedial e arqueudotal (QUINONES-JENAB *et al.*, 1997).

Outro importante peptídeo endógeno relacionado com a modulação da dor é a dinorfina, um agonista K-opióide. DAWSON-BASOA & GINTZLE (1996) averiguaram que os níveis plasmáticos elevados de estrógeno e progesterona são capazes de induzir analgesia pela maior liberação de dinorfina enquanto que CHANG *et al.* (2000) comprovaram que a população de receptores Kapa na medula espinhal de ratos varia conforme a fase do ciclo estral, sendo mais expressiva nas fases proestro

e estro. Essas informações podem explicar como os níveis aumentados de estrógeno e progesterona podem contribuir para a menor sensibilidade das fêmeas em proestro no teste da formalina na ATM.

Os resultados do presente trabalho também são semelhantes com trabalhos que verificaram as diferenças sexuais na nocicepção através da aplicação de formalina na pata de ratos, pois demonstram que machos apresentam menor sensibilidade dolorosa que fêmeas (ALOISI *et al.*, 1994; VINCLER *et al.*, 2001; GAUMOND *et al.*, 2002) enquanto fêmeas castradas apresentam maior sensibilidade à dor em comparação às fêmeas intactas (CECCARELLI *et al.*, 2003). No entanto, GAUMOND *et al.* (2002) observaram que fêmeas castradas foram menos sensíveis a dor que as fêmeas intactas enquanto que, no trabalho de VINCLER *et al.* (2001), não houve diferença nas respostas comportamentais nociceptivas entre as diferentes fases do ciclo estral. Essas discrepâncias em relação aos nossos resultados podem ser explicadas por dois motivos principais: i) no trabalho de GAUMOND *et al.* (2002), as fêmeas foram agrupadas em um único grupo, sem distinção da fase do ciclo estral e ii) a injeção de formalina na pata é realizada em tecido superficial, ao contrário do teste da formalina na ATM, no qual o agente irritante é injetado em tecidos profundos. Existem evidências que estímulos nocivos provindos de tecidos profundos são mais influenciados pelo sistema modulador endógeno da dor do que os estímulos nociceptivos provenientes de tecidos superficiais (FILLINGIM & NESS, 2000). Isso poderia explicar, pelo menos em nosso trabalho, porque as fêmeas em proestro apresentaram menor sensibilidade dolorosa do que as fêmeas em estro e castradas já que, como citado acima, poderiam ser menos favorecidas pelos menores níveis hormonais (ratas em estro e castradas), menor produção de

peptídeos endógenos e receptores opióides importantes para a modulação da dor (castradas).

Já em relação ao teste da incapacitação mastigatória, as fêmeas independentemente da fase do ciclo estral (proestro ou estro), apresentaram maior sensibilidade dolorosa na ATM do que os machos. Um resultado interessante foi que, neste teste nociceptivo, as ratas castradas tiveram uma redução da sensibilidade na ATM, comparável aos machos.

Na região da ATM, o presente trabalho talvez tenha sido o primeiro a analisar as diferenças sexuais na dor inflamatória induzida pela carragenina. Portanto, resta a comparação dos nossos resultados com os obtidos em outros trabalhos que analisaram as diferenças sexuais na dor e inflamação induzida em outras regiões do corpo ou, induzida na ATM por outros agentes irritantes.

Nossos resultados assemelham-se com outros trabalhos os quais observaram que as fêmeas são mais sensíveis do que os machos a uma variedade de testes inflamatórios: hiperalgesia inflamatória na pata induzida pelo adjuvante de Freund (BRADSHAW *et al.*, 2000), artrite em joelho induzida pela bradicinina (GREEN *et al.*, 1999), maior resposta inflamatória induzida pela carragenina (MISIEWICZ *et al.*, 1996) e maior sensibilidade a dor na ATM induzida pela administração de glutamato (CAIRNS *et al.*, 2002). Alguns trabalhos demonstram que a castração das fêmeas também diminui a severidade da inflamação (GREEN *et al.*, 1999) e da dor (CAIRNS *et al.*, 2002), enquanto que a reposição de estrógeno teve os efeitos opostos (GREEN *et al.*, 1999; CAIRNS *et al.*, 2002).

Os resultados do teste da incapacitação mastigatória assemelham-se com os padrões das disfunções têmporo-mandibulares em humanos: a dor é mais prevalente

em mulheres do que em homens e o envolvimento dos hormônios gonadais torna-se evidente pelo fato da dor quase sempre se iniciar após a puberdade e diminuir substancialmente após a menopausa (LE RESCHE *et al.*, 1997). Em acréscimo, mulheres com disfunção têmporo-mandibular (DTM) e que utilizam contraceptivos orais, apresentam um padrão de dor mais constante ao longo do ciclo menstrual (DAO *et al.*, 1998). Outra evidência do envolvimento patológico do estrógeno sobre a ATM é que as mulheres menopausadas as quais fazem terapia de reposição hormonal (estrógeno) aumentam suas chances de desenvolver algum tipo de DTM (LE RESCHE *et al.*, 1997).

O estrógeno pode aumentar a inflamação na ATM (HASKIN *et al.*, 1995) e já foram identificados receptores estrogênicos na ATM de fêmeas primatas, mas não de machos (AUFDEMORTE *et al.*, 1986). Na gravidez o estrógeno aumenta a lassidão ligamentar da ATM o que poderia resultar em alguma disfunção articular e inflamação (WESTLING, 1992).

Os resultados obtidos com o teste da formalina na ATM (menor sensibilidade nas ratas em proestro e nas castradas com reposição de estrógeno) e com o teste da incapacitação mastigatória (maior sensibilidade nas ratas intactas e menor sensibilidade nas ratas castradas) podem, a princípio, parecerem bastante controversos, mas algumas hipóteses sugeridas a seguir podem melhorar a compreensão dessas diferenças.

Por exemplo, a dor induzida pela carragenina é dependente da liberação tecidual de bradicinina que, por sua vez, inicia uma seqüência de eventos após a sua ligação em receptores B2 de células residentes (POOLE *et al.*, 1999). Já foi demonstrado que a expressão dos receptores B2 na aorta e rins de ratos é significativamente

reduzida após a ovariectomia e que a reposição de estrógeno restabelece os níveis fisiológicos desse receptor (MADEDDU *et al.*, 1997). Esse trabalho explica porque as mulheres na menopausa aumentam o risco de desenvolver algum tipo de cardiopatia (já que as cininas têm efeito vasodilatador) e elucida um dos mecanismos protetores da reposição estrogênica no desenvolvimento de cardiopatia em mulheres na menopausa.

O mesmo raciocínio pode ser utilizado para os nossos resultados da incapacitação mastigatória, porém, em se tratando do fenômeno dor, sabe-se que os receptores B2 estão intimamente relacionados com a dor e a inflamação (POOLE *et al.*, 1999). Assim, nas ratas intactas a expressão de receptores B2 na ATM poderia estar substancialmente aumentada em relação às ratas castradas, o que explicaria a menor sensibilidade à dor inflamatória nesse grupo.

Por outro lado, o mecanismo de ação da formalina para induzir dor, difere da carragenina pois, apesar de existir evidências da participação dos receptores B1 e B2 (CORREA & CALIXTO, 1993), já foi demonstrado que os receptores histaminérgico H1 e os receptores serotoninérgicos 5-HT (4/3) e 5-HT (1A), são fundamentais para o desenvolvimento da nocicepção induzida durante o teste da formalina (PARADA *et al.* 2001). Se o número de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos da ATM não se alterar pelas oscilações plasmáticas dos hormônios ovarianos, a nocicepção nas fêmeas após à administração de formalina nessa articulação somente seria influenciada pelo sistema endógeno de modulação da dor que, como visto, é mais pronunciado nas fêmeas em proestro e nas fêmeas castradas com reposição estrogênica. Obviamente, mais estudos necessitam ser realizados para comprovar essas hipóteses.

Já o extravasamento plasmático induzido pelo óleo de mostarda, que induz inflamação do tipo neurogênica, não se mostrou sensível aos fatores sexo e ciclo estral. Levando-se em consideração que o óleo de mostarda induz extravasamento plasmático nos tecidos principalmente através de neuropeptídeos como a substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, ambos liberados de fibras sensitivas do tipo C (INOUE *et al.*, 1997) o fator sexo e as diferenças hormonais que ocorrem durante o ciclo estral parecem não influenciar a ação desses neuropeptídeos.

Os resultados apresentados no presente trabalho reiteram a maioria das conclusões obtidas pelos pesquisadores da área, em que, apesar de não haver dúvidas sobre a existência de diferenças sexuais na dor, o consenso desaparece pelas diversas hipóteses propostas para explicar os mecanismos neurobiológicos envolvidos na modulação do fenômeno doloroso. As diferenças relacionadas ao sexo e ciclo estral encontradas neste trabalho podem ser de grande valia para a melhor compreensão dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas diferenças dos sexos masculino e feminino em relação à nocicepção e analgesia das disfunções têmporo-mandibulares.

6. CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada, os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que, em ratos:

- A sensibilidade ao teste da formalina da ATM é alterada pelas oscilações hormonais do ciclo estral e pela reposição de 17 β -Estradiol em fêmeas castradas;
- A maior sensibilidade à alodinia da ATM (teste da carragenina) nas fêmeas em relação aos machos, é dependente da produção dos hormônios ovarianos;
- O extravasamento plasmático neurogênico da ATM independe do sexo e do ciclo estral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Akiba I, Seki T, Mori M, Iizuka M, Nishimura S, Sasaki S, Imoto K, Barsoumian EL. Stable expression and characterization of human PN1 and PN3 sodium channels. *Receptors Channels* 2003;9(5):291-9.
2. Ali BH, Sharif SI, Elkadi A. Sex difference and the effect of gonadectomy on morphine-induced antinociception and dependence in rat and mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22: 342-4.
3. Almansa C, Alfon J, de Arriba AF, Cavalcanti FL, Escamilla I, Gomez LA, Miralles A, Soliva R, Bartoli J, Carceller E, Merlos M, Garcia-Rafanell J. Synthesis and structure-activity relationship of a new series of COX-2 selective inhibitors: 1,5-diarylimidazoles. *J Med Chem* 2003; 46(16):3463-75.
4. Aloisi AM, Albornetti ME, Carli G. Sex differences in the behavioural response to persistent pain in rats. *Neurosci Lett* 1994; 179:79-82.
5. Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Lundeberg T, Theodorsson E. Co-variation of neuropeptide y, calcitonin gene-related peptide, substance p and neurokinin a in joint fluid from patients with temporomandibular joint arthritis. *Arch Oral Biol* 1995; 40 (2):127-35.
6. Amandusson A, Hallbeck M, Hallbeck AL, Hermanson O, Blomqvist A. Estrogen-induced alterations of spinal cord enkephalin gene expression. *Pain* 1999; 83(2):243-8.
7. Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Lundeberg T, Theodorsson E. Neuropeptides in the arthritic TMJ and symptoms and signs from the stomatognathic system with special consideration to rheumatoid arthritis. *J Orofac Pain* 1995 Summer;9(3):215-25.

*De acordo com a Quinta edição das normas do grupo de Vancouver, de 1997, e abreviaturas dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

8. Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Lundeberg T, Theodorsson E. Substance P-associated increase of intra-articular temperature and pain threshold in the arthritic TMJ. *J Orofac Pain* 1998 Spring;12(2):101-7.
9. Arsati F, Veiga MCFA. Os anti-inflamatórios, dexametasona, indometacina e meloxicam não inibem a inflamação neurogênica induzida pelo óleo de mostarda na ATM de ratos. *Rev Odonto Cienc* 2004 (no prelo).
10. Aufdemorte, T.B., Van Sickels, J.E., Dolwick, M.F., Sheridan, P.J., Holt, G.R., Aragon, S.B., Gates, G.A. Estrogen receptors in the temporomandibular joint of the baboon (*Papio cynocephalus*): An autoradiographic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986; 61: 307-14.
11. Beaty WW, Fessler RG. Gonadectomy and sensitivity to electric shock in the rat. *Physiol Behav* 1976; 19: 1-6.
12. Berkley KJ. Sex differences in pain. *Behav Brain Sci* 1997; 20: 371-80.
13. Binder W, Carmody J, Walker J. Effect of gender on anti-inflammatory and analgesic actions of two κ -opioids. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292 (1):303-9.
14. Bradshaw HB, Temple JL, Wood E, Berkley KJ. Estrous variations in behavioral responses to vaginal and uterine distention in the rat. *Pain* 1999; 82 (2): 187-97.
15. Bradshaw H, Miller J, Ling Q, Malsnee K, Ruda MA. Sex difference and phases of estrous cycle alter the response of spinal cord dynorphin neurons to peripheral inflammation and hyperalgesia. *Pain* 2000; 85 (1/2): 93-9.
16. Cairns BE, Sim Y, Bereiter DA, Sessle BJ, Hu JW. Influence of sex on reflex jaw muscle activity evoked from the rat temporomandibular joint. *Brain Research* 2002; 957: 338-44.

17. Campbell EA, Gentry C, Patel S, Kidd B, Cruwys S, Fox AJ, Urban L. Oral anti-hyperalgesic and anti-inflammatory activity of NK(1) receptor antagonists in models of inflammatory hyperalgesia of the guinea-pig. *Pain* 2000;87(3):253-63.
18. Carleson J, Alstergren P, Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Srinivasan GR, Theodorsson E, Lundeborg T. Effects of adjuvant on neuropeptide-like immunoreactivity in experimentally induced temporomandibular arthritis in rats. *Arch Oral Biol* 1996 Jul;41(7):705-12.
19. Ceccarelli I, Fiorenzani P, Massafra C, Ceccarelli AMA et al. Long-term ovariectomy changes formalin-induced licking in female rats: the role of estrogens. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003, 1:24. This article is available from: <http://www.RBEj.com/content/1/1/24>
20. Chang CP, Aicher SA, Drake CT. Kappa opioid receptors in rat spinal cord vary across the estrous cycle. *Brain Res* 2000; 861:168-72.
21. Cicero TJ, Nock B, Meyer ER. Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, 272 (2): 767-73.
22. Cicero TJ, Nock B, Meyer ER. Sex-related differences in morphine's antinociception activity: relationship to serum and brain morphine concentrations. *J Pharmacol Exp Ther* 1997, 282 (2): 939-4.
24. Clavelou P, Pajot J, Dallel R, Raboisson P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. *Neurosci Lett* 1989, 103 (3): 349-53.
- 25.Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990, 535 (1): 155-8.

26. Correa CR, Calixto JB. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol*. 1993 Sep; 110(1): 193-8.
27. Costello AH, Hargreaves KM. Suppression of carrageenan-induced hyperalgesia, hyperthermia and edema by a bradykinin antagonist. *Eur J Pharmacol* 1989;171(2-3):259-63.
28. Dao TT, Knight K, Ton-that V. Modulation of myofacial pain by the reproductive hormones: a preliminary report. *J Prosthet Dent* 1998; 79 (6): 663-70.
29. Dao TT, Knight K, Ton-that V. Modulation of myofacial pain patterns by oral contraceptives: a preliminary report. *J Dent Res* 1997; 76: 148.
30. Dao TT, Leresche L. Gender differences in pain. *J Orofac Pain* 2000; 14 (3): 169-84.
31. Dawson-Basoa ME, Gintzler AR. Estrogen and progesterone activate spinal kappa-opiate receptor analgesic mechanisms. *Pain* 1996; 64: 169-77.
32. Dexheimer J, Terenzi MG. Efeito dos hormônios gonadais no limiar nociceptivo em ratas ovariectomizadas. In: FeSBE, 2001, Caxambu. Anais...Caxambu, 2001. Resumo 01.138.
33. Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth* 1995; 75: 125-31.
34. Drury RA, Gold RM. Differential effects of ovarian reactivity to electric footshock in the rat. *Physiol Behav* 1978; 20: 187-91.
35. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4 (2):161-74.
36. Ferreira SH, Lorenzetti BB, Correa FM. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol* 1978;53(1):39-48.

37. Fillingim RB, Maixner W, Girdler SS, Light KC, Harris MB, Sheps DS et al. Ischemic but not thermal pain sensitivity varies across the menstrual cycle. *Psychosom Med* 1997; 59 (5): 512-20.
38. Fillingim RB, Maixner W, Kincaid S, Silva S. Sex differences in temporal summation but not sensory-discriminative processing of thermal pain. *Pain* 1998; 75: 121-7.
39. Fillingim RB, Edwards RR, Powell T. The relationship of sex and clinical pain to experimental pain responses. *Pain* 1999; 83: 419-25.
40. Fillingim RB, Maixner E. Gender differences in response to noxious stimuli. *Pain Forum* 1995; 4: 209-21.
41. Fillingim RB, Ness TJ. Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24: 485-501.
42. Fiorentino MP, Brian EC, James WH. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol* 1999; 44 (1): 27-32.
43. Frye CA, Bock BC, Kanarek RB. Hormonal milieu affects tailflick latency in female rats and may be attenuated by access to sucrose. *Physiol Behav* 1992; 52: 699-706.
44. Frye CA, Cuevas CA, Kanarek RB. Diet and estrous cycle influence pain sensitivity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 45: 255-260.
45. Gaumond I, Arsenault P, Marchand S. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res* 2002; 958(1):139-45.
46. Gear RW, Miaskowski C, Gordon NC, Paul SM, Heller PH, Levine JD. Kappa-opioids produce significantly greater analgesia in women than in men. *Nat Med* 1996; 2 (11): 1248-50.

47. Giamberardino MA, Berkley KJ, Iezzi S, de Bigontina P, Vecchiet L. 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* 1997; 71: 187-97.
48. Gordon FT, Soliman MR. Diurnal variation in the acute effects of estradiol and progesterone on beta-endorphin and met-enkephalin levels in specific brain regions of ovariectomized rats. *Pharmacol* 1994; 49 (3): 192-8.
49. Gordon NC, Gear RW, Heller PH, Paul S, Miaskowski C, Levine JD. Enhancement of morphine analgesia by GABA agonist baclofen. *Neuroscience* 1995; 69: 345-9.
50. Green PG, Dahlqvist SR, Isenberg WM, Strausbaugh HJ, Miao FJ, Levine JD. Sex steroid regulation of the inflammatory response: sympathoadrenal dependence in the female rat. *J Neurosci.* 1999; 19(10):4082-9.
51. Hapidou EG, Cantazaro DD. Sensitivity to cold pressor pain in dysmenorrheic and non-dysmenorrheic women as a function of menstrual cycle phase. *Pain* 1988; 34: 277-83.
52. Hapidou EG, Rollman GB. Menstrual cycle modulation of tender points. *Pain* 1998; 77: 151-61.
53. Haskin CL., Milan SB; Cameron IL. Pathogenesis of degenerative joint disease in the human temporomandibular joint. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6: 248-77.
54. Haas DA, Nakanishi O, MacMillan RE, Jordan RC, Hu JW. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. *Arch Oral Biol* 1992; 37 (5): 417-22.

55. Hu JW. Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls. *Pain* 1990; 41: 331-45.
56. Hu, J.W. Excitatory effects on neck and jaw muscle activity of inflammatory irritant applied to cervical paraspinal tissues. *Pain* 1993; 55: 243-50.
57. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30 (1): 104-14.
58. Inoue H, Asaka T, Nagata N, Koshihara Y. Mechanism of mustard oil - induced skin inflammation in mice. *European J Pharmac* 1997; 333: 231-40.
59. Jorge DL. Influência do sexo e do ciclo estral sobre a sensibilidade à dor na atm de ratos (teste da formalina na atm). Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2002, 104p.
60. Joshi D, Billiar RB, Miller MM. Modulation of hypothalamic μ -opioid receptor density by estrogen: a quantitative autoradiographic study of the female C57BL/6J mouse. *Brain Res Bull* 1993; 30:629-634.
61. Kayser V, Berkley KJ, Keita H, Gautron M, Guilbaud G. Estrous and sex variations in vocalization threshold to hindpaw and tail pressure stimulation in the rat. *Brain Res* 1996; 742: 352-54.
62. Kocher L, Anton F, Reeh PW, Handwerker HO. The effect of carrageenan-induced inflammation on the sensitivity of unmyelinated skin nociceptors in the rat. *Pain* 1987; 29(3):363-73.

63. Kubota E, Imamura H, Kubota T, Shibata T, Murakami K. Interleukin 1b and stromelysin (MMP 3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 20-7.
64. Kuczmierczyk AR, Adams HE. Autonomic arousal and pain sensitivity in women with premenstrual syndrome at different phases of the menstrual phases of the menstrual cycle. *J Psychosom Res* 1986; 30 (4): 421-8.
65. Kudrow L. The relationship of headache frequency to hormone use in migraine. *Headache* 1975; 15(1): 36-40.
66. Leer MN, Bradbury A, Maloney JC, Stewart CN. Elevated shock threshold in sexually receptive female rats. *Physiol Behav* 1988; 42: 617-20.
67. Leresche L. Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8 (3): 291- 305.
68. LeResche L. Gender differences in pain. Epidemiologic perspectives. *Pain Forum* 1995; 4: 228-30.
69. Locker D, Slade G., Prevalence of symptoms associated with tempomandibular disorders in a Canadian population. *Community Dent Oral Epidemiol* 1988; 16: 310-13.
70. Madeddu P, Emanuelli C, Song Q, Varoni MD, Demontis MP, Arania V, Glorioso N, Chao J, Glorioso N. Regulation of bradykinin B2-receptor exprssion by oestrogen. *Br J Pharmacol* 1997; 21(8): 1763-9.
71. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biology* 2002 Nov; 62(4A):609-14.

72. Marcus DA. Interrelationships of neurochemicals, estrogen, and recurring headache. *Pain* 1995; 62(2):129-39.
73. Martinez-Gomez M, Cruz Y, Salas M, Hudson R, Pacheco P. Assessing pain threshold in the rat: changes with estrus and time of day. *Physiol Behav* 1994; 55 (4): 651-7.
74. Milan SB, Schmitz, JP. Molecular biology of temporomandibular joint disorders: proposed mechanisms of disease. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53: 1448-54.
75. Misiewicz B, Griebler C, Gomez M, Raybourne R, Zelazowska E, Gold PW, Sternberg EM. The estrogen antagonist tamoxifen inhibits carrageenan induced inflammation in LEW/N female rats. *Life Sci* 1996; 58(16):PL281-6.
76. Nordahl S, Alstergren P, Kopp S. Tumor necrosis factor- α in synovial fluid and plasma from patients with chronic connective tissue disease and its relation to temporomandibular joint pain. *Oral Maxillofac Surg*; 2000; 58(5): 525-30.
77. Otthennnes IG, Moore PF. Carrageenan foot edema test. In: *Enzymology Part L "Chemotaxis and Inflammation"* (Ed. Giovanni Disabato) 1988; 28:320-7.
78. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 2001; 102 (4): 937-44.
79. Paula JL, Macari M, Parada CA, Barros SP, Tambeli CH. Bases científicas para determinação de uma terapêutica farmacológica mais específica e adequada para o controle da dor inflamatória da ATM. *Anais da Jornada Odontológica da FOP-UNICAMP*, 2000.

80. Poole S, Lorenzetti BB, Cunha JM, Cunha FQ, Ferreira SH. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1999;126(3):649-56.
81. Quinn JH, Bazan NG. Identification of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in the synovial fluid of painful, dysfunctional temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 1990; 48: 968-71.
82. Quinones-jenab V, Jenab S, Ogawa S, Inturrisi C, Pfaff DW. Estrogen regulation of mu-opioid receptor mRNA in the forebrain of female rats. *Mol Brain Res* 1997; 47: 134-138.
83. Ratka A, Simpkins JW. Effects of estradiol and progesterone on the sensitivity to pain and on morphine-induced antinociception in female rats. *Horm Behav* 1991; 25(2):217-28.
84. Riendeau D, Percival MD, Brideau C, Charleson S, Dube D, Ethier D et al. Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* 2001 Feb; 296(2):558-66.
85. Robinson ME, Riley JL 3rd, Brown FF, Gremillion H. Sex differences in response to cutaneous anesthesia: a double blind randomized study. *Pain* 1998; 77: 143-9.
86. Roveroni RC, Parada CA, Cecilia M, Veiga FA, Tambeli CH. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: the TMJ formalin test. *Pain* 2001; 94 (2): 185-91.
87. Shafer DM, Assael L, White LB, Rossomando EF. Tumor necrosis factor - α as a biochemical marker of pain and outcome in temporomandibular joints with internal derangements. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52: 786-91.

88. Sluka KA, Willis WD, Westlund KN. The role of dorsal root reflex in neurogenic inflammation. *Pain Forum* 1995; 4: 141-9.
89. Suzuki T, Segami N, Nishimura M, Sato J, Nojima T. Bradykinin expression in synovial tissues and synovial fluids obtained from patients with internal derangement of the temporomandibular joint. *Cranio* 2003; 21(4):265-70.
90. Takahashi T, Kondoh T, Fukuda M, Yamazaki Y, Toyosaki T, Suzuki R. Proinflammatory cytokines detectable in sinovial fluids from patints with temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85:135-41.
91. Veith JL, Anderson J, Slade SA, Thompson P, Laugel GR, Getzlaf S. Plasma beta-endorphin, pain threshold and anxiety levels across the human menstrual cycle. *Physiol Behav* 1984; 32:31-4.
92. Vincler M, Maixner W, Vierck CJ, Light AR. Estrous cycle modulation of nociceptive behaviors elicited by electrical stimulation and formalin. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 69: 315-24.
93. Westling L. Temporomandubular joint dysfunction and systemic joint laxity. *Swed Dent J* 1992; 81 (Supl):1-79.
94. Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain* 1990; 40: 229-38.
95. Winter CA, Risley GA, Nuss GW. Carrageenan-induced edema in hind-paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 111: 544-47.
96. Yoshida H, Fujita S, Nishida M, Iizuka T. The expression of substance p in human temporomandibular joint samples: an immunohistochemical study. *J Oral Rehabil* 1999; 26: 338-44.

97. Yu XM, Sessle BJ, Vernon H, Hu JW et al. Effects of inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint on jaw and neck muscle activity. *Pain* 1994; 60: 143-9.
98. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16: 109 -110.

ANEXOS

ANEXO 1: Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética



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 do Sexo e do Ciclo Estral nas Respostas Comportamentais Induzidas pela Administração de Formalina na Articulação Temporomandibular de Ratos", sob a responsabilidade de Dany 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 06.1.16.1.2000 protocol nº 136-1. This certificate expires on 06.1.16.1.2001.
am 20 11

Campinas 06.1.16.1.2000

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

Alba R. M. Souza Brito

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP-13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE (019) 788.7116
FAX (019) 289.3124



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 286-1, sobre "Influência da ovariectomia e da reposição de estrogênio sobre a dor e o processo inflamatório agudo induzido na ATM de ratas" sob a responsabilidade de Dra. Maria Cecília Figueira de Almeida Viçosa 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 02/08/2001.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 286-1, entitled "Influence of ovariectomy and estrogen replacement on the pain and acute inflammation induced in the TMJ of female rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 02/08/2001.

(d) (m) (y)

Campinas, 02 de agosto de 2001.

Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Prof. Dr. Armando Ferreira Lima
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
CEP -13 081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 37887116
FAX 55 19 32893124

ANEXO 2

Tabelas referentes aos valores individuais da amostra.

TABELA 1: Valores individuais da soma dos comportamentos (s) de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial nas ratas castradas que receberam 50 μ L NaCl a 0,9% (grupo controle) na ATM direita

n	Soma dos comportamentos
1	72,12
2	44,05
3	33,64
4	12,44
5	63,29
6	122,42
Média $\pm$ DP	57,99 $\pm$ 38,05

TABELA 2: Valores individuais da soma dos comportamentos (s) de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial nas ratas em proestro que receberam 50 μ L NaCl a 0,9% (grupo controle) na ATM direita

n	Soma dos comportamentos
1	23,41
2	18,04
3	80,87
4	69,03
5	94,32
6	52,51
7	118,64
8	101,56
9	28,22
10	85,41
Média $\pm$ DP	67,20 $\pm$ 35,20

TABELA 3: Valores individuais da soma dos comportamentos (s) de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial nas ratas em estro que receberam 50 μ L NaCl a 0,9% (grupo controle) na ATM direita

n	Soma dos comportamentos
1	37,22
2	23,84
3	77,12
4	66,96
5	76,16
6	93,52
7	78,86
8	101,52
9	68,16
10	77,18
Média $\pm$ DP	70,05 $\pm$ 23,53

TABELA 4: Valores individuais da soma dos comportamentos (s) de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial nas ratas castradas que receberam 50 μ L formalina a 1,5% na ATM direita

n	Soma dos comportamentos
1	524,97
2	468,78
3	410,97
4	281,87
5	380,84
6	849,76
7	341,03
8	311,68
9	614,71
Média $\pm$ DP	464,95 $\pm$ 179,05

TABELA 5: Valores individuais da soma dos comportamentos (s) de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial nas ratas em proestro que receberam 50 μ L formalina a 1,5% na ATM direita

n	Soma dos comportamentos
1	298,94
2	256,1
3	323,8
4	499,13
5	304,27
6	387,94
7	124,02
8	382,57
9	376,03
10	205,75
Média $\pm$ DP	315,85 $\pm$ 105,32

TABELA 6: Valores individuais da soma dos comportamentos (s) de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial nas ratas em estro que receberam 50 μ L formalina a 1,5% na ATM direita

n	Soma dos comportamentos
1	428,8
2	345,64
3	380,97
4	637,62
5	443,88
6	505,33
7	320,28
8	543,47
9	633,26
10	418,48
Média $\pm$ DP	465,77 $\pm$ 111,58

TABELA 7: Valores individuais da soma dos comportamentos (s) de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial nas ratas castradas com reposição de 17 β -Estradiol que receberam 50 μ L de formalina a 1,5% na ATM direita

n	Soma dos comportamentos
1	314,61
2	460,42
3	242,99
4	213,48
5	365,6
6	506,74
7	464,6
8	310,22
9	293,46
10	340,53
Média $\pm$ DP	351,25 $\pm$ 97,94

TABELA 8: Valores individuais da soma dos comportamentos (s) de levantar rapidamente a cabeça e coçar a região orofacial nas ratas castradas com reposição de óleo mineral (grupo controle) que receberam 50 μ L de formalina a 1,5% na ATM direita

n	Soma dos comportamentos
1	596,9
2	447,77
3	323,85
4	709,93
5	762,42
6	539,71
7	310,94
8	549,59
9	251,13
10	362,96
Média $\pm$ DP	485,52 $\pm$ 174,63

TABELA 9: Valores individuais do peso (g) dos animais submetidos ao teste da incapacitação mastigatória - grupos tratados com NaCl (controle).

n	Grupos			
	machos	Fêmeas em estro	Fêmeas em Proestro	Fêmeas Castradas
1	240	260	255	243
2	243	230	240	261
3	268	260	230	249
4	262	280	225	250
5	260	244	259	260
6	265	260	260	245
7	275	235	260	255
8	267	260	275	246
9	262	255	220	247
10	260	243	260	245
Média ± DP	260,2 ± 10,8	252,7 ± 14,8	248,4 ± 18,3	250,1 ± 6,4

TABELA 10: Valores individuais do peso (g) dos animais submetidos ao teste da incapacitação mastigatória - grupos tratados com carragenina.

n	Grupos			
	machos	Fêmeas em estro	Fêmeas em Proestro	Fêmeas Castradas
1	266	270	255	285
2	270	280	255	240
3	244	266	240	245
4	275	220	230	245
5	266	240	243	290
6	254	240	250	250
7	240	260	264	250
8	258	230	230	250
9	276	230	233	246
10	252	235	250	252
Média ± DP	260,1 ± 12,5	247,1 ± 20,3	245,0 ± 11,7	255,3 ± 17,4

TABELA 11: Valores individuais da quantidade de ração ingerida (g) nos machos que receberam 50 μ L NaCl a 0,9% (grupo controle) na ATM direita

n	Quantidade de ração ingerida
1	4,38
2	4,81
3	4,77
4	7,12
5	0
6	3,74
7	4,39
8	0
9	4,88
10	4,24
Média $\pm$ DP	3,83 $\pm$ 2,2

TABELA 12: Valores individuais da quantidade de ração ingerida (g) nas ratas em proestro que receberam 50 μ L NaCl a 0,9% (grupo controle) na ATM direita

n	Quantidade de ração ingerida
1	0,32
2	0,86
3	1,8
4	2,96
5	2,92
6	1,24
7	1,83
8	1,88
9	2,77
10	3,24
Média $\pm$ DP	1,98 $\pm$ 0,98

TABELA 13: Valores individuais da quantidade de ração ingerida (g) nas fêmeas em estro que receberam 50 μ L de NaCl a 0,9% (grupo controle) na ATM direita

n	Quantidade de ração ingerida
1	2,23
2	0,48
3	1,04
4	2,57
5	0,76
6	1,21
7	0,77
8	0,95
9	1,55
10	0,97
Média $\pm$ DP	1,25 $\pm$ 0,67

TABELA 14: Valores individuais da quantidade de ração ingerida (g) nas fêmeas castradas que receberam 50 μ L de NaCl a 0,9% (grupo controle) na ATM direita

n	Quantidade de ração ingerida
1	8,08
2	3,43
3	4,15
4	2,93
5	6,12
6	3,43
7	0
8	1,35
9	1,99
10	3,29
Média $\pm$ DP	3,48 $\pm$ 2,30

TABELA 15: Valores individuais da quantidade de ração ingerida (g) nos machos que receberam: 50 μ L de carragenina 100 μ g/50 μ L na ATM direita

n	Quantidade de ração ingerida
1	1,71
2	3,1
3	3,43
4	0
5	3,13
6	3,3
7	0
8	2,83
9	0
10	2,25
Média $\pm$ DP	1,98 $\pm$ 1,45

TABELA 16: Valores individuais da quantidade de ração ingerida (g) nas fêmeas em proestro que receberam 50 μ L de NaCl a 0,9% (grupo controle) na ATM direita

n	Quantidade de ração ingerida
1	0,1
2	0,01
3	0,01
4	0,05
5	0
6	1,02
7	0
8	0,79
9	0,88
10	0,46
Média $\pm$ DP	0,33 $\pm$ 0,42

TABELA 17: Valores individuais da quantidade de ração ingerida (g) nas fêmeas em estro que receberam 50 μ L de carragenina 100 μ g/50 μ L na ATM direita

n	Quantidade de ração ingerida
1	0
2	0,35
3	1,68
4	0,01
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
Média $\pm$ DP	0,2 $\pm$ 0,53

TABELA 18: Valores individuais da quantidade de ração ingerida (g) nas fêmeas castradas que receberam 50 μ L de carragenina 100 μ g/50 μ L na ATM direita

n	Quantidade de ração ingerida
1	3,7
2	0,07
3	1,92
4	2,8
5	3,04
6	2,98
7	1,4
8	0,04
9	1,64
10	0
Média $\pm$ DP	1,76 $\pm$ 1,38

TABELA 19: Valores individuais do extravasamento plasmático ($\mu\text{g/g}$) dos tecidos periarticulares das ATMs esquerda e direita de machos, induzido pelo óleo mineral ($20\mu\text{L}$) (controle) e óleo de mostarda a 0,25% ($20\mu\text{L}$), respectivamente.

n	Tratamento	
	Óleo mineral	Óleo de mostarda
1	5,26	34,16
2	2,48	22,60
3	2,5	23,89
4	3,8	13,37
5	4,21	24,77
6	4,44	31,08
Média $\pm$ DP	3,78 $\pm$ 1,11	24,97 $\pm$ 7,25

TABELA 20: Valores individuais do extravasamento plasmático ($\mu\text{g/g}$) dos tecidos periarticulares das ATMs esquerda e direita de fêmeas em estro, induzido pelo óleo mineral ($20\mu\text{L}$) (controle) e óleo de mostarda a 0,25% ($20\mu\text{L}$), respectivamente.

n	Tratamento	
	Óleo mineral	Óleo de mostarda
1	0,9	11,35
2	1,36	18,45
3	2,71	19,57
4	1,97	39,95
5	1,39	25,77
6	2,08	9,33
Média $\pm$ DP	1,74 $\pm$ 0,65	20,80 $\pm$ 11,11

TABELA 21: Valores individuais do extravasamento plasmático ($\mu\text{g/g}$) dos tecidos periarticulares das ATMs esquerda e direita de fêmeas em proestro, induzido pelo óleo mineral ($20\mu\text{L}$) (controle) e óleo de mostarda a 0,25% ($20\mu\text{L}$), respectivamente.

n	Tratamento	
	Óleo mineral	Óleo de mostarda
1	1,41	21,62
2	1,79	16,53
3	1,94	8,36
4	4	29,64
5	1,8	12,61
6	1,96	9,34
7	2,05	15,95
Média $\pm$ DP	2,14 $\pm$ 0,85	16,29 $\pm$ 7,43