UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Aline Soares de Camargo

Orientador(a): Cláudia Herrera Tambeli

Ano de Conclusão do Curso: 2009

UNICAMP / FOP
BIBLIOTECA

Cláudia

Assinatura do(a) Orientador(a)

TCC/UNICAMP
C14e
1290005005 FOP

Aline Soares de Camargo

Efeito organizacional dos hormônios sexuais sobre a nocicepção da ATM de ratos e sobre o efeito antinociceptivo ativacional desses hormônios.

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, para obtenção do Diploma de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli

Piracicaba

2009

Unidade: FOP/UNICAMP
JCC/UNICAMP
CKe Ed.
Vol. Ex.
Tombo 5005
C D
Proc. 16P-134/10
Preço R$ 11,00
D 13/08/10
F 771946

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C14e

Camargo, Aline Soares de.
Efeito organizacional dos hormônios sexuais sobre a nocicepção da ATM de ratos e sobre o efeito antinociceptivo ativacional desses hormônios. / Aline Soares de Camargo. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.
38f. : il.

Orientador: Cláudia Herrera Tambeli.
Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Articulação temporomandibular. I. Tambeli, Cláudia Herrera. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, em gratidão a todo amor e incentivo que me foi oferecido nesta minha etapa da evolução.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todos os meus orientadores espirituais, que com sabedoria me conduziram sempre pelo melhor caminho, me dando coragem para enfrentar as coisas que podiam ser mudadas, serenidade para compreender as que não podiam e sabedoria para distinguir uma coisa da outra.

Agradeço à Profa Dra Claudia Herrera Tambeli, pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Laboratório de Dor Orofacial da FOP-UNICAMP, durante toda a minha graduação.

Agradeço à Profa. Dra. Luana Fischer, minha Co-Orientadora, pelo companheirismo e paciência em desenvolver ao meu lado todos os experimentos.

Agradeço aos colegas e funcionários do laboratório pelo cuidado exemplar que tiveram comigo e com meus animais nestes anos de trabalho.

Agradeço ao amor da minha vida, Bruno, para o qual não existem palavras de agradecimento pelo apoio nestes anos todos que estamos juntos. Sem ele, este sonho não seria possível.

SUMÁRIO

1- Lista de Ilustrações.....pág 5

2- Lista de abreviaturas e siglas.....pág 6

3- RESUMO.....pág 8

4- INTRODUÇÃO.....pág 9

5- DESENVOLVIMENTO.....pág 14

6- CONCLUSÕES.....pág 26

7- Referências Bibliográficas.....pág 33

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Efeito da gonadectomia no primeiro dia pós-natal ou na fase adulta na resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina 1,5% na ATM de machos. (Página)

Figura 2: Efeito da administração de testosterona, estrógeno e progesterona na resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina 1,5% na ATM de machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal ou na fase adulta. (Página)

Figura 3: Efeito da administração pós-natal de testosterona na resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina 1,5% na ATM de fêmeas. (Página)

Figura 4: Efeito da administração de estrógeno, progesterona e testosterona na resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina 1,5% na ATM de fêmeas ovariectomizadas que receberam testosterona pós-natal. (Página)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

"ATM" = articulação têmporo-mandibular

"DTM"= disfunção têmporo-mandibular

"et al"= e outros(abreviatura de "et lii")

IASP= Comitê de Ética da Associação Internacional para Estudo da Dor

g= gramas

mg= miligramas

cirurgia sham= é uma cirurgia "falsa".Simulando etapas de uma original.

µl= microlitro

kg= kilograma

cm= centímetros

s= segundo

OVX= fêmeas ovariectomizadas

ORX= orquiecdomizado

ORX + V = Orquiectomizado tratado com veículo

ORX + T = Orquiectomizado tratado com Testosterona

ORX + E = Orquiectomizado tratado com estrógeno

ORX + P = Orquiectomizado tratado com progesterona

OVX + V = Ovariectomizada com administração de veículo

OVX + T = Ovariectomizada com administração de Testosterona

OVX + E = Ovariectomizada com administração de estrógeno

OVX + P = Ovariectomizada com administração de progesterona

RESUMO

Dados anteriores de nosso laboratório demonstram que altos níveis fisiológicos de estrógeno em ratas ou a administração de estrógeno ou progesterona em ratas ovariectomizadas diminui a nocicepção da ATM. Em machos, embora a orquidectomia não afete, a administração de testosterona em machos orquiectomizados diminui a nocicepção da ATM. Os hormônios sexuais podem afetar a nocicepção através de dois mecanismos distintos: o mecanismo organizacional - que ocorre durante os primeiros dias de vida e medeia a diferenciação sexual do sistema nervoso - e o mecanismo ativacional - mediado pela ativação de receptores hormonais em um sistema nervoso totalmente desenvolvido. Evidentemente, o efeito antinociceptivo do estrógeno e da progesterona na ATM de fêmeas e da testosterona na ATM de machos que observamos em nossos experimentos anteriores é do tipo ativacional. No entanto, como existe um forte caráter sexo-específico no efeito antinociceptivo de cada hormônio, acreditamos que a ação organizacional, ou seja, durante os primeiros dias de vida, afete a nocicepção da ATM e o efeito antinociceptivo dos hormônios sexuais na ATM dos animais adultos. Diante disso, o objetivo desse projeto é avaliar o envolvimento de mecanismos organizacionais na nocicepção e no efeito antinociceptivo dos hormônios sexuais em animais que receberam injeção de formalina na ATM. Para isso, a resposta nociceptiva e o efeito da administração dos hormônios sexuais serão avaliados em fêmeas que tiveram seu sistema nervoso organizado como o de um macho (através de injeção de testosterona no primeiro e segundo dias pós-natal) e em machos que tiveram seu sistema nervoso organizado como o de uma fêmea (através da gonadectomia no primeiro dia pós-natal).

INTRODUÇÃO

Disfunções Temporomandibulares (DTMs) são condições dolorosas dos músculos mastigatórios e da Articulação Temporomandibular (ATM, Dworkin et al. 1990) com maior prevalência, severidade e duração no sexo feminino (LeResche 1997). Em nosso laboratório, trabalhamos com um modelo animal de dor na ATM, utilizando a injeção experimental de formalina (Roveroni et al. 2001), um agente nociceptivo considerado altamente representativo da dor clínica (Le Bars et al. 2001). Através da utilização desse modelo experimental, demonstramos que a injeção de formalina (1,5%) na ATM induz uma resposta nociceptiva significativamente maior em fêmeas do que em machos (Clemente et al., 2004). Diante de tais dados, passamos então a investigar o papel dos hormônios sexuais na nocicepção da ATM. Verificamos que a injeção de formalina (1,5%) na ATM de fêmeas na fase diestro do ciclo estral induz uma resposta nociceptiva significativamente maior que a observada em fêmeas na fase proestro (Fischer et al. 2008). Uma vez que o diestro é a fase do ciclo estral com baixo e o proestro com alto nível de estrógeno circulante, esses dados sugerem que os altos níveis fisiológicos de estrógeno reduzem a dor da ATM. É importante destacar que esse resultado reproduz resultados clínicos que demonstram que a dor da ATM em mulheres é mais intensa durante o período de baixo nível de estrógeno do ciclo menstrual (LeResche et al. 2003). A semelhança entre esses estudos sugere que o teste da formalina na ATM de ratos é um bom modelo experimental para o estudo dos mecanismos através dos quais os hormônios sexuais modulam a dor da ATM. Dando continuidade ao estudo do papel dos hormônios sexuais na dor da ATM nós demonstramos recentemente que a injeção de formalina na ATM de ratas ovariectomizadas induz comportamento nociceptivo similar ao de ratas em diestro e

que esse comportamento é significativamente reduzido quando se administra estrógeno ou progesterona (Fischer et al. 2008). Em machos, apesar de a gonadectomia não afetar a dor da ATM, a administração de testosterona, mas não de estrógeno ou progesterona reduz significativamente a resposta comportamental induzida pela administração de formalina na ATM (Fischer et al. 2007).

Os hormônios sexuais podem afetar a nocicepção através de dois mecanismos distintos: organizacional e ativacional (Kawata 1995). A ação organizacional dos hormônios sexuais ocorre durante os primeiros dias de vida e medeia a diferenciação sexual do sistema nervoso, induzindo mudanças morfológicas permanentes que irão se refletir durante a vida adulta (Kawata 1995). O mecanismo ativacional é mediado pela ativação de receptores específicos para cada hormônio sexual em um sistema nervoso totalmente desenvolvido e é resultado da ação momentânea dos hormônios sexuais com alto nível circulante (Kawata 1995). Evidentemente, o efeito antinociceptivo do estrógeno e da progesterona na ATM de fêmeas (Fischer et al. 2008) e da testosterona na ATM de machos (Fischer et al. 2007) que observamos em nossos experimentos anteriores é do tipo ativacional. No entanto, embora tenha sido descrito que a ação organizacional dos hormônios sexuais afeta a nocicepção (LaCroix-Fralish et al. 2005; Borzan and Fuchs 2006) e o efeito analgésico de opióides (Cicero et al. 2002; Cataldo et al. 2005; Borzan and Fuchs 2006) não se sabe se essa ação organizacional afeta a nocicepção da ATM e o efeito antinociceptivo dos hormônios sexuais na nocicepção da ATM. Um fato que reforça a hipótese de que um mecanismo organizacional possa contribuir para a expressão do efeito antinociceptivo dos hormônios na vida adulta é a sexo-especificidade do efeito de cada hormônio, ou seja, ao contrário do que acontece nas fêmeas, a administração

UNICAMP / FOP
BIBLIOTECA

sistêmica de estrógeno ou de progesterona não afeta a nocicepção da ATM em machos gonadectomizados (Fischer et al. 2007). O efeito da testosterona também é sexo-específico, ou seja a administração de testosterona não afeta a nocicepção em fêmeas ovariectomizadas (Fischer et al. 2007). É difícil explicar esses achados em termos de um efeito ativacional, pois tanto o estrógeno (Lombardi et al. 2001) quanto a progesterona (Oettel and Mukhopadhyay 2004) em machos, assim como a testosterona em fêmeas (Forest 1983), exercem importantes funções fisiológicas através da ativação de receptores específicos presentes em ambos os sexos na ATM (Abubaker et al. 1993; Campbell et al. 1993; Yamada et al. 2003; Fang and Ma 2006) e em áreas do sistema nervoso que participam da transmissão e modulação da informação nociceptiva (Amandusson et al. 1995; Kastrup et al. 1999; Aloisi 2003). Conseqüentemente, acreditamos que a ação organizacional tenha um efeito permissivo para a ação ativacional dos hormônios sexuais na nocicepção da ATM, ou seja, a ação do hormônio durante a vida adulta depende de sua ação prévia na formação do sistema nervoso masculino e feminino.

Se essa hipótese for verdadeira, a manipulação do efeito organizacional dos hormônios sexuais alteraria, no organismo masculino e feminino adulto, a resposta nociceptiva e a resposta aos hormônios sexuais, demonstrando que o papel dos hormônios sexuais na resposta nociceptiva depende de diferenças estruturais no sistema nervoso de machos e fêmeas que se estabelecem nos primeiros dias de vida. Sabe-se que a testosterona, e não os outros hormônios gonadais, é o hormônio responsável pela diferenciação sexual do sistema nervoso, ou seja, a presença de testosterona induz a masculinização do sistema nervoso, enquanto sua ausência leva o cérebro a se desenvolver passivamente como o de uma fêmea (MacLusky and Naftolin 1981; Arnold and Gorski 1984). Sendo assim, a

gonadectomia do macho no primeiro dia pós-natal, reduz a secreção de testosterona, fazendo com que seu sistema nervoso se desenvolva como o de uma fêmea (Cicero et al. 2002; Cataldo et al. 2005; Borzan and Fuchs 2006). De forma semelhante, a administração de testosterona nos primeiros dias pós-natal em fêmeas faz com que seu encéfalo se desenvolva como o de um macho (Cicero et al. 2002; Cataldo et al. 2005; LaCroix-Fralish et al. 2005).

Objetivos

Objetivo geral:

Testar a hipótese de que a ação organizacional dos hormônios sexuais afeta a nocicepção e o efeito antinociceptivo ativacional dos hormônios sexuais na ATM de ratos machos e fêmeas.

Objetivos específicos:

1- Testar a hipótese de que a manipulação do efeito organizacional, através da gonadectomia no primeiro dia pós-natal em machos afeta: A - a nocicepção induzida pela administração de formalina (1,5%) na ATM de machos. B - o efeito antinociceptivo da testosterona. C – a sexo-especificidade do efeito do estrógeno e da progesterona nas fêmeas, ou seja, se em machos gonadectomizados no primeiro dia pós-natal, ao contrário do que acontece naqueles gonadectomizados no período pré-puberal, esses hormônios induzem efeito antinociceptivo.

2- Testar a hipótese de que a manipulação do efeito organizacional, através da injeção de testosterona no primeiro e segundo dia pós-natal em fêmeas afeta: A - a nocicepção induzida pela administração de formalina (1,5%) na ATM de fêmeas. B - o efeito antinociceptivo do estrógeno e da progesterona nas fêmeas. C – a sexo-especificidade do efeito da testosterona nos machos, ou seja, se em fêmeas que

receberam testosterona pós-natal, ao contrário do que acontece naquelas que não a receberam, a testosterona induz efeito antinociceptivo.

Justificativa

Entender os mecanismos através dos quais os hormônios sexuais modulam a dor da ATM é de extrema importância para o desenvolvimento de futuras modalidades terapêuticas que levem em conta o status hormonal do paciente e assim, alcancem um maior índice de sucesso.

Apesar de mecanismos organizacionais influenciarem fortemente a resposta aos hormônios sexuais na vida adulta (Kawata 1995), pouco se sabe a respeito do envolvimento desses mecanismos no efeito dos hormônios sexuais sobre a nocicepção, pois a literatura nessa área ainda é escassa (Cicero et al. 2002; Cataldo et al. 2005; LaCroix-Fralish et al. 2005; Borzan and Fuchs 2006). Determinar a contribuição dos mecanismos organizacionais no efeito antinociceptivo dos hormônios sexuais contribuirá para o entendimento de que os organismos feminino e masculino respondem de forma diferente aos estímulos nociceptivos não só porque têm uma fisiologia hormonal distinta, mas também porque são estruturalmente distintos.

DESENVOLVIMENTO

-Materiais e métodos

Animais

Para realização dos experimentos estão sendo utilizados ratos e ratas Wistar pesando entre 200 a 300 g. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas e estão de acordo com as diretrizes determinadas pelo Comitê de Ética da Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), em animais conscientes (Zimmermann 1983).

Manipulação do efeito organizacional

Tendo em vista que a testosterona, e não os outros hormônios gonadais, é o hormônio responsável pela diferenciação sexual do sistema nervoso (MacLusky and Naftolin 1981; Arnold and Gorski 1984), a testosterona foi removida do organismo dos machos, através da gonadecomia no primeiro dia pós-natal e foi administrada em fêmeas, através de injeção subcutânea no primeiro e segundo dia pós-natal.

Orquidectomia no primeiro dia pós-natal – No primeiro dia após o nascimento todos os machos foram gonadectomizados ou submetidos à cirurgia "sham". A anestesia foi induzida e mantida através da inalação de uma mistura gasosa de oxigênio e halotano (2%). Uma pequena incisão foi feita no abdômen e os testículos foram apenas expostos (grupos sham) ou expostos e removidos sem ligadura (Cicero et al. 2002; Cataldo et al. 2005; Borzan and Fuchs 2006). Um ou dois

pontos, com fio Vicryl 6-0, foram necessários para suturar a incisão abdominal (Cicero et al. 2002).

Administração pós-natal de testosterona em fêmeas - No primeiro e segundo dia pós-natal todas as fêmeas receberam injeções de subcutâneas de testosterona (0,5 mg) ou propilenoglicol (veículo).

Ovariectomia

Durante a fase adulta (45 dias) todas as fêmeas foram ovariectomizadas ou submetidas a cirurgia "sham", sob anestesia induzida pela administração intramuscular de xilazina (0,1mg/kg) e ketamina (100mg/kg). A região correspondente ao ovário a ser removido foi depilada e após anti-sepsia local, a pele e a camada muscular foram incisionadas, o ovário foi somente exposto (grupos sham) ou exposto e removido cirurgicamente, após ligadura com fio de sutura. Os tecidos foram reposicionados e suturados em planos. Procedimento similar foi realizado no lado oposto, na mesma sessão cirúrgica (Waynforth and Flecknell 1992).

Determinação das fases do ciclo estral e avaliação hormonal

As fêmeas que receberam injeção de propilenoglicol (veículo da testosterona) no primeiro e segundo dia pós-natal e que foram submetidas à cirurgia sham tiveram as fases do ciclo estral determinadas através de esfregaços vaginais diários por no mínimo oito dias consecutivos. O material coletado foi observado a fresco através de um microscópio óptico (aumento 10x). A fase com predomínio (> 70%) de células epiteliais é caracterizada como proestro e a fase com maior proporção de leucócitos como diestro (Adler 1981; Cairns et al. 2002; Marcondes et al. 2002). As fases

proestro e diestro foram escolhidas por representarem as fases de maior e menor nível hormonal, respectivamente (Butcher et al. 1974). As fêmeas foram submetidas ao experimento imediatamente após a caracterização da fase do ciclo estral, aproximadamente aos 90 dias de idade.

A administração de testosterona nos primeiros dias pós-natal em fêmeas altera seu ciclo hormonal durante a vida adulta levando a chamada síndrome anovulatória (Cataldo et al. 2005; LaCroix-Fralish et al. 2005). No entanto, ratas "sham" ovariectomizadas que receberam a injeção de testosterona nos primeiros dias pós-natal foram submetidas a esfregaços vaginais diários para a determinação das características celulares do epitélio vaginal. Essas fêmeas apresentaram ciclos irregulares, marcados por inúmeros dias em metaestro. Apesar de algumas fêmeas entrarem esporadicamente em estro e proestro, a divisão dos animais em fases não pôde ser realizada, pois o ciclo se apresentava totalmente irregular.

Injeções na ATM

Para realização das injeções na ATM, o animal foi brevemente anestesiado através da inalação de halotano e uma agulha calibre 30, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50µl) por um tubo de polietileno P50 foi inserida na porção inferior da borda póstero-inferior do arco zigomático e avançada em direção anterior até contactar a região póstero-lateral do côndilo (Roveroni et al. 2001). O volume total de cada injeção foi de 30 µl. Após o término da análise comportamental o sítio de injeção foi confirmado visualmente. Para isso, sob efeito anestésico, o corante azul de Evans (1%; 5mg/Kg) foi injetado, intracardiacamente. Após dez minutos, o animal foi submetido à perfusão cardíaca com soro fisiológico. Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas, o local da injeção pôde ser identificado

visualmente, de acordo com a localização do corante extravasado (Haas et al. 1992).

Teste comportamental

Para a realização das análises comportamentais uma caixa de observação medindo 30x30x30 cm com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro foi utilizada. As respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região orofacial com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 minutos, divididos em 9 blocos de 5 min. Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1 s de duração, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada somando-se esse comportamento ao tempo em segundos que o animal dispende coçando a região injetada, como previamente padronizado (Roveroni et al. 2001).

Administração hormonal

A administração hormonal foi realizada por meio de injeções subcutâneas diárias, de estrógeno (50ug/kg, (Gordon and Soliman 1994), progesterona (8mg/kg, (Hau et al. 2004) ou testosterona (1mg, (Campos et al. 2003) durante sete dias. No sétimo dia de tratamento os animais foram submetidos ao experimento. Os grupos controles receberam injeção de veículo.

Delineamento experimental

1- Machos:

a- Para determinar se mecanismos organizacionais afetam a resposta nociceptiva de machos na fase adulta, formalina 1,5% foi administrada na ATM de

machos (75 dias de idade) intactos, sham e gonadectomizados no primeiro dia pós natal.

b- Para determinar se mecanismos organizacionais afetam o efeito antinociceptivo da testosterona em machos na fase adulta (75 dias de idade), formalina 1,5% foi administrada na ATM de machos gonadectomizados no primeiro dia pós-natal e que receberam injeção de testosterona ou de veículo por sete dias antes do experimento.

c- Para determinar se mecanismos organizacionais afetam a sexo-especificidade do efeito antinociceptivo do estrógeno e da progesterona, formalina 1,5% foi administrada na ATM de machos (75 dias de idade) gonadectomizados no primeiro dia pós-natal e que receberam injeção de estrógeno, progesterona ou de veículo por sete dias antes do experimento.

Grupos de machos intactos, sham gonadectomizados, ou gonadectomizados na fase adulta (45 dias de idade) recebendo ou não injeção de hormônios ou veículo foram utilizados para comparação e avaliação do efeito organizacional da testosterona.

2- Fêmeas:

a- Para determinar se mecanismos organizacionais afetam a resposta nociceptiva de fêmeas na fase adulta (90 dias de idade), formalina 1,5% foi administrada na ATM de fêmeas que receberam injeção de testosterona ou de veículo no primeiro e segundo dias pós-natal. As fêmeas que receberam injeção de veículo foram submetidas ao experimento durante as fases diestro e proestro do ciclo estral, o mesmo não foi possível para as fêmeas que receberam injeção de testosterona, pois esse procedimento induz ciclos anovulatórios.

b- Para determinar se mecanismos organizacionais afetam o efeito antinociceptivo do estrógeno e da progesterona em fêmeas na fase adulta (90 dias de idade), formalina 1,5% foi administrada na ATM de fêmeas que receberam injeção de testosterona ou de veículo no primeiro e segundo dias pós-natal, e que após gonadectomia (45 dias de idade) receberam injeção de estrógeno, de progesterona ou de veículo por sete dias antes do experimento.

c- Para determinar se mecanismos organizacionais afetam a sexo-especificidade do efeito antinociceptivo da testosterona nos machos, formalina 1,5% foi administrada na ATM de fêmeas (90 dias de idade) que receberam injeção de testosterona ou de veículo no primeiro e segundo dias pós-natal, e que após gonadectomia (45 dias de idade) receberam injeção de testosterona ou de veículo por sete dias antes do experimento.

Grupos de fêmeas que não passaram por nenhuma intervenção no primeiro e segundo dias pós-natal serão utilizados para descartar um possível efeito da administração de veículo.

Análise estatística

A soma dos comportamentos nociceptivos registrados durante os 45 min de observação, ou seja, o ato de levantar reflexamente a cabeça e de coçar a região orofacial foi utilizada nas análises estatísticas. A comparação entre os diferentes grupos de animais que receberam testosterona ou veículo no primeiro e segundo dia pós-natal foi realizada através do teste t (Figura 4, comparação entre pares). ANOVA e o teste post-hoc de Tukey foram utilizados para comparar o efeito da administração pós-natal de testosterona ou de veículo em fêmeas sham ovariectomizadas (Figura 3) e o efeito da administração de veículo ou dos hormônios

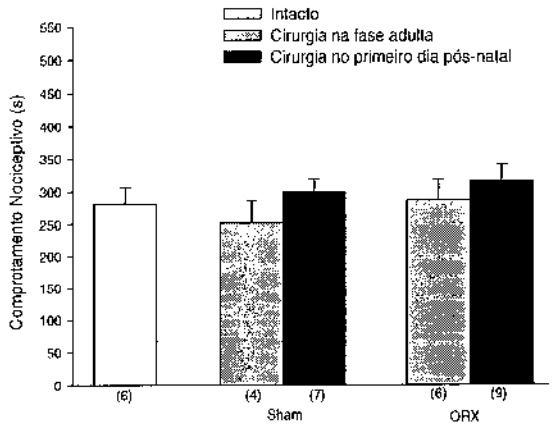
nas fêmeas OVX que receberam testosterona pós-natal. Os resultados estão apresentados pela média ± EPM e o nível de significância de $p < 0,05$ foi utilizado.

UNICAMP / FOP
BIBLIOTECA

RESULTADOS

A resposta comportamental nociceptiva induzida pela injeção de formalina (1,5%) na ATM de machos orquiectomizados ou sham operados no primeiro dia pós-natal foi semelhante à de machos orquiectomizados ou sham operados na fase adulta (Figura 1, teste t, $p > 0,05$). A resposta comportamental nociceptiva induzida pela injeção de formalina na ATM de machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal foi semelhante à de machos intactos e sham operados (Figura 1, teste de Tukey, $p > 0,05$).

Figura 1 - Efeito da gonadectomia no primeiro dia pós-natal ou na fase adulta na resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina 1,5% na ATM de machos.



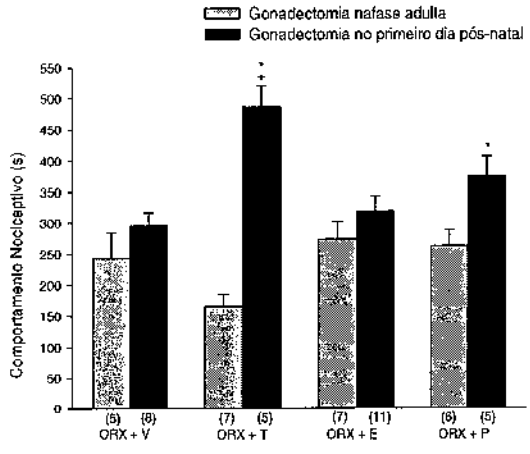
ORX = Orquiectomizado

A gonadectomia no primeiro dia pós-natal não afetou a resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina na ATM de machos. Machos sham ou orquiectomizados no primeiro dia pós-natal apresentaram resposta nociceptiva semelhante à de machos sham ou orquiectomizados na fase adulta (teste t $p > 0,05$). Machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal apresentaram resposta nociceptiva semelhante à de machos intactos e sham orquiectomizados no primeiro dia pós-natal (teste de Tukey $p > 0,05$). Números entre parêntesis se referem ao numero de animais em cada grupo experimental.

A administração de testosterona ou de progesterona, mas não de veículo ou de estrógeno em machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal aumentou significativamente a resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina na ATM

quando comparada à administração dos mesmos hormônios ou de veículo em animais orquiectomizados na fase adulta (Figura 2, teste t, $p < 0,05$). A administração de testosterona, mas não de progesterona aumentou significativamente a resposta nociceptiva quando comparada à administração de veículo e estrógeno em machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal (Figura 2, teste de Tukey, $p < 0,05$).

Figura 2 - Efeito da administração de testosterona, estrógeno e progesterona na resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina 1,5% na ATM de machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal ou na fase adulta.

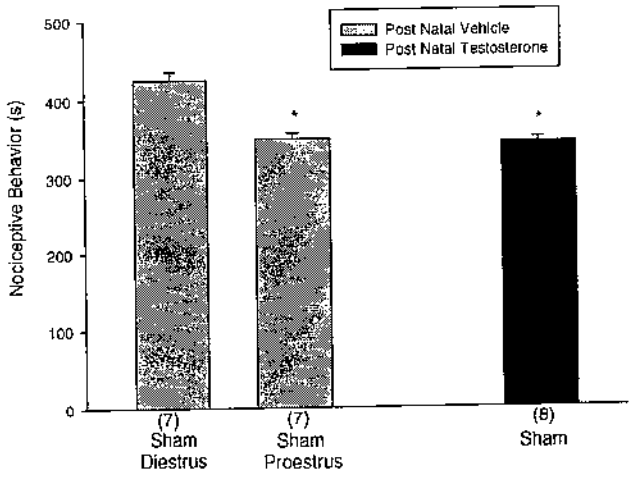


ORX + V = Orquiectomizado tratado com veículo; ORX + T = Orquiectomizado tratado com Testosterona; ORX + E = Orquiectomizado tratado com estrógeno; ORX + P = Orquiectomizado tratado com progesterona

A administração de testosterona e progesterona aumentou a resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina na ATM de machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal quando comparados a machos orquiectomizados na fase adulta, como indicado pelo símbolo "*" (teste t, $p < 0,05$). A resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina na ATM de machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal foi significativamente maior naqueles que receberam administração de testosterona do que naqueles que receberam administração de veículo e estrógeno, como indicado pelo símbolo "+" (teste de Tukey, $p < 0,05$).

A resposta comportamental nociceptiva induzida pela injeção de formalina (1,5%) na ATM de fêmeas sham ovariectomizadas que receberam testosterona pós-natal foi semelhante a de fêmeas em proestro e significativamente menor que aquela de fêmeas em diestro que receberam propilenoglicol (veículo) pós-natal (Figura 3, teste de Tukey, $p < 0,05$). As ratas "sham" ovariectomizadas que receberam injeção de testosterona nos primeiros dias pós-natal apresentaram ciclos irregulares, marcados por inúmeros dias em metaestro, motivo pelo qual foram agrupadas em um único grupo.

Figura 3 - Efeito da administração pós-natal de testosterona na resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina 1,5% na ATM de fêmeas.

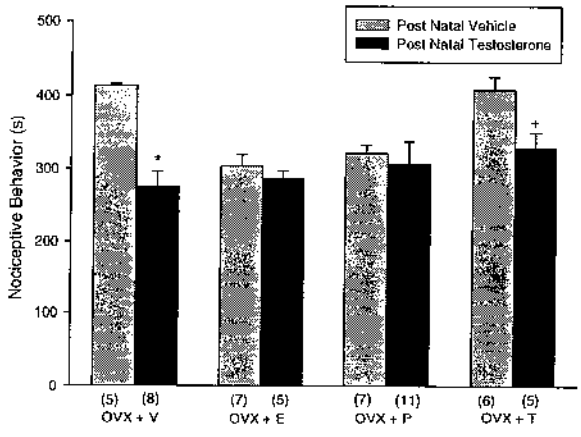


Fêmeas que receberam administração pós-natal de testosterona apresentaram resposta comportamental nociceptiva semelhante a de fêmeas em proestro e significativamente menor que aquela de fêmeas em diestro, conforme indicado pelo símbolo "*" (teste de Tukey, $p < 0,05$).

A resposta comportamental nociceptiva induzida pela injeção de formalina (1,5%) na ATM de fêmeas OVX que receberam administração pós-natal de testosterona foi significativamente menor que aquela de fêmeas OVX que receberam administração pós-natal de veículo (Figura 4, teste t, $p < 0,05$). A resposta

comportamental nociceptiva foi semelhante em todas as fêmeas OVX que receberam administração pós-natal de testosterona, ou seja, a administração dos hormônios estrógeno, progesterona e testosterona na fase adulta não afetou a resposta nociceptiva nessas fêmeas (One Way ANOVA, $p > 0,05$). Quando comparadas às fêmeas OVX que receberam veículo pós-natal e testosterona na fase adulta, as fêmeas que receberam testosterona pós-natal e na fase adulta exibiram comportamento nociceptivo significativamente menor (teste t, $p < 0,05$).

Figura 4 - Efeito da administração de estrógeno, progesterona e testosterona na resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina 1,5% na ATM de fêmeas ovariectomizadas que receberam testosterona pós-natal.



Abreviações: OVX + V = Ovariectomizada com administração de veículo; OVX + T = Ovariectomizada com administração de Testosterona; OVX + E = Ovariectomizada com administração de estrógeno; OVX + P = Ovariectomizada com administração de progesterona

O comportamento nociceptivo induzido pela injeção de formalina na ATM foi semelhante em todos os grupos que receberam administração pós-natal de testosterona (barras pretas, Anova, $p > 0,05$). A comparação entre os pares demonstra que fêmeas OVX que receberam administração pós-natal de testosterona exibem comportamento nociceptivo menor que aquelas que receberam administração pós-natal de veículo (diferença indicada pelo símbolo "*", duas primeiras barras, teste t, $p < 0,05$). Fêmeas OVX que receberam administração pós-natal e na fase adulta de testosterona exibem comportamento nociceptivo menor que aquelas que receberam administração pós-natal de veículo e de testosterona na fase adulta

(diferença indicada pelo símbolo "+", duas últimas barras, teste t, $p < 0,05$).

O comportamento nociceptivo foi semelhante em fêmeas naive e sham ovariectomizadas em diestro (432.5 $\pm$ 24.5 e 424.1 $\pm$ 11.3, respectivamente) e em proestro (256.0 $\pm$ 29.9 e 348.8 $\pm$ 8.0, respectivamente) que receberam injeção de veículo no primeiro e segundo dias pós-natal. O comportamento nociceptivo também foi semelhante em fêmeas OVX que receberam injeção de veículo no primeiro e segundo dias pós-natal e que receberam ou não administração de veículo na fase adulta (416.6 $\pm$ 20.3 e 421.8 $\pm$ 15.8, respectivamente).

CONCLUSÃO

Nossos resultados parciais, obtidos com os grupos de machos, demonstram que (a) a nocicepção induzida pela administração de formalina na ATM não foi afetada pela gonadectomia no primeiro dia pós-natal, (b) a testosterona perdeu seu efeito antinociceptivo observado quando administrada em machos orquiectomizados na fase adulta e passou a ter um efeito pró-nociceptivo quando administrada em machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal, (c) a progesterona, mas não o estrógeno perdeu seu efeito sexo-específico, ou seja, ao contrário do que acontece em machos orquiectomizados na fase adulta, nos quais ambos os hormônios não afetam a nocicepção, em machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal a progesterona passa a ter um efeito pró-nociceptivo, assim como a testosterona.

O fato de a gonadectomia, tanto no primeiro dia pós-natal quanto na fase adulta (Fischer et al. 2007), não afetar a nocicepção sugere que tanto os efeitos organizacionais quanto os efeitos ativacionais da testosterona endógena não afetam a nocicepção da ATM em machos. Considerando que machos orquiectomizados na fase adulta apresentam resposta nociceptiva induzida pela administração de formalina na ATM semelhante a de fêmeas em proestro (fase do ciclo estral com altos níveis hormonais) e menor que a de fêmeas em diestro (fase do ciclo estral com baixos níveis hormonais) (Clemente et al. 2004) e que machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal têm seu sistema nervoso, a partir de então, organizado como o de uma fêmea (Cicero et al. 2002; Cataldo et al. 2005; Borzan and Fuchs 2006), poderíamos esperar que esses machos apresentassem resposta nociceptiva semelhante a de fêmeas em diestro. O fato de essa idéia não se confirmar poderia ser explicado por uma de duas possibilidades: Primeiro, a gonadectomia no primeiro dia pós-natal pode não ter sido efetiva em suprimir todos

os efeitos organizacionais da testosterona. Embora esse seja um procedimento amplamente utilizado para o estudo dos mecanismos organizacionais da testosterona (Cicero et al. 2002; Cataldo et al. 2005; Borzan and Fuchs 2006), a secreção desse hormônio começa a aumentar no fim da vida intra-uterina do embrião e seus efeitos organizacionais começam a ser induzidos já nesse período (Weisz and Ward 1980). Além disso, mesmo que esses machos tenham seu sistema nervoso estruturado como o de uma fêmea, eles não sofrem a influência da mais marcante característica da fisiologia reprodutiva feminina, as flutuações hormonais. Sabe-se que a dor da ATM, em mulheres, é exacerbada durante os períodos de rápidas flutuações dos níveis de hormônios ovarianos (LeResche et al. 2003) e essas flutuações hormonais poderiam contribuir para a maior sensibilidade dolorosa observada em fêmeas em diestro quando comparadas aos machos.

Um achado intrigante nesse estudo foi de que o efeito ativacional da testosterona, quando administrada em machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal foi oposto ao seu efeito observado quando ela é administrada em machos orquiectomizados na fase adulta, ou seja, quando o efeito organizacional da testosterona é suprimido pela gonadectomia no primeiro dia pós-natal, a administração de testosterona no animal adulto tem um efeito pró-nociceptivo que contrasta com o efeito antinociceptivo induzido pela sua administração em animais que foram orquiectomizados na fase adulta (Fischer et al. 2007), quando o sistema nervoso já está totalmente formado. Esse resultado sugere não só que o efeito antinociceptivo ativacional da testosterona depende de sua ação organizacional nos primeiros dias de vida pós-natal, mas também que a testosterona pode exercer um efeito ativacional pró-nociceptivo em uma situação em que seu efeito organizacional foi suprimido através da gonadectomia no primeiro dia pós-natal. Durante os

primeiros dias de vida pós-natal a ausência ou presença de testosterona induz mudanças estruturais permanentes no sistema nervoso (MacLusky and Naftolin 1981; Arnold and Gorski 1984), na ausência de níveis fisiológicos de testosterona, como é o caso dos animais orquiectomizados tanto na fase adulta como no primeiro dia pós-natal, essas mudanças estruturais parecem não afetar diretamente a nocicepção da ATM, como demonstrado pelo comportamento nociceptivo semelhante observado nesses animais. No entanto, a administração de testosterona exerce efeito anti ou pró-nociceptivo dependendo da estruturação do sistema nervoso. É difícil explicar os possíveis mecanismos envolvidos nesse efeito oposto da testosterona sobre a nocicepção da ATM, pois várias alterações estruturais, como por exemplo, na expressão dos receptores hormonais (McAbee and DonCarlos 1999), no número e tamanho das células neuronais (Breedlove and Arnold 1981), na formação de sinapses e estruturação de circuitos neuronais (McEwen 1999) e na distribuição de neuropeptídeos (Rugarn et al. 1999) e neurotransmissores (Davis et al. 1999) poderiam contribuir.

À semelhança do que aconteceu com a administração de testosterona, a administração de progesterona também aumentou a resposta nociceptiva em machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal quando comparados aos machos orquiectomizados na fase adulta. Isso poderia ser explicado pelo fato de que parte da progesterona é convertida em testosterona (Welsh et al. 1982; Zimniski et al. 1991) o que poderia resultar em um efeito indireto da progesterona sobre os receptores androgênicos. Por outro lado, a administração de estrógeno em machos orquiectomizados no primeiro dia pós-natal não afetou a nocicepção. Esse resultado dá um suporte adicional a idéia de que o efeito pró-nociceptivo da testosterona é mediado pela ativação de receptores androgênicos, pois grande parte da

testosterona é convertida em estrógeno pela ação da enzima aromataSe (Lombardi et al. 2001) e consequentemente, parte do efeito pró-nociceptivo da testosterona poderia ser mediado pela ação do estrógeno proveniente de sua aromatização, fato que não se confirma diante da falta de efeito do estrógeno.

Diante dos resultados expostos conclui-se que a supressão dos efeitos organizacionais da testosterona no início da vida pós-natal de machos não afeta o comportamento nociceptivo induzido pela injeção de formalina na ATM. No entanto, o efeito antinociceptivo ativacional da testosterona, demonstrado pela administração desse hormônio em machos orquiectomizados na fase adulta, parece depender de mecanismos organizacionais, pois quando esses mecanismos são suprimidos pela gonadectomia no primeiro dia pós-natal, o efeito antinociceptivo ativacional da testosterona não é observado. Ao contrário, observa-se um efeito pró-nociceptivo. A administração de progesterona, mas não de estrógeno também induziu efeito pró-nociceptivo. Como parte da progesterona é convertida em testosterona e parte da testosterona é convertida em estrógeno, esse resultado sugere que o efeito pró-nociceptivo observado é dependente da ativação de receptores androgênicos e independente da ativação receptores estrogênicos.

Os resultados apresentados confirmam nossa hipótese de que a manipulação do efeito organizacional, através da injeção de testosterona no primeiro e segundo dia pós-natal em fêmeas afeta a nocicepção induzida pela administração de formalina na ATM e o efeito antinociceptivo do estrógeno e da progesterona. No entanto, os resultados não nos permitem concluir que essa manipulação do efeito organizacional afeta a sexo-especificidade do efeito da testosterona.

As fêmeas que receberam testosterona pós-natal não apresentam ciclo estral característico ou regular, o que impossibilita a separação desses animais em grupos

nas fases diestro e proestro, impossibilitando também a comparação direta entre os grupos de fêmeas sham ovariectomizadas que receberam veículo ou testosterona pós-natal. No entanto, duas observações importantes suportam a idéia de que a manipulação do efeito organizacional, através da masculinização dessas fêmeas diminui a nocicepção da ATM. Primeiro, se a masculinização altera o ciclo estral e portanto essas fêmeas não passam normalmente pela fase diestro, que é a fase em que a resposta nociceptiva está exacerbada (Fischer et al. 2008), pode-se concluir que a masculinização tende a diminuir a nocicepção ao impedir que essas fêmeas sofram a exacerbação da resposta nociceptiva característica da fase diestro do ciclo estral. Evidentemente, esse efeito pode ser conseqüência de uma ação sobre o sistema reprodutor e não sobre as alterações organizacionais no sistema nervoso durante a diferenciação sexual. Segundo, quando as fêmeas nas fases diestro e proestro são reunidas em um único grupo, a resposta nociceptiva desse grupo é maior que aquela do grupo de fêmeas que recebeu testosterona pós-natal (teste t, $p < 0,05$, dados não mostrados). Além disso, a resposta nociceptiva das fêmeas que receberam testosterona pós-natal é semelhante à de machos (teste t, $p > 0,05$, dados não mostrados). Portanto, esses dados sugerem que fêmeas que tiveram o sistema nervos organizado como o de um macho no período pós-natal, passam a responder aos estímulos nociceptivos de forma semelhante a machos, não só pela semelhança na magnitude da resposta nociceptiva, mas também pela ausência de variação da resposta nociceptiva em decorrência das flutuações hormonais características do sexo feminino.

Recentemente demonstramos que a administração de estrógeno ou progesterona em fêmeas OVX reduz a nocicepção da ATM e que fêmeas OVX apresentam resposta nociceptiva semelhante a de fêmeas em diestro (baixos níveis

UNICAMP / FOP
BIBLIOTECA

hormonais) e significativamente maior que a de fêmeas em proestro (altos níveis hormonais) (Fischer et al. 2008). Os resultados do presente trabalho demonstram que fêmeas ovariectomizadas que receberam testosterona pós-natal apresentam resposta nociceptiva significativamente menor que aquelas que receberam apenas veículo pós-natal, ou seja, após o tratamento pós-natal com testosterona, as fêmeas OVX passam a exibir comportamento nociceptivo semelhante ao das fêmeas em proestro (teste t, $p > 0.05$, dados não mostrados). Juntos, os resultados obtidos com as fêmeas sham ovariectomizadas (Figura 3) e OVX (Figura 4) suportam a hipótese de que o efeito organizacional dos hormônios sexuais durante a diferenciação sexual pós-natal do sistema nervoso induz alterações permanentes que podem contribuir para a maior sensibilidade do sexo feminino a dor.

A administração de estrógeno ou progesterona, durante a fase adulta, em fêmeas OVX que receberam testosterona pós-natal não afeta a nocicepção da ATM, ou seja, animais que receberam os hormônios apresentam nocicepção semelhante aos animais que receberam veículo (Figura 4). Se considerarmos que, em animais não submetidos a nenhum procedimento pós-natal, o estrógeno e a progesterona reduzem a nocicepção da ATM apenas em fêmeas OVX (Fischer et al. 2008), mas não machos gonadectomizados (Fischer et al. 2007), podemos concluir mais uma vez que as fêmeas masculinizadas pela testosterona pós-natal passam a responder de forma semelhante a machos, ou seja, não se observa efeito antinociceptivo dos hormônios femininos nessas fêmeas. Portanto, esse resultado confirma nossa hipótese de que o efeito antinociceptivo ativacional dos hormônios femininos depende de suas ações organizacionais durante a diferenciação sexual do sistema nervoso. Embora a comparação entre fêmeas que receberam testosterona na fase adulta e veículo ou testosterona pós-natal revele que as últimas apresentam

resposta nociceptiva significativamente menor (teste t, $p< 0,05$, Figura 4), é importante salientar que não há diferença na resposta nociceptiva entre fêmeas que receberam testosterona pós-natal e veículo ou testosterona na fase adulta (Anova, $p> 0,05$, Figura 4). Portanto, esse dado não nos permite concluir que a manipulação do efeito organizacional dos hormônios sexuais através da masculinização de fêmeas afete a sexo-especificidade do efeito antinociceptivo da testosterona.

Em resumo os resultados desse estudo sugerem que o efeito organizacional dos hormônios sexuais durante a diferenciação sexual pós-natal contribui para a marcante diferença na sensibilidade dolorosa entre os sexos. Essa idéia é suportada pelos dados que demonstram que fêmeas masculinizadas através da administração pós-natal de testosterona passam a responder de forma semelhante a machos não só quanto a magnitude da resposta nociceptiva, mas também com relação ao efeito antinociceptivo ativacional dos hormônios femininos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abubaker AO, Raslan WF, Sotereanos GC. Estrogen and progesterone receptors in temporomandibular joint discs of symptomatic and asymptomatic persons: a preliminary study. J Oral Maxillofac Surg 1993;51(10):1096-1100.Adler N. Neuroendocrinology of reprodution. New York: Plenum Press, 1981.

Aloisi AM. Gonadal hormones and sex differences in pain reactivity. Clin J Pain 2003;19(3):168-174.

Amandusson A, Hermanson O, Blomqvist A. Estrogen receptor-like immunoreactivity in the medullary and spinal dorsal horn of the female rat. Neurosci Lett 1995;196(1-2):25-28.

Arnold AP, Gorski RA. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. Annu Rev Neurosci 1984;7:413-442.

Borzan J, Fuchs PN. Organizational and activational effects of testosterone on carrageenan-induced inflammatory pain and morphine analgesia. Neuroscience 2006;143(3):885-893.

Breedlove SM, Arnold AP. Sexually dimorphic motor nucleus in the rat lumbar spinal cord: response to adult hormone manipulation, absence in androgen-insensitive rats. Brain Res 1981;225(2):297-307.

Butcher RL, Collins WE, Fugo NW. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. Endocrinology 1974;94(6):1704-1708.

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):338-344.

Campbell JH, Courey MS, Bourne P, Odziemiec C. Estrogen receptor analysis of human temporomandibular disc. J Oral Maxillofac Surg 1993;51(10):1101-1105.

Campos M, Morais Pde L, Pupo AS. Effects of castration and of testosterone replacement on alpha(1)-adrenoceptor subtypes in the rat vas deferens. Eur J Pharmacol 2003;471(2):149-155.

Cataldo G, Bernal S, Markowitz A, Ogawa S, Ragnauth A, Pfaff DW, Bodnar RJ. Organizational manipulation of gonadal hormones and systemic morphine analgesia in female rats: effects of adult ovariectomy and estradiol replacement. Brain Res 2005;1059(1):13-19.

Cicero TJ, Nock B, O'Connor L, Meyer ER. Role of steroids in sex differences in morphine-induced analgesia: activational and organizational effects. J Pharmacol Exp Ther 2002;300(2):695-701.

Clemente JT, Parada CA, Veiga MC, Gear RW, Tambeli CH. Sexual dimorphism in the antinociception mediated by kappa opioid receptors in the rat temporomandibular joint. Neurosci Lett 2004;372(3):250-255.

Davis AM, Ward SC, Selmanoff M, Herbison AE, McCarthy MM. Developmental sex differences in amino acid neurotransmitter levels in hypothalamic and limbic areas of rat brain. Neuroscience 1999;90(4):1471-1482.

Dworkin SF, LeResche L, DeRouen T, Von Korff M. Assessing clinical signs of temporomandibular disorders: reliability of clinical examiners. J Prosthet Dent 1990;63(5):574-579.

Fang ZQ, Ma XC. [Study on differential estrogen receptor beta expression of mandibular condylar chondrocyte in temporomandibular joint osteoarthritis]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2006;24(5):469-472.

Fischer L, Clemente JT, Tambeli CH. The protective role of testosterone in the development of temporomandibular joint pain. J Pain 2007;8(5):437-442.

Fischer L, Torres-Chavez KE, Clemente-Napimoga JT, Jorge D, Arsati F, de Arruda Veiga MC, Tambeli CH. The influence of sex and ovarian hormones on temporomandibular joint nociception in rats. J Pain 2008;9(7):630-638.

Forest MG. Role of androgens in fetal and pubertal development. Horm Res 1983;18(1-3):69-83.

Gordon FT, Soliman MR. Diurnal variation in the acute effects of estradiol and progesterone on beta-endorphin and Met-enkephalin levels in specific brain regions of ovariectomized rats. Pharmacology 1994;49(3):192-198.

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):417-422.

Hau M, Dominguez OA, Evrard HC. Testosterone reduces responsiveness to nociceptive stimuli in a wild bird. Horm Behav 2004;46(2):165-170.

Kastrup Y, Hallbeck M, Amandusson A, Hirata S, Hermanson O, Blomqvist A. Progesterone receptor expression in the brainstem of the female rat. Neurosci Lett 1999;275(2):85-88.

Kawata M. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. Neurosci Res 1995;24(1):1-46.

LaCroix-Fralish ML, Tawfik VL, DeLeo JA. The organizational and activational effects of sex hormones on tactile and thermal hypersensitivity following lumbar nerve root injury in male and female rats. Pain 2005;114(1-2):71-80.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. Pharmacol Rev 2001;53(4):597-652.

LeResche L. Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. Crit Rev Oral Biol Med 1997;8(3):291-305.

LeResche L, Mancl L, Sherman JJ, Gandara B, Dworkin SF. Changes in temporomandibular pain and other symptoms across the menstrual cycle. Pain 2003;106(3):253-261.

Lombardi G, Zarrilli S, Colao A, Paesano L, Di Somma C, Rossi F, De Rosa M. Estrogens and health in males. Mol Cell Endocrinol 2001;178(1-2):51-55.

Lund TD, Lephart ED (Manipulation of prenatal hormones and dietary phytoestrogens during adulthood alter the sexually dimorphic expression of visual spatial memory. BMC neuroscience 2:21.2001).

MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. Science 1981;211(4488):1294-1302.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Braz J Biol 2002;62(4A):609-614.

McAbee MD, DonCarlos LL. Regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid expression in the developing rat forebrain. Endocrinology 1999;140(4):1807-1814.

McCormick CM, Mahoney E (Persistent effects of prenatal, neonatal, or adult treatment with flutamide on the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response of adult male rats. Horm Behav 35:90-101.1999).

McEwen BS. Permanence of brain sex differences and structural plasticity of the adult brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1999;96(13):7128-7130.

Oettel M, Mukhopadhyay AK. Progesterone: the forgotten hormone in men? Aging Male 2004;7(3):236-257.

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):185-191.

Rugarn O, Hammar M, Theodorsson A, Theodorsson E, Stenfors C. Sex differences in neuropeptide distribution in the rat brain. Peptides 1999;20(1):81-86.

Waynforth H, Flecknell P. Experimental and surgical technique in the rat

Weisz J, Ward IL. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. Endocrinology 1980;106(1):306-316.

Welsh TH, Jr., Bambino TH, Hsueh AJ. Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis in vitro. Biology of reproduction 1982;27(5):1138-1146.

Yamada K, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Kohno S, Amizuka N, Iwanaga T, Maeda T. Expression of estrogen receptor alpha (ER alpha) in the rat temporomandibular joint. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2003;274(2):934-941.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 1983;16(2):109-110.

Zimniski SJ, Brandt ME, Melner MH, Brodie AM, Puett D. Effect of 4-hydroxyandrostenedione on murine Leydig tumor cell steroidogenesis. Cancer research 1991;51(14):3663-3668.

UNICAMP / FOP
BIBLIOTECA