

MARIANA TREVISANI ARTHURI FRANCO

***ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR OPIÓIDE KAPA NA
MODULAÇÃO DA DOR INDUZIDA PELA FORMALINA NA
ATM DE RATAS PRENHAS E NA FASE ESTRO***

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

PIRACICABA

2004

MARIANA TREVISANI ARTHURI FRANCO

***ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR OPIÓIDE KAPPA NA
MODULAÇÃO DA DOR INDUZIDA PELA FORMALINA NA
ATM DE RATAS PRENHAS E NA FASE ESTRO***

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

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

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Débora Bevilaqua Grossi

Profa. Dr. Fausto Bérzin

Suplente:

Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli

PIRACICABA

2004

Ficha Catalográfica

F848e	<p>Franco, Mariana Trevisani Arthuri.</p> <p>Envolvimento do receptor opióide kapa na modulação da dor induzida pela formalina na ATM de ratas prenhas e na fase estro. / Mariana Trevisani Arthuri Franco. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004. viii, 69f. : il.</p> <p>Orientadora : Prof^a Dr^a Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Articulação temporomandibular. 2. Dor. 3. Gravidez. I. Veiga, Maria Cecília Ferraz de Arruda. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p>
-------	--

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

Dedicatória:

Acima de tudo, **a Deus**, pelas vitórias que venho obtendo em minha caminhada.

Aos meus queridos pais, **Marilene e Amauri**, pelos ensinamentos que me deram durante toda a vida. Em especial pelos valores que me foram transferidos por meio do exemplo, o apoio incondicional, o amor e a força durante a realização deste trabalho.

Ao **Jorge**, meu amor, que me motivou, acalmou e acolheu em todos os momentos e dedicou parte do seu tempo a este estudo. Só nós sabemos o significado do esforço e dedicação que decidimos fazer juntos. Se existem méritos, a conquista é nossa.

Aos meus amados irmãos, **Rogério e Amaury**, os quais tenho muita admiração, carinho e respeito.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS:

Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga

Meu eterno agradecimento pela oportunidade de desenvolver este estudo, e contar com a qualidade científica de sua orientação. Obrigada acima de tudo, pela amizade e apoio.

Profa. Dra. Débora Bevilaqua Grossi

Quem em outros tempos plantou a semente, para a realização deste trabalho. Sua extrema competência me serviu de referência, e continua até hoje norteando a minha vida.

Prof. Dr. Fausto Bérzin

Seu conhecimento e experiência, certamente contribuíram para o meu aprendizado. Sou muito grata pela oportunidade e confiança que me proporcionou.

AGRADECIMENTOS:

À **Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes**, obrigada pela extrema competência demonstrada nas aulas de Fisiologia, e por ter contribuído para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli**, sua opinião foi muito importante, no propósito da minha investigação.

Aos professores doutores **Maria Beatriz Duarte Gavião, Pedro Duarte Novaes, Darcy de Oliveira Tosello e Ynara Bosco de Oliveira Lima Arsati**, pelas orientações pertinentes e enriquecedoras na ocasião das aulas de pré-qualificação e qualificação.

Ao senhor **Carlos Alberto A. Feliciano**, senhora **Eliete Righetto** e senhoritas **Érica Paula P. Nunes** e **Daniele A. Antônio**; solícitos e eficientes funcionários, todos, sem exceção. Muito obrigada pela amizade, carinho e dedicação.

Aos meus avós **Leny** (*in memoriam*) e **Hélio** (*in memoriam*), suas presenças se manifestam na força que encontro para lutar e não desistir jamais.

À minha avó **Vitalina**, com todo carinho e amor.

Aos meus **pacientes**, que compartilharam e compartilham suas vidas comigo, e compreenderam os momentos de ausência.

Às minhas **companheiras** e **amigas** do “Centro de Fisioterapia”, **Thereza, Fernanda, Cristiane, Ivana, Ana Carolina** e **Carolina**, que trabalham com o firme propósito de melhorar a saúde, função e a qualidade de vida dos nossos pacientes. Obrigada por sempre torcerem por esta conquista!

À amiga **Susane**, muita obrigada pela dedicação, carinho e respeito.

Agradeço especialmente ao **Fábio**, grande amigo de todas as horas. Obrigada pelo apoio incondicional, por compartilhar os momentos difíceis, mas também os momentos de alegria e vitória.

Aos amigos – **Gustavo, Elizabeth, Maria Cláudia, Paula, Luciano, Tatiana, Luciane, Ana Paula, Franco, Daniela, Marcelo, Dany, Leonardo**, e especialmente à amiga **Juliana**, com quem compartilhei momentos de alegria, companheirismo e que pela convivência e constante troca de idéias, ajudou na transposição de obstáculos comuns.

À todos os **colegas** dos outros departamentos, pelos momentos agradáveis durante o curso.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP/UNICAMP, por ter permitido a realização deste trabalho.

À PROAP e FAEP, UNICAMP, Brasil, pelo apoio financeiro nesta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	4
1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1 MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS BÁSICOS DA DOR OROFACIAL	9
2.2 ALTERAÇÕES HORMONAIS RELACIONADAS À DOR	15
2.3 TESTE DA FORMALINA NA ATM	21
3 PROPOSIÇÃO	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	25
4.2 DETERMINAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL E INDUÇÃO DA GRÁVIDEZ	26
4.3 SOLUÇÕES UTILIZADAS	28
4.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL	29
4.5 CONFIRMAÇÃO DO LOCAL DE APLICAÇÃO DA FORMALINA	32
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO	47

7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO	67
APÊNDICE	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	-	Azul de Evans
ATM	-	Articulação Temporomandibular
BK	-	Bradicinina
CGRP	-	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CO	-	Comportamento de coçar a região orofacial
Ct	-	Contralateral
DTM	-	Disfunção Temporomandibular
E.P.M.	-	Erro Padrão da Média
FSH	-	Hormônio folículo estimulante
HCG	-	Gonadotropina coriônica
Ipsi	-	Ipsilateral
κ-opiíide	-	Receptor opiíide kapa
LC	-	Comportamento de levantar a cabeça
LH	-	Hormônio luteinizante
NO	-	Óxido Nítrico
nor-BNI	-	Nor-Binaltorphimine
PG	-	Prostaglandina
QX-314	-	Derivado Quaternário da Lidocaína Hidrofílica
SNC	-	Sistema nervoso central
SP	-	Substância P
TNL	-	Terminação Nervosa Livre

RESUMO

O efeito dos hormônios sexuais na modulação da dor orofacial é ainda pouco compreendido. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito das alterações hormonais decorrentes da gravidez e do antagonista de receptor k-opiíide (kapa-opiíide) sobre a sensibilidade ao teste da formalina na articulação temporomandibular (ATM) de ratas. Inicialmente as fêmeas em estro e as prenhas no 19º dia de gestação (n=8), receberam injeção de 50µl de formalina 1,5 % na ATM direita. Posteriormente o antagonista seletivo de receptor k-opiíide, nor-BNI (nor-Binalthorphimine) (200 e 400µg), foi co-administrado (25µl) com a formalina 3% (25µl) na ATM de ratas em estro e prenhas. A seguir, foram realizados grupos adicionais, que receberam o antagonista de receptor kapa (200µg) ou NaCl 0,9% (controle) 24 horas antes da administração periarticular de formalina (1,5%) em ratas prenhas, e (1%) em ratas na fase de estro. Para investigar um possível efeito sistêmico do nor-BNI, o mesmo foi administrado (200µg/ 25µl) na região da ATM contralateral a da administração de formalina (1,5%/ 50µl). Após os diferentes tratamentos, as respostas comportamentais nociceptivas sinalizadas nos animais, caracterizadas pelo ato de coçar a região orofacial (CO) e levantar rapidamente a cabeça (LC) foram quantificadas durante 45 minutos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e o teste de Tukey foi aplicado para identificar diferenças significativas ($p < 0,05$). As respostas comportamentais utilizadas como índice de dor orofacial foram analisadas conjuntamente pela soma das mesmas. Os resultados deste trabalho mostraram que as fêmeas prenhas apresentaram uma redução estatisticamente

significativa da nocicepção ao teste da formalina na ATM, em relação às fêmeas em estro. Além disso, o antagonista de receptor κ -opióide, nor-BNI, quando administrado 24 horas antes da formalina, induziu um aumento dos comportamentos nociceptivos somente nas fêmeas prenhas. O nor-BNI, quando aplicado na ATM contralateral, não alterou a resposta nociceptiva induzida pela formalina, mostrando um efeito periférico da droga. Os resultados obtidos permitem concluir que: 1) O aumento dos níveis de hormônios sexuais decorrentes da gravidez induzem uma redução da nocicepção ao teste da formalina na ATM; 2) a ativação de receptores κ -opióide periféricos pela liberação de agonistas opióides endógenos, está envolvida na analgesia induzida pela gravidez no teste da formalina na ATM.

ABSTRACT

The effect of sex hormones in relation to orofacial pain modulation is poorly understood. Therefore, the aim of this work was to investigate the effect of hormonal changes as result of pregnancy and from the kappa opioid receptor antagonist over the sensibility to the formalin test in the female rats temporomandibular joint (TMJ). Initially the animals received a 50µl formalin (1.5%) injection at the right TMJ, female rats at estrus (n=8) and pregnant females on day 19 of pregnancy (n=8). Then, the selective kappa opioid receptor antagonist nor-Binaltorphimine (nor-BNI), had been co-administered (25µl) with the formalin 3% (25µl) at the female rats TMJ at estrus and pregnant, at different concentrations (200 and 400µg). Next, additional groups were made, which received the kappa (200µg) receptor antagonist or 0.9% NaCl (contralateral) 24 hours prior to the periarticular injection of formalin (1.5%) in pregnant female rats, and (1%) in female rats, estrous cycle phase. In order to investigate a possible systemic effect of nor-BNI, the same was administered (200µg/ 25µl) at the TMJ region contralateral to the formalin (1.5%/ 50µl) administration). After the different treatments, the nociceptive behavioral responses signaled in the animals, characterized by rubbing the orofacial region and flinching the head quickly were quantified during 45 minutes. The data obtained were submitted to analysis of variance, and the test of Tukey was applied to identify significant differences ($p < 0,05$). The behavioral responses used as orofacial pain index were analysed in conjunction with their somation. The results of this work demonstrated that

pregnant females showed a reduction statistically significant of nociceptive responses to the TMJ formalin test than female rats at estrus. Moreover, the selective kappa opioid receptor antagonist, nor-BNI, when administered 24 hours before the formalin, enhances the nociceptive behavioral responses just in pregnant females. When applied into contralateral TMJ, nor-BNI did not affect the magnitude of the nociceptive response induced by formalin. It can be concluded that: 1) The increase of the sex hormone levels as result of pregnancy, induces a reduction of nociceptive behavioral responses to the TMJ formalin test; 2) the peripherally kappa opioid receptor activation, by endogenous opioid agonists release, is involved in the antinociception induced by pregnancy, to TMJ formalin test.

1 INTRODUÇÃO

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, que pode (ou não) estar associada a dano real ou potencial nos tecidos, podendo ser descrita tanto em termos destes danos, quanto por ambas às características (Mersky, 1986).

A dor, portanto, é uma experiência complexa, que pode ser influenciada por fatores endógenos (biopsíquicos) e exógenos (sócio-culturais), podendo ser mais bem descrita como uma experiência multidimensional.

Portanto, a unicausalidade não retrata isoladamente o fenômeno da dor. A multidimensionalidade é o que permeia e determina o processo doloroso.

Por trás dos mais variados tipos de dor estão fatores como o trauma, sedentarismo, as posturas alteradas e o estresse.

Cerca de 15 a 30% da população dos países industrializados sofre de algum tipo de dor, o que gera problemas de ordem pessoal, social e econômica para a sociedade em geral (Aghabeigi, 1992).

Particularmente a dor orofacial, destaca-se das outras dores somáticas devido à sua grande intensidade e freqüente ocorrência, o que impede muitas vezes que um indivíduo mantenha as suas atividades de vida diária.

Dentre as estruturas craniomandibulares, a articulação temporomandibular (ATM) é considerada uma das principais fontes desencadeantes de dor na região orofacial.

A dor na região temporomandibular é encontrada principalmente, em jovens e adultos de meia-idade (18-44 anos), sendo mais incidente em mulheres, na referida faixa etária (Steenks & Wijer, 1996).

As diferenças sexuais na percepção da dor têm recebido atenção especial por parte da comunidade científica. Porém, as afirmações de uma maior prevalência de distúrbios craniomandibulares entre homens e mulheres ainda é desconhecida (Bereiter, 2001).

Além das diferenças sexuais 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 -opióide (receptor opióide kapa) (Gear *et al.*, 1996).

Discussões relevantes têm sido realizadas no âmbito da influência de hormônios sexuais femininos sobre as respostas dolorosas em humanos e em animais experimentais. Condições como a gestação e o parto, têm sido constantemente associadas com uma analgesia opióide. Acredita-se portanto, que os hormônios sexuais femininos sejam responsáveis pelo menos em parte, por ativar um sistema κ -opióide/dinorfina na medula espinhal (Sander *et al.*, 1989).

A analgesia induzida pela gravidez tem sido relatada por vários autores (Whipple *et al.*, 1990; Ratka & Simpkins, 1991) evidenciando um aumento no limiar de sensibilidade aos estímulos dolorosos em mulheres grávidas.

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 quanto em humanos, nas diversas áreas de interesse do estudo da dor.

É extenso o número de trabalhos que procuram elucidar a influência dos hormônios sexuais no processamento da dor, em diversas regiões do corpo, por meio da utilização de testes nociceptivos tanto em humanos quanto em outras espécies (Fillingim & Ness, 2000). Entretanto, na região da ATM, pouco se sabe a respeito dos efeitos dos hormônios sexuais femininos, e o possível envolvimento do receptor κ -opióide, no processamento e modulação periférica da percepção dolorosa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS BÁSICOS DA DOR OROFACIAL

Para que ocorra o fenômeno sensitivo-doloroso, uma série de eventos são necessários, até que os estímulos ambientais sejam transformados em potenciais de ação a partir dos receptores periféricos e através das fibras neurais, a fim de que sejam conduzidos ao sistema nervoso central (SNC) (Lund *et al.*, 2002).

A dor é considerada uma das formas de sensibilidade somestésica, sendo que para cada uma das formas de sensibilidade existe um receptor específico.

Os receptores sensoriais específicos responsáveis pela captação de estímulos nocivos são as terminações nervosas livres, que são conhecidas como nociceptores (ou algioreceptores), sensíveis a diversas formas de estímulos: mecânicos, térmicos ou químicos.

Os nociceptores estão presentes em vários tecidos orofaciais, tais como a pele, mucosa oral, polpa dental, periodonto, periósteo, articulação temporomandibular e músculos (Aghabeigi, 1992).

Quando ativados, os nociceptores desencadeiam um potencial gerador, que caso atinja o limiar de excitabilidade da fibra, promove a formação do potencial de ação.

Uma vez gerado o potencial de ação, determina-se sua propagação através das fibras nervosas aferentes, enviando informações para que o SNC,

onde será identificada a intensidade, qualidade, localização e duração do estímulo (Sessle, 2000).

A intensidade e duração do estímulo nociceptivo são determinadas pela frequência e pelo 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 da pele, mucosa ou tecido profundo 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, que conduzem os estímulos nociceptivos podem ser classificadas segundo o seu diâmetro. Portanto, quanto maior for o diâmetro da fibra nervosa, maior será sua velocidade de condução.

Para o caso da transmissão dolorosa, Dubner & Benett (1983), classificaram as fibras nociceptivas em três tipos principais: 1) Fibras A delta ($A\delta$) mecanotérmicas, que respondem a estímulos térmicos e mecânicos intensos; 2) Fibras polimodais C, que são sensíveis a estímulos mecânicos, térmicos e químicos intensos; 3) Fibras A beta ($A\beta$) mecanoreceptivas de alto limiar de excitabilidade, que respondem melhor a estímulos mecânicos intensos. Essas fibras estão envolvidas no processo de modulação do estímulo doloroso (Dubner & Bennett, 1983).

As fibras $A\delta$ e C transportam a informação neural por meio do gânglio trigeminal, onde os corpos celulares dos aferentes trigeminais primários estão localizados, e então para dentro do tronco cerebral, onde ocorre a primeira retransmissão sináptica da informação. Os aferentes

cutâneos e trigeminais intra-orais, bem como os aferentes primários que inervam tecidos mais profundos (por exemplo, ATM e músculos da língua e maxilares) e alguns aferentes dos nervos cranianos VII, IX e X e de nervos cervicais superiores, se projetam para o complexo trigeminal do tronco cerebral (Fricton & Dubner, 2003). O complexo trigeminal do tronco cerebral pode ser subdividido em principal, ou núcleo sensorial principal, e núcleo do trato espinhal. Este último é constituído por três subnúcleos: oral, interpolar e caudal (Sessle, 1996).

O subnúcleo caudal é o subnúcleo que está localizado na porção mais inferior do núcleo do trato espinhal, estendendo-se até o corno dorsal da medula espinhal cervical, fundindo-se com a mesma. É a principal estação de transmissão da informação nociceptiva proveniente da região orofacial (Fricton & Dubner, 2003).

Estudos anatômicos têm demonstrado que o subnúcleo caudal possui uma estrutura laminar semelhante àquela do corno dorsal da medula espinhal. As fibras nervosas de pequeno diâmetro do tipo C e A δ , terminam nas lâminas I, II, V e VI (laterais) do subnúcleo caudal, já as fibras A β terminam nas lâminas III e IV (mediais).

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 das fibras tipo A de pequeno e grande calibre, e das fibras do tipo C, e podem ser excitados por estímulos nocivos e não nocivos (táteis). Ambos os neurônios estão concentrados nas lâminas superficiais (I e II) e profundas do subnúcleo caudal (V, VI) (Lund *et al.*, 2002).

Os neurônios nociceptivos do subnúcleo caudal apresentam uma extensa convergência de fibras nervosas aferentes, sendo estas provenientes da pele e da mucosa (tecidos superficiais), e da ATM, músculos mastigatórios, língua e da dura-máter (tecidos profundos). Essa convergência de fibras da ATM e músculos mastigatórios para os neurônios nociceptivos superficiais pode explicar pelo menos em parte, a dificuldade na localização exata de estímulos nocivos profundos, e a dor referida que freqüentemente está associada a esses tecidos (Lund *et al.*, 2002).

As semelhanças morfológicas e funcionais, entre o subnúcleo trigeminal caudal e o corno dorsal da medula espinhal, ressaltam a importância do subnúcleo caudal nos mecanismos nociceptivos trigeminais.

Apesar do papel crucial nos mecanismos orofaciais nociceptivos ter sido descrito para o subnúcleo caudal, estudos recentes também incluíram os componentes rostrais do complexo trigeminal do tronco cerebral nos mecanismos orofaciais nociceptivos (Fricton & Dubner, 2003). As lesões dentro ou adjacentes ao subnúcleo caudal não necessariamente eliminam por completo todos os reflexos ou respostas comportamentais aos estímulos orofaciais nocivos; em contrapartida, as lesões rostrais podem interferir com comportamento de dor provocado por estímulos nocivos térmicos ou mecânicos aplicados aos tecidos periorais ou intra-orais. Além disso, a polpa dentária, bem como os aferentes cutâneos nociceptivos, podem terminar nos componentes rostrais, e neurônios nociceptivos foram encontrados no subnúcleo interpolar e oral. Os locais de projeção das regiões rostrais são também algumas das mesmas regiões em que estão os locais de projeção dos neurônios caudais, e muitos desses locais estão implicados na transmissão da

dor ou seu controle. Além disso, muitos dos neurônios que recebem entradas aferentes trigeminais, e estão localizados dentro ou adjacentes aos componentes rostrais do complexo trigeminal, podem servir como interneurônios reflexos na multidão de respostas reflexas que podem ser provocadas por estímulos orofaciais nociceptivos. Tal evidência aponta claramente para o papel desses componentes tanto rostrais como caudais na nocicepção, porém mais pesquisas são necessárias para esclarecer a importância relativa e o papel nos mecanismos de dor orofacial dos componentes rostrais e caudais do complexo trigeminal do tronco cerebral.

Após serem processadas no núcleo do tracto espinhal, as informações dolorosas são retransmitidas para diversas áreas do SNC, como tálamo posterior, cerebelo, substância cinzenta periaquedutal, formação reticular do tronco cerebral, núcleo parabraquial pontino e medula espinhal, como também para as regiões rostrais do complexo trigeminal do tronco cerebral, como o subnúcleo oral (Fricton & Dubner, 2003).

Algumas dessas áreas retransmitem a informação orofacial sensorial que receberam do subnúcleo caudal para centros cerebrais mais altos, enquanto outros utilizam essa informação do subnúcleo caudal (ou outras partes do complexo trigeminal do tronco cerebral) para modular a transmissão somato-sensorial. 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 na frequência respiratória e cardíaca, e alterações na pressão arterial (Sessle, 2000).

Aghabeigi (1992), sugere que a projeção espinotalâmica ao tálamo medial e deste para o córtex frontal, está relacionada com o componente afetivo e motivacional da dor. Enquanto que a projeção para o tálamo ventrobasal, e deste para o córtex somato-sensorial, é responsável pelo componente sensório-discriminativo da dor.

Apesar do grande número de intercomunicações existentes entre todo o complexo trigeminal e áreas adjacentes no tronco cerebral, a principal área de projeção do complexo trigeminal do tronco cerebral, é o tálamo contralateral. Depois de entrar no subnúcleo caudal, no núcleo sensorial principal há sinapse para o lado oposto e daí ascendem para o tálamo.

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 do subnúcleo caudal, que ao se projetarem para áreas específicas do córtex cerebral, determinam o caráter multidimensional da experiência dolorosa (Sessle, 2000; Lund *et al.*, 2002).

Acredita-se que os neurônios nociceptivos que se projetam para a região do córtex somato-sensorial primária SI desempenham 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).

A origem da sensação dolorosa, desde a captação do estímulo nocivo até a sua interpretação, pode resultar de vários fatores, incluindo mudanças funcionais nos tecidos periféricos e no sistema nervoso central (SNC), juntamente com interpretações psicossociais disfuncionais dos

estímulos periféricos. Ao ocorrer uma lesão tecidual, imediatamente uma série de respostas são desencadeadas pelo organismo por intermédio da liberação de substâncias, tais como: ácido láctico, bradicinina (BK), prostaglandinas (PG), substância P (SP), íons potássio, serotonina, histamina, fator de crescimento neural (NGF), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), íons hidrogênio, ATP, citocinas, óxido nítrico (NO) e outras, levando a alterações neuroplásticas periféricas e centrais (Swift *et al.*, 1998).

A maioria dos estudos tem avaliado a capacidade dos estímulos nocivos, aplicados a uma região do corpo, de modular os reflexos nociceptivos e a percepção da dor, originária de uma área do corpo distante provocada por estímulos experimentais. Poucos estudos examinaram a influência das alterações hormonais sobre a modulação da dor.

2.2 ALTERAÇÕES HORMONAIS RELACIONADAS À DOR

Existem poucas pesquisas com respeito às diferentes respostas relacionadas ao gênero frente a várias aflições sensoriais, incluindo a experiência dolorosa. As diferenças entre homens e mulheres, quanto ao metabolismo, estrutura física, e variações hormonais podem influenciar os mecanismos biológicos da transmissão dolorosa, da sensibilidade dolorosa, e da percepção à dor (Unruh, 1996).

Tem sido indicado que as mulheres reportam dores mais severas, mais freqüentes e de maior duração do que os homens. Interessantemente, as

condições dolorosas que afetam com mais frequência as mulheres se expressam ao nível da cabeça e pescoço (Unruh, 1996).

As maiores discussões com relação à modulação da dor têm sido feitas no âmbito da influência de hormônios sexuais femininos sobre as respostas dolorosas em humanos e em ratos. Principalmente com respeito à gestação e ao parto, condições estas constantemente associadas com uma analgesia opióide (Sander *et al.*, 1989). Assim, é válida uma revisão sobre as variações hormonais durante o ciclo ovariano da mulher (ciclo menstrual), da rata (ciclo estral) e dos eventos ocorridos na gravidez.

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 é o período que precede a ovulação (começa com o início da menstruação). Precocemente, na fase folicular, os níveis de FSH (hormônio folículo estimulante) e 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). A fase folicular é dominada pelo estrógeno cujos níveis aumentam 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).

A ovulação se segue ao surto de secreção de estrógeno, no fim da fase folicular: tal surto exerce efeito de feedback positivo sobre a secreção de FSH e de LH, pela hipófise anterior. Os níveis de estrógeno diminuem após a ovulação, mas irão aumentar durante a fase lútea (Costanzo, 1999).

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 atingirem seus valores mais baixos, e os níveis de FSH começarem novamente a subir, até ocorrer à menstruação (Berne & Levy, 1996).

Se houver fecundação, o óvulo fertilizado se divide em blastocisto e implanta-se no endométrio. A receptividade do endométrio ao óvulo é dependente de baixa proporção de estrógeno/progesterona, e corresponde ao período de maior secreção de progesterona pelo corpo amarelo. O blastocisto é constituído por uma massa interna de células, que vai formar o feto, e por um revestimento externo, chamado trofoblasto. No primeiro trimestre de gestação, o trofoblasto irá se transformar na placenta, e começará a secretar gonadotropina coriônica humana (HCG). A HCG do trofoblasto (placenta) “resgata” o corpo amarelo de sua regressão, pois sem a fertilização, e a estimulação pela HCG, o corpo amarelo regredirá doze dias após a ovulação, e a partir daí se seguirá à menstruação. Com ação semelhante a do LH, a HCG estimula a produção pelo corpo amarelo, de estrógeno e progesterona. Os níveis de HCG atingem o máximo na nona semana. O segundo e terceiro trimestres de gravidez, são sustentados pelos hormônios esteróides da placenta.

Nas ratas o ciclo ovariano é constituído por quatro fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II) (Smith *et al.*, 1975).

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 metaestro e estende-se até a manhã do diestro, enquanto que o segundo pico somente ocorre no final da tarde e noite do proestro (Marcondes *et al.*, 2002).

Com a distinção das variações hormonais durante o ciclo menstrual e o ciclo estral, vários estudos relacionados à dor puderam ser desenvolvidos. No entanto, ainda existe uma grande variabilidade de resultados encontrados na literatura, que relacionam os sistemas nociceptivo, opióide e hormonal.

Com relação aos opióides, eles são conhecidos por atuarem em três principais tipos de receptores opióides: mu (μ), delta (δ) e kapa (κ). Estes receptores estão distribuídos no organismo de forma heterogênea, e de acordo com a sua função.

Evidências mostraram a existência de substâncias endógenas similares à morfina, com ação nesses receptores opióides. Essas substâncias são chamadas de peptídeos opióides endógenos, e são classificadas em: encefalinas (que são derivadas da pró-encefalina) e as endorfinas, a beta-endorfina (derivada da pró-melanocortina) e a dinorfina (derivada da pró-encefalina beta). A dinorfina está presente na substância negra, estruturas do

sistema límbico, e substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, além de possuir alta afinidade pelo receptor κ (Clark, 1987).

Está bem estabelecido pela literatura, que os receptores opióides estão implicados na modulação da resposta dolorosa. O sistema de modulação opióide não é exclusivamente central, apresenta componentes periféricos. Foram encontrados receptores opióides nos macrófagos, mastócitos, nos gânglios trigeminais e espinhais, e nas fibras sensitivas que inervam nociceptores (Binder, 2001). Além disso, sabe-se que o efeito antinociceptivo produzido pela administração de morfina na ATM de ratos sugere a presença de receptores opióides funcionais na ATM (Bakke *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 2001). No entanto, não se sabe qual o tipo de receptor opióide existente, uma vez que a morfina não é seletiva para nenhum tipo específico de receptor.

Há ainda uma série de discussões a respeito da variação das respostas analgésicas com relação às variações hormonais.

Alguns autores têm encontrado maior sensibilidade à dor na fase ovulatória da mulher (Unruh *et al.*, 1996; Fillingim *et al.*, 1997).

A analgesia induzida pela gravidez foi relatada em mulheres por vários estudos. Em um desses estudos, foi observado a presença de um mecanismo endógeno responsável por atenuar a dor, ativado quando o colo uterino se dilata, durante o parto (Whipple *et al.*, 1990). Um outro estudo também demonstrou um nítido aumento nos limiares dolorosos de mulheres grávidas (Ratka & Simpkins, 1991). Em contraste, os limiares de mulheres não-grávidas, testados em paralelo, permaneceram constantes. Estudos em animais demonstraram que o limiar de dor em ratas é 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).

Acredita-se, portanto, que os hormônios sexuais femininos sejam responsáveis pelo menos em parte, por ativar um sistema κ -opióide (k)/dinorfina da medula espinhal (Sander *et al.*, 1989).

Em animais, observou-se um aumento da sensibilidade à dor durante as fases do ciclo estral: proestro (Chang *et al.*, 2000; Vincler *et al.*, 2001), estro (Kaiser *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2000).

Também em animais, foi demonstrado que a reposição hormonal, em ratos gonadectomizados, causa alterações no limiar de dor, podendo aumentá-lo (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, o efeito antinociceptivo é dependente da ativação simultânea do sistema opióide κ e δ , sendo potencializado pela ativação de receptores alfa 2 (α_2) noradrenérgicos. Nos ratos, o efeito antinociceptivo depende da ativação de receptores κ -opióide e mu, que agem independentemente e aditivamente (Liu & Gintzler, 2000).

Atualmente, por meio de modelos experimentais em animais, tem-se conseguido, cada vez mais, adquirir informações a respeito dos mecanismos neurofisiológicos da dor. No entanto, a maioria dos estudos que relacionam modulação opióide e variações hormonais, tem utilizado a administração de

agonistas de receptor opióide exógenos, o que não permite avaliar a ativação endógena das redes inibitórias da dor.

Tem sido relatado, que os receptores κ -opióide e delta opióide, são os responsáveis pela antinocicepção induzida pela gravidez, e que o estrógeno e a progesterona são os responsáveis por modular esses receptores, como também a concentração da dinorfina (κ -opióide endógeno) na medula espinhal (Dawson-Basoa & Gintzler, 1996, 1998).

2.3 TESTE DA FORMALINA NA ATM

O teste da formalina é considerado um modelo experimental de dor inflamatória tônica, e sensível a várias classes de drogas analgésicas (Hunskar & Hole, 1987; Tjolsen *et al.*, 1992). Atualmente, este teste vem sendo utilizado e adaptado para estudos em diferentes regiões do corpo de ratos.

O modelo foi descrito originalmente por Dubuisson & Dennis (1977), a partir da administração subcutânea de formaldeído a 37% diluído em solução salina (que é a formalina) no dorso da pata traseira de ratos. Em seguida, os comportamentos nociceptivos estereotipados, caracterizados pelos atos de lambe e levantar rapidamente a pata eram observados. Foi observado que esses comportamentos obedeciam a um padrão de respostas bifásico (Wheeler-Aceto *et al.*, 1990; Rosland, 1991), com um período inicial de dor intensa e de curta duração (primeiros 5 minutos) e uma segunda fase de dor moderada e persistente (entre 10 a 60 minutos após a injeção). Entre a primeira e a segunda fase, existe um curto período de latência denominado de

interfase. A interfase é considerada um período de baixa atividade comportamental, que é atribuído à redução momentânea da atividade das fibras nervosas aferentes (Puig & Sorkin, 1996; Mccall *et al.*, 1996) e à ação de mecanismos inibitórios descendentes (Franklin & Abbott, 1993).

Hunnskaar & Hole (1987) sugeriram que a primeira fase é decorrente da estimulação química direta dos nociceptores, e que a segunda fase seria provocada pelo desenvolvimento do processo inflamatório local e pela sensibilização dos neurônios nociceptivos no SNC (Coderre *et al.*, 1990; Tjolsen *et al.*, 1992).

Entretanto, a comprovação experimental de que na primeira fase há participação de mediadores endógenos, como a bradicinina, histamina, serotonina e substância P, levantaram dúvidas quanto a essa idéia (Parada *et al.*, 2001).

Contudo, a sensibilização central desencadeada pelos impulsos da primeira fase da formalina pode não ser suficiente para manter as respostas comportamentais nociceptivas na segunda fase. A administração local de um derivado quaternário da lidocaína hidrofílica (QX-314) 10 minutos após a administração de formalina na pata é capaz de inibir as respostas da segunda fase, sugerindo, portanto, a participação do componente periférico (Taylor *et al.*, 1995).

Clavelou *et al.* (1989) apresentaram uma modificação no teste da formalina, a fim de adaptá-lo para o estudo da dor orofacial. Os autores observaram, que a injeção de formalina no lábio superior de ratos, foi capaz de induzir respostas comportamentais nociceptivas, tais como o ato de coçar a região orofacial com as patas dianteiras, e algumas vezes com a pata traseira ipsilateral. Assim como no teste da formalina na pata, foram observados dois

períodos, denominados de primeira fase (0-3 minutos) e segunda fase (entre 18 a 42 minutos após a injeção).

Roveroni *et al.* (2001) propuseram o teste da formalina na ATM. A administração de formalina na ATM de ratos desencadeia os comportamentos nociceptivos de coçar a região orofacial, de levantar rapidamente a cabeça e o de tombar a cabeça para o lado injetado. Esses comportamentos foram reduzidos pela administração de morfina (4mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da injeção da formalina, e também pela co-administração de lidocaína (QX-314, 2%) com a formalina. Diferentes concentrações de formalina foram testadas nesse modelo (0,5%, 1,5%, 2,5% e 5,0%) e os resultados mostraram que as respostas comportamentais foram significativamente maiores a partir de 1,5% e que acima disso, as respostas não diferiram entre si.

Roveroni *et al.* (2001) sugeriram ainda que as respostas comportamentais nociceptivas, como o ato de coçar a região orofacial e de levantar rapidamente a cabeça, que ocorrem de forma alternada, devem ser avaliadas conjuntamente para serem utilizadas como um índice de dor orofacial. Assim como descrito na literatura, a simples soma de mais de um comportamento seria a forma mais adequada de avaliar as respostas comportamentais induzidas pela administração de formalina, uma vez que pode haver uma integração entre os comportamentos (Wheele-Aceto & Cowan, 1993; Abbott *et al.*, 1995).

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste trabalho foi o de verificar: 1) a influência das alterações hormonais decorrentes da gravidez na sensibilidade ao teste da formalina na ATM e 2) um possível envolvimento do receptor κ -opióide na modulação periférica da dor, induzida pela formalina na ATM de ratas prenhas e na fase estro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biologia/UNICAMP (CEEA - protocolo nº 389-1) (Anexo).

A experimentação animal seguiu as diretrizes propostas pelo Comitê para Pesquisa e Ética, da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) em animais conscientes (Zimmermann, 1983).

Para a realização deste trabalho foram submetidos ao teste da formalina na ATM (Roveroni *et al.*, 2001) ratas Wistar, (n=85), pesando entre 200 e 350g com 3 a 4 meses de idade, provenientes da ANILAB / Paulínia – SP.

Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, em gaiolas plásticas (5 animais por gaiola) contendo maravalha, em ambiente controlado (temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$; ciclos claro/escuro de 12 h). Durante esse período receberam água e ração à vontade.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS FASES DO CICLO ESTRAL E INDUÇÃO DA GRAVIDEZ

Foram selecionadas fêmeas em estro (baixos níveis hormonais) e fêmeas prenhas no 19º dia de gravidez (altos níveis hormonais). A determinação das fases do ciclo estral era feita diariamente, entre 12:00 e 13:00 h, pelo método modificado do esfregaço vaginal (Figura 1) (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 10µl de soro fisiológico (Figura 1 a e b). Para a análise do material, foi utilizado um microscópio óptico (aumento de 10 vezes) e observado a fresco (Figura 1 c).

A partir da proporção entre o número de células queratinizadas, epiteliais e leucócitos, as ratas eram classificadas de acordo com as fases do ciclo estral (Marcondes *et al.*, 2002), (Figura 2).

A fase de estro foi identificada pela presença em maior proporção de células queratinizadas (Bereiter, 2001).

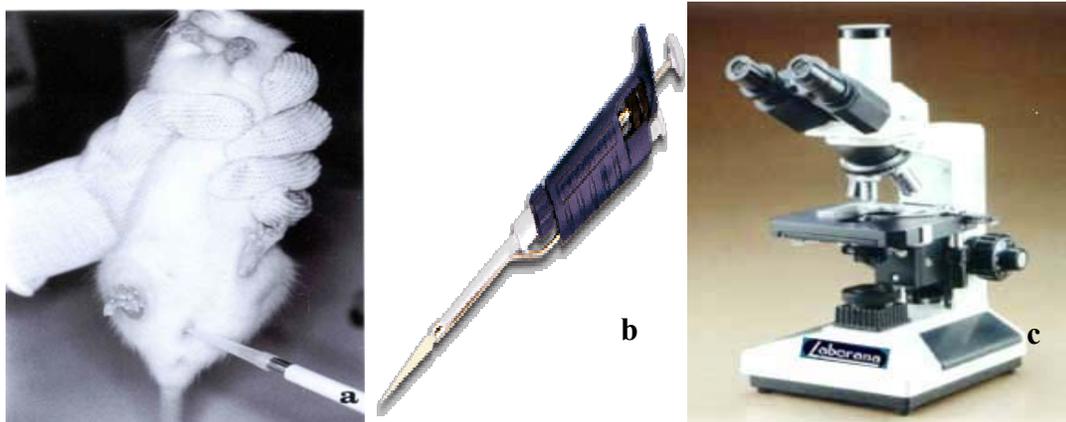
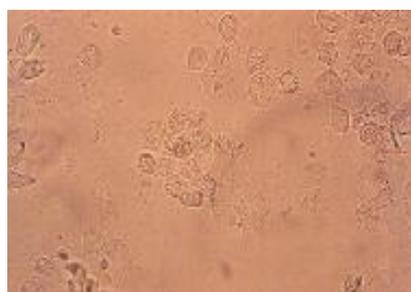


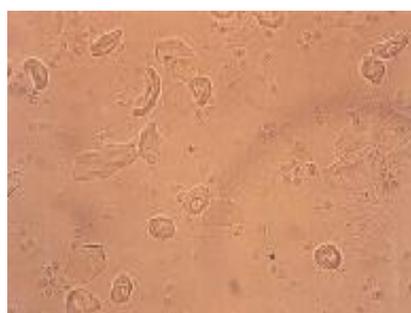
Figura 1 - Esfregaço vaginal. **a)** coleta do fluido vaginal; **b)** pipeta utilizada para coletar o fluido vaginal; **c)** observação do material coletado, com o auxílio de um microscópio de luz.



PROESTRO



ESTRO



METAESTRO



DIESTRO

Figura 2 - Fotomicrografia da secreção vaginal de ratas nas diferentes fases do ciclo estral: proestro, estro, metaestro e diestro.

Para a indução da gravidez, fêmeas em estro foram colocadas em contato com ratos machos por um período de 24 horas, para o acasalamento (duas fêmeas para cada macho/por gaiola).

Nos dias subseqüentes, era realizado o esfregaço vaginal. As ratas consideradas prenhas mantinham-se em metaestro por cinco dias consecutivos, onde era identificada uma proporção semelhante dos três tipos celulares (células epiteliais, queratinizadas e leucócitos).

4.3 SOLUÇÕES UTILIZADAS

- Formalina 1,5% e 1%: consiste na diluição de formaldeído a 37% em NaCl 0,9%
- Solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) - HALEXISTAR®
- Formaldeído a 37% - (Formaldehyde - SIGMA®; F-1635)
- NOR-Binaltorphimine (nor-BNI) - SIGMA®; N-1771)
- Uretano – (Urethane Ethyl Carbamate - SIGMA®; U2500)
- Alfa Cloralose – (alfa chloralose B-anomer 20% - SIGMA®; C0128)
- Halothano® - CRISTÁLIA
- Azul de Evans® - (SIGMA®; E - 2129)

4.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Os procedimentos experimentais foram realizados durante o período da tarde (13:00 às 18:00), (Labrecque *et al.*, 1984) 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 (30x30x30cm) com base e laterais espelhadas e frente de vidro (Figura 3). Primeiramente, cada animal foi mantido nessa câmara por 10 minutos, para familiarizar-se ao ambiente (Aloisi *et al.*, 1994). Após esse período de adaptação, o animal foi retirado da caixa e anestesiado com halotano para administração de drogas na região da ATM.



Figura 3 - Câmara de observação espelhada, utilizada para a análise das respostas comportamentais.

A administração das soluções na ATM foi realizada através de uma cânula (agulha 0,4 mm x 13 mm ligada a um tubo de polietileno P50) conectada a uma seringa Hamilton (50µl) (Figura 4). A borda póstero-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).



Figura 4 - Administração da droga na ATM do animal: posição de inserção da agulha hipodérmica calibre 30 que está conectada a uma seringa de microlitro Hamilton por meio de uma cânula de polietileno P50.

Após a injeção periarticular de formalina, o animal era colocado na câmara de observação e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região orofacial (CO), e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça (LC), eram quantificadas utilizando-se respectivamente um cronômetro e um contador de células (Figura 5).

O período de observação era de 45 minutos, divididos em 15 blocos de 3 minutos (Figura 6). O comportamento CO foi quantificado em segundos, e o comportamento LC, em número de vezes que ocorria, ao longo do experimento.



Figura 5 - Contador de célula e cronômetro – utilizados para quantificar as respostas comportamentais.

DATA: ____/____/____ HORÁRIO: _____

GRUPO: _____

PESO: _____ g

	0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15-18	18-21	21-24	24-27	27-30	30-33	33-36	36-39	39-42	42-45
CO															
LC															

CO: comportamento de coçar a região orofacial (segundos)

LC: comportamento de levantar rapidamente a cabeça (número de vezes)

Figura 6 - Ficha utilizada para quantificar as respostas comportamentais induzidas pela administração de drogas na região da ATM de ratos, durante o período de observação de 45 minutos.

Os comportamentos nociceptivos, induzidos pela administração de formalina na região da ATM, foram analisados conjuntamente pela soma do período de tempo em que os animais apresentaram o comportamento de coçar (CO), com o número de vezes que os animais apresentaram o comportamento de levantar a cabeça (LC) ao longo do período de observação (Figura 7).

$$\frac{\text{CO (segundos)} + \text{LC (nº de vezes)} \times 1\text{LC} = 1\text{seg}}{\text{Soma}}$$

Figura 7 - Índice de dor orofacial, utilizado para quantificar as respostas comportamentais analisadas conjuntamente pela soma das mesmas.

4.5 CONFIRMAÇÃO DO LOCAL DE APLICAÇÃO DA FORMALINA

Após o término de cada análise comportamental, foi feita a confirmação visual do local de administração da formalina (pos-mortem). Para esse procedimento o animal foi anestesiado com co-administração de Uretano (1g/Kg) e Alfa cloralose (50mg/Kg) intraperitonealmente, em seguida, o corante azul de Evans foi injetado, intracardiacamente, na concentração de 1% (5mg/kg). Após dez minutos, foi realizada 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, tornou-se possível a confirmação visual do sítio de aplicação (Hass *et al.*, 1992) (Figura 8).



Figura 8 - Visualização do sítio de injeção da droga: ATM dissecada após o sacrifício, confirmando o local de administração da droga (contraste visual devido ao corante Azul de Evans).

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização deste trabalho, foram utilizados no total, 85 ratas Wistar. Esses animais foram divididos nos diferentes grupos experimentais, a seguir:

4.6.1 EFEITO DAS ALTERAÇÕES HORMONAIIS DECORRENTES DA GRAVIDEZ SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NA ATM DE RATAS

Inicialmente para verificar se havia influência das alterações hormonais decorrentes da gravidez, sobre as respostas comportamentais nociceptivas, a formalina 1,5% (50µl) foi administrada na ATM direita de fêmeas em estro e de fêmeas prenhas no 19º dia de gestação (n=8) (Dawson-Basoa, 1996) (Tabela 1).

Tabela 1
Administração de formalina

GRUPOS	ANIMAIS	TRATAMENTO	n
1	fêmeas em estro	formalina 1,5% (50 µl)	8
2	fêmeas prenhas	formalina 1,5% (50 µl)	8

4.6.2 EFEITO DA CO-ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA ESPECÍFICO DE RECEPTOR κ -OPIÓIDE, NOR-BNI SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE FORMALINA NA ATM DE RATAS

Nesta etapa, para verificar o possível envolvimento do receptor κ -opióide na sensibilidade nociceptiva, o antagonista seletivo de receptor κ -opióide, nor-BNI, foi co-administrado (25 μ l) com a formalina 3% (25 μ l) na região da ATM de ratas na fase de estro e de ratas prenhas no 19º dia de gestação nas concentrações de (200 e 400 μ g, (n=8)). Foram utilizados como controles do nor-BNI, os mesmos animais do experimento anterior (fêmeas em estro e fêmeas prenhas no 19º dia de gestação) que receberam formalina 1,5% (50 μ l) que corresponde à administração de formalina 3% (25 μ l) + NaCl 0,9% (25 μ l) (Tabela 2).

Tabela 2
Co-administração de nor-BNI + formalina

GRUPOS	ANIMAIS	TRATAMENTO	n
3	fêmeas em estro	nor-BNI 200 μ g (25 μ l) e formalina 3% (25 μ l)	8
4	fêmeas em estro	nor-BNI 400 μ g (25 μ l) e formalina 3% (25 μ l)	8
5	fêmeas prenhas (19º)	nor-BNI 200 μ g (25 μ l) e formalina 3% (25 μ l)	8
6	fêmeas prenhas (19º)	nor-BNI 400 μ g (25 μ l) e formalina 3% (25 μ l)	8

4.6.3 EFEITO DA PRÉ-ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA DE RECEPTOR κ -OPIÓIDE, NOR-BINALTORPHIMINE, NA ATM DE RATAS, 24 HORAS ANTES DA ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA

O antagonista seletivo de receptor κ -opióide, nor-BNI (200 μ g, 25 μ l) (n=7), ou salina (NaCl 0,9 %, 25 μ l) (n=6), foram administrados na região da ATM de ratas prenhas no 18^o dia de gravidez, 24 horas antes da administração de formalina 1,5% (50 μ l) (Tabela 4).

Em um grupo de fêmeas em estro, foi administrado a formalina 1% (50 μ l) na ATM, e avaliadas as respostas comportamentais nociceptivas (Tabela 3).

A seguir, o antagonista de receptor κ -opióide, nor-BNI (200 μ g, 25 μ l) (n=6), ou salina (NaCl 0,9 %, 25 μ l) (n=6), foram administrados na região da ATM de fêmeas em estro, 24 horas antes da administração de formalina 1% (50 μ l) (Tabela 4).

Tabela 3
Administração de formalina

GRUPOS	ANIMAIS	TRATAMENTO	n
7	fêmeas prenhas (18 ^o)	formalina 1% (50 μ l)	6

Tabela 4

Pré-administração de nor-BNI (24h antes) e formalina

GRUPO	ANIMAIS	TRATAMENTO	n
8	fêmeas em estro	nor-BNI 200 μ g (25 μ l) e formalina 1% (50 μ l)	6
9	fêmeas em estro	NaCl 0,9% (25 μ l) e formalina 1% (50 μ l)	6
10	fêmeas prenhas (18 $^{\circ}$)	nor-BNI 200 μ g (25 μ l) e formalina 1,5% (50 μ l)	7
11	fêmeas prenhas (18 $^{\circ}$)	NaCl 0,9% (25 μ l) e formalina 1,5% (50 μ l)	6

4.6.4 EFEITO DA PRÉ-ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA DE RECEPTOR κ -OPIÓIDE, NA ATM CONTRALATERAL DE RATAS PRENHAS

Em um grupo de ratas prenhas no 18 $^{\circ}$ dia de gestação, o antagonista de receptor κ -opióide, nor-BNI (200 μ g (25 μ l ; n=6)) foi administrado 24 horas antes da formalina 1,5% (50 μ l) na ATM contralateral (Tabela 5).

Tabela 5

Pré-administração de nor-BNI (24h antes) na ATM contralateral e formalina na ATM ipsilateral

GRUPOS	ANIMAIS	TRATAMENTO	n
12	fêmeas prenhas (18 $^{\circ}$)	nor-BNI 200 μ g (25 μ l) e formalina 1,5% (50 μ l)	6

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Na presença de significância ($p < 0,05$), o teste de Tukey foi aplicado para a identificação de diferenças significativas entre as médias.

As respostas comportamentais nociceptivas, caracterizadas pela exacerbação do ato de coçar a região orofacial (CO), e pelo ato de levantar rapidamente a cabeça (LC), utilizada como índice de dor orofacial para o teste da formalina na ATM de ratas, foram analisadas em conjunto pela soma das mesmas.

Os resultados foram apresentados como a média \pm E.P.M. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se o programa Sigma Stat.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DAS ALTERAÇÕES HORMONAIIS DECORRENTES DA GRAVIDEZ, SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA 1,5% NA ATM DE RATAS.

A análise de variância revelou que houve diferença entre as médias da soma dos comportamentos, quando comparadas fêmeas prenhas com fêmeas na fase de estro. O comportamento nociceptivo foi estatisticamente reduzido pela administração de formalina 1,5% (50 μ l) na ATM de fêmeas prenhas quando comparado às fêmeas em estro, sugerindo que as fêmeas prenhas são menos sensíveis ao teste da formalina ($p < 0,05$); (Tabela 6 e Figura 9).

Tabela 6

Comportamento nociceptivo induzido pela administração de formalina 1,5% na ATM de ratas prenhas e na fase de estro. Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey

GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
Fêmeas em estro (formalina 1,5%; n= 8)	475,56 \pm 31,06 A
Fêmeas prenhas (formalina 1,5%; n=8)	300,78 \pm 40,43 B *

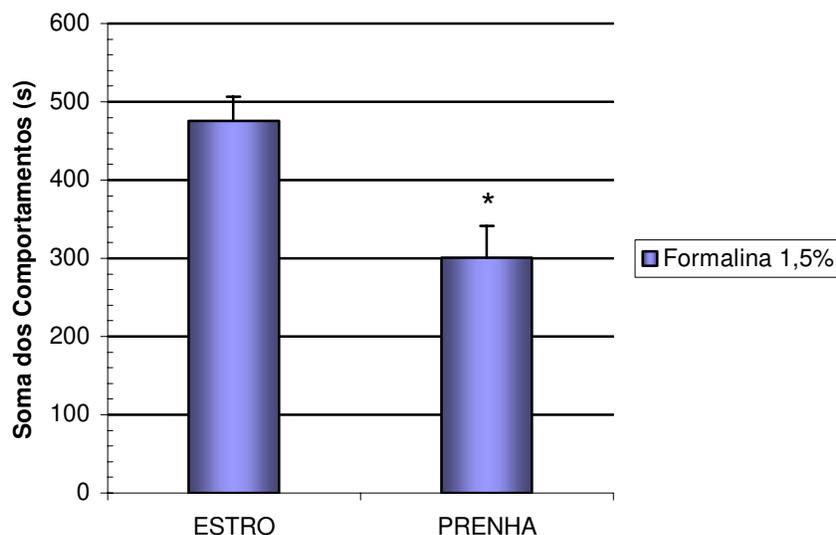


Figura 9 - Comportamento nociceptivo induzido pela administração de formalina 1,5% na ATM de ratas prenhas e na fase de estro (média; E.P. M). * Indica diferença estatística significativa em relação ao grupo em estro ($p < 0,05$).

5.2 EFEITO DA CO-ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA ESPECÍFICO DE RECEPTOR κ -OPIÓIDE , nor-BNI SOBRE O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE FORMALINA NA ATM DE RATAS.

A análise de variância não revelou indícios de que exista diferença estatística significativa entre as médias do comportamento nociceptivo, entre as diferentes doses usadas na co-administração do antagonista de receptor κ -opióide, nor-BNI (200 e 400 μ g / 25 μ l) e formalina 3%, (25 μ l) na ATM de ratas na fase de estro e em prenhas ($p > 0,05$; Tabelas 7 e 8) e (Figura 10).

Tabela 7

Comportamento nociceptivo induzido pela co-administração de nor-BNI com a formalina em ratas na fase de estro ($p>0,05$)

GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
fêmeas estro (formalina 1,5% / 50 μ l; n= 8)	475,56 \pm 31,06
fêmeas estro (formalina 3% / 25 μ l + nor-BNI 200 μ g / 25 μ l; n= 8)	400,55 \pm 34,81
fêmeas estro (formalina 3% /25 μ l + nor-BNI 400 μ g / 25 μ l ; n= 8)	377,18 \pm 45,89

Tabela 8

Comportamento nociceptivo induzido pela co-administração de nor-BNI com a formalina em ratas prenhas ($p<0,05$)

GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
fêmeas prenhas (formalina 1,5% / 50 μ l; n=8)	300,78 \pm 40,43
fêmeas prenhas (formalina 3% /25 μ l + nor-BNI 200 μ g / 25 μ l ; n= 8)	299,40 \pm 27,07
fêmeas prenhas (formalina 3% / 25 μ l + nor-BNI 400 μ g / 25 μ l ; n= 8)	338,41 \pm 22,99

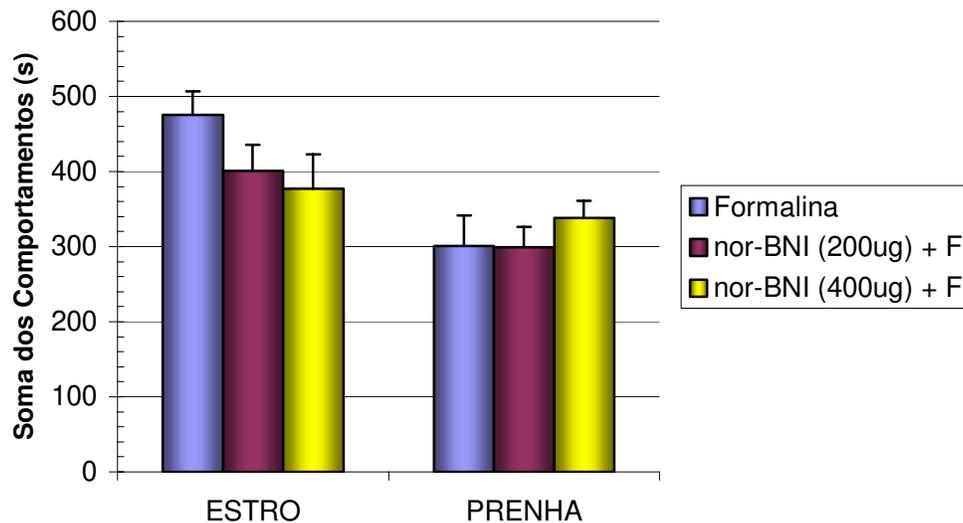


Figura 10 - Comportamento nociceptivo induzido pela co-administração de nor-BNI com a formalina ($p>0,05$).

5.3 EFEITO DA PRÉ-ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA DE RECEPTOR κ -OPIÓIDE NA ATM DE RATAS, 24 HORAS ANTES DA ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA

Foi observado que ratas prenhas que receberam formalina 1,5%, apresentaram o mesmo comportamento nociceptivo que as ratas em estro, que receberam formalina 1%, portanto não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$; Tabela 9 e Figura 11). Sendo assim, ficou determinado que para a realização dos grupos subseqüentes, seria utilizado formalina 1,5% para ratas prenhas e formalina 1% para ratas em estro.

Tabela 9

Comportamento nociceptivo induzido pela administração de formalina 1,5% em ratas prenhas e 1% em ratas em estro. Dados expressos como média \pm E.P.M. ($p > 0,05$; Teste de Tukey)

GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
fêmeas prenhas (formalina 1,5%; n=8)	300,78 \pm 40,43
fêmeas em estro (formalina 1%; n=6)	384,27 \pm 35,80

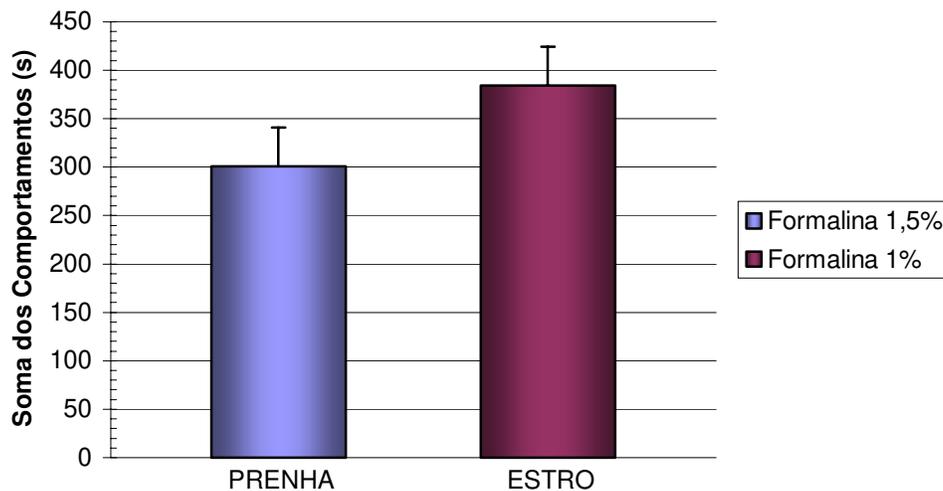


Figura 11 - Comportamento nociceptivo induzido pela administração de formalina 1,5% em ratas prenhas e 1% em ratas em estro ($p>0,05$).

O nor-BNI teve um efeito importante nas fêmeas prenhas, induzindo um aumento estatisticamente significativo das respostas comportamentais, o que não ocorreu com o grupo de fêmeas em estro (Tabela 10 e Figura 12). Pôde-se demonstrar, portanto, a especificidade da ação do receptor κ -opióide, na redução dos efeitos antinociceptivos induzidos pela formalina em ratas prenhas. Este dado foi evidenciado quando o antagonista de receptor κ -opióide, (nor-BNI), administrado 24h antes, apresentou uma maior seletividade a esse receptor (Wettstein & Grouhel, 1996), conseguindo reverter os efeitos antinociceptivos induzidos pela formalina.

Tabela 10

Comportamento nociceptivo induzido pela pré-administração de nor-BNI 24 horas antes da injeção de formalina em ratas prenhas e em fase de estro. Dados expressos como média \pm E.P.M. Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey.

GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
fêmeas prenhas (nor-BNI 200 μ g e formalina 1,5%; n= 7)	565,38 \pm 55,96 A * +
fêmeas prenhas (NaCl 0,9% e formalina 1,5%; n= 6)	398,22 \pm 18,59 B
fêmeas estro (nor-BNI 200 μ g e formalina 1%; n= 6)	404,35 \pm 15,86 B
fêmeas estro (NaCl 0,9% e formalina 1%; n= 6)	384,79 \pm 32,40 B

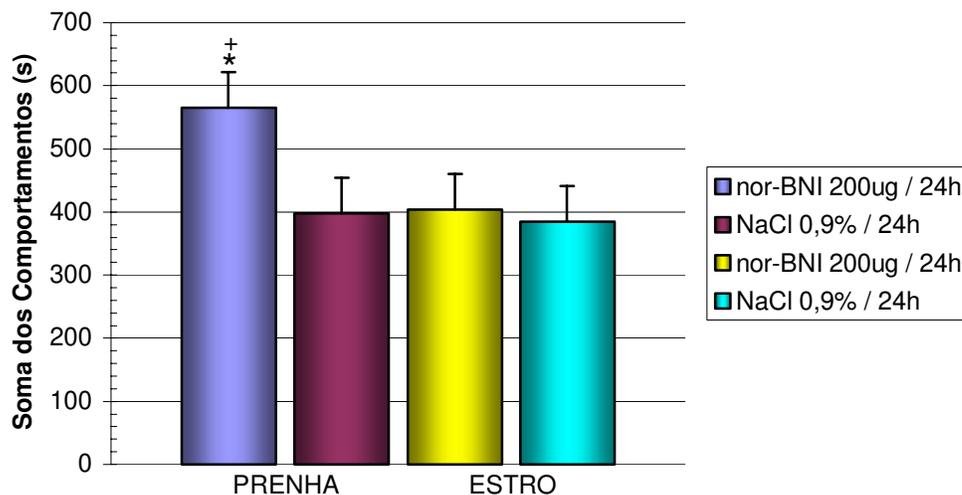


Figura 12 - Comportamento nociceptivo induzido pela pré-administração de nor-BNI 24 horas antes da injeção de formalina na ATM de ratas prenhas e na fase de estro. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação às ratas prenhas que receberam NaCl 0,9% ($p < 0,05$). + Indica diferença estatisticamente significativa em relação às ratas em estro ($p < 0,05$).

5.4 EFEITO DA PRÉ-ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA DE RECEPTOR κ -OPIÓIDE, nor-BNI NA ATM CONTRALATERAL DE RATAS PRENHAS

As ratas prenhas que receberam 200 μ g de nor-BNI, diferiram estatisticamente das ratas prenhas que receberam NaCl 0,9%, e das ratas prenhas que receberam o nor-BNI no lado contralateral da ATM ($p < 0,05$), sendo que este último não diferiu do grupo de ratas prenhas tratadas com NaCl 0,9% (Tabela 11 e Figura 13).

A ausência de efeito do antagonista de receptor κ -opióide na ATM contralateral à administração de formalina, evidencia o efeito periférico local deste antagonista, o que descarta a possibilidade de um efeito sistêmico desta droga.

Tabela 11

Comportamento nociceptivo induzido pela pré-administração de nor-BNI 24 horas antes da injeção de formalina na ATM contralateral. Dados expressos como média \pm E.P.M. Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey

GRUPOS	Resposta Comportamental (s)
fêmeas prenhas (nor-BNI 200 μ g/ ipsilateral e formalina 1,5%; n= 7)	565,38 \pm 55,96 A *
Fêmeas prenhas (NaCl 0,9%/ ipsilateral e formalina 1,5%; n=6)	398,22 \pm 18,59 B
fêmeas prenhas (nor-BNI 200 μ g/contralateral e formalina 1,5%; n=6)	374,97 \pm 14,04 B

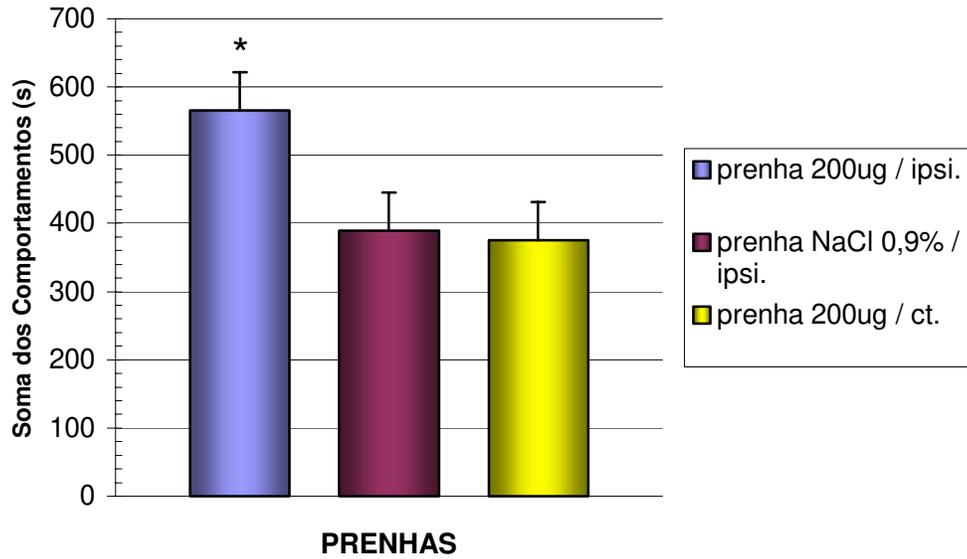


Figura 13 - Comportamento nociceptivo induzido pela pré-administração de nor-BNI 24 horas antes da injeção de formalina na ATM contralateral. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação às ratas prenhas que receberam NaCl 0,9% , e nor-BNI na ATM contralateral ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A utilização das fases do ciclo estral das ratas como meio de investigação da influência das variações hormonais na percepção dolorosa tem gerado dados conflitantes.

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; Giamberardino *et al.*, 1997; 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 e com o método de avaliação.

São poucos os trabalhos que comparam as diferenças sexuais na sensibilidade à dor induzida pela administração de agentes irritantes na região da ATM. Dados obtidos em nosso laboratório demonstram que fêmeas em estro são mais sensíveis ao teste da formalina na ATM do que machos. Por outro lado, fêmeas em proestro são menos sensíveis à administração de formalina 1,5% na região da ATM do que as fêmeas em estro e as castradas, que não diferem entre si (Arsati *et al.*, 2003; Jorge *et al.*, 2003). Esses dados estão de acordo com os de outros autores que encontraram diferença na percepção dolorosa entre machos e fêmeas (Aloisi *et al.*, 1994), sendo que entre as fêmeas a maior sensibilidade foi observada durante a fase estro (Martínez-Gómez *et al.*, 1994) e a menor na fase proestro (Drury & Gold, 1978; Frye *et al.*, 1992; Martínez-Gómez *et al.*, 1994).

Por outro lado, as fêmeas castradas com reposição de estrógeno apresentaram menor sensibilidade ao teste da formalina na ATM, indicando que a reposição hormonal teve um efeito antinociceptivo (Jorge *et al.*, 2003).

Outros autores também verificaram que a reposição hormonal em ratas castradas diminuiu a sensibilidade dolorosa (Drury & Gold, 1978; Martínez-Gómez *et al.*, 1994). Receptores de estrógeno foram encontrados na ATM (Abubaker *et al.*, 1996) e em neurônios sensoriais na lâmina I e II do subnúcleo caudal trigeminal, uma estação crítica de processamento da informação dolorosa da região orofacial, que também expressam receptores de estrógeno (Amandusson *et al.*, 1999). Tem sido reportado que o estrógeno pode modular as propriedades do campo receptivo das fibras aferentes primárias trigeminais (Bereiter & Barker, 1975, 1980).

Cairns *et al.* (2002) também detectaram maior sensibilidade dolorosa das fêmeas em estro em relação aos machos. Os autores demonstraram que as fêmeas em estro apresentam um aumento da atividade eletromiográfica em resposta à administração de glutamato na ATM, significativamente maior que os machos. Entretanto, os resultados obtidos com a castração e a reposição hormonal foram opostos aos obtidos por Jorge *et al.* (2003), onde as fêmeas castradas apresentaram menor sensibilidade dolorosa que era revertida pela reposição hormonal.

Trabalhos realizados com machos mostraram que a orquidectomia também causou redução do limiar de nocicepção, que foi restituído com a reposição do hormônio testosterona e reduziu a analgesia opióide e não opióide induzida por estresse (Mogil *et al.*, 1993), evidenciando o envolvimento dos hormônios sexuais na modulação da resposta dolorosa.

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).

Os resultados deste trabalho demonstram que as ratas prenhas, quando submetidas ao teste da formalina na ATM, no 19º dia de gravidez, apresentaram uma redução estatisticamente significativa das respostas comportamentais nociceptivas em relação às fêmeas em estro (Tabela 6 e Figura 9). Esses resultados reforçam a hipótese sugerida por outros autores (Drury & Gold, 1978; Frye *et al.*, 1992; Martínez-Gómez, *et al.*, 1994) de que os níveis hormonais aumentados característicos da fase proestro são de algum modo, os responsáveis pela diminuição da sensibilidade dolorosa. Além disso, o fato da reposição de 17β -estradiol em ratas castradas ter aumentado o limiar de sensibilidade dolorosa na ATM (Arsati *et al.*, 2003) sugere que esse hormônio possa estar envolvido na modulação da nocicepção nas fêmeas prenhas, durante o teste da formalina na ATM.

Acreditamos que os baixos níveis de hormônios ovarianos durante a fase estro (Smith *et al.*, 1975) sejam os responsáveis pela maior frequência do comportamento nociceptivo 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).

Tem sido relatado 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 de dinorfina (agonista κ -opióide endógeno) na medula espinhal (Medina *et al.*, 1993; 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).

A administração exógena de estrógeno e progesterona em ratas induz um aumento no limiar aos estímulos dolorosos, sendo esse efeito antinociceptivo dependente da ativação simultânea dos sistemas opióides kapa e delta, e potencializado pela ativação de receptores $\alpha 2$ noradrenérgicos (Liu & Gintzler, 2000).

Entretanto, o envolvimento de receptores kapa na modulação opióide é extremamente complexa e pode tanto inibir, como estimular a nocicepção dependendo da via neural e da sub-população de neurônios ativados no núcleo ventromedial rostral da medula espinhal ou no subnúcleo caudal. Segundo Ackley *et al.* (2001), nem todos os neurônios primários que ativam o sistema supressor de dor possuem receptores kapa, de forma que existe uma distribuição diferencial destes receptores nas células primárias que modulam a resposta nociceptiva. Tem sido demonstrado que a efetividade de agonistas kapa em modular a nocicepção é dependente da natureza química do estímulo nociceptivo aplicado (Leighton *et al.*, 1988).

Por outro lado, Fang & Proudfit (1998) sugerem que diferentes populações de neurônios na medula espinhal, que modulam a nocicepção,

podem ser ativadas dependendo do local de origem e do estímulo nociceptivo. Desta forma, pode ser que em uma determinada via, os neurônios de segunda ordem recebam fibras aferentes que possuam receptores κ -opióide, de forma que podem ser inibidos pré-sinápticamente por agonistas kapa, levando à antinocicepção por ativação do sistema supressor de dor.

Uma hipótese para explicar a menor sensibilidade à dor nas fêmeas prenhas é a interação dos hormônios sexuais com o sistema endógeno de modulação da dor.

Amandusson *et al.* (1999) demonstraram que ratas castradas apresentam uma acentuada redução, na expressão do precursor de encefalina na medula espinhal, e que a reposição hormonal de estrógeno induz um rápido aumento desse precursor opióide.

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).

Dawson-Basoa & Gintzler (1996) verificaram que os níveis plasmáticos elevados de estrógeno e progesterona são capazes de induzir analgesia pela maior liberação de dinorfina, um agonista κ -opióide, importante peptídeo endógeno relacionado com a modulação da dor.

Por outro lado, Chang *et al.* (2000) comprovaram que a população de receptores κ -opióide na medula espinhal de ratos varia conforme a fase do ciclo estral sendo mais expressiva na fase de proestro (altos níveis hormonais). Essas informações podem explicar como os níveis aumentados de estrógeno e progesterona, podem contribuir para a menor sensibilidade apresentada pelas fêmeas prenhas no teste da formalina na ATM. Da mesma forma, as fêmeas em estro apresentaram maior sensibilidade dolorosa que as fêmeas prenhas, provavelmente por apresentarem baixos níveis hormonais, e conseqüentemente menor produção de peptídeos opióides endógenos e/ou de receptores opióides importantes para a modulação da dor.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que o aumento dos níveis hormonais decorrente da gravidez podem modular a nocicepção, uma vez que a administração do antagonista κ -opióide 24 horas antes do teste da formalina na ATM, teve um efeito algésico induzindo um aumento estatisticamente significativo das respostas comportamentais nociceptivas nas fêmeas prenhas, porém, não alterou a sensibilidade dolorosa em fêmeas na fase de estro, (Tabela 10 e Figura 12), demonstrando que o nor-BNI, antagoniza a analgesia induzida pela gravidez.

Entretanto, quando o antagonista de receptor κ -opióide, nor-BNI (200 e 400 μ g) foi co-administrado com a formalina, não ocorreu alteração na nocicepção (Tabelas 7 e 8; Figura 10), comprovando que a seletividade do nor-BNI para os receptores κ -opióide se desenvolve algumas horas após a sua administração, como tem sido sugerido também por outros autores (Spanagel & Shoaib, 1994; Wettstein & Grouhel, 1996).

Como foi demonstrado, a administração de formalina 1% nas fêmeas em estro, (maior sensibilidade dolorosa) desencadeou comportamentos nociceptivos similares aos da administração de formalina 1,5% nas fêmeas prenhas, (menor sensibilidade dolorosa) (Tabela 9 e Figura 11). Além disso, foi observado que a administração de formalina 1,5% nas fêmeas em estro, elevou substancialmente as respostas comportamentais nociceptivas, demonstrando que o limite máximo de respostas neste tipo de teste, pode ter sido atingido. Por esse motivo, optamos pela utilização de formalina 1% nas fêmeas em estro, conseguindo assim, avaliar e comparar melhor a sensibilidade desses grupos, ao efeito algésico do antagonista de receptor κ -opióide, o nor-BNI.

A administração do nor-BNI na ATM contralateral à administração de formalina não alterou a sensibilidade dolorosa nas fêmeas prenhas (Tabela 11 e Figura 13). Esse fato evidencia, um efeito algésico periférico do antagonista κ -opióide, quando administrado previamente à formalina na ATM ipsilateral, e descarta a possibilidade de um efeito sistêmico dessa droga.

Considerando que os receptores κ -opióide encontram-se distribuídos não somente no sistema nervoso central, como também nos neurônios dos gânglios trigeminiais (Li *et al.*, 1998) e nas terminações periféricas das aferências somáticas (Fields *et al.*, 1980; Coggeshall *et al.*, 1997), foi proposto que o agonista desses receptores pode atuar periféricamente nos aferentes primários, produzindo antinocicepção (Ferreira *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1993).

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram a importância dos mecanismos periféricos na modulação da dor. O fato da administração local do antagonista κ -opióide ter aumentado significativamente o comportamento

nociceptivo nas fêmeas prenhas, sugere que a liberação endógena (periférica) de agonista de receptor κ -opióide esteja envolvida na analgesia induzida pela gravidez.

É importante ressaltar que, além dos agonistas do receptor κ -opióide exógenos, produzirem efeitos antinociceptivos locais (Machelska *et al.*, 1999; Ko *et al.*, 2000; Binder *et al.*, 2001) eles também induzem uma melhor resposta analgésica em ratas (Binder *et al.*, 2001), assim como em mulheres (Gear *et al.*, 1996, 1999) e a dose ótima desses agonistas para mulheres é menor do que a preconizada (Gear *et al.*, 1999).

Desta forma, a redução da sensibilidade dolorosa relacionada ao aumento dos níveis circulantes de hormônios sexuais decorrentes da gravidez, pode estar relacionada a: 1) uma elevação nos níveis de dinorfina (κ -opióide endógeno) como sugerido por Dawson-Basoa & Gintzler (1998) e/ ou; 2) um aumento da sensibilidade ou da população dos receptores κ -opióide. Entretanto, Clemente *et al.* (2003) demonstraram a existência de receptores κ -opióide funcionais na ATM de ratos, e verificaram que a ativação destes receptores, suprime a resposta nociceptiva induzida pela formalina na ATM, e que as fêmeas em diestro (baixos níveis hormonais) foram mais sensíveis aos efeitos antinociceptivos do agonista de receptor κ -opióide, que as fêmeas em proestro (altos níveis hormonais).

Portanto, o efeito algésico do nor-BNI evidenciado apenas nas ratas prenhas, pode não estar relacionado a um aumento da sensibilidade, ou da população de receptores κ -opióide na ATM. Isso sugere que o aumento de agonistas de receptor κ -opióide endógenos como a dinorfina, seja de primordial importância na analgesia induzida pela gravidez.

Embora as diferenças quanto aos tipos e locais dos receptores opióides tenha grande importância funcional, dados a respeito de neurotransmissores naturais (endógenos) que se ligam a esses receptores são ainda muito imprecisos, sendo que, a grande maioria dos trabalhos relacionados à modulação opióide, investigam o efeito da administração exógena de agonistas opióides.

Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram pela primeira vez, o envolvimento de opióides endógenos na modulação periférica da dor proveniente da ATM.

Apesar de não restarem dúvidas sobre a influência dos hormônios sexuais na percepção dolorosa, os dados encontrados na literatura ainda são muito contraditórios, provavelmente por envolverem complexos mecanismos e fatores psicossociais relacionados ao sistema de modulação do fenômeno doloroso.

A interação entre os hormônios sexuais, e a percepção dolorosa é de relevância para o estudo de síndromes dolorosas craniofaciais. Tem sido demonstrado, que os hormônios sexuais têm um papel relevante no desenvolvimento e manutenção das condições dolorosas craniofaciais agudas e crônicas, como as desordens temporomandibulares (DTM's) que parecem ser mais prevalentes em mulheres do que nos homens. (Leresche *et al.*, 1997; Dao & Leresche, 2000; Cairns *et al.*, 2001). No entanto, apesar da alta incidência das condições dolorosas da ATM em mulheres, e da maior eficácia analgésica dos agonistas dos receptores κ -opióide no sexo feminino (Gear *et al.*, 1999) quase nada se sabe sobre o papel desses receptores na modulação da dor proveniente da ATM.

Os resultados deste trabalho evidenciam o envolvimento do receptor κ -opióide periférico (da ATM) e a liberação de opióides endógenos na analgesia induzida pela gravidez. Esses dados podem ser de grande valia para a melhor compreensão dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nas condições dolorosas da ATM e da inter-relação entre hormônios sexuais, nocicepção e analgesia.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- O aumento dos níveis de hormônios sexuais decorrentes da gravidez, induzem à uma redução da nocicepção ao teste da formalina na ATM;
- A ativação de receptores κ -opióide periféricos pela liberação de agonistas opióides endógenos, está envolvida na analgesia induzida pela gravidez no teste da formalina na ATM.

REFERÊNCIAS*

Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*. 1995; 60(1): 91-102.

Abubaker AO, Hebda PC, Gunsolley JN. Effects of sex hormones on protein and collagen content of the temporomandibular joint disc of the rat. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996; 54(6): 721-7.

Ackley MA, Hurley RW, Virnich DE, Hammond DL. A cellular mechanism for the antinociceptive effect of a kappa opioid receptor agonist. *Pain*. 2001; 91(3): 377-88.

Alder ME, Dove SB, Murrah VA, Salinas F, Williams RF. Magnetic resonance spectroscopy of inflammation associated with the temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992; 74(4): 515-23.

Aghabeigi B. The pathophysiology of pain. *Br Dent J*. 1992; 173(3): 91-97.

Aloisi AM, Albonetti ME, Carli G. Sex differences in the behavioural response to persistent pain in rats. *Neurosci Lett*. 1994; 179(1-2): 79-82.

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.

Arsati F, Veiga MCFA, Jorge DL. Influência dos gêneros masculino e feminino sobre a sensibilidade à dor na ATM de ratos. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17(Supl) 2: 246.

Bakke M, Hu JW, Sessle BJ. Morphine application to peripheral tissues modulates nociceptive jaw reflex. *Neuroreport*. 1998; 9(14): 3315-9.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Bereiter DA. Sex differences in brainstem neural activation after injury to the TMJ region. *Cells Tissues Organs*. 2001; 169(3): 226-37.

Bereiter DA, Barker DJ. Facial receptive fields of trigeminal neurons: increased size following estrogen treatment in female rats. *Neuroendocrinology*. 1975; 18(1): 115-24.

Bereiter DA, Barker DJ. Hormone-induced enlargement of receptive fields in trigeminal mechanoreceptive neurons. I. Time course, hormone, sex and modality specificity. *Brain Res*. 1980; 184(2): 395-410.

Berne RM, Levy MN. As glândulas reprodutoras. *In*: Berne RM, Levy MN. *Fisiologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p. 920-961.

Binder W, Machelska H, Mousa S, Schmitt T, Riviere PJ, Junien JL *et al*. Analgesic and antiinflammatory effects of two novel kappa-opioid peptides. *Anesthesiology*. 2001; 94(6): 1034-44.

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.

Cai BB, Cairns BE, Sessle BJ, Hu JW. Sex-related suppression of reflex jaw muscle activity by peripheral morphine but not GABA. *Neuroreport*. 2001; 12(16): 3457-60.

Cairns BE, Hu JW, Arendt-Nielsen L, Sessle BJ, Svensson P. Sex-related differences in human pain and rat afferent discharge evoked by injection of glutamate into the masseter muscle. *J Neurophysiol*. 2001; 86(2): 782-91.

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 Res*. 2002; 957(2): 338-44.

Chang PC, Aicher SA, Drake CT. Kappa opioid receptors in rat spinal cord vary across the estrous cycle. *Brain Res*. 2000; 861(1): 168-72.

Clark GT. Diagnosis and treatment of painful temporomandibular disorders. *Dent Clin North Am*. 1987; 31(4): 645-74.

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.

Clemente JT, Oliveira MCG, Parada CA, Veiga MCFA, Tambeli CH. Avaliação da presença de receptores opióides capa funcionais na ATM de ratas e do papel desses receptores na dor da ATM. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17(Supl 2): 124.

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.

Coggeshall RE, Zhou S, Carlton SM. Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain Res*. 1997; 764(1-2): 126-32.

Costanzo L. Fisiologia da reprodução. In: Costanzo L. *Fisiologia*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 920-961.

Dao TT, LeResche L. Gender differences in pain. *J Orofac Pain*. 2000; 14(3): 169-84.

Dawson-Basoa ME, Gintzler AR. Estrogen and progesterone activate spinal kappa-opiate receptor analgesic mechanisms. *Pain*. 1996; 64(3): 608-15.

Dawson-Basoa ME, Gintzler AR. Gestational and ovarian sex steroid antinociception: synergy between spinal kappa and delta opioid systems. *Brain Res*. 1998; 794(1): 61-7.

Drury RA, Gold RM. Differential effects of ovarian hormones on reactivity to electric footshock in the rat. *Physiol Behav*. 1978; 20(2): 187-91.

Dubner R, Bennett GJ. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu Rev Neurosci*. 1983; (6): 381-418.

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.

Fang F, Proudfit HK. Antinociception produced by microinjection of morphine in the rat periaqueductal gray is enhanced in the foot, but not the tail, by intrathecal injection of alpha1-adrenoceptor antagonists. *Brain Res.* 1998; 790(1-2): 14-24.

Ferreira SH, Duarte ID, Lorenzetti BB. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol.* 1991; 201(1): 121-2.

Fields HL, Emson PC, Leigh BK, Gilbert RF, Iversen LL. Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. *Nature.* 1980; 284(5754): 351-3.

Fillingim RB, Maixner W, Girdler SS, Light KC, Harris MB, Sheps DS, Mason GA. Ischemic but not thermal pain sensitivity varies across the menstrual cycle. *Psychosom Med.* 1997; 59(5): 512-20.

Fillingim RB, Ness TJ. Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000; 24(4): 485-501.

Franklin KB, Abbott FV. Pentobarbital, diazepam, and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABA A receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993; 46(3): 661-6.

Fricton JR, Dubner R. Mecanismos da dor orofacial no tronco cerebral. In: Fricton Jr, Dubner. *Dor Orofacial e Desordens Temporomandibulares.* 1. ed. São Paulo: Santos; 2003. p. 43-57.

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(4): 699-706.

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.

Gear RW, Miaskowski C, Gordon NC, Paul SM, Heller PH, Levine JD. The kappa opioid nalbuphine produces gender- and dose-dependent analgesia and antianalgesia in patients with postoperative pain. *Pain.* 1999; 83(2): 339-45.

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 non-dysmenorrheic women, dysmenorrheic women and men. *Pain*. 1997; 71(2): 187-97.

Gintzler AR, Bohan MC. Pain thresholds are elevated during pseudopregnancy. *Brain Res*. 1990; 507(2): 312-6.

Guyton AC. Fisiologia feminina antes da gravidez e hormônios femininos. In: Guyton AC. *Tratado de fisiologia médica*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992. p. 792-805.

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.

Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987; 30(1): 103-14.

Jorge DL, Arsati F, Veiga MCFA, Tambeli CH. Influência do estrógeno na sensibilidade à dor na ATM de ratas (teste da formalina). *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17 Supl 2: 246.

Kayser V, Berkley KJ, Keita H, Gautron M, Guilbaud G. Estrous and sex variations in vocalization thresholds to hindpaw and tail pressure stimulation in the rat. *Brain Res*. 1996; 742(1-2): 352-4.

Ko MC, Tuchman JE, Johnson MD, Wiesenauer K, Woods JH. Local administration of mu or kappa opioid agonists attenuates capsaicin-induced thermal hyperalgesia via peripheral opioid receptors in rats. *Psychopharmacology*. 2000; 148(2): 180-5.

Labrecque G, Dore FM, Belanger PM, Carter V. Chronobiological study of plasma exudation in carrageenan-paw oedema in the rat. *Agents Actions*. 1984; 14(5-6): 719-22.

Leer MN, Bradbury A, Maloney JC, Stewart CN. Elevated shock threshold in sexually receptive female rats. *Physiol Behav*. 1988; 42(6): 617-20.

LeResche L, Saunders K, Von Korff MR, Barlow W, Dworkin SF. Use of exogenous hormones and risk of temporomandibular disorder pain. *Pain*. 1997; 69(1-2):153-60.

Li JL, Ding YQ, Li JS, Nomura S, Kaneco T *et al*. Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide. A light and electron microscope study in the rat. *Brain Res*. 1998; 794(2):347-52.

Liu N, Gintzler AR. Prolonged ovarian sex steroid treatment of male rats produces antinociception: identification of sex-based divergent analgesic mechanisms. *Pain*. 2000; 85:273-281.

Machelska H, Pfluger M, Weber W, Piranvisseh-Volk M, Daubert JD, Dehaven R, Stein C. Peripheral effects of the kappa-opioid agonist EMD 61753 on pain and inflammation in rats and humans. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 290(1):354-61.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the Estrous Cycle Phases of Rats: Some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 2002; 62(4 A):609-14.

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.

McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett*. 1996; 208(1): 45-8.

Medina VM, Dawson-Basoa, ME, Gintzler AR. 17β estradiol and progesterone positively modulate spinal cord dynorphin: relevance to the analgesia of pregnancy. *Neuroendocrinology*. 1993; 58: 310-315.

Mersky YH. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain*. 1986; 3 Suppl S1-S226.

Mogil JS, Sternberg WF, Kest B, Marek P, Liebeskind JC. Sex differences in the antagonism of swim stress-induced analgesia: effects of gonadectomy and estrogen replacement. *Pain*. 1993; 53(1): 17-25.

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.

Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain*. 1996; 64(2): 345-355.

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.

Rosland JH. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain*. 1991; 45(2): 211-216.

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.

Sander HW, Kream RM, Gintzler AR. Spinal dynorphin involvement in the analgesia of pregnancy: effects of intrathecal dynorphin antisera, *Eur. J. Pharmacol*. 1989; 159: 205-209.

Sessle BJ. Mechanism of trigeminal and occipital pain. *Pain Rev*. 1996; 3:91-116.

Sessle B.J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11(1): 57-91.

Smith MS, Freeman ME, Neill JD. 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*. 1975; 93:756-758.

Spanagel R, Shoaib M. Involvement of mesolimbic kappa-opioid systems in the discriminative stimulus effects of morphine. *Neuroscience*. 1994; 63(3):797-804.

Steenks MH, Wijer A. Epidemiologia, Sintomatologia e Etiologia da Disfunção Craniomandibular. In: Boever JA, Steenks MH. *Disfunções da articulação temporomandibular do ponto de vista da fisioterapia e da odontologia – diagnóstico e tratamento*. 1. ed. São Paulo: Santos; 1996. p. 35-43.

Stein C, Hassan AH, Lehrberger K, Giefing J, Yassouridis A. Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. *Lancet*. 1993; 342(8867):321-4.

Swift JQ, Roszkowski MT, Alton T, Hargreaves KM. Effect of intra-articular versus systemic anti-inflammatory drugs in a rabbit model of temporomandibular joint inflammation. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998; 56(11): 1288-95.

Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci*. 1995; 15(11): 7575-7584.

Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992; 51(1): 5-17.

Unruh AM. Gender variations in clinical pain experience. *Pain*. 1996; 65: 123-167.

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: 315-324.

Wettstein JG, Grouhel A. Opioid antagonist profile of SC nor-binaltorphimine in the formalin paw assay. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996; 53(2):411-6.

Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain*. 1990; 40(2): 229-238.

Wheeler-Aceto H, Cowan A. Naloxone causes apparent antinociception and pronociception simultaneously in the rat paw formalin test. *Eur J Pharmacol.* 1993; 236(2): 193-199.

Whipple B, Josimovich JB, Komisaruk BR. Sensory thresholds during the antepartum, intrapartum, and postpartum periods. *Ins. J. Nursing Stud.* 1990; 27: 213-221.

Zimmermann, N. Ethical guidelines for investigation pain in conscious animals. *Pain.* 1983; 16:109-110.

ANEXO



INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 389-1, sobre "Envolvimento do
receptor episódico kappa na modulação da dor
irradiada pela formol na ATM de ratos..."
sob a responsabilidade de Maíra Alcibia Frazz de
Almeida Jesus 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 07/06/2002

Campinas, 7 de junho de 2002

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº "389-1", entitled "Envolvimento do
receptor episódico kappa na modulação da dor
irradiada pela formol na ATM de ratos..."
is in agreement with the Ethical Principles in 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
07/06/02

Campinas 7 de junho de 2002.


Prof(a) Dr(a) Alba R.M. Souza Brito
Presidente – CEEA/IB/UNICAMP

APÊNDICE

Tabelas referentes aos valores individuais da amostra.

Efeito da administração de formalina a 1% e 1,5% na ATM de ratas na fase de estro e prenhas.

ANIMAIS	FÊMEAS EM ESTRO	FÊMEAS EM ESTRO	FÊMEAS PRENHAS
	formalina (1,5%)	formalina (1%)	formalina (1,5%)
1	434,78	325,31	173,95
2	370,80	549,26	300,40
3	433,76	418,26	264,90
4	468,29	344,36	331,25
5	463,73	332,37	440,54
6	462,48	336,11	134,89
7	498,12		462,61
8	672,51		297,77
Média ± E.P.M.	475,56 ± 31,06	384,27 ± 35,80	300,78 ± 40,43

Efeito da co-administração de nor-BNI e formalina, na ATM de ratas na fase de estro e prenhas.

ANIMAIS	FÊMEAS EM	FÊMEAS EM	FÊMEAS	FÊMEAS
	ESTRO	ESTRO	PRENHAS	PRENHAS
	nor-BNI (200µg) +Formalina (3%)	nor-BNI (400µg) +Formalina (3%)	nor-BNI (200µg) +Formalina (3%)	nor-BNI (400µg) +Formalina (3%)
1	524,22	247,87	232,76	337,33
2	381,35	420,84	349,69	372,07
3	392,64	441,63	317,68	428,49
4	294,41	475,94	239,17	239,07
5	555,43	444,42	248,01	373,63
6	330,02	548,40	240,67	266,46
7	430,79	247,97	453,73	300,46
8	295,55	190,42	313,50	389,78
Média ± E.P.M.	400,55 ± 34,81	377,18 ± 45,89	299,40 ± 27,07	338,41 ± 22,99

Efeito da pré-administração de nor-BNI, ou NaCl, 24 horas antes da administração de formalina na ATM de ratas em estro

ANIMAIS	FÊMEAS EM ESTRO	FÊMEAS EM ESTRO
	nor-BNI (200µg) e Formalina (1%)	NaCl (0,9%) e Formalina (1%)
1	464,76	355,12
2	432,38	292,42
3	389,50	500,27
4	361,99	343,13
5	406,24	463,01
6	371,23	354,80
Média ± E.P.M.	404,35 ± 15,86	384,79 ± 32,40

Efeito da pré-administração de nor-BNI, ou NaCl, 24 horas antes da administração de formalina na ATM ipsilateral ou contralateral de ratas prenhas.

ANIMAIS	FÊMEAS PRENHAS	FÊMEAS PRENHAS	FÊMEAS PRENHAS
	nor-BNI (200µg) e Formalina (1,5%)	NaCl (0,9%) e Formalina (1,5%)	nor-BNI (200µg/ct) e Formalina (1,5%)
1	263,48	418,11	324,19
2	476,10	396,36	402,51
3	610,18	465,38	397,18
4	638,26	409,01	341,23
5	667,11	331,05	379,26
6	651,53	369,42	405,50
7	651,01		
Média ± E.P.M.	565,38 ± 55,96	398,22 ± 18,59	374,97 ± 14,04