LUCIANA DE BRITTO PEDROSO

AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL DIFERENÇA NA SENSIBILIDADE DOLOROSA DE RATOS MACHOS E FÊMEAS E DA RESPOSTA DE CADA SEXO A CROTALFINA, UM ANALGÉSICO TIPO OPIÓIDE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

LUCIANA DE BRITTO PEDROSO

AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL DIFERENÇA NA SENSIBILIDADE DOLOROSA DE RATOS MACHOS E FÊMEAS E DA RESPOSTA DE CADA SEXO A CROTALFINA, UM ANALGÉSICO TIPO OPIÓIDE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profª Drª. Yara Cury

Versão Original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Pedroso, Luciana de Britto.
Avaliação da possível diferença na sensibilidade dolorosa de ratos machos e fêmeas e da resposta de cada sexo a Crotalfina, um analgésico tipo opióide / Luciana de Britto Pedroso. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Yara Cury.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Dor e venenos de animais.

Versão do título para o inglês: Sex differences in pain sensitivity and in analgesic actions of crotalphine, an opioid analgesic.

Descritores: 1. Crotalfina 2. Hormônios gonadais 3. Antinocicepção 4. Receptores opióides 5. Diferenças sexuais 6. Nocicepção I. Cury, Yara II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB084/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciana de Britto Pedroso.

Título da Tese: Avaliação da possível diferença na sensibilidade dolorosa de ratos machos e fêmeas e da resposta de cada sexo a Crotalfina, um analgésico tipo opióide.

Orientador(a): Yara Cury.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **006** nas fls. **46** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Yara Cury** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***Avaliação da possível diferença na sensibilidade dolorosa de ratos machos e fêmeas e da resposta de cada sexo ao CNF 021.03, um analgésico tipo opióide***" do qual participou(aram) o(s) alunos ***Luciana de Britto Pedroso e a pesquisadora Gisele Picolo,*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **19.06.2007.**

São Paulo, 20 de junho de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.30 .10
WTL/mcgn

São Paulo, 17 de junho de 2010.

REF.: Protocolo nº006/07.

"Avaliação da possível diferença na sensibilidade dolorosa de ratos machos e fêmeas e da resposta de cada sexo ao CNF 021.03, um analgésico tipo opióide"

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 06.07.2013.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de Ética
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilma.Sra.
Profa Dra. YARA CURY
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Às pessoas mais especiais da minha vida, minha família e Fernando, pelo incentivo e apoio.
À Buma, companheira que me faz sorrir todos os dias.
Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Yara Cury, por sua paciência, sabedoria, conduta ética, respeito. Por compartilhar conosco a sua paixão pela ciência e nos ensinar a fazer ciência. Nossa mestra, mãe científica, muito obrigada!

Amigos, alguns há tantos anos, outros há tão pouco tempo, mas todos sempre presentes, auxiliando e apoiando em todas as etapas do projeto e também presentes em minha vida: Vanessa Zambelli, Ana, Juliana, Laís, Nathália, Paula, Paola, Vanessa Gutierrez, César, Leandro Márcio, Leandro Grecco, Tânia, Wilson, Claudemir, Sandra, Franciele, Gisele, Elisângela, Julian, Caru, Renata Dias, Patrícia, pela amizade verdadeira, minha segunda família!

Agradeço especialmente às colaboradoras Vanessa Zambelli e a Ana Carolina. Além da amizade, a contribuição científica, a paciência, o entusiasmo, auxiliando na fase mais difícil deste projeto.

Agradeço a Dra. Janete Aparecida, pela contribuição científica na fase incial do projeto.

O Laboratório Especial de Dor e Sinalização, nossa antiga Unidade de Dor, meu lar durante seis anos.

Ao Instituto Butantan, por tornar possível o desenvolvimento da ciência.

A Fapesp, Capes, CNPQ e INCTTOX, pelo auxílio financeiro.

Aos animais. Não só ferramentas deste trabalho, vidas. À estas criaturas, meu profundo respeito e gratidão.

“Hoje, tenho a ventura de ver esta Instituição, árvore frondosa a cuja sombra se abrigam numerosas famílias, produzindo frutos maduros e saborosos. Que ela, sob orientação dos jovens sábios que a dirigem, siga a trilha brilhante de crescente progresso...”

(Discurso de Vital Brazil na homenagem recebida do Governo do Estado de São Paulo, 1948).

RESUMO

PEDROSO, L. B. **Avaliação da possível diferença na sensibilidade dolorosa de ratos machos e fêmeas e da resposta de cada sexo a Crotalfina, um analgésico tipo opióide.** 2011. 141 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Evidências clínicas e experimentais têm sugerido a existência de diferenças na sensação de dor e na resposta a fármacos analgésicos entre machos e fêmeas. A crotalfina (CRF), um peptídeo inicialmente isolado e caracterizado no veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, apresenta efeito antinociceptivo, quando avaliado em diferentes modelos experimentais de dor aguda e crônica. O efeito deste peptídeo é de longa duração e mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo *kappa* e *delta*. Contudo, os estudos com a crotalfina foram sempre realizados utilizando roedores machos. Assim, o presente projeto de pesquisa teve por objetivo avaliar a possível diferença na sensibilidade dolorosa e no efeito antinociceptivo da crotalfina, entre ratos machos e fêmeas. Para a avaliação da nocicepção, foram utilizados o modelo de hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de prostaglandina E_2 (PGE_2) ou o modelo de lesão crônica do nervo isquiático. Animais fêmeas apresentaram menor limiar nociceptivo, avaliado no teste de pressão de patas, e responderam à doses mais baixas de PGE_2, quando comparado aos ratos machos. Não foram detectadas diferenças na resposta causada pela CCI, entre machos e fêmeas. A administração oral de CRF inibiu a hipernocicepção em ambos os modelos. Contudo, em animais fêmeas, as doses efetivas 90% foram menores do que em machos. Adicionalmente, a ação antinociceptiva da crotalfina, no modelo de hipernocicepção induzida por PGE_2, foi mais prolongada em fêmeas (até 6 dias) do que em machos (até 5 dias), evidenciando maior potência deste peptídeo em fêmeas. Em ambos os sexos, o efeito antinociceptivo da CRF, no modelo de hiperalgesia por PGE_2, foi mediado por receptores opióides periféricos do tipo *kappa,* enquanto no modelo de lesão nervosa, esse efeito foi mediado pela ativação de receptores opióides do tipo *kappa e delta.* Ainda, em estudos *in vitro,* fêmeas apresentaram maior expressão de receptores opióides *kappa*, em nervo da pata, em relação à machos, o que pode ter contribuído para a maior potência antinociceptiva da crotalfina, nestes animais. Para verificar a influência de hormônios gonadais nos efeitos observados, animais fêmeas foram castradas (OVX) e submetidas à reposição hormonal. Fêmeas OVX apresentaram

limiares nociceptivos basais mais altos e resposta hipernociceptiva à PGE_2 semelhante a dos machos, efeito que foi revertido pela reposição hormonal. A OVX não interferiu com o efeito antinociceptivo da crotalfina.

Palavras-chave: Crotalfina. Hormônios Gonadais. Antinocicepção. Receptores Opióides. Diferenças Sexuais. Nocicepção.

ABSTRACT

PEDROSO, L. B. **Sex differences in nociception and in the antinociceptive activity of crotalphine, an opioid-like analgesic drug.** 2011. 141 p. Ph. D. thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Experimental and clinical evidences have suggested that there are differences in pain sensation and in the response to antinociceptive drugs between males and females. Crotalphine (CRF) is a peptide first isolated and characterized on the *Crotalus durissus terrificus* snake venom, that displays antinociceptive activity when evaluated in acute and chronic pain models. This peptide induces long lasting antinociceptive effect, mediated by activation of peripheral *kappa* and *delta* opioid receptors. Nevertheless, the studies with crotalphine have always been carried out using male rodents. The aim of the present study was to evaluate the possible differences on pain sensation and on the antinociceptive effect of crotalphine between female and male rodents. In this study, prostaglandin E_2 – induced hypernociception or the chronic constriction injury of rat sciatic nerve was used for pain evaluation. Females displayed lower nociceptive thresholds, evaluated on the paw pressure test and responded to lower doses of PGE_2 when compared to male rodents. On the other hand, there were no differences in the nociceptive response to nerve constriction between male and female rats. The oral administration of CRF inhibited hypernociception in both models of pain. However in female animals the 90% effective dose was smaller than in males. Furthermore, the antinociceptive effect of crotalphine, on the PGE_2 -induced hypernociception was long lasting in females (six days) than in males (5 days). These results show that crotalphine is more effective in females than in males. In both sexes, the antinociceptive effect of CRF is mediated by peripheral *kappa* opioid receptors (PGE_2 - induced hypernociception) or *kappa* and *delta* opioid receptors (CCI model). In *in vitro* assays demonstrated that, the *kappa* opioid receptor expression is higher in the nerve paw obtained from females than the one obtained from males. This phenomenon may contribute to the higher efficacy of crotalphine in females. In order to evaluate the influence of gonadal hormones on the observed effects, female animals were ovariectomized (OVX) and submitted to hormonal replacement. OVX females showed higher nociceptive thresholds and hypernociceptive response to PGE_2, that

was similar to those of males. These alterations were reversed by hormonal replacement. The OVX procedure did not interfere with the antinociceptive effect of crotalphine.

Keywords: Crotalphine. Gonadal hormones. Antinociception. Opioid receptors. Sex differences. Nociception.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	**Nome**
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATM	Articulação têmporo mandibular
CA	Campo aberto
Cox	Ciclooxigenase
CCI	Constrição crônica do nervo isquiático
Cdt	*Crotalus durissus terrificus*
Cg	Carragenina
CRF	Crotalfina
D	Diestro
DMSO	Dimetilsulfóxido
Es	Estrógeno
ER	Receptor de estrógeno
E	Estro
FINT	Fêmeas intactas
FFO	Fêmeas falso operadas
FOVX	Fêmeas ovariectomizadas
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
M	Metaestro
Mor	Morfina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
P	Proestro
PFA	Paraformaldeído
PGE_2	Prostaglandina E_2
PI_3K	Fosfoinositídeo-3-quinase
PK	Proteína quinase
PKA	Proteína quinase A

PKC	Proteína quinase C
Pr	Progesterona
Sal	Salina
SNC	Sistema Nervoso Central
VCdt	Veneno de *Crotalus durissus terrificus*
WTT	Wortmannin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Seqüência de aminoácidos da crotalfina..... 24
Figura 2- Constrição crônica do nervo isquiático..... 46
Figura 3- Teste de pressão de patas..... 47
Figura 4- Filamentos de von Frey..... 48
Figura 5- Fases do ciclo estral (Objetiva 10x)..... 50
Figura 6- Esquema de realização da ovariectomia..... 51
Figura 7- Esquema de memoção do útero..... 52
Figura 8- Determinação do limiar nociceptivo de ratos machos e fêmeas e avaliação da influência das fases do ciclo estral neste limiar.... 58
Figura 9- Detecção do limiar de resposta à estimulação tátil (filamentos de von Frey) de ratos machos e fêmeas e avaliação da influência das fases do ciclo estral nesta resposta..... 60
Figura 10- Caracterização da hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2) em ratos fêmeas e machos..... 62
Figura 11- Efeito da crotalfina sobre a hipernocicepção induzida por PGE_2 em ratos fêmeas (A) e machos (B)..... 64
Figura 12- Avaliação da influência das fases do ciclo estral de fêmeas no efeito antinociceptivo da crotalfina no modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2)..... 66
Figura 13- Determinação da duração do efeito antinociceptivo da crotalfina em ratos fêmeas (A) e machos (B) no modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2..... 68
Figura 14- Efeito da morfina sobre a hipernocicepção induzida por PGE_2 em ratos fêmeas (A) e machos (B)..... 70
Figura 15- Efeito da morfina sobre a atividade motora de ratos fêmeas..... 72
Figura 16- Efeito da crotalfina sobre a atividade motora de ratos fêmeas..... 74
Figura 17- Envolvimento de receptores opióides no efeito antinociceptivo da crotalfina, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2, em fêmeas (A) e machos (B)..... 76

Figura 18- Envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido por crotalfina, na vigência de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 em fêmeas (A) e machos (B)..... 78
Figura 19- Envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido por morfina, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2 em fêmeas (A) e machos (B)..... 80
Figura 20- Envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido pelo U50488, na vigência de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 em machos..... 82
Figura 21- Determinação da hipernocicepção e alodinia em ratos fêmeas (A e B, respectivamente) e machos (C e D, respectivamente) submetidos à constrição do nervo isquiático..... 84
Figura 22- Influência das fases do ciclo estral nos fenômenos de hipernocicepção (A) e alodinia (B) induzida pela ligadura do nervo isquiático..... 85
Figura 23- Efeito da crotalfina sobre a hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos fêmeas (A, B) e machos (C, D)..... 87
Figura 24- Duração do efeito antinociceptivo da crotalfina sobre a hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos fêmeas (A, C) e machos (B, D)..... 89
Figura 25- Determinação do envolvimento de receptores opióides no efeito antinociceptivo da crotalfina, na dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo isquiático (CCI)..... 91
Figura 26- Efeito da ovariectomia sobre o limiar de resposta à estimulação nociceptiva mecânica e no desenvolvimento de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 (A e B)..... 94
Figura 27- Efeito da reposição hormonal no limiar de resposta à estimulação nociceptiva mecânica e no desenvolvimento de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2..... 98
Figura 28- Efeito da ovariectomia e da reposição hormonal na antinocicepção induzida pela crotalfina, na ausência (M1) ou vigência (M2 e M3) de hipernocicepção induzida por PGE_2..... 100

Figura 29- Expressão de receptores opióides do tipo *mu, kappa e delta* em nervo da pata de ratos, em modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2..... 102

SUMÁRIO

1 Introdução **23**

1.1 Crotalfina **24**

1.2 Dor **26**

1.3 Fármacos Opióides **30**

1.4 Diferenças sexuais na sensibilidade dolorosa e na resposta a fármacos opióides **35**

2 Objetivos **42**

2.1 Objetivo Geral **43**

2.2 Objetivo Específicos **43**

3 Materiais e Métodos **44**

3.1 Animais **45**

3.2 Indução da hipernocicepção por prostaglandina E_2 ..... **45**

3.3 Indução de dor neuropática **45**

3.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa **46**

3.4.1 Determinação da hipernocicepção **46**

3.4.2 Determinação da alodinia **47**

3.5 Avaliação da atividade motora dos animais **48**

3.6 Determinação das fases do ciclo estral **49**

3.7 Ovariectomia **50**

3.7.1 Remoção do útero **52**

3.8 Tratamentos Farmacológicos **52**

3.8.1 Crotalfina **52**

3.8.2 Morfina **53**

3.8.3 Antagonistas de receptores opióides **53**

3.8.4 Inibidor da PI_3K..... 53
3.8.5 Hormônios esteroidais..... 54
3.9 Avaliação *in vitro* da expressão de receptores opióides..... 54
3.10 Análise estatística..... 55

4 Resultados..... 56

4.1 Determinação do limiar nociceptivo de ratos machos e fêmeas e avaliação da influência das fases do ciclo estral neste limiar..... 57
4.2 Detecção do limiar de resposta à estimulação tátil (filamentos de von Frey) de ratos machos e fêmeas e avaliação da influência das fases do ciclo estral nesta resposta..... 59
4.3 Caracterização da hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2) em ratos machos e fêmeas..... 61
4.4 Efeito da crotalfina sobre a hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 em ratos machos e fêmeas..... 63
4.5 Determinação da influência do ciclo estral no efeito antinociceptivo da crotalfina, no modelo de hipernocicepção induzida por PGE_2..... 65
4.6 Determinação da duração do efeito antinociceptivo da crotalfina em ratos machos e fêmeas no modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2..... 67
4.7 Efeito da morfina sobre a hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 em ratos machos e fêmeas..... 69
4.8 Efeito da morfina sobre a atividade motora de ratos fêmeas..... 71
4.9 Efeito da crotalfina sobre a atividade motora de ratos fêmeas..... 73
4.10 Determinação do envolvimento de receptores opióides no efeito antinociceptivo da crotalfina, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2..... 75
4.11 Determinação do envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido pela crotalfina, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2..... 77

4.12 Determinação do envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido por morfina, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2 ..... **79**
4.13 Determinação do envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido por U50488, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2 ..... **81**
4.14 Caracterização da dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático em ratos machos e fêmeas e avaliação da influência das fases do ciclo estral **83**
4.15 Efeito da crotalfina sobre a hipernocicepção, e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos fêmeas e machos **86**
4.16 Duração do efeito antinociceptivo da crotalfina sobre a hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos fêmeas e machos **88**
4.17 Determinação do envolvimento de receptores opióides no efeito antinociceptivo da crotalfina, na dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo isquiático **90**
4.18 Influência dos hormônios ovarianos no limiar de resposta à estimulação nociceptiva mecânica e no desenvolvimento de hipernocicepção induzida por PGE_2 ..... **92**
4.18.1 Efeito da ovariectomia **92**
4.18.2 Efeito da reposição hormonal **96**
4.19 Efeito da ovariectomia e da reposição hormonal na antinocicepção induzida pela crotalfina, na ausência ou vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2 ..... **99**
4.20 Expressão de receptores opióides do tipo *mu, kappa* e *delta* em nervo da pata de fêmeas em comparação à machos, em modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 ..... **101**
5 Discussão **103**
6 Conclusão **117**
REFERÊNCIAS **119**

1 Introdução

1.1 Crotalfina

A crotalfina é um peptídeo de 14 resíduos de aminoácidos (Figura 1), com atividade antinociceptiva, inicialmente identificado e isolado do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*. Este peptídeo possui massa molecular de 1534,6 daltons e uma seqüência (Figura 1) idêntica à cadeia γ da crotapotina (KONNO et al., 2008).

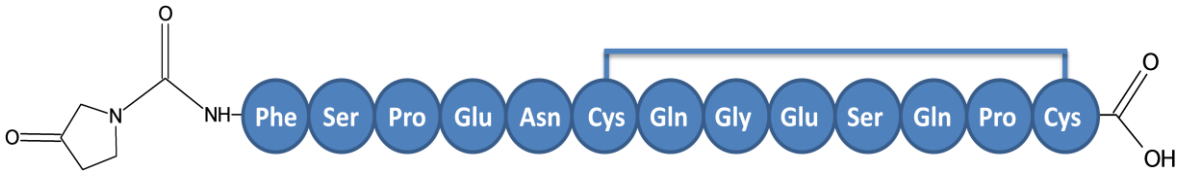


Figura 1 - Seqüência de aminoácidos da crotalfina

Os estudos com a crotalfina estão baseados em dados da literatura evidenciando que o veneno crotálico acarreta efeito analgésico em seres humanos (BRAZIL, 1934) e em estudos experimentais mostrando que este veneno induz em roedores, efeito antinociceptivo. Nestes estudos foi observado que o efeito antinociceptivo do veneno é de longa duração (até 3 dias em modelos de dor crônica e 5 dias em modelos de dor aguda) e mediado pela ativação de receptores opióides do tipo *kappa e delta* (GIORGI; BERNARDI; CURY, 1993; PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; BRIGATTE, 2005; GUTIERREZ, 2005; GUTIERREZ et al., 2008). Apesar da atividade tipo opióide e, dependendo do modelo experimental utilizado, o tratamento prolongado com o veneno não acarreta o desenvolvimento de tolerância ou de sinais característicos de síndrome de abstinência (BRIGATTE et al., 2001). Estudos iniciais realizados por Giorgi et al. (1993) sugeriram que o fator responsável pelo efeito antinociceptivo do veneno não era um componente tóxico deste veneno, uma vez que a neutralização com o soro anticrotálico não interferia com o efeito antinociceptivo. Estudos subseqüentes possibilitaram o isolamento e caracterização da substância, presente no veneno, responsável pelo efeito antinociceptivo, a qual foi denominada crotalfina (KONNO et al., 2008). Estes estudos mostraram que, no modelo de hipernocicepção induzida, em ratos, pela administração intraplantar (i.pl.)

de prostaglandina (PGE_2), o efeito antinociceptivo da crotalfina é detectado após administração sistêmica – oral e endovenosa – ou por via local – intraplantar (tecido subcutâneo). Quando administrada por via oral, sua efetividade neste modelo, é observada a partir da dose de 0,0016 μg/Kg. O efeito antinociceptivo é também observado no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina e em modelos de dor de câncer (induzido pela injeção intraplantar de células do carcinoma de Walker 256 em ratos) e dor neuropática (induzida pela constrição crônica do nervo isquiático). Ainda, em todos os modelos, a ação antinociceptiva da crotalfina é de longa duração (3 a 5 dias), mediada pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo *kappa* (modelos de dor aguda) e *kappa* e *delta* (modelos de dor crônica) (GUTIERREZ et al., 2008; KONNO et al., 2008). Curiosamente, apesar deste peptídeo apresentar efeito opióide, a sua estrutura química não tem homologia com nenhum peptídeo opióide conhecido.

Os estudos com a crotalfina mostraram ainda, que: (a) o tratamento prolongado com este peptídeo não acarreta o desenvolvimento de tolerância ao efeito antinociceptivo, quando avaliado em modelo de dor neuropática (GUTIERREZ et al., 2008); (b) diferentemente do que ocorre com a morfina, a crotalfina não é capaz de acarretar o fenômeno de hipernocicepção tardia (PEREIRA e CURY, em fase de elaboração), indicando a menor incidência para este peptídeo, de efeitos adversos característicos de fármacos com atividade opióide.

Cabe ressaltar que a elevada efetividade da crotalfina e a longa duração de ação antinociceptiva só são detectadas na presença de inflamação ou lesão tecidual. Dados recentes obtidos pelo nosso grupo indicam que este fenômeno é decorrente da maior expressão de receptores opióides e de sua ativação pela crotalfina na vigência de processos inflamatórios (ZAMBELLI e CURY, em fase de elaboração).

Apesar destes dados, não são ainda conhecidos os alvos moleculares da ação da crotalfina ou mesmo, se o peptídeo tem ação direta em células neuronais responsáveis pela condução da informação nociceptiva. Cabe ressaltar que resultados iniciais obtidos em estudos de "*binding*", indicam que a crotalfina não é capaz de ativar diretamente os receptores opióides, sugerindo o envolvimento de peptídeos opióides endógenos na ação deste peptídeo. Dados recentes obtidos em nosso laboratório têm mostrado também o envolvimento de receptores canabinóides,

no efeito antinociceptivo do peptídeo (MACHADO e PICOLO, em fase de elaboração). Apesar destes dados, não foi ainda determinada a possível relação entre estes receptores, a liberação de opióides endógenos e consequente ativação de receptores opióides, para a expressão da ação antinociceptiva da crotalfina.

Baseado nas propriedades antinociceptivas da crotalfina, ensaios pré-clínicos vem sendo realizados atualmente, com o intuito de avaliar a possibilidade do desenvolvimento deste peptídeo como um novo medicamento analgésico.

1.2 Dor

A dor, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é definida como "*Experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano presente ou potencial, ou descrita em termos de tal dano"* (IASP). A dor, portanto, é um processo cognitivo e dependente da memória, aspectos culturais e psíquicos.

A transmissão da dor, da periferia para o SNC (nocicepção), está associada à atividade elétrica das fibras nervosas aferentes primárias, as quais possuem terminações sensoriais nos tecidos periféricos e são ativadas por estímulos mecânicos, térmicos e/ou químicos. Os neurônios aferentes primários desempenham três funções principais no que diz respeito à nocicepção: **1 - Transdução**: detecção do estímulo nociceptivo ou nocivo e conversão em sinais elétricos nos nociceptores; **2- Transmissão:** a informação (impulso elétrico) é conduzida da periferia para a medula espinal, onde ocorre sinapse com neurônios presentes em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinal (CAVIEDES e HERRANZ, 2002). Da medula espinal, as informações nociceptivas são conduzidas ao tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral, onde ocorre a percepção da dor (SCHAIBLE e RICHTER, 2004); **3 - Modulação**: este processo representa mudanças que ocorrem no sistema nervoso em resposta à estimulação nociva, mediadas por neurônios intermediários (interneurônios) e também por tratos neurais descendentes que podem modificar a transmissão do estímulo nociceptivo (VANDERAH, 2007).

O estímulo nociceptivo é conduzido da periferia para a medula espinal por fibras aferentes sensitivas. Muitas destas fibras nervosas aferentes são

denominadas nociceptores polimodais (fibras C), possuindo baixa velocidade de condução (cerca de 0,5 a 2 m/segundo), por não apresentarem mielina. Fibras C nociceptivas conduzem estímulos de diferentes modalidades, incluindo estímulos mecânicos, térmicos e químicos, portanto, são denomidas fibras polimodais (VANDERAH, 2007). As fibras nociceptivas mielinizadas conduzem mais rapidamente os estímulos (cerca de 2 a 20 m/segundo). Essas fibras também conduzem estímulos mecânicos, e algumas destas fibras, mas não todas, respondem à estímulos térmicos (VANDERAH, 2007).

Durante o desenvolvimento de uma resposta de origem inflamatória, as fibras nervosas, particularmente as do tipo C, são ativadas por estímulos de baixa intensidade, acarretando dor mais persistente. Neste caso, a sensibilização dos receptores da dor (nociceptores) causa hiperalgesia, que, segundo definição da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2011), é uma resposta exacerbada a um estímulo doloroso, e está relacionada à diminuição do limiar em seres humanos, enquanto que o termo hipernocicepção aplica-se à diminuição do limiar em animais.

É importante salientar que, além dos receptores polimodais C, um grupo adicional de nociceptores, denominados receptores "silenciosos" ou "adormecidos" (*silent nociceptors/ sleeping nociceptors*) são irresponsivos, porém, em processos inflamatórios, são ativados contribuindo para a hipernocicepção (SCHAIBLE e SCHMIDT, 1988; VANDERAH, 2007). Estes receptores possuem alto limiar de ativação, mas durante um processo inflamatório tornam-se mais facilmente ativáveis e responsivos a estímulos mecânicos e térmicos. Estas fibras aferentes são encontradas na pele, articulações e em órgãos viscerais (SCHAIBLE e SCHMIDT, 1988; SCHEMELZ et al., 1994).

Além da hipernocicepção, na vigência de estímulos nociceptivos de grande intensidade, é observado o fenômeno de alodinia, isto é, a presença de dor em resposta a estímulos que usualmente não provocam dor (estímulos não nocivos) (IASP; KIDD e URBAN, 2001 ; DWORKIN et al., 2003). Diversos mecanismos estão envolvidos na gênese dos fenômenos de hipernocicepção e alodinia e incluem a sensibilização dos nociceptores, excitabilidade ectópica, aumento da excitabilidade dos neurônios no corno dorsal da medula espinal ou no núcleo trigeminal do tronco cerebral (sensibilização central), reorganização estrutural e redução da atividade de sistemas inibitórios endógenos (COSTIGAN e WOOLF, 2000).

Várias substâncias sintetizadas e / ou liberadas durante o processo inflamatório podem interferir com a atividade de fibras nervosas sensitivas aferentes (SCHAIBLE e RICHTER, 2004). Os mediadores periféricos da dor atuam via receptores ligados a intermediários celulares (proteína G, segundos mensageiros), que regulam a permeabilidade da membrana e a concentração iônica celular (BEVAN, 1999; REICHLING e LEVINE, 1999). A hipernocicepção decorre, em parte, do incremento das concentrações intracelulares de AMPc, o qual modula diretamente a atividade de proteínoquinases como PKA (ALEY e LEVINE, 1999). A ativação de proteínoquinases resulta na fosforilação de canais iônicos, aumento do influxo de Ca^{2+} intracelular, despolarização da membrana celular e transmissão do impulso nervoso (FERREIRA e LORENZETTI, 1994; ENGLAND; BEVIAN; DOCHERTY, 1996; CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999). Alguns mediadores hipernociceptivos elevam diretamente as concentrações intracelulares de AMPc mas outros, cujos receptores não estão acoplados a adenilato ciclase, sensibilizam nociceptores por mecanismos independentes da formação direta do AMPc. Estes mecanismos incluem a geração de prostanóides e a ativação de proteínoquinase C (PKC) (BEVAN, 1999), particularmente as PKCε, independentes da ativação de PKA (HUCHO et al., 2005). A ativação da PKC acarreta a fosforilação e o aumento da atividade de canais iônicos permeáveis a Ca^{2+} e Na^{+} (LORENZETTI e FERREIRA, 1996; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001). Tem sido proposta ainda, uma via de sinalização intracelular adicional, a via das MAPKs, que pode ser ativada independentemente da ativação da PKC ou PKA (DINA et al., 2003). A cascata das MAPKs é ativada pela fosforilação de resíduos de tirosina e treonina (JI e WOOLF, 2001), sendo subdividida em 3 membros: quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), quinase N-terminal c-Jun (JNK) e a p-38 MAPK. Dai et al. (DAI et al., 2002) demonstraram a participação das MAPKs, mais especificamente das ERKs, em processos hipernociceptivos (DAI et al., 2002). Independentemente do mecanismo de sinalização intracelular, o aumento na expressão e fosforilação de canais iônicos em membranas de neurônios periféricos é o principal fator responsável pelo aumento da excitabilidade da membrana destas células (WOOLF, 2000). Os principais canais iônicos responsáveis pela geração de potenciais de ação na membrana de neurônios nociceptivos e a propagação da informação nociceptiva são os canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem (VANEGAS e SCHAIBLE, 2000; SAEGUSA et al., 2002; AMAYA et al., 2006; MAINGRET et al., 2008).

Como mencionado, neurônios do corno dorsal recebem a informação sensorial de aferentes primários e respondem a diferentes tipos de estímulos, nocivos ou táteis. O corno dorsal da medula espinal é portanto, um importante sítio no processo de transmissão da informação nociceptiva da periferia para o Sistema Nervoso Central.

A distribuição dos aferentes primários, no corno dorsal, ocorre de modo organizado, em padrões determinados pela modalidade sensorial e a região do corpo da qual esses neurônios conduzem a informação a ser processada (TODD, 2010). O corno dorsal é dividido em um sistema de 10 camadas, ou lâminas de Rexed (I – X). Em geral, aferentes do tipo Aδ (A delta) e C penetram no corno dorsal pela região que abrange lâminas I e II (TODD, 2010) e então realizam sinapse com neurônios de projeção que enviam a informação para centros supraespinais (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

Muitos neurotransmissores estão envolvidos na modulação desta transmissão nestes sítios medulares (AIMONE e YAKSH, 1989; YAKSH, 1999). Estes neurotransmissores incluem, entre outros, aminoácidos excitatórios como o glutamato, e neuropeptídeos como a substância P, a neurocinina A e o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) (KIDD e URBAN, 2001; SCHAIBLE e RICHTER, 2004), os quais, atuando em receptores específicos na membrana celular de neurônios pós-sinápticos, favorecem a transmissão da informação nociceptiva e a geração da sensibilização central. A ativação de receptores NMDA para glutamato, tem papel chave na indução e manutenção da sensibilização central (SCHAIBLE e RICHTER, 2004). Contudo, a liberação de neuropeptídeos, fatores neurotróficos e de prostaglandinas, neste sítio medular, também contribui para a gênese do processo de sensibilização central (BESSON, 1999; WOOLF e SALTER, 2000; SCHAIBLE e RICHTER, 2004). Dados da literatura têm evidenciado ainda, que as células da glia (astrócitos e micróglia) da medula espinal, por meio da liberação de vários mediadores nociceptivos, contribuem para a transmissão da informação nociceptiva e para o fenômeno de sensibilização central (CHACUR et al., 2004; BRADESI, 2010).

Durante o processo de transferência da informação nociceptiva da medula espinal para estruturas supraespinais, podem ocorrer modificações dos sinais, uma vez que há influência de tratos descendentes excitatórios (ex.: glutamatérgicos) e inibitórios (ex.: gabaérgicos/ glicinérgicos) nesta sinalização. Estes tratos podem

atuar em fibras aferentes primárias, em fibras pós-sinápticas ou ainda, em interneurônios presentes no corno dorsal da medula espinal (MILLAN, 2002; BLYTH et al., 2005; TODD, 2010).

Os múltiplos tratos descendentes se originam de áreas como hipotálamo e amígdala, córtex cingulado rostro-anterior, direcionando-se a regiões no tronco encefálico como a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e medula rostro ventro-medial (RVM). Neurônios do núcleo da rafe magna e núcleo reticular gigantocelular, que estão localizados na medula rostro-ventro medial, também projetam diretamente para o corno dorsal da medula espinal (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). Diversos mediadores estão envolvidos na inibição e facilitação do sinal nociceptivo, incluindo serotonina, noradrenalina, opióides, GABA e acetilcolina (STAMFORD, 1995). Na PAG há grande concentração de peptídeos opióides, tais como as encefalinas e dinorfina, e também receptores opióides, especialmente os do tipo *mu* (CALVINO e GRILO, 2006).

A transmissão do sinal nociceptivo da periferia para o Sistema Nervoso Central é portanto, um processo dinâmico e complexo. A caracterização dos múltiplos mecanismos e dos componentes moleculares responsáveis pela geração da dor tem contribuído não só para o avanço no conhecimento da fisiopatologia da dor, mas também para o seu controle e para a seleção de novos alvos para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas.

1.3 Fármacos Opióides

Atualmente os medicamentos comumente utilizados no tratamento da dor são os opióides, os quais incluem a morfina, principal fármaco desta classe, e outros analgésicos como o fentanil e a codeína. Além desses analgésicos, são comumente utilizados opióides em associação, como a codeína associada ao paracetamol, ou antiinflamatórios não esteroidais, inibidores da enzima ciclooxigenase -1 ou 2 (COX-1 e 2), como o diclofenaco e o celecoxibe, e ainda, agentes anticonvulsivantes, tais como a gabapentina e carbamazepina. Esses medicamentos atuam suprimindo ou controlando os sintomas da dor (SINDRUP et al., 1999), bem como inibindo os mecanismos envolvidos na gênese da dor (SCHOLZ e WOOLF, 2002).

Os opióides estão entre os analgésicos mais utilizados no controle da dor, particularmente a dor crônica. O termo opióide aplica-se a qualquer substância que produza efeitos semelhantes aos da morfina e que são bloqueados por antagonistas do tipo naloxona (FOLEY e INTURRISI, 1987; REISINE et al., 1996; HARDMAN et al., 2006). Os opióides induzem analgesia em seres humanos e em animais, por ação em receptores específicos, alterando a resposta do organismo a estímulos nocivos, químicos, mecânicos e térmicos (YAKSH, 1999).

Os principais efeitos analgésicos dos opióides decorrem da ação destas substâncias em receptores opióides, os quais são denominados pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR) em receptores do tipo do tipo MOP ou *mu* (μ), KOP ou *kappa* (κ) e DOP ou *delta* (δ) (IUPHAR, 2011; KIEFFER e EVANS, 2009). Em 1996 foi proposta uma nova nomenclatura para estes receptores, a qual não foi completamente aceita, sendo que atualmente, ainda são amplamente utilizados os símbolos gregos para nomear estes receptores (DHAWAN, 1996; BRIAN, 2009). Outros receptores opióides já foram caracterizados e vem sendo alvos de estudos, entretanto, ainda não estão completamente caracterizados (JUNIEN e WETTSTEIN, 1992). A síntese destes receptores é regulada por três diferentes genes, entretanto eles apresentam extensa homologia estrutural entre si (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001; ZHANG et al., 2005).

A existência de receptores para opióides foi primeiramente proposta por Beckett e Casy, em 1954, baseado em estudos de relação estrutura-atividade, para uma série de opióides sintéticos (BECKETT e CASY, 1954). Estudos conduzidos na década de 1970 indicaram a existência de 4 tipos de receptores opióides. Primeiramente, Martin e colaboradores identificaram 3 tipos, os receptores *mu, kappa e sigma* (σ) (MARTIN et al., 1976). Posteriormente, Lord e colaboradores identificaram o quarto subtipo, denominado receptor *delta* (LORD et al., 1977). Estudos recentes têm mostrado que, além dos receptores *mu, kappa e delta*, os receptores do tipo *sigma* também estão envolvidos na analgesia induzida por opióides (MAURICE e SU, 2009) e que esta ação é mediada principalmente por receptores do tipo *sigma* -1 supraespinais (MEI e PASTERNAK, 2002). Entretanto, o envolvimento de receptores *sigma* no efeito de analgésicos opióides ainda não foi completamente elucidado.

Os receptores opióides e seus subtipos pertencem à classe A da superfamília de receptores com 7 domínios transmembrânicos (7 TM), acoplados à proteína $G_{i/o}$ heterotrimérica (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001; ZHANG et al., 2005; PAN et al., 2008; KIEFFER e EVANS, 2009; VAN RIJN et al., 2010). Outra característica destes receptores é a capacidade de formar interações receptor-receptor, formando complexos de receptores homômeros e heterômeros com propriedades farmacológicas diferentes (VAN RIJN et al., 2010).

Os receptores opióides estão amplamente distribuídos no Sistema Nervoso Central (SNC) (YAKSH, 1999), em regiões como córtex cerebral, tálamo, amígdala, núcleo *accumbens*, substância nigra, formação reticular mesencefálica e substância cinzenta periaquedutal mesencefálica (PAG), além de serem encontrados na medula espinal e também em vários tecidos e células na periferia (FERREIRA e NAKAMURA, 1979; KAISER et al., 1990; STEIN; GRAMSCH; HERZ, 1990; WITTERT et al., 1996). A distribuição dos receptores opióides no córtex cerebral varia de acordo com a porção cortical e laminar. Os receptores *mu* estão localizados preferencialmente nas camadas I, V e VI, os receptores *delta* nas camadas II, III, V e VI, de maneira mais difusa, enquanto os receptores *kappa* estão presentes nas camadas III, V, e VI do córtex anterior cingulado (LEWIS et al., 1987). Na medula espinal, os receptores *mu*, na proporção de 70%, estão distribuídos predominantemente nas camadas superficiais do corno dorsal, principalmente na substância gelatinosa (ATWEH e KUHAR, 1977; DAVIDSON et al., 2000). Os receptores *kappa* (7%) e *delta* (23%) estão também distribuídos nas camadas superficiais do corno dorsal, em vários segmentos da medula espinal (QUIRION, 1984; DAVIDSON et al., 2000). Os receptores *kappa* estão predominantemente localizados nos corpos celulares de aferentes nociceptivos mielinizados e não mielinizados, no gânglio da raiz dorsal e medula espinal. Na periferia, os receptores *kappa* estão localizados em terminais de neurônios sensoriais da pele, músculos, articulações e vísceras (KIVELL e PRISINZANO, 2010). Os receptores *delta* encontram-se presentes preferencialmente nos segmentos cervicais, apresentando baixa densidade de ligação em regiões lombo-sacrais, diferindo do padrão dos sítios de ligação *kappa*, concentrados nestas regiões (GOUARDERES; CROS; QUIRION, 1985).

Os receptores *mu,* cujos ligantes endógenos preferenciais são as endorfinas*,* são os responsáveis pela maioria dos efeitos analgésicos dos opióides e por alguns dos mais importantes efeitos adversos, como depressão respiratória, euforia, dependência física, sedação e diminuição da motilidade gastrointestinal. A maioria dos opióides analgésicos é representada por agonistas destes receptores (BROWNSTEIN, 1993; PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001; JONGKAMONWIWAT et al., 2003; PAN et al., 2008). Os receptores *delta,* cujos ligantes endógenos preferenciais são as encefalinas, são provavelmente, mais importantes na periferia, entretanto podem contribuir também para a analgesia central. Os receptores *kappa*, cujos ligantes endógenos preferenciais são as dinorfinas, acarretam número relativamente pequeno de efeitos indesejáveis, podendo contribuir para a sedação e disforia, mas não para a dependência física (WOOD, 1988; BOWEN et al., 2003). A importância dos receptores *kappa* para analgesia, a sua distribuição central e periférica e o menor número de efeitos adversos têm contribuído para a intensa pesquisa de novos fármacos analgésicos opióides com ação seletiva para este tipo de receptor.

Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos na ação analgésica dos opióides. Após o acoplamento do agonista ao receptor opióide, a proteína G heterotrimérica dissocia-se em unidade G_{α} e unidade $G_{\beta\gamma}$, que modula negativamente o sistema da adenilato ciclase (AC), diminuindo a produção de AMPc (SCHULTZ e GROSS, 2001). Ocorre abertura de canais de potássio, com consequente hiperpolarização da membrana, impedindo a abertura de canais de cálcio e a liberação de neurotransmissores (DICKENSON e SULLIVAN, 1987). Foi observada ainda, a ativação de cascatas das MAPK (MAPquinases) (RASAKHAM e LIU-CHEN, 2011). Sugere-se atualmente, que a ativação da via L-arginina-óxido nítrico-GMPc seja a responsável pela analgesia periférica induzida por alguns opióides (FERREIRA; DUARTE; LORENZETTI, 1991; GRANADOS-SOTO et al., 1997; AMARANTE e DUARTE, 2002), uma vez que inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) ou da guanilato ciclase revertem o efeito destes fármacos, quando avaliados em modelos de hipernocicepção inflamatória aguda (DUARTE; LORENZETTI; FERREIRA, 1990; FERREIRA e LORENZETTI, 1995; GRANADOS-SOTO et al., 1997; AMARANTE e DUARTE, 2002) ou crônica (SACHS et al., 2004). Trabalhos recentes têm indicado que ativação da via de sinalização intracelular da

PI_3K é um importante mecanismo envolvido na ação dos opióides (CUNHA et al., 2010). As PI_3K ou fosfoinositídio-3-quinase são uma classe de enzimas que estão envolvidas em uma série de eventos celulares, incluindo diferenciação, crescimento celular e *trafficking* intracelular (JOYAL et al., 1997). Estas quinases são ativadas por receptores acoplados à proteína G, tais como receptores opióides e/ou a receptores acoplados à tirosina quinase (PAEZ e SELLERS, 2003).

Várias evidências experimentais e clínicas têm sugerido que fármacos opióides apresentam eficácia aumentada na vigência de processos inflamatórios ou lesão tecidual (MCEVER et al., 1989; STEIN; GRAMSCH; HERZ, 1990; PHIPPS et al., 1991; STEIN e ZOLLNER, 2009). Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar o aumento na intensidade do efeito analgésico na presença de inflamação. Estas hipóteses incluem aumento da síntese *de novo* de receptores opióides, tanto na periferia quanto centralmente, aumento do transporte axonal destes receptores e seu acúmulo no tecido inflamado (HASSAN et al., 1993; BINDER, CARMODY; WALKER, 2001), além do incremento na exposição de receptores opióides. O aumento na exposição de receptores opióides parece ser decorrente da ruptura da barreira perineural de neurônios sensoriais, causada pela ação dos mediadores inflamatórios ou por solução hiperosmótica na vigência de lesão ou inflamação (RECHTHAND e RAPOPORT, 1987; OLSSON, 1990). Contudo, é importante salientar que estas alterações dependem do tipo de lesão ou inflamação, do tipo de receptor opióide e localização (central ou periférica). Desta forma, dependendo do tipo de inflamação ou lesão tecidual, podem ser detectados aumento ou diminuição da expressão e da atividade de receptores opióides, o que poderia contribuir, por exemplo, para a diminuição da efetividade de alguns fármacos opióides na vigência de dor neuropática (ZHANG et al., 1998; KOHNO et al., 2005). Trabalhos têm mostrado ainda, que a reação inflamatória pode alterar a funcionalidade de receptores opióides, favorecendo a ligação ao agonista e o acoplamento à proteína G, com conseqüente amplificação da sinalização intracelular (ZOLLNER et al., 2003; PUEHLER et al., 2004).

Apesar da eficácia e efetividade dos fármacos opióides no controle da dor, diversos trabalhos realizados nos últimos 15 anos têm mostrado haver diferenças entre os gêneros masculino e feminino na sensibilidade dolorosa e na resposta à analgésicos opióides, evidenciando a necessidade da realização de estudos envolvendo ambos os sexos. Ainda, uma vez que determinados tipos de dores

persistentes são predominantes no sexo feminino, torna-se necessária a busca por novos medicamentos que possuam maior eficácia no sexo feminino.

1.4 Diferenças sexuais na sensibilidade dolorosa e na resposta a fármacos opióides

Como mencionado anteriormente, os estudos experimentais sobre o efeito analgésico da crotalfina foram sempre realizados em roedores machos. Vários dados da literatura têm mostrado a existência de diferenças entre machos e fêmeas quanto à sensibilidade dolorosa e na resposta a analgésicos opióides, uma vez que estes fármacos são menos efetivos em induzir antinocicepção em animais fêmeas (BINDER et al., 2000; CRAFT, 2003; CRAFT et al., 2008; LI et al., 2009). Estas diferenças na sensibilidade dolorosa e na resposta à opióides têm sido também observadas entre homens e mulheres (BERKLEY, 1997; TERNER et al., 2005; WIESENFELD-HALLIN, 2005) e atribuídas a múltiplos fatores, como por exemplo, fatores ambientais, hormonais, genéticos, sócio-culturais, entre outros (BERKLEY, 1997; CRAFT e BERNAL, 2001; CRAFT, 2003; JI et al., 2006; LU et al., 2009; TOUSIGNANT-LAFLAMME e MARCHAND, 2009; MANSON, 2010).

Estudos clínicos têm indicado que mulheres relatam dor com mais freqüência e possuem menor tolerância à dor em relação aos homens (BERKLEY, 1997; TERNER et al., 2005; WIESENFELD-HALLIN, 2005; GIOIOSA et al., 2008; LOYD e MURPHY, 2009; PALLER et al., 2009). A dor em mulheres tende a ser mais severa, prolongada e recorrente, havendo maior prevalência, comparativamente aos homens, de dores crônicas como enxaquecas, dores pélvicas, injúrias da articulação temporomandibular (ATM), fibromialgia e artrite (UNRUH, 1996; BERKLEY, 1997; ADAMS JR. et al., 2000; FLAKE; HERMANSTYNE; GOLD, 2006; SHERMAN e LERESCHE, 2006; BERNAL et al., 2007; SANOJA e CERVERO, 2007; JI; TANG; TRAUB, 2008; MANSON, 2010; SANOJA e CERVERO, 2010). Alguns parâmetros são importantes na observação de tais diferenças, como o tipo de estímulo - térmico, mecânico ou químico (LAUTENBACHER e ROLLMAN, 1993; BERNAL et al., 2007), o tempo de duração do estímulo, o local de aplicação e a presença de outros

fatores, como fatores biológicos, psicológicos e sociais (SHERMAN e LERESCHE, 2006), condições patológicas e variáveis do estado reprodutivo, como a puberdade, ciclo menstrual, gravidez e menopausa (BERKLEY, 1997; GREENSPAN et al., 2007). Estudos têm mostrado ainda que hormônios esteroidais gonadais podem ser um dos responsáveis pelas diferenças na sensibilidade dolorosa e na resposta a fármacos analgésicos observadas entre homens e mulheres (STOFFEL; ULIBARRI; CRAFT, 2003; EVRARD, 2006; BERNAL et al., 2007; GREENSPAN et al., 2007; CRAFT, 2008; KREN et al., 2008; PALLER et al., 2009; MANSON, 2010). Estes estudos demonstraram que alguns tipos de dores crônicas ocorrem com mais freqüência em mulheres em idade reprodutiva, nas quais ocorrem flutuações nas concentrações hormonais. Em casos de dores crônicas, como a enxaqueca, a prevalência desta patologia é 3 vezes maior em mulheres, em comparação com homens, havendo declínio após a menopausa, e pelo menos em 50% das mulheres que sofrem de crises de enxaquecas, o desencadeamento da crise é dependente do período do ciclo menstrual (CRAFT, 2007; MANSON, 2010).

Estudos experimentais utilizando roedores, também demonstraram a existência de diferenças na sensibilidade dolorosa entre machos e fêmeas (CRAFT e ULIBARRI, 2009), sendo que fêmeas apresentam menor limiar nociceptivo, quando comparado aos machos (SHERMAN e LERESCHE, 2006; BERNAL et al., 2007; CRAFT, 2008; GIOIOSA et al., 2008). Em modelos de inflamação induzida por formalina ou capsaicina, animais machos mostraram ser menos sensíveis à dor, necessitando de doses maiores destes agentes, para indução da resposta nociceptiva, quando comparado às fêmeas (BARRETT; SMITH; PICKER, 2003). Adicionalmente, Gaumond et al. (2005) observaram em ratos, que a testosterona diminui a sensibilidade dolorosa, enquanto os hormônios femininos interferem principalmente com os mecanismos inibitórios da dor, sugerindo que a prevalência de dores crônicas em mulheres é decorrente da deficiência do controle endógeno da dor. Estudos têm mostrado, ainda, que hormônios esteroidais podem acarretar alterações na excitabilidade neuronal (LU et al., 2009) e também regular a ativação de vias de sinalização intracelular, interferindo principalmente com a ativação de proteínoquinases (PK) (DINA et al., 2001).

Além da diferença na sensibilidade à dor, observam-se também diferenças entre a resposta de machos e fêmeas ao efeito de fármacos analgésicos (LOYD et

al., 2007; BOBECK et al., 2009; RICHARDSON e HOLDCROFT, 2009), particularmente fármacos com atividade opióide (STOFFEL; ULIBARRI; CRAFT,2003; STOFFEL et al., 2005; JI et al., 2006; LOYD e MURPHY, 2006; GIOIOSA et al., 2008). Algumas variáveis podem influenciar a observação dessas diferenças, tais como a seletividade e o tipo do fármaco opióide e o tipo e a intensidade do estímulo nociceptivo. Patrick e colaboradores (PATRICK, 1999) demonstraram que alguns agonistas opióides não seletivos, são mais eficazes em camundongos machos. Estas diferenças têm sido também observadas para os agonistas seletivos de receptores opióides. Assim, alguns trabalhos mostraram que agonistas seletivos de receptores opióides do tipo *mu*, tais como a morfina, induzem maior antinocicepção em machos do que em fêmeas (CRAFT e BERNAL, 2001; GUPTA et al., 2006; LOYD et al., 2007; GIOIOSA et al., 2008; BOBECK et al., 2009). Por outro lado, alguns estudos têm evidenciado que a morfina acarreta maior antinocicepção em fêmeas do que em machos. Tem sido observado também, que agonistas seletivos de receptores opióides do tipo *kappa* são mais efetivos em fêmeas do que machos (KAVALIERS e INNES, 1987; GEAR et al., 1996). Com relação aos agonistas de receptores opióides do tipo *delta*, não foram detectadas até o momento, diferenças significativas no efeito antinociceptivo, entre os sexos (BARRETT et al., 2003). Cabe ressaltar que a maioria destes estudos utiliza estímulos nociceptivos térmicos para avaliação da sensibilidade dolorosa, sendo pouco caracterizadas as diferenças na sensibilidade dolorosa e na ação de fármacos analgésicos entre machos e fêmeas, em modelos experimentais que utilizem estímulos mecânicos ou químicos para avaliação da nocicepção.

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar as diferenças entre machos e fêmeas na resposta aos fármacos opióides. Assim, tem sido sugerido que os hormônios esteroidais gonadais femininos, como o estrógeno e a progesterona, inteferem com o sistema opioidérgico, seja por meio da modulação da atividade de receptores opióides, da alteração da expressão destes receptores ou por meio de mecanismos ainda não elucidados. Essas hipóteses baseiam-se em estudos mostrando co-localização de receptores opióides e receptores para hormônios sexuais em diferentes áreas do cérebro, medula espinal e na periferia (STOFFEL; ULIBARRI; CRAFT, 2003; FLANAGAN-CATO et al., 2006; FLANAGAN-CATO; LEE; CALIZO, 2006; LOYD et al., 2007). No Sistema Nervoso Central, estas áreas estão

relacionadas principalmente às vias inibitórias descendentes da dor, principalmente a substância cinzenta periaquedutal, indicando que hormônios esteroidais podem modular tanto a nocicepção como o efeito antinociceptivo dos opióides, por interferir com o controle endógeno da dor.

Outros mecanismos propostos referem-se à modulação da atividade de neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal (DRG) por estrógenos, ou a alterações na expressão de receptores opióides promovidas por hormônios esteroidais. Diversos estudos mostraram que neurônios nociceptivos expressam diferentes subtipos de receptores de estrógeno (ER), indicando que o acoplamento a estes receptores por hormônios esteroidais, poder resultar na modulação da informação nociceptiva em aferentes primários (TALEGHANY et al., 1999; PAPKA e STOREY-WORKLEY, 2002; PAPKA e MOWA, 2003; CHABAN e MICEVYCH, 2005). Os estrógenos exercem estes efeitos por meio da ligação à receptores intracelulares nucleares do tipo ER α e β, ou por meio da ligação com receptores de membrana, ainda não completamente identificados e localizados. Estes receptores estão localizados em diversas áreas relacionadas à modulação da nocicepção, como o corno dorsal da medula espinal, substância cinzenta periaquedutal, núcleo parabraquial, núcleo da rafe, hipotálamo, sistema límbico e várias áreas corticais. No corno dorsal da medula espinal, os receptores do tipo ER α e β estão localizados principalmente nas lâminas II, mas podem ser encontrados também nas lâminas I, III, V e X (EVRARD, 2006). Assim, dados da literatura tem mostrado que a ligação dos hormônios com estes receptores nucleares pode afetar a transcrição gênica, alterando a síntese de RNAm de receptores opióides (LAWSON et al., 2010). Estes estudos demonstram ainda, que a elevação nas concentrações de hormônios esteroidais durante a fase do proestro, altera a expressão gênica de receptores opióides, principalmente os do tipo *kappa,* indicando que os hormônios interferem diretamente com a síntese e expressão de receptores opióides (LAWSON et al., 2010). Ainda, há evidências de que a ligação de estrógenos nos seus receptores de membrana, ativa vias de sinalização resultando na modulação das concentrações de cálcio intracelular e na ativação da proteína quinase C. Estes hormônios podem ainda ativar a via do AMPc, PKA, MAPKs e tirosina quinase (CORNIL; BALL; BALTHAZART, 2006).

Dados de literatura tem indicado também, que a diferença sexual na resposta a opióides, como por exemplo à morfina, pode ser decorrente de efeitos agudos dos hormônios esteroidais gonadais, mediados por receptores (efeitos ativacionais) ou crônicos, de longo prazo (efeitos organizacionais) (BREEDLOVE, 1992, 1994; BLEDNOV et al., 2003; STOFFEL et al., 2005; CRAFT, 2008). Os efeitos organizacionais dos hormônios são permanentes no organismo e medeiam a diferenciação sexual de estruturas cerebrais e a neurobiologia desde fases pré-natais até a vida adulta, definindo a fisiologia e comportamentos ligados aos gêneros masculino e feminino (CICERO et al., 2002; LACROIX-FRALISH et al., 2005). Os efeitos ativacionais correspondem aos efeitos agudos, transientes, de hormônios gonadais no sistema nervoso já desenvolvido e são responsáveis pela manutenção da diferenciação sexual, pela variabilidade de comportamentos sexuais e outros comportamentos, em adultos (LACROIX-FRALISH et al., 2005; CRAFT, 2008). Cícero e colaboradores (CICERO et al., 2002) demonstraram que a diferença sexual na resposta a analgésicos opióides é mediada por efeitos organizacionais, já que a manipulação de hormônios gonadais em neonatos aboliu as diferenças na resposta à morfina. Neste estudo, ratos fêmeas neonatas tratadas com testosterona tornaram-se significativamente mais sensíveis à morfina, quando na fase adulta, enquanto ratos machos neonatos gonadectomizados apresentaram menor sensibilidade, quando adultos, em comparação com grupos controle (CICERO et al., 2002). Por outro lado, LaCroix-Fralish et al. (LACROIX-FRALISH et al., 2005) mostraram que os efeitos ativacionais de hormônios gonadais medeiam o aumento da hipernocicepção mecânica e térmica induzida por lesão de nervos em fêmeas e sugerem que a manipulação hormonal pode se tornar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da dor crônica em mulheres.

Dados da literatura têm evidenciado também que diferenças anatômicas e organizacionais de vias de transmissão da dor, diferenças na densidade de receptores opióides em estruturas relacionadas à nocicepção e antinocicepção e ainda, diferenças na farmacocinética de analgésicos na presença de hormônios esteroidais, podem contribuir para as diferenças no efeito de fármacos opióides entre machos e fêmeas (PIVA et al., 1995; LOYD e MURPHY, 2006; BERNAL et al., 2007; DRAKE e KLAKAMP, 2007). Adicionalmente tem sido observado que a administração, em diferentes tempos e de diferentes doses de hormônios sexuais

em fêmeas, reduz o efeito antinociceptivo da morfina, em comparação com machos ou fêmeas castradas, sugerindo que estes hormônios podem modular diretamente a atividade de fármacos opióides (WEILAND e WISE, 1990; RATKA e SIMPKINS, 1991; STOFFEL; ULIBARRI; CRAFT, 2003; STOFFEL et al., 2005; CRAFT, 2008; JI; TANG; TRAUB., 2008). Tem sido também evidenciada a ocorrência de flutuações na densidade de receptores opióides e alterações de precursores de opióides endógenos nas diferentes fases do ciclo estral em fêmeas, o que pode contribuir para as diferenças observadas. O ciclo estral é um fenômeno rítmico que envolve o período de receptividade sexual, dura de quatro a cinco dias em ratas e pode ser dividido, de acordo com as alterações hormonais, em proestro e estro (cio), sendo ambos períodos foliculares com presença de progesterona e estrógeno; metaestro e diestro, sendo que ambos caracterizam a fase luteínica, com baixas concentrações de hormônios esteroidais.

O ciclo estral influencia também a sensibilidade a opióides exógenos (BANERJEE; CHATTERJEE; GHOSH, 1983; BERGLUND e SIMPKINS, 1988) e endógenos (ROMERO et al., 1988; RYAN e MAIER, 1988). Segundo Martini e colaboradores (MARTINI et al., 1989), a densidade de receptores opióides em homogenato de cérebro e hipotálamo é maior durante proestro, e níveis elevados de estrógeno estão associados com o aumento na expressão de pró-encefalina, precursor do opióide endógeno encefalina (ROMANO et al., 1990). Ao contrário do que ocorre com as fêmeas, não foi ainda detectada, em machos, influência de hormônios na densidade de receptores opióides (CICERO, NEWMAN, MEYER, 1983; MARTINI et al., 1989). Entretanto, há evidências de que a morfina é mais efetiva quando há queda nos níveis de testosterona (BORNSCHEIN; CROCKETT; SMITH, 1977; KAVALIERS e HIRST, 1983).

Como mencionado, a crotalfina apresenta atividade antinociceptiva de longa duração e decorrente da ativação de receptores opióides do tipo *kappa e delta*. Em virtude da potente ação antinociceptiva deste peptídeo, da longa duração de ação e da sua efetividade em modelos de dor persistente, estudos vêm sendo realizados visando o desenvolvimento deste fármaco como um novo analgésico. Estes estudos encontram-se na fase pré-clínica, que incluem ensaios de farmacodinâmica, farmacocinética e toxicológicos. Contudo, os estudos sobre a atividade antinociceptiva da crotalfina foram desenvolvidos sempre em animais (ratos e

camundongos) machos. Em decorrência dos dados acima descritos, mostrando diferenças na sensibilidade a agonistas opióides entre machos e fêmeas, é importante determinar as diferenças na resposta antinociceptiva à crotalfina entre os sexos e os mecanismos envolvidos nessas diferenças.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a diferença da sensibilidade dolorosa e a possível diferença na resposta antinociceptiva à crotalfina entre ratos machos e fêmeas e os mecanismos envolvidos nestas diferenças.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

i. Avaliar a diferença entre ratos machos e fêmeas, quanto:

- ao início de efeito hipernociceptivo, pico de ação, intensidade e duração da hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 e também à hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos (CCI, dor neuropática);

- à expressão de receptores opióides do tipo *mu, kappa e delta*, na vigência de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2;

- ao efeito antinociceptivo da crotalfina, em relação à dose, ao início do efeito, pico de ação, intensidade e duração nos modelos de hipernocicepção induzida pela prostaglandina E_2 ou CCI; Nestes ensaios a morfina foi utilizada como controle positivo.

ii. os mecanismos responsáveis pelo efeito antinociceptivo da crotalfina, em machos e fêmeas, quanto:

- o envolvimento de receptores opióides;

- a ativação das vias de sinalização intracelulares, referentes à fosfoinositídio-3-quinase (PI_3K);

iii. *Avaliar, em fêmeas, a influência dos hormônios sexuais e das fases do ciclo estral na sensibilidade dolorosa e na efetividade da crotalfina.*

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, com peso entre 160 a 180 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Estes animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada (22 °C + 1) e ciclo claro-escuro (12:12 h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (número 390/07 e 625/09) e Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo registrado sob n° 006, nas fls. 46 do livro 2, para uso de animais em experimentação).

3.2 Indução da hipernocicepção por prostaglandina E_2

A prostaglandina E_2 foi injetada por via intraplantar (i.pl., volume final 50 µL), em uma das patas posteriores dos ratos machos e fêmeas. Uma solução estoque de PGE_2 foi preparada, dissolvendo-se 500 µg de prostaglandina em 1 mL de etanol. No momento do uso, essa solução estoque foi novamente diluída em salina estéril, para a obtenção de doses de 50, 100 e 150 ng/pata de PGE_2. Dados anteriores obtidos em nosso laboratório mostram que animais tratados por via i.pl. com salina mais a proporção de etanol utilizada para a diluição de PGE_2, não apresentam alteração do limiar nociceptivo (dados não mostrados).

3.3 Indução de dor neuropática

Para a indução de dor neuropática, foi realizada constrição crônica do nervo isquiático, de acordo com o método descrito por Bennett e Xie (BENNETT e XIE, 1988) (Figura 2). Os animais foram anestesiados com halotano e o nervo isquiático exposto na região mediana da coxa, afastando-se o músculo bíceps femoral. Próximo à trifurcação do nervo isquiático, a 7 mm de distância da trifurcação, foram

realizadas 4 ligaduras (fio categute cromado 4-0) frouxas ao redor deste, distantes entre si aproximadamente 1 mm. As ligaduras foram realizadas ao longo do nervo, até 4 - 5 mm do ponto inicial. A incisão foi suturada em camadas, utilizando fio de sutura de seda número 4.0. Como parâmetros de dor neuropática foram avaliados os fenômenos de hipernocicepção e alodinia.

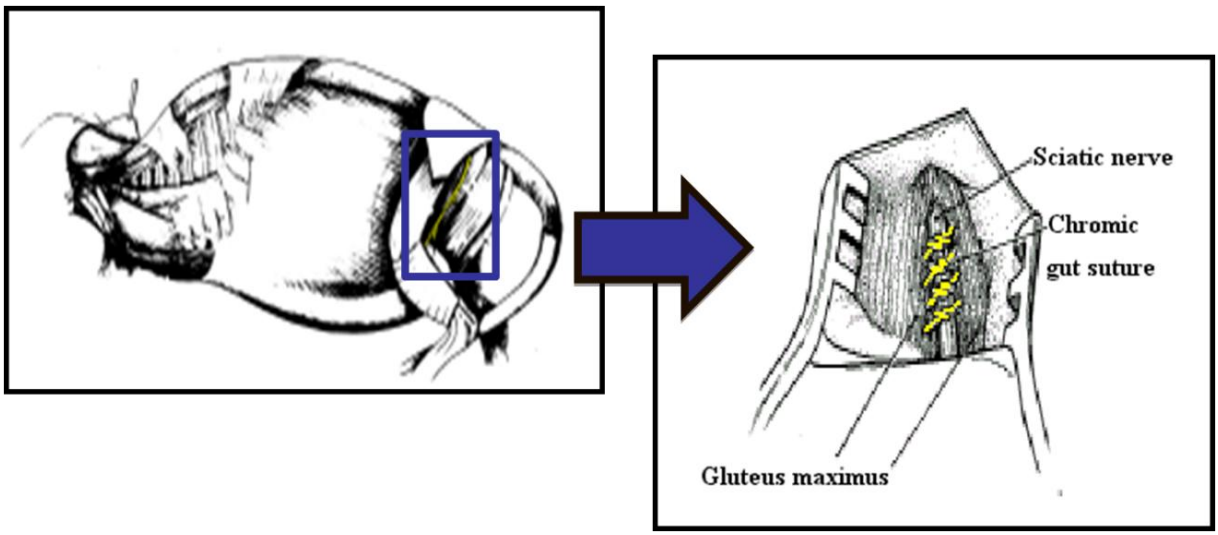


Figura 2 - Esquema demonstrando os pontos de ligadura do nervo isquiático

3.4 Avaliação da sensibilidade dolorosa

3.4.1 Determinação da hipernocicepção

O teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile, Itália) foi realizado de acordo com método descrito por Randall & Sellito (RANDALL e SELITTO, 1957). Neste teste, uma força (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso de uma das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de “retirada” do membro. Neste modelo, o limiar nociceptivo é representado como a força (g) necessária para a indução da reação (Figura 3). Este teste foi aplicado antes (medida inicial) da administração de prostaglandina E_2 e 3 h após (medida final) ou antes (medida inicial) e 1, 7 e 14 dias (medida final) após a constrição do nervo isquiático.

Figura 3 - Teste de pressão de patas (Analgesímetro Ugo Basile ®)
FONTE: Stoelting (2011)

3.4.2 Determinação da alodinia

Avaliada por ensaio quantitativo, em resposta a estímulo tátil aplicado a uma das patas posteriores do rato, segundo método descrito por Chaplan et al. (1994), modificado (Figura 4). Neste teste, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas destes animais. Os ratos foram inicialmente habituados à gaiola, por uma hora, durante os 3 dias que antecederam os experimentos. Para o ensaio de alodinia, foi empregada uma série logarítmica de 10 filamentos de von Frey (Aesthesiometer Semmes-Weinstein, Stoelting Co., EUA), com os valores, em Log 10 (mg x10): 3,61 (0,407 g); 3,84 (0,692 g); 4,08 (1,202 g); 4,17 (1,479 g); 4,31 (2,041 g); 4,56 (3,630 g); 4,74 (5,495 g); 4,93 (8,511 g); 5,07 (11,749 g) e 5,18 (15,136 g). Cabe ressaltar que os filamentos com rigidez superior a 15,136 g não são empregados nos estudos de alodinia. Os filamentos foram aplicados, um a um, perpendicularmente, sob a área plantar de uma das patas posteriores e mantidos por um período de 8 segundos. Os ensaios foram iniciados com o filamento de 2,041 g. Na ocorrência da retirada da pata a este filamento, foi utilizado o filamento de 0,407 g. Na ausência de resposta ao filamento de 0,407 g, o filamento seguinte (0,692 g) foi aplicado novamente, 30-60 s depois. O filamento capaz de induzir a retirada da pata, duas vezes consecutivas, foi considerado como a força em gramas necessária para induzir a resposta (100% de resposta). Na ausência de resposta ao filamento inicial (2,041 g), a apresentação dos filamentos foi realizada de forma ascendente, até a observação de duas respostas consecutivas para um mesmo filamento. Na ausência de resposta ao maior estímulo (15,135 g), este filamento foi

considerado como valor de corte. Esta forma de apresentação dos filamentos minimiza o risco de habituação do animal ao teste (MILLIGAN et al., 2000).

O valor da força (em log) necessária para induzir 50% de resposta de retirada da pata foi calculado pela aplicação de uma função psicométrica integral de Gauss, aplicada para as respostas obtidas para cada filamento. A função de Gauss foi aplicada utilizando programa de computador PsycoFit. Este teste foi aplicado antes (medida inicial) e 1, 7 e 14 dias (medida final) após a constrição do nervo isquiático.

Figura 4 - Filamentos de von Frey (Stoelting Co. ®)
FONTE: Stoelting (2011)

3.5 Avaliação da atividade motora dos animais

Uma vez que nosso objeto de estudo é uma substância com atividade antinociceptiva, e que os métodos para avaliação da sensibilidade dolorosa presentemente utilizados, empregam uma resposta motora, tornou-se necessário a determinação da atividade motora dos animais.

Para a avaliação da atividade motora dos ratos foi utilizado o método do Campo Aberto, de acordo com o proposto por Broadhurst (BROADHURST, 1960). O campo aberto consiste em uma arena plastificada, com formato cilíndrico. O corpo do cilindro tem 32,5 cm de altura e base circular de 97 cm de diâmetro, pintada de branco. Os animais foram colocados individualmente na arena e observados por um período de três minutos. Os parâmetros avaliados foram:

a) frequência de locomoção (LO): cada unidade de medida corresponde ao ato de o animal penetrar, com as 4 patas, em uma das divisões do chão da arena;

b) frequência de levantar (LE): cada unidade de medida corresponde à postura de o animal permanecer apoiado somente nas patas posteriores, com o

tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando, ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto. Este teste foi aplicado 3 h após a administração de crotalfina. Neste ensaio, a morfina foi utilizada como controle positivo, e o teste realizado 1 h após o tratamento cm este opióide.

3.6 Determinação das fases do ciclo estral

Para avaliar a possível interferência das fases do ciclo estral na resposta das fêmeas aos estímulos nociceptivos e tratamentos farmacológicos, as células presentes no lavado vaginal obtido das fêmeas foram analisadas. Os animais foram submetidos à coleta de conteúdo vaginal diariamente, por meio de técnica de lavado vaginal. Uma pipeta plástica contendo 10 µL de salina foi introduzida na vagina. O conteúdo vaginal foi coletado e então depositado em lâmina de vidro para posterior observação em fotomicroscópio Leica DFC420 (Alemanha) nas objetivas de 10 e 40x (LU et al., 2009). As diferentes fases do ciclo estral foram identificadas de acordo com as células presentes no lavado: **(a) Proestro**: grande número de células nucleadas pequenas, poucas células corneificadas e tipos celulares intermediários, sendo característica dessa fase a ausência quase total de leucócitos e formações de aglomerados celulares **(Figura 5 A)**; **(b) Estro**: a maioria das células do esfregaço apresenta-se corneificada, não sendo observada a presença de células nucleadas ou de leucócitos. O epitélio apresenta intensa descamação. Formações celulares irregulares **(Figura 5 B)**; **(c) Metaestro**: a proporção entre os diferentes tipos de células vaginais começa a variar, com redução do número de células corneificadas e grande infiltração de leucócitos, observando-se então a presença dos três tipos celulares **(Figura 5 C)**; **(d) Diestro**: Presença de grande quantidade de leucócitos e muco, com ausência quase completa de células nucleadas e corneificadas **(Figura 5 D)**. Em caso de não haver fecundação, no final dessa fase, surgem as primeiras células nucleadas pequenas (MARCONDES et al., 2002). A coleta do conteúdo vaginal foi realizada entre 8h 30 min e 9 h da manhã, uma vez que podem ocorrer diferenças nos níveis de hormônios esteroidais entre os períodos da manhã, tarde e noite de um mesmo dia.

Figura 5 - Fases do ciclo estral (Objetiva 10x). Os animais foram submetidos à coleta de conteúdo vaginal por meio de técnica de lavado vaginal e as lâminas, analisadas em fotomicroscópio, separadas em Proestro: presença de células nucleadas pequenas, formações de aglomerados celulares (Figura 5 A); Estro: presença de células corneificadas (Figura 5 B); Metaestro: presença de células nucleadas, células corneificadas e leucócitos (Figura 5 C); Diestro: presença de leucócitos (Figura 5 D).

3.7 Ovariectomia

Com o intuito de avaliar se os hormônios esteroidais influenciam a resposta nociceptiva e antinociceptiva dos animais, foi realizada a ovariectomia. Como controle da eficácia da cirurgia, e após a eutanásia, foi realizada a pesagem do útero dos animais, (LU et al., 2009; TORRES-REVERON et al., 2009). Cabe ressaltar que todos os animais foram submetidos à tratamentos pós-cirúrgico com cetoprofeno (5

mg/kg, via s.c., a cada 12 h por até 2 dias após a cirurgia) (LILES e FLECKNELL, 1994; FLECKNELL et al., 1999), com o objetivo de minimizar o desconforto pós-operatório.

Para a remoção dos ovários, os animais foram anestesiados com solução de ketamina e xilazina, na proporção de 1:1, por via intraperitonial (i.p). Foi realizada tricotomia na região dorsal, entre o rebordo costal inferior e a coxa, com o animal posicionado em decúbito ventral e a seguir, incisão de aproximadamente três centímetros na pele e tecido subcutâneo, cerca de um centímetro lateralmente à linha mediana. A parede muscular foi divulsionada até haver acesso a cavidade abdominal, e o ovário localizado. A retirada do ovário foi realizada após ligadura da extremidade da tuba uterina, seccionando-se a porção situada entre a ligadura e o ovário. Após esse procedimento, foi suturada a parede muscular e a pele. O processo foi repetido contralateralmente para a retirada do segundo ovário (Figura 6). O grupo falso operado foi constituído por animais que tiveram os ovários apenas expostos e novamente inseridos na cavidade. Os experimentos de avaliação da nocicepção foram realizados 11 dias após a ovariectomia (LU et al., 2009).

A eficácia da ovariectomia foi avaliada pela análise do lavado vaginal, diariamente, durante 11 dias, e pela pesagem do útero, ao final dos experimentos e após eutanásia dos animais (JI; TANG; TRAUB., 2008).

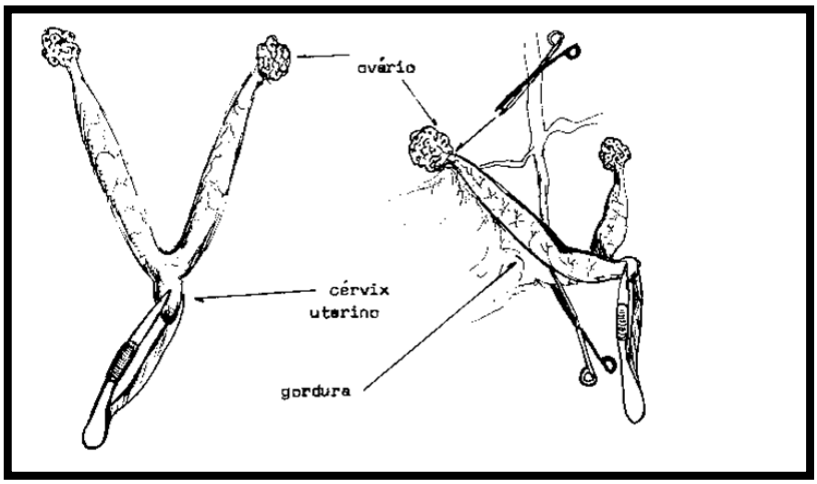


Figura 6. Esquema de realização da ovariectomia.
FONTE: (CAIRASCO, 2007)

3.7.1 Remoção do útero

A remoção do útero (Figura 7), para posterior pesagem do órgão, foi realizada como parâmetro adicional de avaliação da eficácia da ovariectomia, uma vez que, após a ovariectomia, a ausência de estrógenos reduz o tamanho e peso uterino da rata (JI; TANG; TRAUB., 2008). Para a realização deste procedimento, foram utilizados animais castrados, não castrados e falso-operados. Após os experimentos de avaliação de nocicepção. Os animais foram anestesiados com halotano e eutanasiados em câmara de CO_2. Foi realizada incisão abdominal, o útero foi removido e pesado.

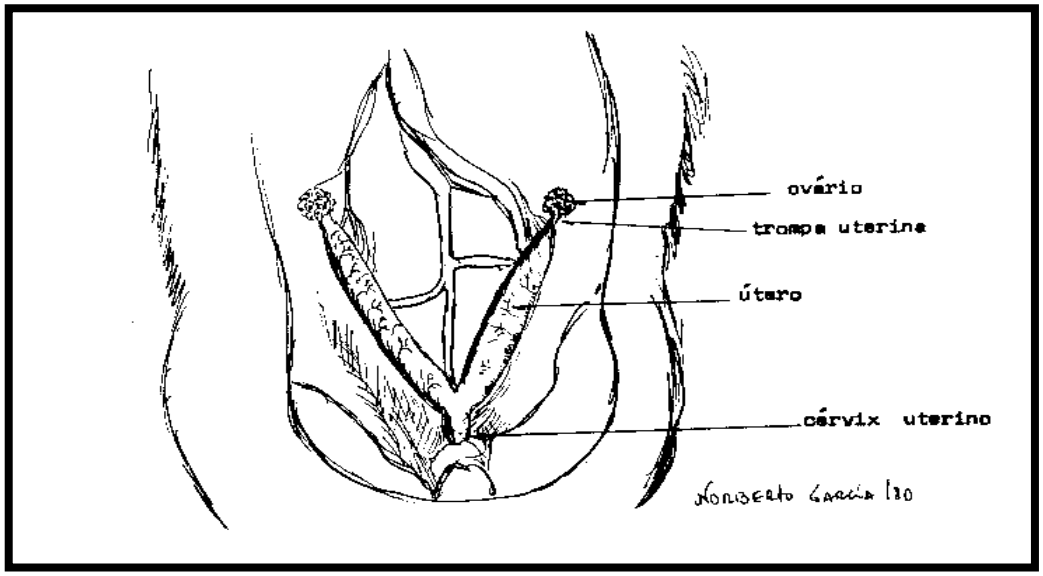


Figura 7. Esquema de remoção do útero
FONTE: (CAIRASCO, 2007).

3.8 Tratamentos farmacológicos

3.8.1 Crotalfina

Obtida por meio de síntese peptídica em fase sólida, utilizando estratégia Fmoc (Produtor: American Peptide Company Inc, produto número 331065, lote U07122A1, pureza 98%). O peptídeo foi armazenado em alíquotas em água destilada, a 20 °C, e no momento do uso, diluído em salina estéril e administrado sempre por via oral (p.o, 2 mL), por meio de sonda gástrica, imediatamente antes da

injeção i.pl. de PGE_2 ou no 14° dia após a ligadura do nervo isquiático. Foram determinadas as doses efetivas 90% em animais machos e fêmeas. A dose efetiva 90% foi escolhida uma vez que esta dose vem sendo utilizada em machos, nos ensaios pré-clínicos. Animais tratados com salina (2 mL, p.o.) foram utilizados como controles.

3.8.2 Morfina

A morfina (sulfato de morfina, Protequim Brasil), utilizada como controle positivo em alguns dos experimentos, foi dissolvida em solução de salina estéril e administrada por via s.c. (5 mg/kg), 60 minutos antes da avaliação da sensibilidade dolorosa, ou ainda, administrada por via i.pl (6 µg /pata) nos estudos referentes à participação da PI_3K. Animais tratados com salina (50 µL, via s.c. ou i.pl.) foram utilizados como controles.

3.8.3 Antagonistas de receptores opióides

Para caracterizar o tipo de receptor opióide envolvido no efeito antinociceptivo da crotalfina, em animais machos e fêmeas, foram utilizados: CTOP (Sigma-Aldrich Co., EUA), antagonista seletivo de receptor *mu*, dissolvido em água destilada e administrado por via i.pl. (20 µg/pata), nor–BNI (Sigma-Aldrich Co. EUA), antagonista seletivo de receptor *kappa*, dissolvido em salina e administrado por via i.pl. (50 µg/pata); ICI 174, 864 (Sigma-Aldrich Co. EUA), antagonista seletivo de receptores *delta*, dissolvido em água destilada e administrado por via i.pl. (10 µg/pata) (PICOLO e CURY, 2004). Todos os antagonistas foram injetados imediatamente após a administração oral de crotalfina. Animais tratados com salina (50 µL, via i.pl.) foram utilizados como controle.

3.8.4 Inibidor da PI_3K

Uma vez que dados da literatura têm mostrado o envolvimento da fosfoinositídeo-3-kinase (PI_3K) no efeito analgésico periférico da morfina (CUNHA et al., 2010), o envolvimento desta quinase no efeito das crotalfina foi presentemente

investigado. Para tanto, foi utilizado o wortmannin (Sigma Chemical Co., EUA), inibidor irreversível desta quinase. O wortmannin foi diluído em solução de DMSO 2% em salina e então administrado via i.pl. (3 ou 9 µg/pata) 90 minutos após a injeção de PGE_2 (CUNHA et al., 2010). Animais tratados com veículo (salina + DMSO 2%, 50 µL, via i.pl.) foram utilizados como controle.

3.8.5 Hormônios esteroidais

Para avaliar a possível interferência de hormônios esteroidais gonadais no limiar nociceptivo e na resposta à crotalfina, fêmeas castradas foram submetidas a regime de reposição hormonal. O cipionato de estradiol (17- B estradiol; Sigma-Aldrich Co., EUA), 5 µg em 0,2 mL de veículo (óleo vegetal), foi administrado por 4 dias consecutivos (via s.c.), sempre às 9 horas, a partir do 11° dia após a ovariectomia, imediatamente após a coleta do lavado vaginal. No 14° dia após a ovariectomia, foi também administrada progesterona (Sigma-Aldrich Co., EUA), 2,5 mg em 0,2 mL de veículo (óleo vegetal), às 10 horas da manhã. Os experimentos foram realizados neste dia, equivalente ao Proestro. Fêmeas castradas tratadas com óleo vegetal via s.c., foram utilizadas como controle (HELENA; FRANCI; ANSELMO-FRANCI, 2002).

3.9 Avaliação *in vitro* da expressão de receptores opióides

Para investigar possíveis diferenças entre os sexos, em relação à expressão dos receptores opióides, foi utilizada técnica de ELISA em *slice* (em nervo da pata). Para tanto, animais tratados com prostaglandina E_2 foram anestesiados com solução de quetamina e xilazina (1:1) e submetidos à perfusão com paraformaldeído 4%. O nervo da pata foi extraído e conservado em paraformaldeído 4% (PFA) por 4 horas e então, em sacarose por no mínimo 48 horas, em geladeira.

Após este período, os tecidos foram emblocados em “tissue freezing medium” (TBS®), foram realizados cortes de 14 µm, em criostato (Leica LM 500, Alemanha). As fatias de tecido foram colocadas em lâminas para microscopia e então isoladas por uma barreira hidrofóbica (Vector Laboratories, Inc., CA), resultando em poços de

200 µL na própria lâmina. O material foi bloqueado em solução de sacarose e albumina bovina sérica (BSA), em tampão fosfato salina (PBS), para minimizar ligações inespecíficas dos anticorpos, e então, incubado *overnight* com anticorpos primários anti- receptores *mu*, *delta* (Sigma-Aldrich, Co.) ou *kappa* (Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:1000, para avaliação da expressão de receptores totais. Após este período, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS e então incubadas com anticorpos secundários específicos conjugado à peroxidase (1:1000, Sigma-Aldrich, Co., EUA), por 2 horas. O produto da reação foi transferido para placas de 96 poços e a absorbância determinada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 450 nm.

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de teste estatístico t de Student, para comparação das médias dos grupos experimentais. Para comparação de médias de mais de 2 grupos experimentais, foi utilizada ANOVA de duas vias. Os testes foram realizados por meio da utilização de software GraphPad Prism versão 5.0. O índice de significância para os resultados obtidos foi de $p<0,05$.

4 Resultados

4.1 Determinação do limiar nociceptivo de ratos machos e fêmeas e avaliação da influência das fases do ciclo estral neste limiar

Para verificar as possíveis diferenças no limiar nociceptivo basal entre machos e fêmeas, os animais foram submetidos ao teste de pressão de patas. Os resultados mostraram que a força (em gramas) necessária para a indução de retirada da pata nas fêmeas, é significativamente menor do que em machos (Figura 8 A), indicando que as fêmeas são mais sensíveis à estimulação nociceptiva mecânica.

Ainda, com o intuito de avaliar a possível interferência das fases do ciclo estral no limiar nociceptivo, fêmeas foram submetidas à coleta do conteúdo vaginal (Figura 8 B) imediatamente antes da realização do teste de pressão de patas. Para a análise dos resultados, os animais foram separados em Proestro, Estro, Metaestro e Diestro, de acordo com o descrito em Material e Métodos (item 3.6). Não foram observadas diferenças significativas no limiar nociceptivo basal das fêmeas, nas diferentes fases do ciclo estral (Figura 8 B).

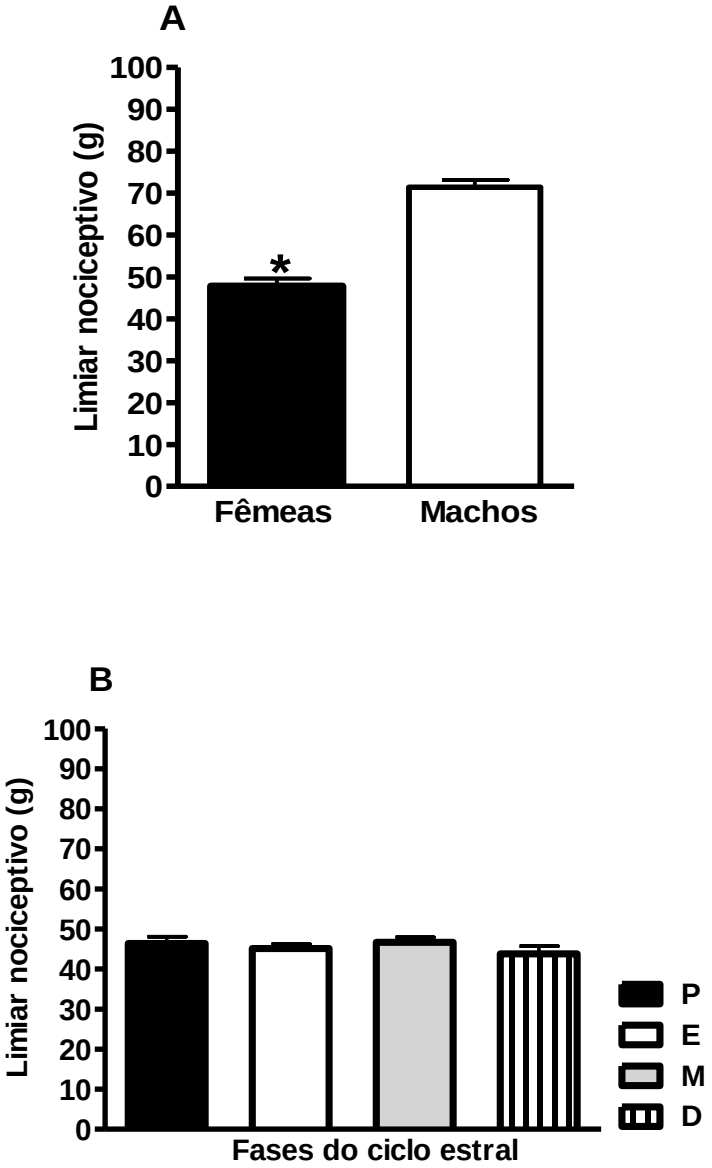


Figura 8 - Determinação do limiar nociceptivo de ratos machos e fêmeas (A) e avaliação da influência das fases do ciclo estral de fêmeas (B) neste limiar. O limiar nociceptivo, representado pela força (em gramas) necessária para a indução de retirada da pata, foi determinado no teste de pressão de patas de ratos. Fêmeas foram submetidas à coleta do conteúdo vaginal e separadas em Proestro (P), Estro (E), Metaestro (M) e Diestro (D). Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *$p<0,05$ por comparação com os machos.

4.2 Detecção do limiar de resposta à estimulação tátil (filamentos de von Frey) de ratos machos e fêmeas e avaliação da influência das fases do ciclo estral nesta resposta

Para verificar as possíveis diferenças na resposta à estimulação tátil entre ratos machos e fêmeas, foram utilizados os filamentos de von Frey. Não foram observadas diferenças significativas na intensidade de estímulo necessária para a indução de retirada da pata, entre animais fêmeas e machos (Figura 9 A).

Com o intuito de verificar se as fases do ciclo estral interferem no limiar de resposta à estimulação tátil, fêmeas foram submetidas à coleta do conteúdo vaginal imediatamente antes da realização do teste de von Frey. Para a análise dos resultados, os animais foram separados em Proestro, Estro, Metaestro e Diestro, de acordo com o descrito em Material e Métodos (item 3.6). Nas fêmeas em proestro e metaestro, a força necessária para indução de retirada da pata foi significativamente menor em relação aos valores observados nas fêmeas em estro e diestro (Figura 9 B).

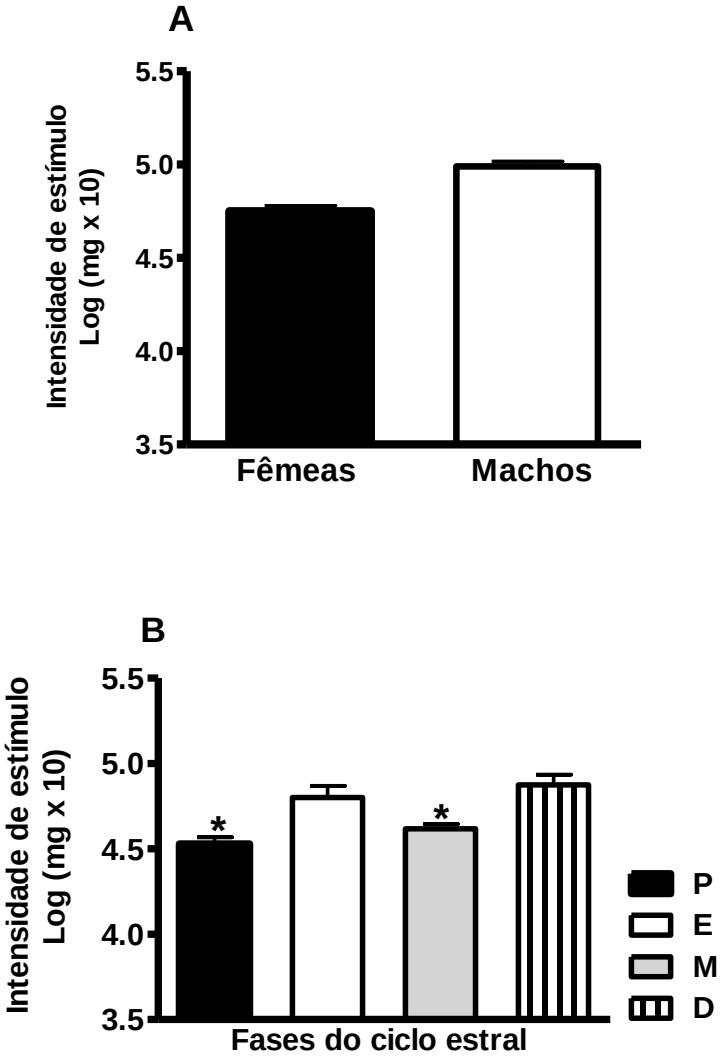


Figura 9 - Detecção do limiar de resposta à estimulação tátil (filamentos de von Frey) de ratos machos e fêmeas (A) e avaliação em fêmeas, da influência das fases do ciclo estral nesta resposta (B). O limiar de resposta ao estimulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em log (mgx10) necessária para induzir a retirada da pata (A, B). Fêmeas foram submetidas à coleta do conteúdo vaginal e separadas em Proestro (P), Estro (E), Metaestro (M) e Diestro (D) (Figura 9 B). Os dados representam a média ± e.p.m. de 10 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o estro e diestro.

4.3 Caracterização da hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2) em ratos machos e fêmeas

A administração de PGE_2 (i.pl., 50, 100 e 150 ng/pata) acarretou, nas fêmeas (Figura 10 A), diminuição significativa do limiar nociceptivo, na 3ª hora após a injeção. Não houve diferença significativa na intensidade da resposta entre as 3 doses. Nos machos (Figura 10 B), o efeito hipernociceptivo de PGE_2 foi observado a partir da dose de 100 ng/pata, não havendo diferenças significativas na intensidade de resposta entre as doses de 100 e 150 ng/pata (Figura 10 B). Salina, injetada por via i.pl., não acarretou alterações significativas no limiar nociceptivo nos animais machos e fêmeas, durante todo o período de observação (Figura 10). Baseado nestes resultados, foi escolhida a dose de 100 ng/pata de PGE_2 para os estudos subseqüentes. Neste experimento, a porcentagem de queda do limiar nociceptivo, em relação à medida basal, para esta dose, foi de 26% para fêmeas e 27% para machos, na 3ª h após a administração do eicosanóide.

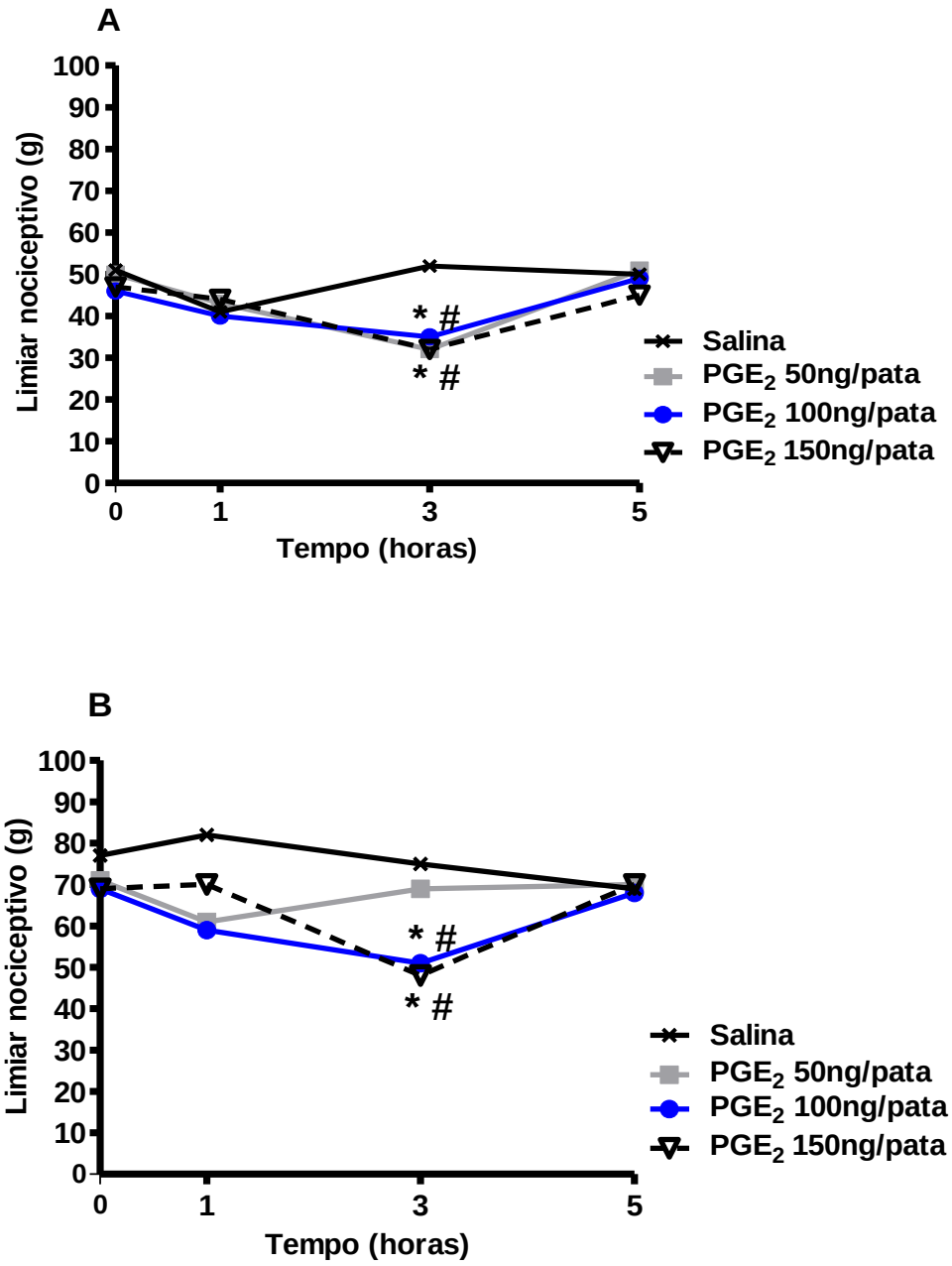


Figura 10- Caracterização da hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2) em ratos fêmeas (A) e machos (B). O limiar de dor, representado pela força (em gramas) necessária para a indução de retirada da pata, foi determinado no teste de pressão da pata de ratos aplicado antes (tempo 0) e 1, 3 e 5 h após a injeção intraplantar de PGE_2 (50, 100 e 150 ng/pata) ou salina (grupo controle). Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *$p<0,05$ por comparação com a medida basal e $^{\#}p<0,05$ por comparação com o grupo controle.

4.4 Efeito da crotalfina sobre a hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 em ratos machos e fêmeas

Os animais foram tratados p.o. com crotalfina (CRF) (0,008; 0,04; 0,2; 1 e 5 µg/kg) ou salina (controle), imediatamente antes da administração i.pl. de PGE_2. A crotalfina inibiu, em ratos fêmeas (Figura 11 A) e machos (Figura 11 B), a hipernocicepção induzida por PGE_2. Para as fêmeas, esta inibição foi significativa a partir da dose de 0,008 µg/kg (Figura 11 A) e para os machos, a partir da dose de 0,04 µg/kg (Figura 11 B). Ainda, nas fêmeas, a dose de 0,2 µg/kg, além de reverter a hipernocicepção, acarretou aumento do limiar nociceptivo dos animais em relação à medida basal (Figura 11 A), enquanto que nos machos, este aumento foi observado para a dose de 5 µg/kg (Figura 11 B). A dose efetiva 90% para as fêmeas foi de 0,07 µg/kg, e para os machos, foi de 1,8 µg/kg. Estes dados apontam para a maior efetividade da crotalfina em ratos fêmeas, neste modelo de hipernocicepção.

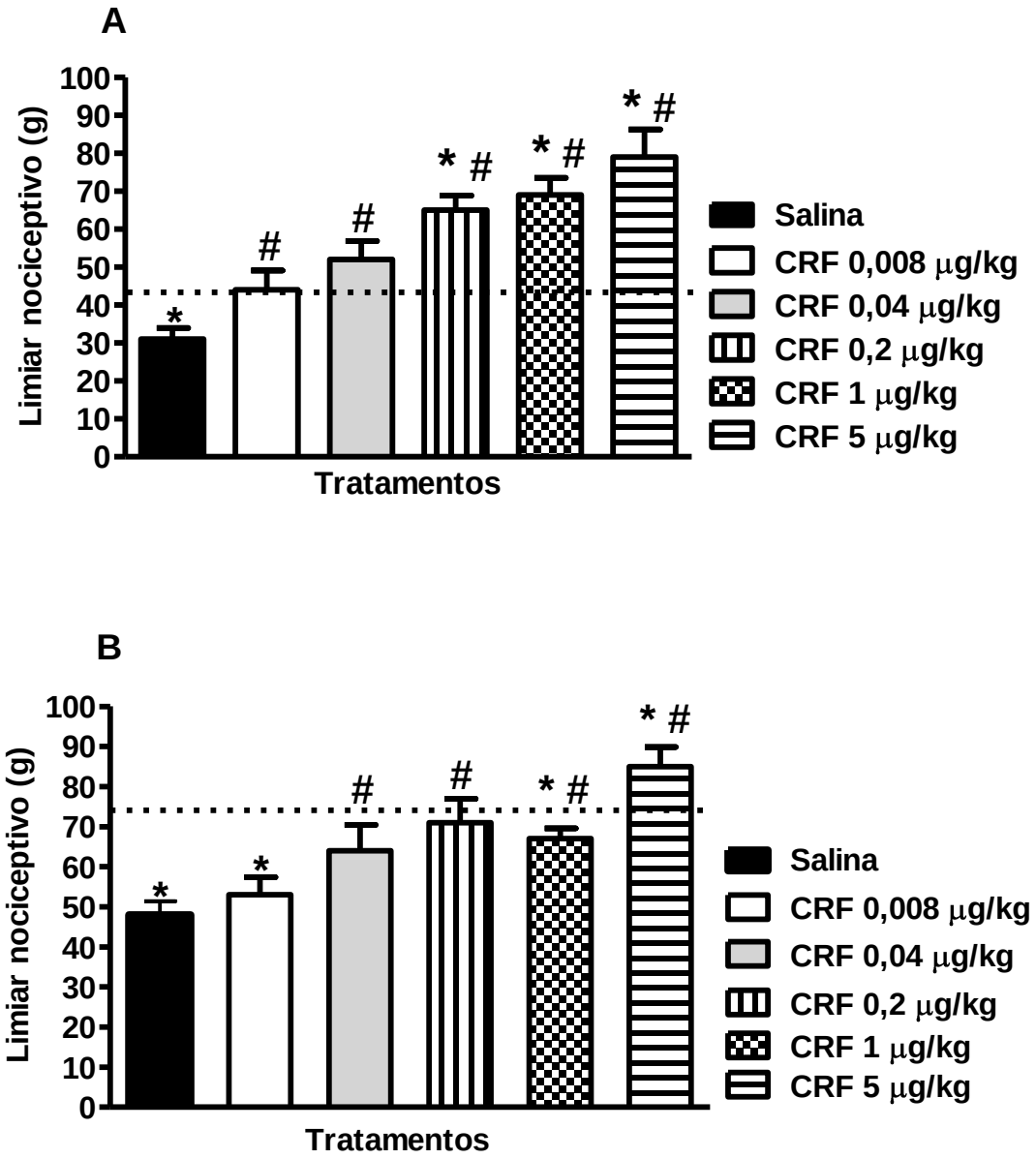


Figura 11- Efeito da crotalfina sobre a hipernocicepção induzida por PGE_2 em ratos fêmeas (A) e machos (B). O limiar de dor, representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata, foi determinado antes (linha tracejada, medida inicial) e 3 h após a injeção i.pl. de PGE_2 (100 ng/pata – 50 µL), utilizando o teste de pressão da pata. A crotalfina (0,008; 0,04; 0,2; 1 e 5 µg/kg) ou salina (grupo controle) foram administradas p.o., imediatamente antes da PGE_2. A linha tracejada representa a média dos valores basais obtidos antes de qualquer tratamento. A dose efetiva 90%, calculada pelo programa Curve Expert, foi de 0,07 µg/kg para as fêmeas e de 1,8 µg/kg para os machos. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. $^{*}p<0,05$ por comparação com a medida basal (linha tracejada) e $^{\#}p<0,05$ por comparação com o grupo controle.

4.5 Determinação da influência do ciclo estral no efeito antinociceptivo da crotalfina, no modelo de hipernocicepção induzida por PGE_2.

Com o intuito de verificar se as fases do ciclo estral interferem com o efeito antinociceptivo da crotalfina, fêmeas foram submetidas à coleta do conteúdo vaginal imediatamente antes da administração p.o do peptídeo. As fêmeas foram submetidas ao teste de pressão de patas antes e após indução da hipernocicepção por PGE_2. Para a análise dos resultados, os animais foram separados em Proestro, Estro, Metaestro e Diestro. Não foram observadas diferenças significativas do efeito antinociceptivo da crotalfina, nas diferentes fases do ciclo estral (Figura 12).

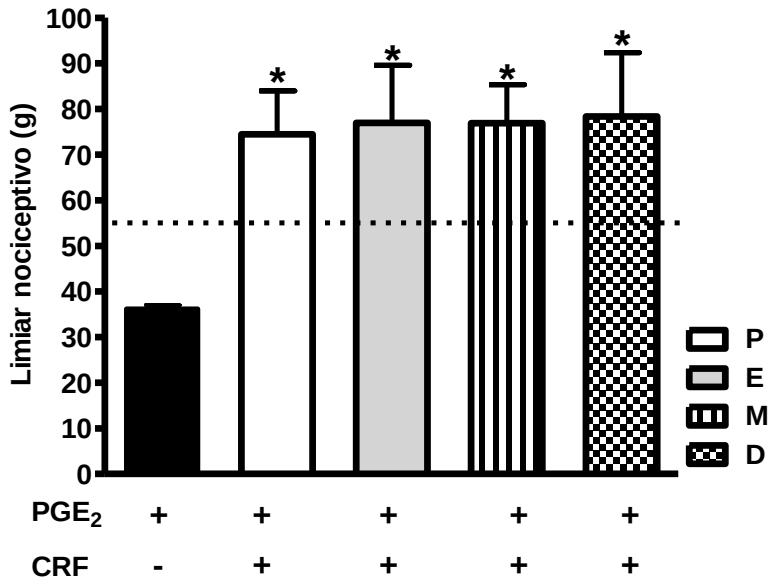


Figura 12- Avaliação da influência das fases do ciclo estral de fêmeas no efeito antinociceptivo da crotalfina no modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2). O limiar nociceptivo, representado pela força (em gramas) necessária para a indução de retirada da pata, foi determinado no teste de pressão de patas de ratos. A hipernocicepção foi induzida pela injeção intraplantar de PGE_2 (100 ng/pata). A crotalfina (5 µg/kg, p.o., barras) ou salina (controle, linha tracejada) foram administradas imediatamente antes da injeção de PGE_2. Fêmeas foram submetidas à coleta do conteúdo vaginal, imediatamente antes dos tratamentos e separadas em Proestro, Estro, Metaestro e Diestro. Os dados referentes à hipernocicepção induzida por PGE_2 estão representados em uma única barra, uma vez que não foi detectada diferenças na hipernocicepção, nas diferentes fases do ciclo estral. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *$p<0,05$ em comparação com grupo tratado com prostaglandina E_2.

4.6 Determinação da duração do efeito antinociceptivo da crotalfina em ratos machos e fêmeas no modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2

Para este estudo, foram utilizadas 3 doses de crotalfina: a) a menor dose capaz de reverter a hipernocicepção causada pela PGE_2, isto é, 0,008 µg/kg para fêmeas e 0,2 µg/kg para machos; b) a DE90 - 0,07 µg/kg para fêmeas e 1,8 µg/kg para machos e c) a dose de 5 µg/kg. Esta dose foi utilizada tanto em ratos machos quanto em fêmeas, pois foi a dose capaz de induzir em ambos os sexos, aumento do limiar nociceptivo em relação à medida basal. Neste estudo, a prostaglandina foi injetada, por via i.pl. imediatamente após ou 3, 24, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 h após a administração da crotalfina. Para cada tempo, foram utilizados grupos distintos de animais. O teste de pressão de patas, utilizado para a determinação da hipernocicepção, foi aplicado antes de qualquer tratamento e 3 h após a injeção de PGE_2.

Os resultados apresentados na Figura 13 mostram que o efeito antinociceptivo da crotalfina foi detectado, nas fêmeas, até 144 h após sua administração, para a dose de 5 µg/kg, e até 72 h para as demais doses (Figura 13 A). Nos machos, este efeito foi observado até a 3ª hora após a administração da dose de 0,2 µg/kg e por um período de 120 h para as demais doses (Figura 13 B).

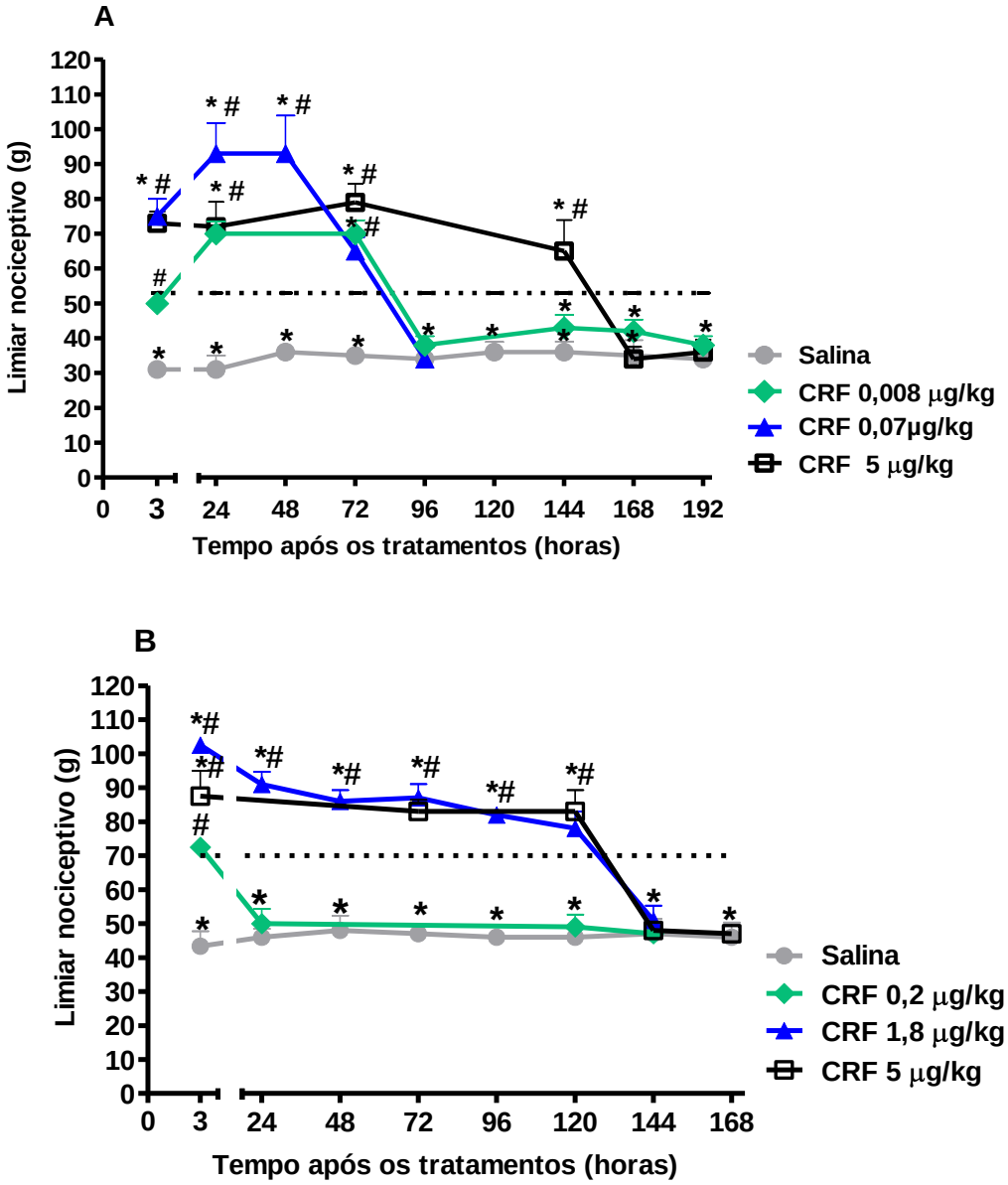


Figura 13 - Determinação da duração do efeito antinociceptivo da crotalfina em ratos fêmeas (A) e machos (B) no modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2. O limiar de dor, representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata, foi determinado utilizando o teste de pressão de patas, aplicado antes (linha tracejada) e 3 h após a injeção i.pl. de PGE_2 (100 ng/pata – 50 µL). A crotalfina (CRF) foi administrada, por via oral (0,008, 0,07 e 5 µg/kg em fêmeas e 0,2, 1,8 e 5 µg/kg em machos). Grupos controles foram constituídos por animais tratados com salina por via oral. A prostaglandina foi injetada imediatamente após ou 3, 24, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 h após a administração da crotalfina. Para cada tempo, foram utilizados grupos distintos de animais. A linha tracejada representa a média dos valores basais obtidos antes de qualquer tratamento. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *$p<0,05$ por comparação com a medida basal (linha tracejada) e $^{\#}p<0,05$ por comparação com o grupo controle.

4.7 Efeito da morfina sobre a hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 em ratos machos e fêmeas

Os animais foram tratados por via s.c. com morfina (0,008; 0,04; 0,2; 1 e 5 mg/kg), utilizada como controle positivo, ou salina (controle), 2 h após a administração i.pl. de prostaglandina E_2. A morfina reverteu, em fêmeas (Figura 14 A) e machos (Figura 14 B), a diminuição do limiar nociceptivo induzida pela PGE_2. Em ambos os sexos, esta inibição foi significativa a partir da dose de 0,008 mg/kg de morfina (Figura 14). Ainda, em fêmeas, as doses de 1 e 5 mg/kg causaram aumento do limiar nociceptivo dos animais, em relação à medida basal (Figura 14 A), enquanto que para os machos, este aumento foi detectado apenas para a dose de 5mg/kg (Figura 14 B).

Estes dados apontam para a maior efetividade da morfina em fêmeas, neste modelo de hipernocicepção.

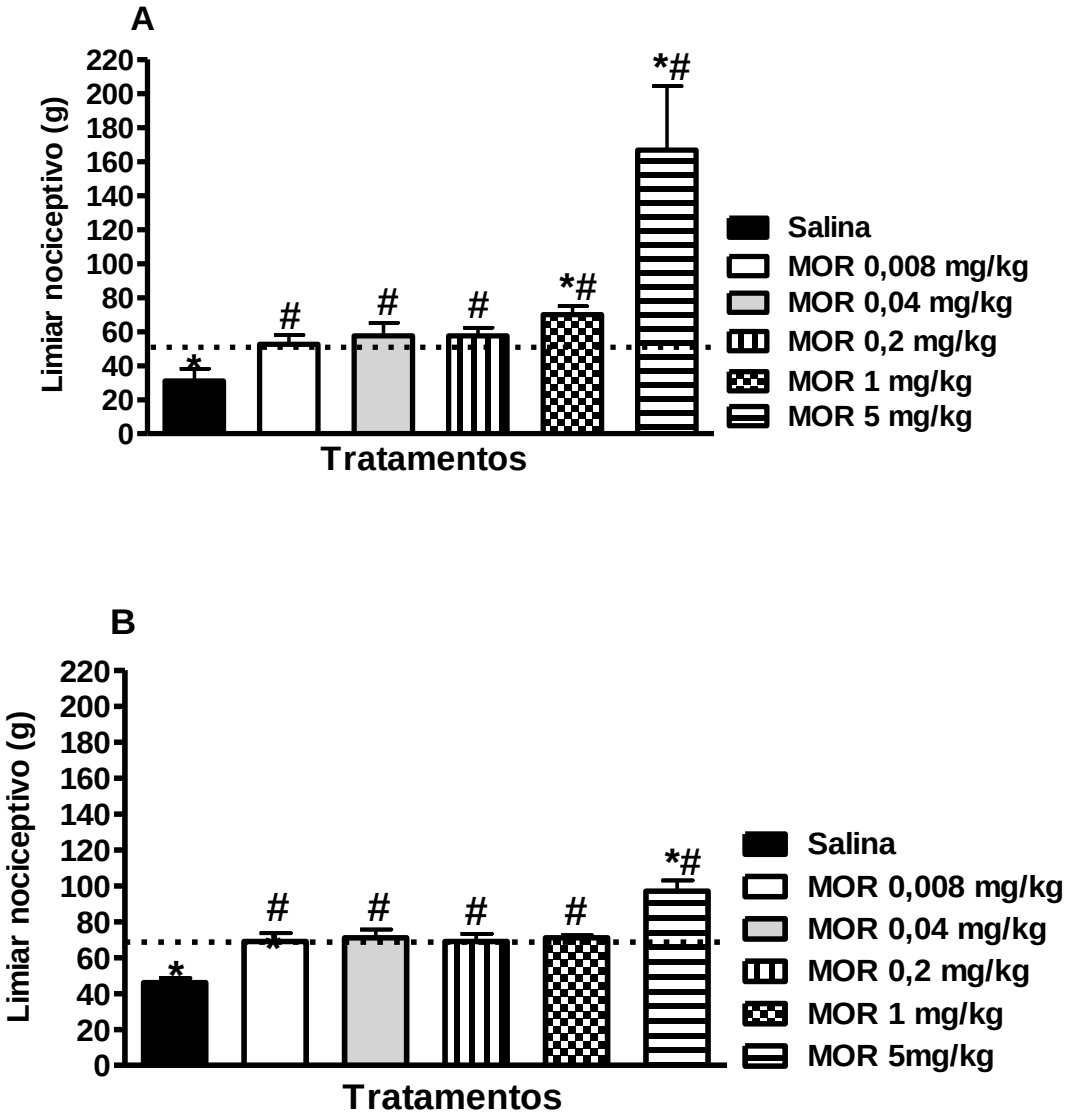


Figura 14- Efeito da morfina sobre a hipernocicepção induzida por PGE_2 em ratos fêmeas (A) e machos (B). O limiar de dor, representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata, foi determinado antes (linha tracejada) e 3 h após a injeção i.pl. de PGE_2 (100 ng/pata – 50 µL), utilizando o teste de pressão da pata. A morfina (0,008; 0,04; 0,2; 1 e 5 mg/kg - 200 µL) ou salina (grupo controle) foram administradas, s.c., 2 h após a PGE_2. A linha tracejada representa a média dos valores basais obtidos antes de qualquer tratamento. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *$p<0,05$ por comparação com a medida basal e $^{\#}p<0,05$ por comparação com o grupo controle.

4.8 Efeito da morfina sobre a atividade motora de ratos fêmeas

Dados anteriores de nosso laboratório indicam que em ratos machos, doses de morfina superiores a 5 mg/kg acarretam alterações da atividade locomotora dos animais, avaliada no teste do Campo Aberto (GUTIERREZ, 2005). Com o intuito de verificar se a morfina, nas doses presentemente utilizadas, é capaz de acarretar alterações na atividade motora de ratos fêmeas, o que poderia interferir com a resposta dos animais nos testes de avaliação da sensibilidade nociceptiva, avaliou-se a freqüência de locomoção e levantar destes animais, utilizando o teste do Campo Aberto. As fêmeas foram tratadas com morfina (2,5 e 5 mg/kg) ou salina (grupo controle) e a freqüência de locomoção (Figura 15 A) e de levantar (Figura 15 B) determinada 1 hora após os tratamentos. Os resultados demonstram que a morfina, nas doses utilizadas, não alterou significativamente ambas as freqüências, quando comparado ao grupo controle, indicando que nestas doses, o opióide não interfere com a atividade locomotora dos animais.

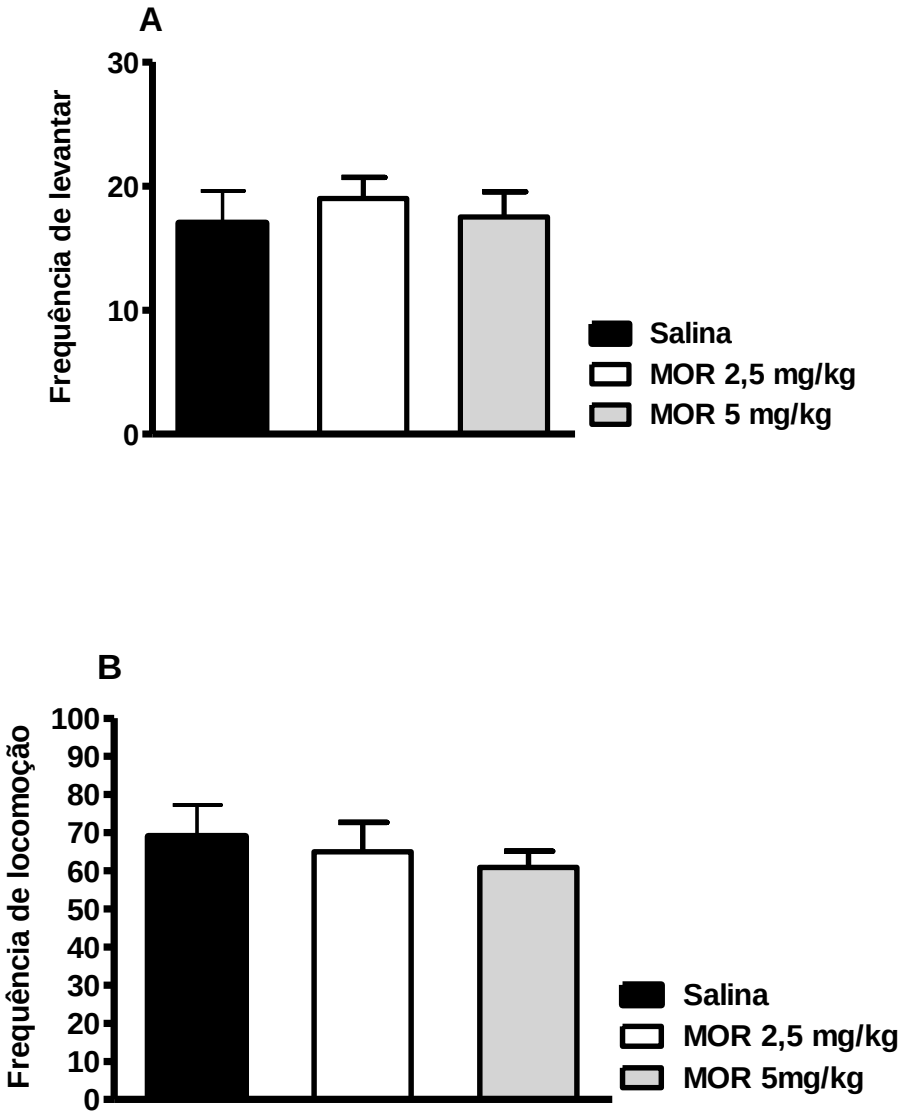


Figura 15- Efeito da morfina sobre a atividade motora de ratos fêmeas. As freqüências de levantar (A) e locomoção (B) foram avaliadas no teste do Campo Aberto, por um período de 3 minutos de observação, 1 hora após a administração s.c. de morfina ou salina (grupo controle). Os dados representam a média ± e.p.m. de 10 animais por grupo.

4.9 Efeito da crotalfina sobre a atividade motora de ratos fêmeas

Com o intuito de verificar se a crotalfina é capaz de acarretar alterações na atividade motora de fêmeas, o que poderia interferir com a resposta dos animais nos testes de avaliação da sensibilidade nociceptiva, determinou-se a freqüência de locomoção e levantar destes animais, utilizando o teste do Campo Aberto. A crotalfina foi administrada p.o. nas doses de 0,07 µg/kg (DE 90%) ou 5 µg/kg, 3 horas antes do teste do Campo Aberto.

Os resultados demonstram que a crotalfina não alterou a freqüência de levantar (Figura 16 A) e de locomoção (Figura 16 B) das fêmeas, em relação aos animais tratados com salina (controle). Cabe ressaltar que para os machos, estudos anteriores não detectaram alteração de atividade locomotora após o tratamento com a crotalfina (GUTIERREZ et al., 2008).

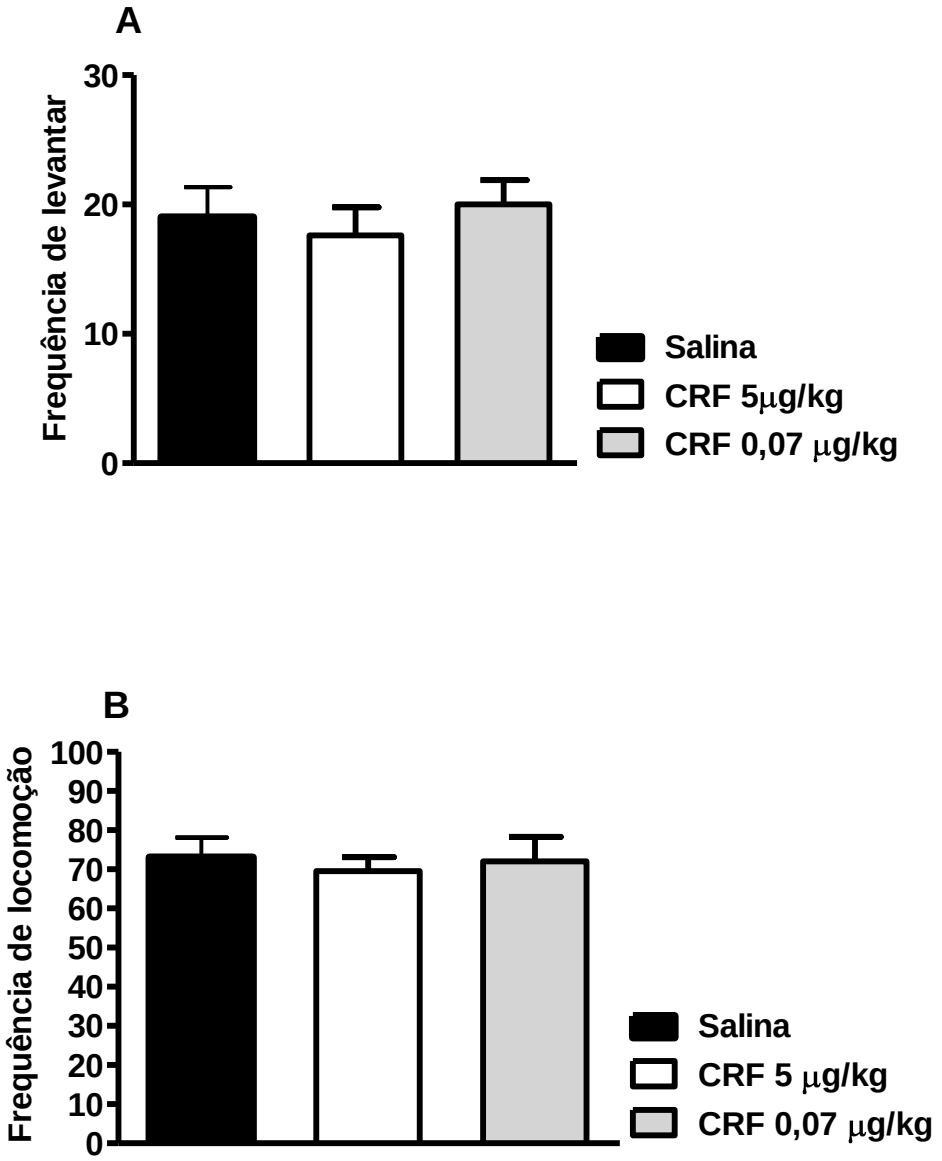


Figura 16- Efeito da crotalfina sobre a atividade motora de ratos fêmeas. As freqüências de Levantar (A) e Locomoção (B) foram avaliadas no Campo Aberto, por um período de 3 minutos de observação, 3 horas após a administração p.o. de crotalfina ou salina (grupo controle). Os dados representam a média ± e.p.m. de 10 animais por grupo.

4.10 Determinação do envolvimento de receptores opióides no efeito antinociceptivo da crotalfina, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2

Baseado nos dados obtidos até o momento e nos estudos anteriores realizados em machos, nos quais sempre foi utilizada a dose de crotalfina capaz de, além de reverter a hipernocicepção, aumentar o limiar nociceptivo em relação à medida basal (KONNO et al., 2008; GUTIERREZ, 2011, em fase de elaboração), foi presentemente utilizado, nos estudos dos mecanismos envolvidos no efeito da crotalfina, a dose de 5 µg/kg do peptídeo.

Para avaliação do envolvimento de receptores opióides no efeito antinociceptivo da crotalfina, foram utilizados antagonistas seletivos de receptores do tipo *mu* (CTOP); *kappa* (nor-BNI) e *delta* (ICI - 174,864). A injeção i.pl. de nor-BNI (50 µg/pata) reverteu, em fêmeas (Figura 17 A) e machos (Figura 17 B), o efeito antinociceptivo da crotalfina. Por outro lado, a injeção intraplantar de CTOP (20 µg/pata) ou de ICI - 174,864 (10 µg/pata), não interferiu com o efeito do peptídeo nestes animais. Os antagonistas *per se* não interferiram com a hipernocicepção causada pela prostaglandina E_2 (*Fêmeas: sal + CTOP = 35 g ± 2.74; sal + ICI = 34 g ± 1.9; sal + Nor= 33 g ± 2.48; Machos: sal + CTOP = 47 g ± 3.58; sal + ICI = 41g ± 1.8; sal + Nor = 46 g ± 2.38*).

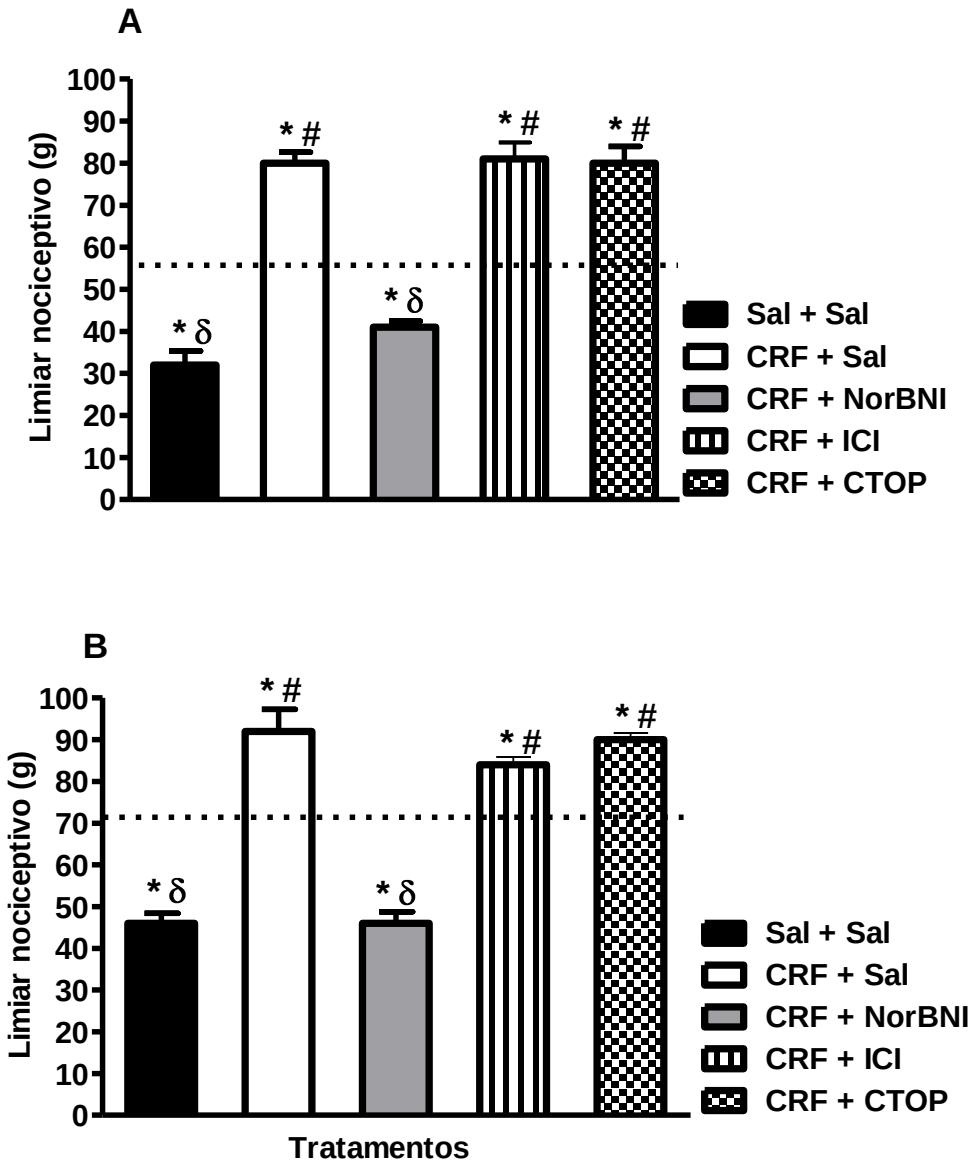


Figura 17- Envolvimento de receptores opióides no efeito antinociceptivo da crotalfina, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2, em fêmeas (A) e machos (B). O limiar de dor, representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata, foi determinado antes (linha tracejada, média das medidas basais) e 3 h após a injeção i.pl. de PGE_2 (100 ng/pata), utilizando o teste de pressão da pata. A crotalfina (CRF, 5 µg/kg) ou salina (Sal.) foram administradas p.o., imediatamente antes da PGE_2. O nor-BNI (50 µg/pata), CTOP (20 µg/pata), ICI 174,864 (10 µg/pata) ou salina (50 µL, via s.c.) foram injetados concomitantemente à PGE_2. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *$p<0,05$ por comparação com a medida basal (linha tracejada), $^{\#}p<0,05$ por comparação com o grupo salina, $^{\delta}p<0,05$ por comparação com o grupo CRF+ Sal.

4.11 Determinação do envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido pela crotalfina, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2

Uma vez determinado o subtipo de receptor opióide envolvido na ação antinociceptiva da crotalfina, o próximo passo foi caracterizar as vias de sinalização intracelulares subsequentes à ativação do receptor opióide. Uma vez que dados da literatura têm indicado haver participação da via da fosfoinositídeo - 3 quinase (PI_3K) no efeito da morfina (CUNHA et al., 2010), investigamos se esta quinase estaria também envolvida na ação da crotalfina. Para tanto, foi utilizado inibidor desta quinase, o wortmannin (3 ou 9 µg/kg – 50 µL, diluída em DMSO 2%).

Conforme apresentado na Figura 18, a administração intraplantar de PGE_2 causou, em ratos machos e fêmeas, hipernocicepção, determinada na 3ª hora após o tratamento (Figura 18 A e B), a qual foi revertida pela administração oral de crotalfina (5 µg/kg). O pré tratamento com o inibidor da PI_3K não interferiu com o efeito antinociceptivo da crotalfina (Figura 18 A e B). O WTT *per se* não interferiu com a hipernocicepção induzida pela PGE_2 (*Fêmeas: WTT + PGE_2 = 36 g ± 5.8; WTT + Sal. = 52 g ± 2,5; Machos: WTT + PGE_2 = 40 g ± 1,6; WTT + Sal. = 63 g ± 3,74)*

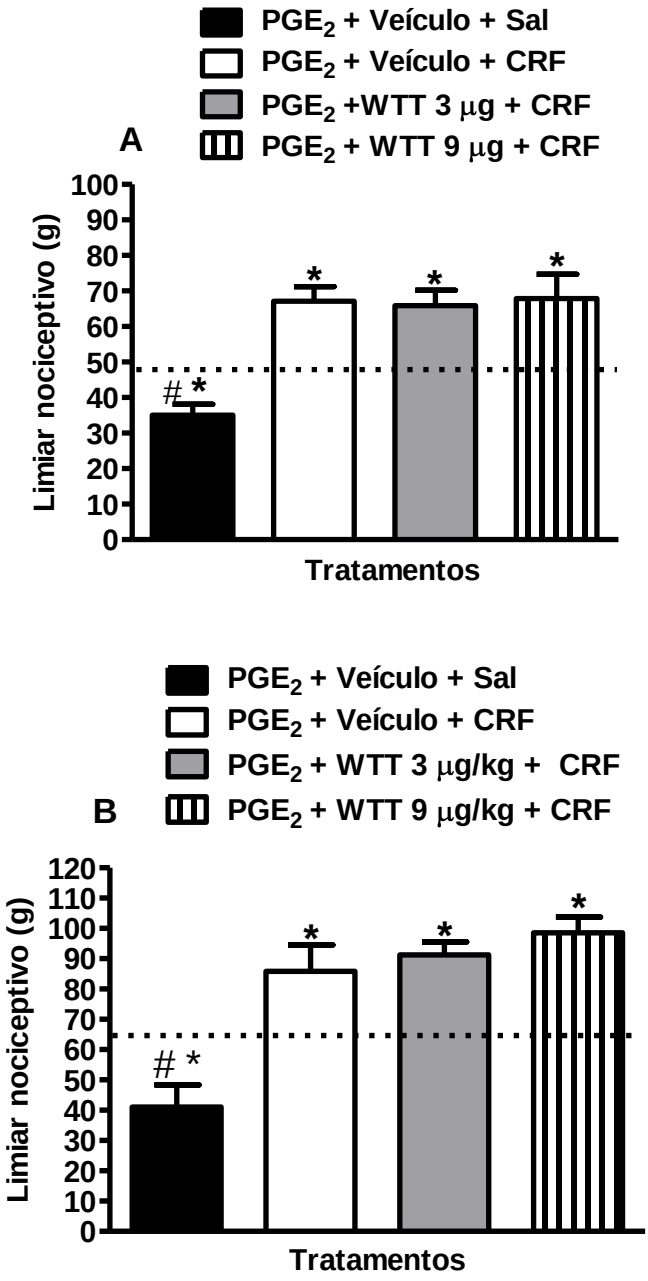
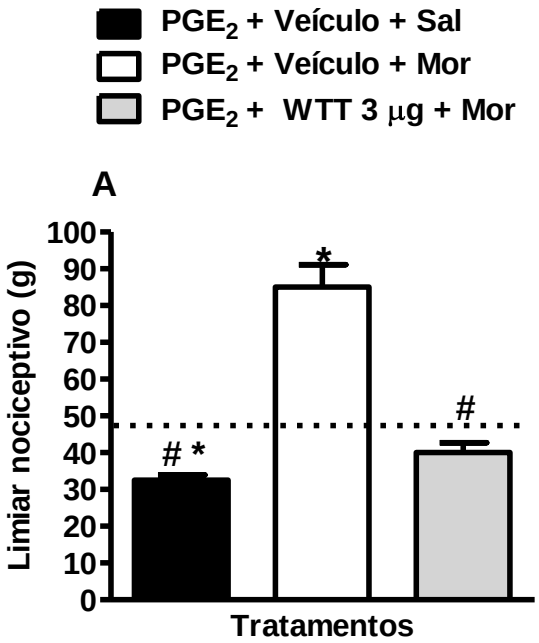


Figura 18- Envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido por crotalfina, na vigência de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 em fêmeas (A) e machos (B). O limiar de dor, representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata, foi determinado antes (linha tracejada, média das medidas basais) e 3 h após a injeção i.pl. de PGE_2 (100 ng/pata- 50 µL), em ratos fêmeas (A) e machos (B), utilizando o teste de pressão da pata. O WTT (3 e 9 µg/kg) ou o veículo (DMSO 2 % em salina – 50 µL/ pata) foram administrados 90 min. após a PGE_2. Crotalfina (CRF, 5 µg/kg – 2 mL, p.o.) ou salina (Sal., 2 mL, p.o.) foram administradas 30 minutos após o WTT ou veículo. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. $^{*}p<0,05$ por comparação com a medida basal (linha tracejada) e $^{\#}p<0,05$ por comparação com o grupo veículo + crotalfina.

4.12 Determinação do envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido por morfina, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2

Uma vez que dados da literatura têm indicado haver participação de vias de sinalização intracelular dependentes da PI_3K no efeito antinociceptivo da morfina, em ratos machos (CUNHA et al., 2010), este opióide foi presentemente utilizado como controle positivo. Cabe ressaltar que os dados da literatura referem-se apenas a ratos machos. No presente estudo foi utilizado um inibidor irreversível desta quinase, o wortmannin (WTT), administrado por via i.pl., na dose de 3 µg/kg, em ratos fêmeas (Figura 19 A) e machos (Figura 19 B).

Os dados apresentados na Figura 19 mostram que a injeção intraplantar de PGE_2 causou hipernocicepção em fêmeas (Figura 19 A) e machos (Figura 19 B), a qual foi revertida pela administração de morfina (6 µg/pata). O pré-tratamento com WTT reverteu o efeito antinociceptivo da morfina, confirmando o envolvimento desta quinase na ação deste opióide. O WTT *per se* não interferiu com a hipernocicepção induzida pela PGE_2 (*Fêmeas: WTT + PGE_2 = 35 g ± 1.8; WTT + Sal. = 45 g ± 1,2; Machos: WTT + PGE_2 = 45 g ± 1,9; WTT + Sal. = 65 g ± 2,8).*



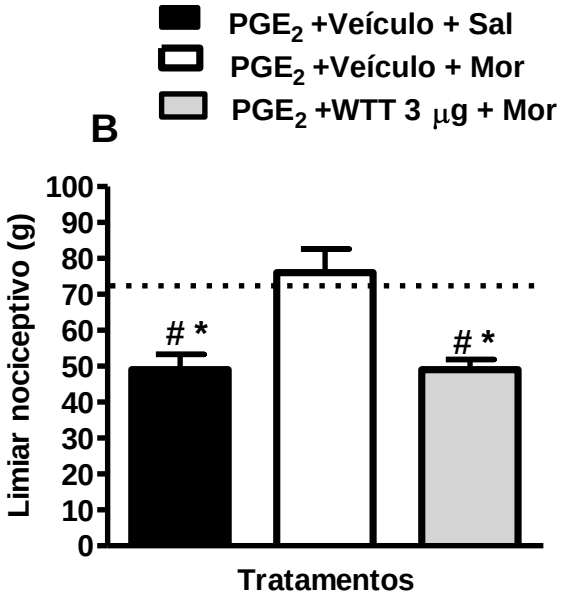


Figura 19- Envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido por morfina, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2 em fêmeas (A) e machos (B). O limiar de dor, representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata, foi determinado antes (linha tracejada, média das medidas basais) e 3 h após a injeção i.pl. de PGE_2 (100 ng/pata), utilizando o teste de pressão da pata em ratos fêmeas (A) e machos (B). O WTT (3 µg/kg) e o veículo (DMSO 2 % em salina – 50 µL/ pata) foram administrados 90 min. após a PGE_2. Morfina (Mor, 6 µg/kg, i.pl. – 50 µL) ou salina (Sal.; i.pl. – 50 µL) foram administradas 30 minutos após o WTT ou veículo. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. $^{*}p<0,05$ por comparação com a medida basal e $^{\#}p<0,05$ por comparação com o grupo veículo + morfina.

4.13 Determinação do envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido por U50488, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2

Uma vez que o efeito antinociceptivo da crotalfina, em modelo de hipernocicepção induzida por PGE_2 é mediado por receptores do tipo *kappa*, o próximo passo foi investigar se há ou não participação da PI_3K no efeito do U50488, um agonista de receptores opióides do tipo *kappa*. Para tanto foi também utilizado o wortmannin (WTT), administrado por via i.pl., na dose de 3 µg/kg, em ratos machos (Figura 20).

A administração intraplantar de PGE_2 causou hipernocicepção nos animais, a qual foi revertida pela administração intraplantar do U50488 (10 µg/pata). O pré-tratamento com WTT reverteu o efeito antinociceptivo do U50488, evidenciando o envolvimento desta quinase na ação deste agonista (Figura 20). O WTT *per se* não interferiu com a hipernocicepção induzida pela PGE_2.

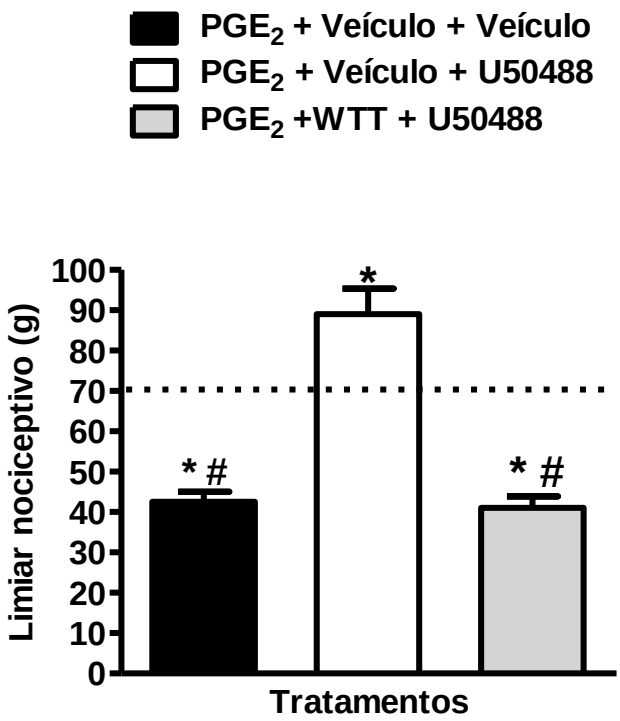


Figura 20- Determinação do envolvimento da PI_3K no efeito antinociceptivo induzido pelo U50488, na vigência de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 em machos. O limiar de dor, representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata, foi determinado antes (linha tracejada, média das medidas basais) e 3 h após a injeção i.pl. de PGE_2 (100 ng/pata), utilizando o teste de pressão da pata em ratos machos. O WTT (3 µg/kg) e o veículo (DMSO 2 % em salina – 50 µL/ pata) foram administrados 90 min. após a PGE_2. U50488 (10 µg/pata, i.pl. – 50 µL) ou veículo (DMSO 2 % em salina – 50 µL/ pata) foram administrados 30 minutos após o WTT ou veículo. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. $^{*}p<0,05$ por comparação com a medida basal e $^{\#}p<0,05$ por comparação com o grupo veículo + U50488.

4.14 Caracterização da dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático em ratos machos e fêmeas e avaliação da influência das fases do ciclo estral

A ligadura do nervo isquiático acarretou diminuição do limiar nociceptivo de ratos fêmeas (Figura 21 A) e machos (Figura 21 C), em relação à medida basal, caracterizando o fenômeno de hipernocicepção. Este fenômeno foi detectado na 24ª h após a cirurgia e se manteve pelo menos, até o 14° dia do pós-operatório. A ligadura do nervo isquiático provocou também diminuição na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta de retirada da pata, quando comparado à medida basal (Figuras 21 B e D), caracterizando o fenômeno de alodinia. Este fenômeno foi também detectado na 24° hora, mantendo-se por pelo menos até 14 dias após a cirurgia. Estes resultados indicam a presença de fenômenos nociceptivos persistentes, acarretados pela lesão nervosa periférica, caracterizando a dor neuropática. Não houveram diferenças significativas na queda do limiar nociceptivo entre machos e fêmeas (38% para machos e 35% para fêmeas) e na alodinia (9% para machos e 8% para fêmeas). Com o intuito de verificar se as fases do ciclo estral interferem nos fenômenos de hipernocicepção e alodinia produzidos pela constrição do nervo, fêmeas foram submetidas à coleta do conteúdo vaginal (Figura 22) no 14° dia após a constrição do nervo isquiático. Para a análise dos resultados, os animais foram separados em Proestro (P), Estro (E), Metaestro (M) e Diestro (D). Não foram observadas diferenças significativas no limiar de nocicepção (Figura 22 A) e na resposta ao estímulo tátil (Figura 22 B), nas diferentes fases do ciclo estral.

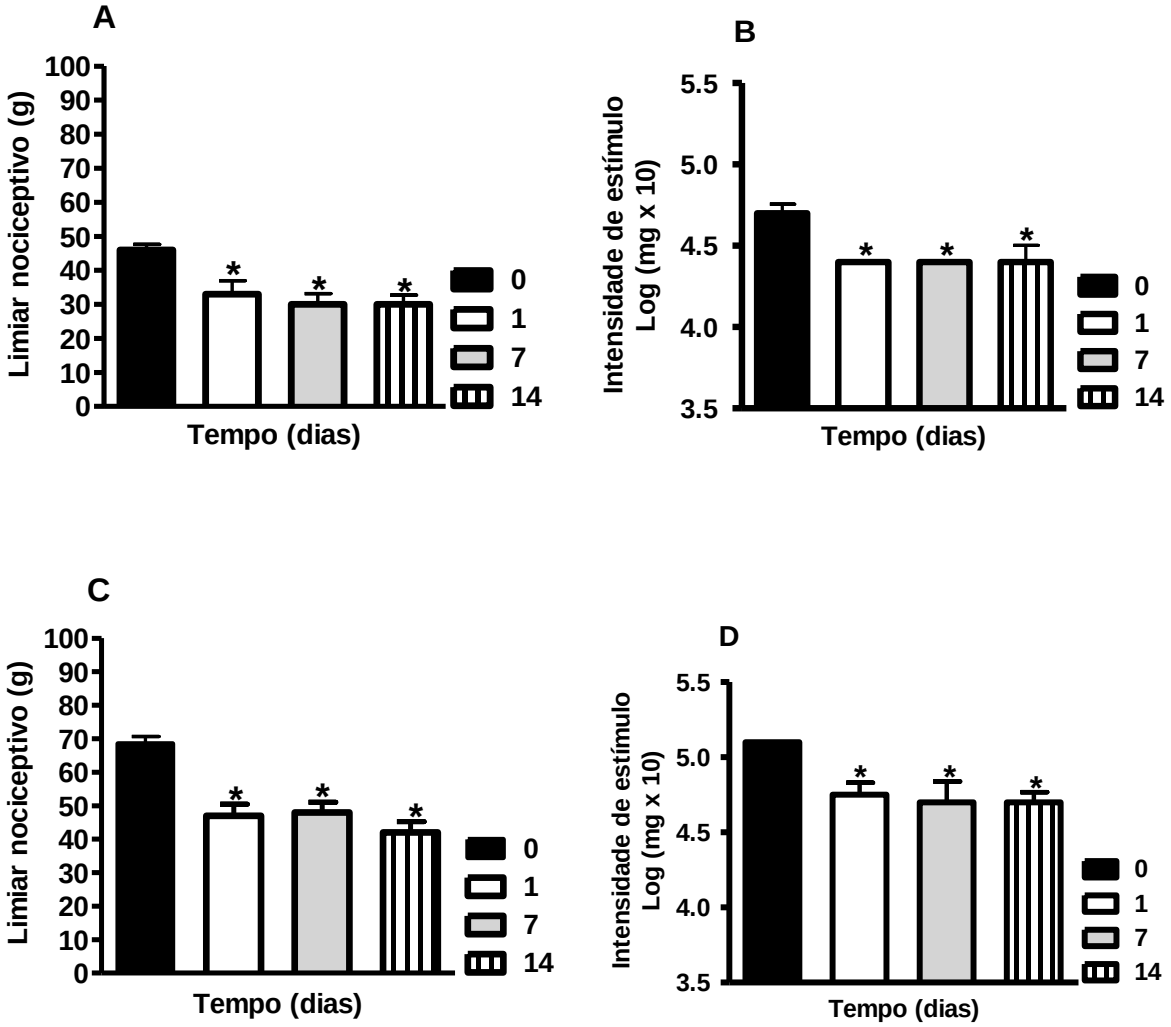


Figura 21- Determinação da hipernocicepção e alodinia em ratos fêmeas (A e B, respectivamente) e machos (C e D, respectivamente) submetidos à constrição do nervo isquiático. A hipernocicepção foi determinada pelo teste de pressão de pata de ratos (A, C). O limiar nociceptivo está representado pela força (g) necessária para a retirada da pata. A alodinia, representada como a intensidade de estímulo em log (mgx10) necessária para induzir a retirada da pata (B e D), foi determinada por meio dos filamentos de von Frey. Os testes foram aplicados antes (Tempo 0, medida inicial) e 1, 7 e 14 dias após a ligadura do nervo. Os dados representam a média ± e.p.m. de 10 animais por grupo. $^{*}p<0,05$ por comparação com a medida basal (Tempo 0).

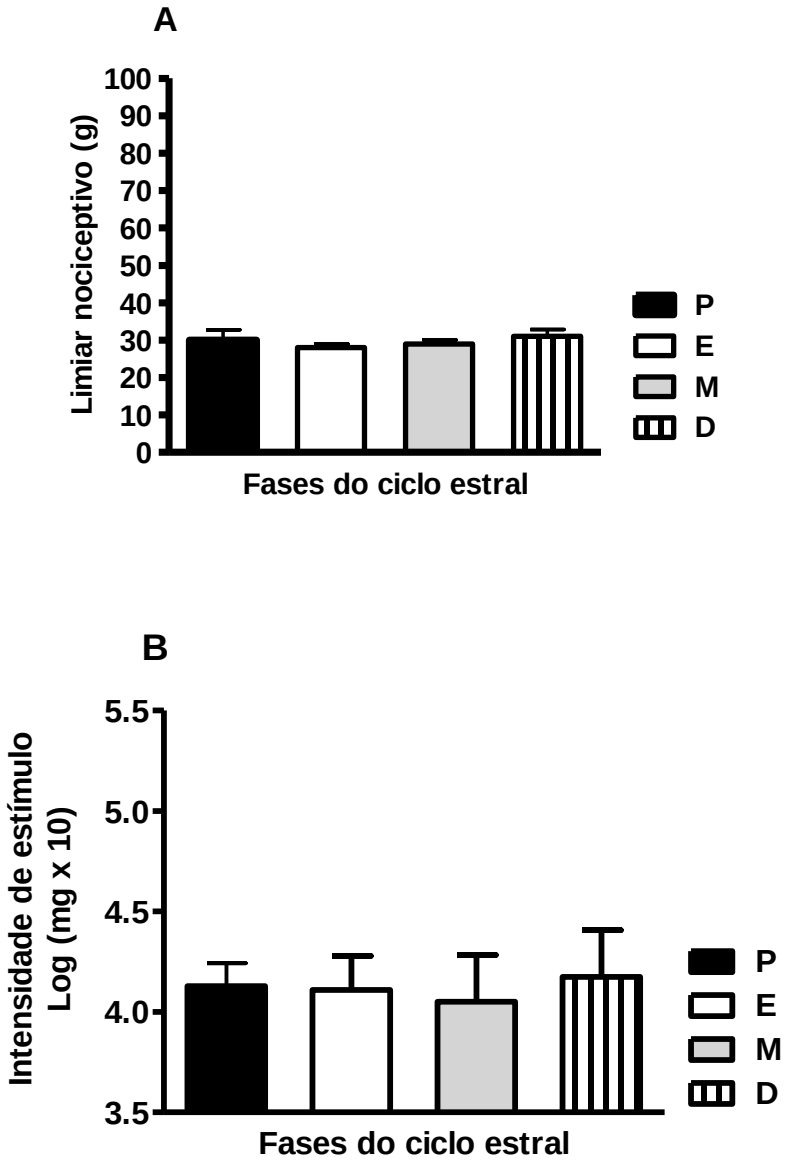


Figura 22- Influência das fases do ciclo estral nos fenômenos de hipernocicepção (A) e alodinia (B) induzida pela ligadura do nervo isquiático. Fêmeas foram submetidas à coleta do conteúdo vaginal e separadas em Proestro (P), Estro (E), Metaestro (M) e Diestro (D). A hipernocicepção, representado pela força (em gramas) necessária para a indução de retirada da pata, foi determinada no teste de pressão de patas de ratos (Figura A). A alodinia, representada como a intensidade de estímulo em log (mgx10) necessária para induzir a retirada da pata (Figura B) foi determinada por meio dos filamentos de von Frey. Os testes foram aplicados 14 dias após a constrição do nervo isquiático. Os dados representam a média ± e.p.m. de 10 animais por grupo.

4.15 Efeito da crotalfina sobre a hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos fêmeas e machos

A próxima etapa foi verificar a possível diferença no efeito da crotalfina, entre ratos machos e fêmeas, na dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático. Os animais foram tratados p.o. com crotalfina (0,0016; 0,008; 0,04; 0,2; 1, 5 e 25 µg/kg) ou salina (controle), no 14° dia após a ligadura do nervo isquiático. A crotalfina inibiu, em ratos fêmeas (Figura 23 A) e machos (Figura 23 C), a hipernocicepção induzida pela constrição do nervo. Para as fêmeas, a dose de 0,02 µg/kg de crotalfina já foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo dos animais, em relação ao grupo salina. Ainda, em fêmeas, as doses de 1 e 5 µg/kg do peptídeo, além de inibir a hipernocicepção, causaram aumento do limiar nociceptivo em relação à medida basal (Figura 23 A). Para os machos, foi observada reversão significativa da hipernocicepção à partir da dose de 5 µg/kg (Figura 23 C). A administração de crotalfina também inibiu a alodinia acarretada pela constrição do nervo. Nas fêmeas, a menor dose de crotalfina (0,0016 µg/kg) já foi capaz de promover um aumento no limiar de resposta à estimulação tátil, contudo, apenas a partir da dose de 1 µg/kg houve reversão significativa, em relação ao grupo controle. Ainda, houve aumento significativo em relação à medida basal para a dose de 5 µg/kg (Figura 23 B). Nos machos, doses a partir de 0,008 µg/kg foram capazes de promover aumento do limiar de resposta à estimulação tátil, porém apenas a partir da dose de 0,2 µg/kg, foi observada inibição significativa da alodinia, quando comparado com dados obtidos no grupo controle. Ainda, apenas a partir da dose de 1µg/kg a crotalfina foi capaz de elevar o limiar de estimulação em relação à medida basal (Figura 23 D).

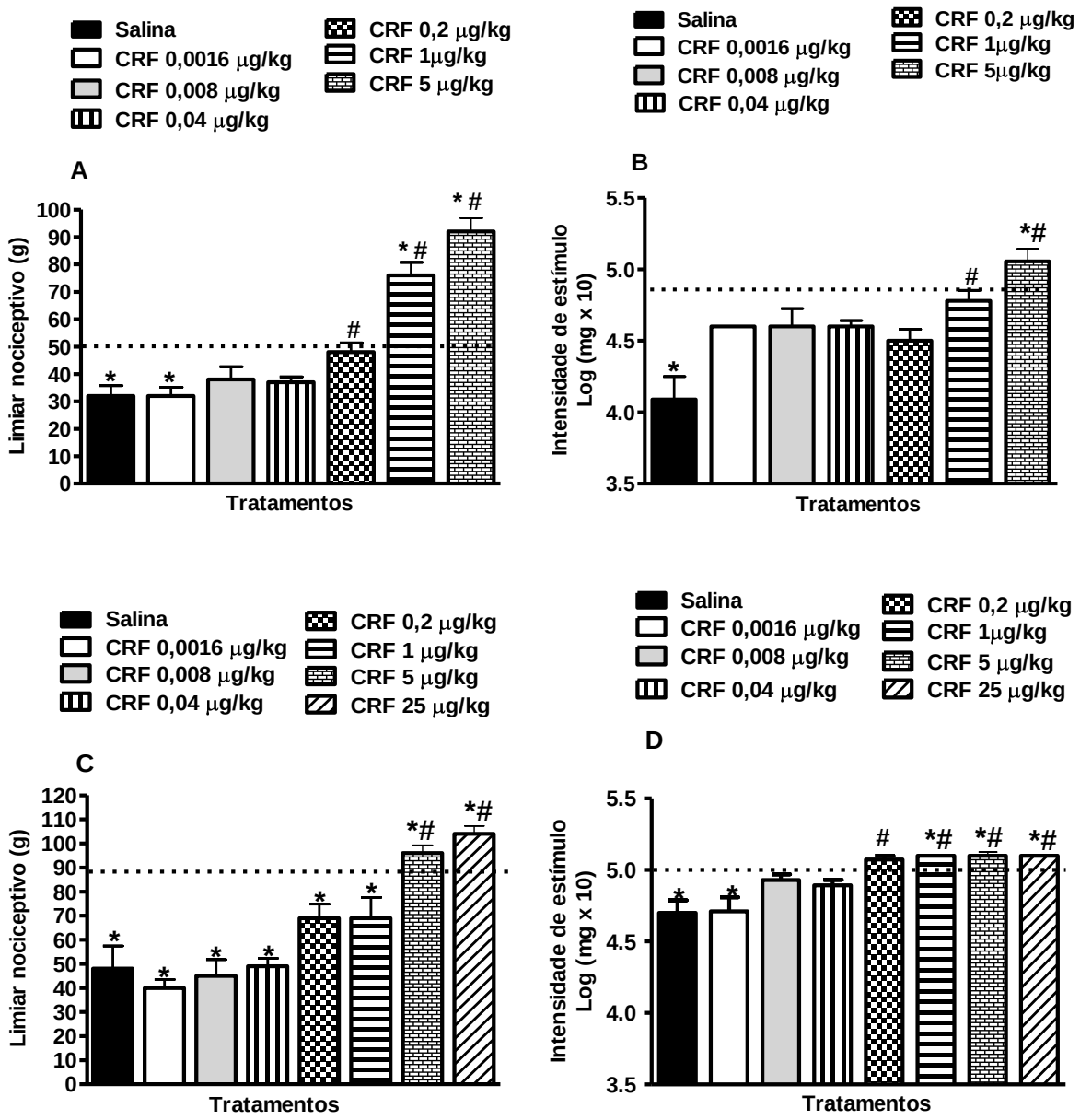


Figura 23- Efeito da crotalfina sobre a hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos fêmeas (A, B) e machos (C, D). A hipernocicepção, representada pela força (em gramas) necessária para a indução de retirada da pata, foi determinada no teste de pressão de patas de ratos (A, C). A alodinia, representada como a intensidade de estímulo em log (mgx10) necessária para induzir a retirada da pata foi determinada por meio dos filamentos de von Frey (B e D). Os testes foram aplicados antes (linha tracejada) e 14 dias após a ligadura do nervo isquiático. No 14° dia, os testes foram aplicados 1 h após a administração p.o. de crotalfina (CRF, 0,0016; 0,008; 0,04; 0,2; 1; 5 e 25 μg/kg) ou salina (grupo controle). Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a medida basal, #p<0,05 por comparação com o grupo controle.

4.16 Duração do efeito antinociceptivo da crotalfina sobre a hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos fêmeas e machos

Uma vez que em fêmeas, as doses de 1 e 5 µg/kg do peptídeo, e em machos a dose de 5 e 25 µg/kg, além de inibirem a hipernocicepção, causaram aumento do limiar nociceptivo em relação à medida basal, utilizamos essas doses com o intuito de verificar a duração do efeito da crotalfina neste modelo de dor neuropática.

Assim, no 14º dia após a cirurgia de constrição crônica do nervo isquiático, animais foram tratados com crotalfina (v.o., 2 mL) nas doses de 1 e 5 (Fêmeas) ou 5 e 25 µg/kg (Machos). Os dados apresentados na Figura 24 mostram que a ligadura do nervo isquiático acarretou, no 14º dia do período pós-operatório, diminuição do limiar nociceptivo de ratos fêmeas (Figura 24 A) e machos (Figura 24 C) em relação à medida basal, caracterizando o fenômeno de hipernocicepção. Adicionalmente foi observada diminuição na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta de retirada da pata, quando comparado à medida basal (Figuras 24 B e D), caracterizando o fenômeno de alodinia. A administração de crotalfina, nas doses de 1 e 5 µg/kg em fêmeas e de 5 e 25 µg/kg em machos, reverteu a hipernocicepção e alodinia, tanto em machos quanto em fêmeas. Nestas doses, para ambos os sexos, o efeito antinociceptivo da crotalfina foi detectado por 72 h (Figura 24).

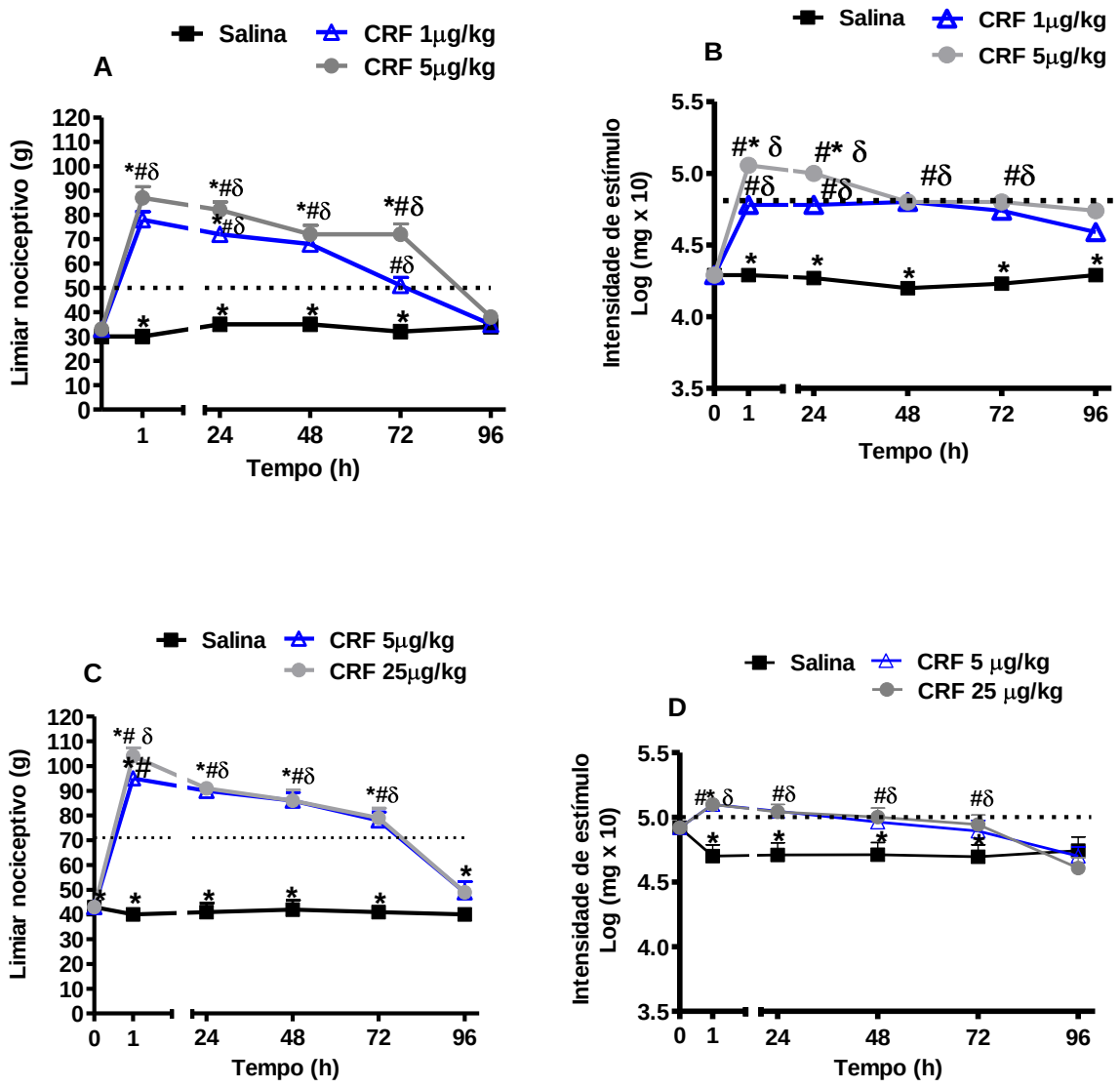


Figura 24- Duração do efeito antinociceptivo da crotalfina sobre a hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos fêmeas (A, C) e machos (B, D). A hipernocicepção, representado pela força (em gramas) necessária para a indução de retirada da pata, foi determinada no teste de pressão de patas de ratos (A, B). A alodinia, representada como a intensidade de estímulo em log (mgx10) necessária para induzir a retirada da pata foi determinada por meio dos filamentos de von Frey (C, D). Os testes foram aplicados antes (linha tracejada) e 14 dias após a ligadura do nervo. No 14° dia, os testes foram aplicados imediatamente antes (tempo 0) e 1, 24, 48, 72 e 96 h após a administração p.o. de crotalfina (CRF) ou salina (grupo controle). Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a medida basal, $^{\#}$p<0,05 por comparação com a medida obtida no 14° dia, antes de qualquer tratamento e $^{\delta}$p<0,05 por comparação com o grupo controle.

4.17 Determinação do envolvimento de receptores opióides no efeito antinociceptivo da crotalfina, na dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo isquiático

Trabalhos recentes realizados em nosso laboratório mostraram que receptores opióides do tipo *kappa* e *delta* estão envolvidos no efeito antinociceptivo da crotalfina, neste modelo de dor neuropática em ratos machos (GUTIERREZ et al., 2008). Assim, dando continuidade, foi investigada a participação destes receptores, no efeito do peptídeo em ratos fêmeas. Conforme observado na Figura 25, o Nor-BNI (50 μg/pata) promoveu reversão parcial do efeito antinociceptivo da crotalfina, enquanto que a administração de ICI-174,864 (10 μg/pata) bloqueou este efeito. O CTOP (20 μg/pata) não interferiu com o efeito antinociceptivo da crotalfina (Figura 25). Os antagonistas *per se* não interferiram com a hipernocicepção causada pela constrição crônica do nervo isquiático.

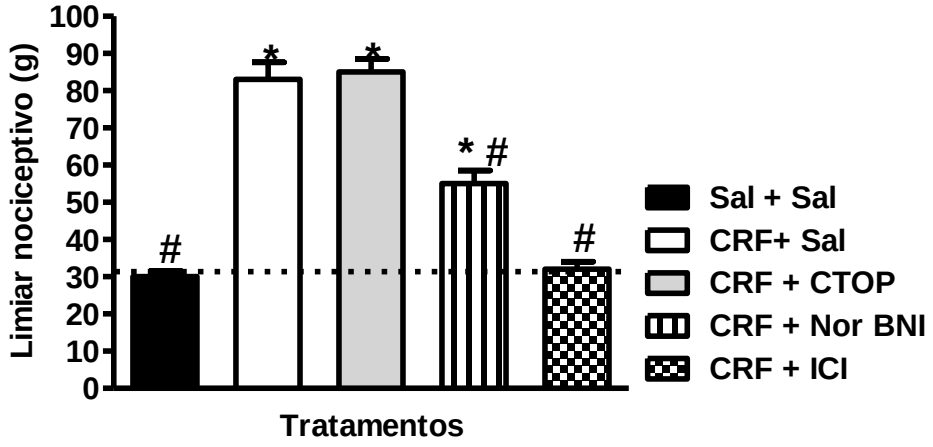


Figura 25- Determinação do envolvimento de receptores opióides no efeito antinociceptivo da crotalfina, na dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo isquiático (CCI). O limiar de dor, representado pela força (em gramas) necessária para a retirada da pata, foi determinado antes (linha tracejada, média das medidas basais) e no 14º dia após a CCI utilizando o teste de pressão da pata, antes e 3 h após os tratamentos. A crotalfina (CRF, 5 µg/kg) ou salina (Sal., grupo controle) foram administradas p.o. O nor-BNI (50 µg/pata – 50 µL), o CTOP (20 µg/pata – 50 µL) e o ICI 174,864 (10 µg/pata – 50 µL) foram injetados imediatamente antes da crotalfina. Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *$p<0,05$ por comparação com a medida basal (linha tracejada), $^{\#}p<0,05$ por comparação com o grupo CRF+ Sal.

4.18 Influência dos hormônios ovarianos no limiar de resposta à estimulação nociceptiva mecânica e no desenvolvimento de hipernocicepção induzida por PGE_2.

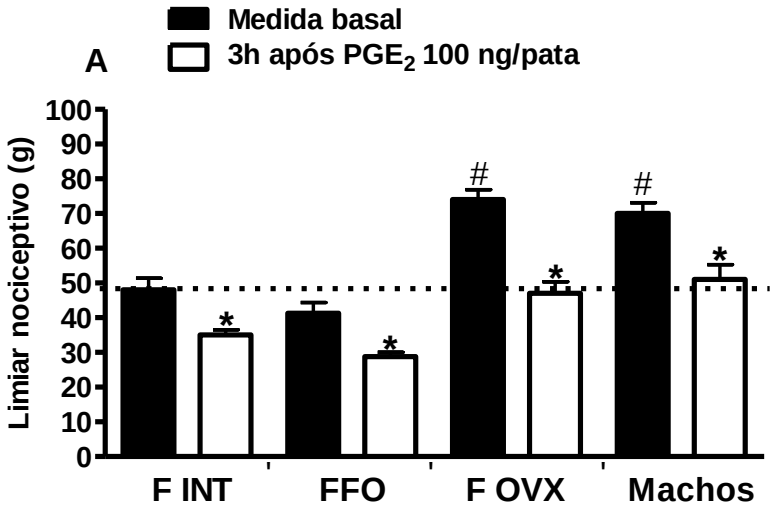
4.18.1 Efeito da ovariectomia

Uma vez caracterizados as diferenças das respostas nociceptivas entre machos e fêmeas, o próximo passo foi investigar a possível modulação dos hormônios esteroidais gonadais nesas diferenças. Para tanto, fêmeas foram submetidas à ovariectomia (OVX) e como controles foram utilizados fêmeas intactas (F INT), nas quais não se realizou procedimento cirúrgico e fêmeas falso - operadas (FFO), nas quais os ovários foram expostos, manipulados e inseridos novamente na cavidade abdominal e adicionalmente, foram utilizados como controles ratos machos. Neste estudo, foi escolhido o modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2, para avaliação da nocicepção.

Para confirmação da efetividade da ovariectomia, foi realizada diariamente a coleta do conteúdo vaginal, por 11 dias. A análise do conteúdo vaginal mostrou que fêmeas castradas mantiveram-se constantes na fase de diestro, entre o 7º e o 11° dia do pós cirúrgico, enquanto que fêmeas falso - operadas e intactas mantiveram-se ciclando normalmente (dados não mostrados). Como controle adicional da eficácia da cirurgia, nesta fase, foi realizada a pesagem do útero dos animais. Os resultados mostram que o peso do útero de animais OVX foi significativamente menor que os de animais intactos, confirmando a efetividade da cirurgia (Tabela 1).

No 11° dia do pós – cirúrgico, todos os 4 grupos de animais foram inicialmente avaliados no teste de pressão de patas (medida basal) e os resultados comparados. Os resultados mostraram que fêmeas submetidas à ovariectomia apresentam aumento significativo do limiar nociceptivo basal em relação à fêmeas intactas e falso-operadas, não sendo detectadas diferenças significativas em relação ao limiar de machos (Figura 26 A). A seguir, verificou-se o desenvolvimento de hipernocicepção, por meio da administração i.pl. de PGE_2 50 (Figura 26 B) ou 100 ng/pata (Figura 26 A). Os animais foram novamente submetidos ao teste de pressão de patas, 3 h após a administração da prostaglandina (Figura 26). A administração de PGE_2, na dose de 100 ng/pata, causou queda do limiar nociceptivo em todos

grupos de animais, como mostrado na Figura 26 A. A administração de PGE_2, na dose 50 ng/pata, promoveu em fêmeas intactas, diminuição do limiar nociceptivo, entretanto, em fêmeas OVX, não houve desenvolvimento de hipernocicepção, como mostrado na Figura 26 B. Estes dados indicam que fêmeas OVX têm resposta semelhantes aos animais machos.



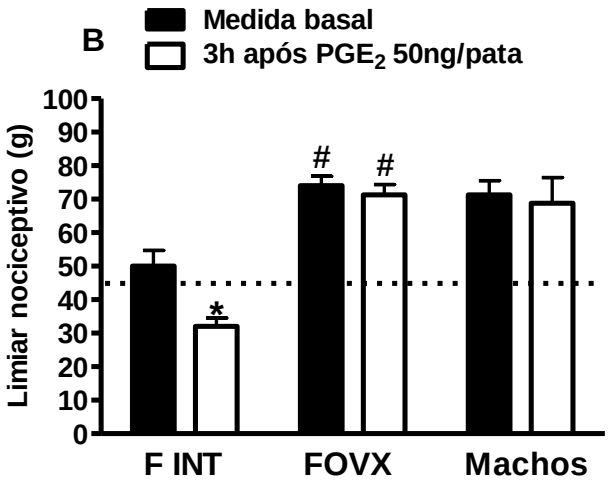


Figura 26- Efeito da ovariectomia sobre o limiar de resposta à estimulação nociceptiva mecânica e no desenvolvimento de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 (A e B). Fêmeas foram castradas e comparadas com grupos controles, machos, fêmeas intactas (F INT) e falso-operadas (FFO). O limiar nociceptivo, representado pela força (em gramas) necessária para a indução de retirada da pata, foi determinado no teste de pressão de patas de ratos. Os testes foram realizados antes de quaisquer tratamentos (medida basal, linha tracejada) e no 11° dia após os procedimentos cirúrgicos, antes e 3 h após a administração de PGE_2 nas doses de 100 ng/pata (Figura A) ou 50 ng/pata (Figura B). Os dados representam a média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. *$p<0,05$ por comparação com medida basal; $^{\#}p<0,05$ por comparação com as medidas do grupo F INT.

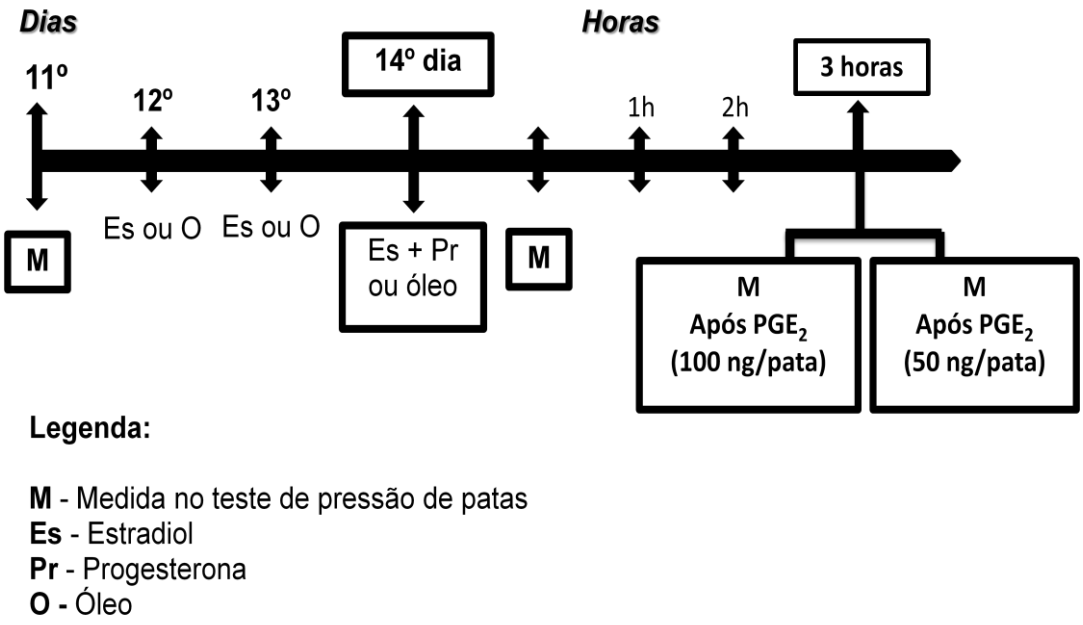
Tabela 1- Avaliação do peso uterino após remoção

Grupos	Peso uterino (g)
Controle (não castrados)	0,458 g ± 1,2
OVX	0,142 g ± 0,3

Tabela 1 - A ovariectomia (OVX) foi realizada de acordo com a metodologia apresentada no item 3.7. O peso do útero foi determinado 14 dias após a cirurgia. O útero de fêmeas ovariectomizadas (OVX) apresentou acentuada redução de peso (69%) após remoção em relação ao grupo controle. Os dados representam a média ± e.p.m. de 10 animais por grupo.

4.18.2 Efeito da reposição hormonal

Para verificar a interferência direta de hormônios esteroidais gonadais na resposta dos animais ao estímulo mecânico, fêmeas foram avaliadas no teste de pressão de patas no 11° dia após a ovariectomia. A seguir, iniciou-se o regime de reposição hormonal (EP). O estradiol foi administrado via s.c. por 4 dias consecutivos e, no 14° dia, além do estradiol foi administrada progesterona. Como controle, foram utilizados animais tratados com óleo vegetal (OVX + Óleo). O conteúdo vaginal foi coletado e analisado, indicando que no 14° dia, os animais submetidos à reposição encontravam-se no proestro, enquanto que o grupo controle, tratado com óleo vegetal, encontrava-se no diestro (dados não mostrados). No 14° dia, os animais foram novamente avaliados no teste de pressão de patas, conforme mostrado no esquema abaixo:



Os dados obtidos mostram que fêmeas castradas, submetidas à reposição com estradiol e progesterona tiveram acentuada diminuição do limiar nociceptivo em relação aos valores obtidos antes da reposição hormonal e em relação ao grupo controle, constituído por fêmeas castradas e tratadas com óleo vegetal (Figura 27).

A seguir foi induzida hipernocicepção, por meio da administração i.pl. de PGE_2, (50 e 100 ng/pata). Os animais foram novamente submetidos ao teste de pressão de patas, 3 h após a administração da prostaglandina E_2. Os dados obtidos mostram que em animais castrados submetidos à reposição hormonal, a PGE_2, na dose de 100 ng/pata, causou queda do limiar nociceptivo, de menor magnitude (22%) em relação à queda observada para o grupo controle constituído por animais castrados e tratados com óleo vegetal (128%) (Figura 27). Adicionalmente, a dose de 50 ng/pata, diferentemente do observado nas fêmeas castradas tratadas com óleo, causou diminuição no limiar nociceptivo, em relação às medidas obtidas no 11° e 14° dia, em fêmeas OVX submetidas ao regime de reposição hormonal (Figura 27).

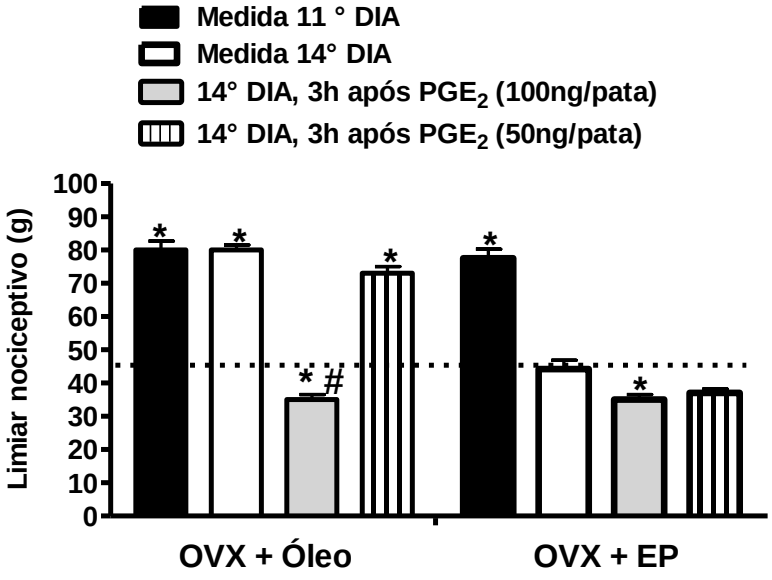


Figura 27- Efeito da reposição hormonal no limiar de resposta à estimulação nociceptiva mecânica e no desenvolvimento de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2. O limiar nociceptivo, representado pela força (em gramas) necessária para a indução de retirada da pata, foi determinado no teste de pressão de patas de ratos. Os testes foram realizados antes da cirurgia de ovariectomia (medida basal, linha tracejada) e no 11° dia após os procedimentos cirúrgicos e no 14° dia, antes e 3 h após a administração de PGE_2 (100 ng/pata ou 50 ng/pata). Fêmeas castradas tratadas com veículo (óleo vegetal) foram utilizadas como grupo controle. Os dados representam a média ± e.p.m. de 6 animais por grupo.*$p<0,05$ por comparação com medida basal (linha tracejada); $^{\#}p<0,05$ por comparação com medida do 14° dia.

4.19 Efeito da ovariectomia e da reposição hormonal na antinocicepção induzida pela crotalfina, na ausência ou vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2

Para verificar a influência de hormônios gonadais femininos nas diferenças observadas entre ratos fêmeas e machos, quanto ao efeito antinociceptivo da crotalfina, fêmeas foram ovariectomizadas, tratadas ou não com hormônios esteroidais e posteriormente tratadas com o peptídeo. A seguir, foram submetidas ao teste de pressão de patas, na ausência e na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2. Os dados estão representados na Figura 28. Os animais foram inicialmente avaliados no teste de pressão de patas (após tratamentos com hormônios ou óleo), no 14°dia após cirurgia de ovariectomia, correspondente ao 4° dia de reposição hormonal (**M1**, medida basal) e então submetidos aos seguintes tratamentos: salina (p.o., 2 mL) + PGE_2 (i.pl., 100 ng/pata) ou CRF (p.o., 5 µg/kg) + PGE_2 (i.pl., 100 ng/pata). Após 3 horas destes tratamentos, os animais foram novamente avaliados no teste de pressão de patas, sendo **M2** a média das medidas obtidas para o grupo tratado com salina + PGE_2 e **M3** a média das medidas obtidas para o grupo tratado com CRF + PGE_2 (Figura 28 A), conforme demonstrado no esquema abaixo.

Os resultados demonstram que no 14º dia, fêmeas tratadas com estradiol e progesterona apresentam queda do limiar nociceptivo, sendo o limiar semelhante ao limiar basal dos animais. No 14º dia após cirurgia, a PGE_2 (100 ng/pata) acarretou queda do limiar nociceptivo, em relação à medida basal em ambos os grupos (controle e tratado). A crotalfina, em todos os grupos, inibiu a hipernocicepção, além de causar aumento no limiar nocicpetivo dos animais em realção à medida basal (M1).

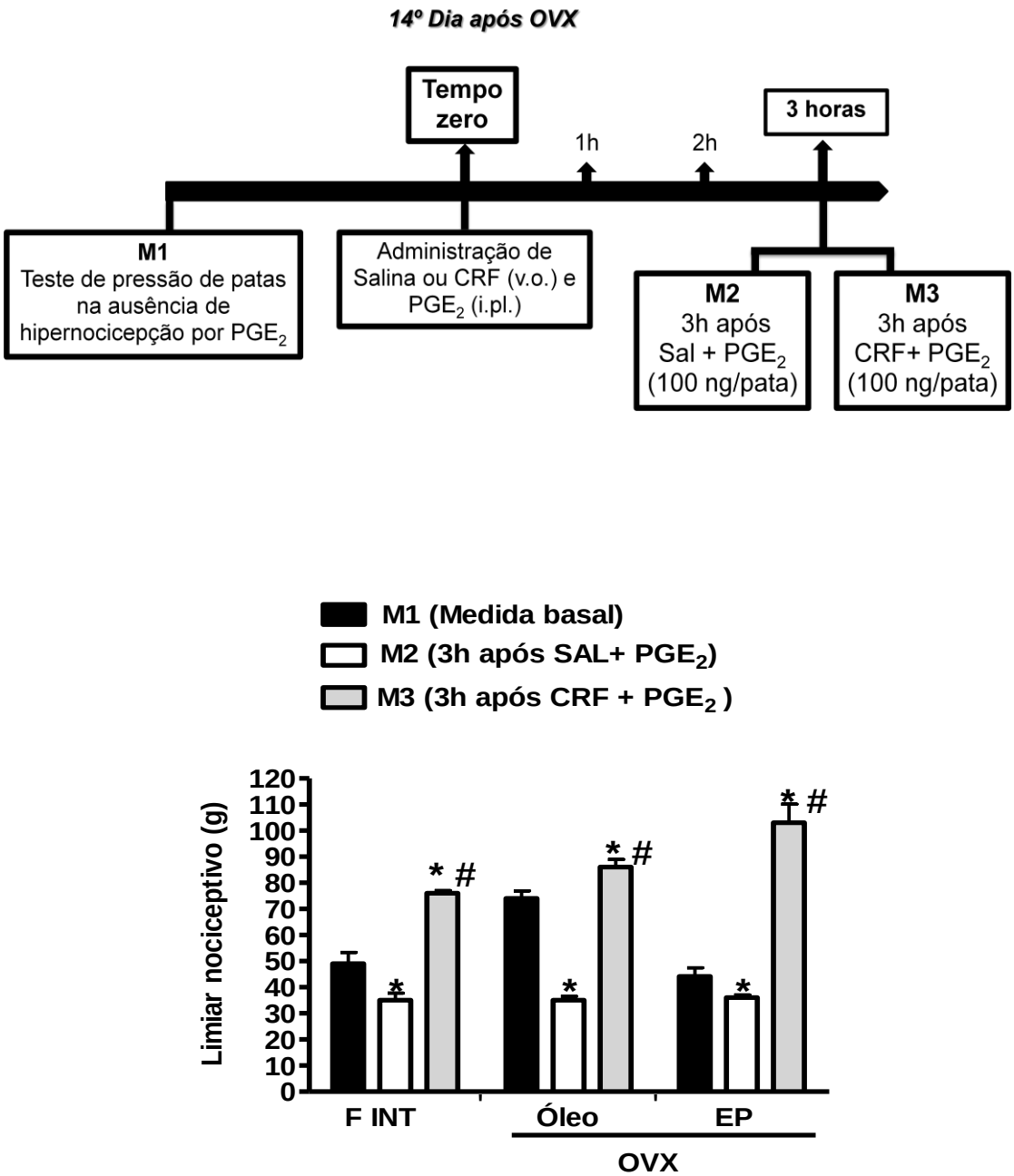


Figura 28- Efeito da ovariectomia e da reposição hormonal na antinocicepção induzida pela crotalfina, na ausência (M1) ou vigência (M2 e M3) de hipernocicepção induzida por PGE_2. Os animais foram divididos em: fêmeas intactas (INT) ou submetidas à ovariectomia (OVX), sendo este grupo subdividido em fêmeas com reposição hormonal (EP), ou tratadas com óleo vegetal (grupo controle). Os animais foram inicialmente avaliados no teste de pressão de patas, no 14°dia após cirurgia de ovariectomia e antes dos tratamentos (M1, medida basal). A seguir os animais receberam: CRF (p.o., 5 µg/kg) + PGE_2 (i.pl., 100 ng/pata) ou salina (p.o., 2 mL) + PGE_2 (i.pl., 100 ng/pata). O teste de pressão de patas foi realizado 3 h após os tratamentos (M3). O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para a indução de retirada da pata.*$p<0,05$ por comparação com M1; $^{\#}p<0,05$ por comparação com grupo salina.

4.20 Expressão de receptores opióides do tipo *mu, kappa* e *delta* em nervo da pata de fêmeas em comparação à machos, em modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2

Com o intuito de avaliar se existem diferenças na expressão dos receptores opióides do tipo *mu, kappa e delta* no nervo da pata de fêmeas, em relação aos machos, avaliou-se a porcentagem de expressão destes receptores por meio de técnica de Elisa modificado (Elisa em *slice*).

Para obtenção do nervo da pata, os animais foram tratados com prostaglandina E_2 e na 3ª hora após a administração deste agente, o nervo da pata foi removido para análise. Foram utilizados animais nas diferentes fases do ciclo para obtenção das amostras. Neste estudo, para comparação, os valores obtidos em machos foram considerados como 100% de expressão dos receptores opióides. Os resultados obtidos mostram que fêmeas apresentam maior expressão de receptores opióides do tipo *kappa* (38%), em relação aos machos (Figura 29 A). Por outro lado, não houve diferenças na porcentagem de expressão de receptores *mu e delta,* entre machos e fêmeas (Figuras 29 B e C).

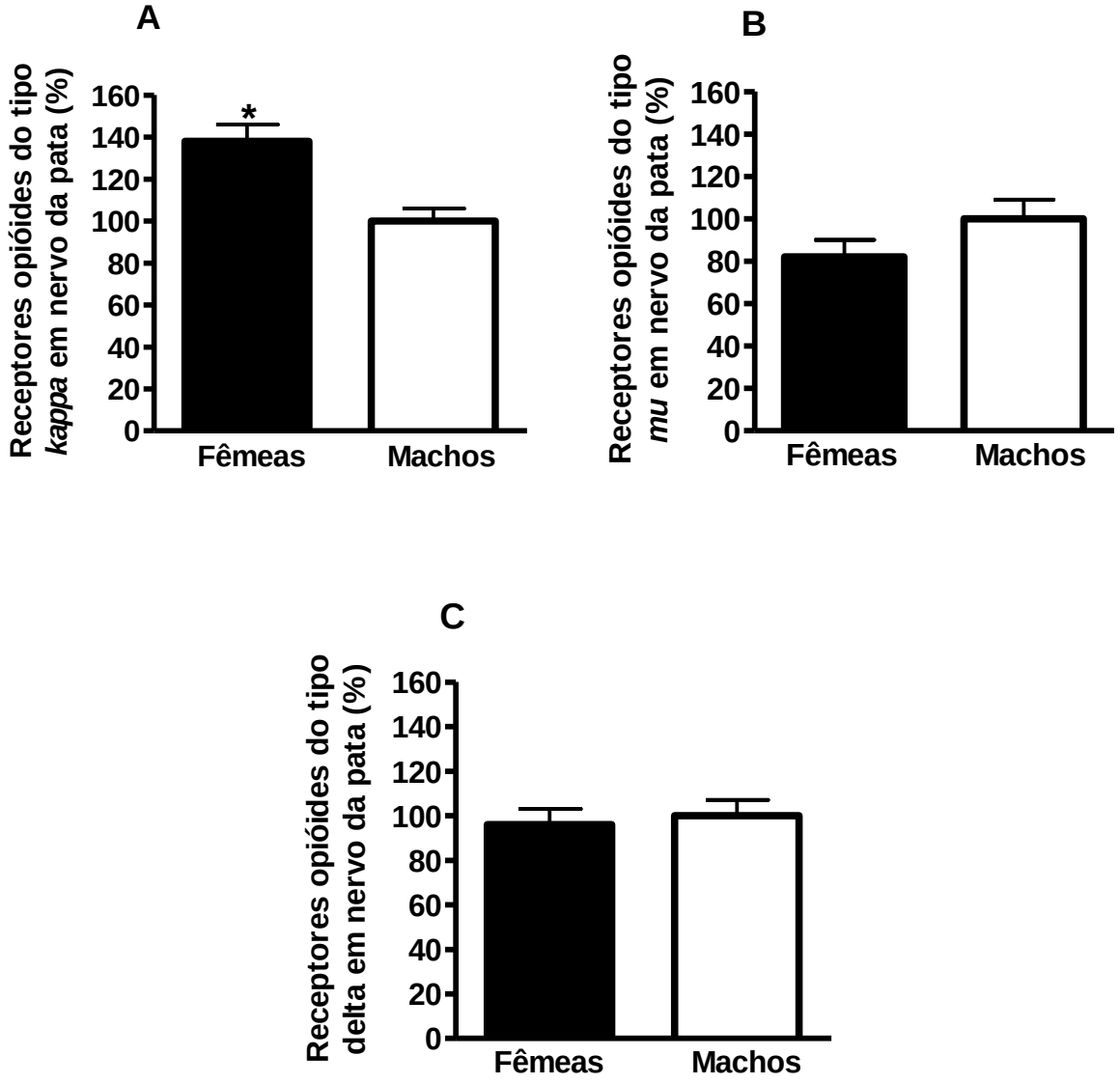


Figura 29- Expressão de receptores opióides do tipo *mu, kappa e delta* em nervo da pata de ratos, em modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2. Os animais foram tratados com prostaglandina E_2, submetidos à perfusão e tiveram os tecidos isolados, os quais foram posteriormente incubados com anticorpos primários e secundários específicos. A expressão dos receptores opióides no nervo da pata de ratos machos foi considerada 100% (controle) e os resultados obtidos em fêmeas comparados à estes valores. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de Elisa. *$p<0,05$ por comparação com grupo de machos.

5 Discussão

A crotalfina, um peptídeo de 14 aminoácidos primeiramente isolado e caracterizado do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, apresenta atividade antinociceptiva decorrente da ativação de receptores opióides periféricos (KONNO et al., 2008). Em virtude da potente ação analgésica deste peptídeo, da longa duração desta ação e da sua efetividade em modelos de dor aguda e persistente, estudos vêm sendo realizados visando o desenvolvimento deste fármaco como um novo analgésico. Contudo, os estudos com a crotalfina foram realizados sempre em animais (ratos e camundongos) machos. Dados da literatura, embora ainda controversos, têm sugerido a existência de diferenças na sensação de dor ou na resposta a fármacos analgésicos, incluindo opióides, entre homens e mulheres ou mesmo entre animais machos e fêmeas (BARRETT et al., 2002; GREENSPAN et al., 2007; BIJUR et al., 2008; LU et al., 2009), indicando papel modulador dos hormônios sexuais sobre a nocicepção e antinocicepção (LU et al., 2009).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diferença na sensibilidade dolorosa e na resposta à crotalfina entre ratos machos e fêmeas, e alguns dos possíveis fatores que poderiam contribuir para estas diferenças.

Inicialmente, foi necessário caracterizar as possíveis diferenças na resposta de ratos machos e fêmeas aos estímulos nociceptivos ou fenômenos de sensibilização ora empregados. Para esta caracterização, foram escolhidos dois modelos comumente utilizados em estudos de nocicepção e de efeito de fármacos analgésicos - um modelo de sensibilização aguda, (hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2) e um modelo de dor crônica (dor neuropáticaa, CCI). A prostaglandina E_2 age sensibilizando diretamente o neurônio sensitivo primário (FERREIRA e NAKAMURA, 1979; TAIWO e LEVINE, 1991), com consequente despolarização da membrana celular e transmissão do impulso nociceptivo (FERREIRA, 1994), causando diminuição do limiar nociceptivo dos animais (FERREIRA e NAKAMURA, 1979; FERREIRA e LORENZETTI, 1981; DRAY, 1995). A PGE_2 interage com receptores do tipo EP, acoplados à proteína G, e estes receptores podem mediar o efeito sensibilizante da prostaglandina E_2 em nociceptores e neurônios do gânglio da raiz dorsal. Para a indução da dor neuropática foi utilizado o modelo de constrição crônica do nervo isquiático. Neste modelo, a injúria parcial do nervo isquiático pode ser produzida por constrições

crônicas, por meio de ligações frouxas neste nervo (BENNETT e XIE, 1988). A lesão do nervo acarreta nocicepção manifesta, hipernocicepção e alodinia, em resposta a estímulos térmicos ou mecânicos. Estes sintomas iniciam-se 1 a 5 dias após a indução da lesão, com respostas máximas ao final da segunda semana e que se estendem por 2 meses (BENNETT e XIE, 1988).

Os resultados presentemente obtidos indicam haver diferenças no limiar nociceptivo entre ratos machos e fêmeas, uma vez que as fêmeas, quando avaliadas no teste de pressão de pata de ratos, apresentaram reação de retirada de pata em resposta a uma força (em gramas) de menor magnitude, em relação àquela observada para os machos. Apesar da maior sensibilidade das fêmeas ao estímulo mecânico nociceptivo, não foi detectada influência das diferentes fases do ciclo estral no limiar nociceptivo. Por outro lado, foram observadas diferenças na resposta das fêmeas à estimulação tátil (filamentos de von Frey), nas diferentes fases do ciclo estral. Assim, fêmeas no proestro e metaestro responderam a uma força de menor magnitude dos filamentos, em relação àquelas na fase de estro e diestro. É importante ressaltar que tal diferença não foi observada quando da instalação do fenômeno de alodinia, no 14° dia após a constrição do nervo isquiático.

Os dados da literatura são controversos com relação à influência das fases do ciclo estral na sensibilidade de fêmeas à estímulos nociceptivos ou estímulos táteis. Alguns trabalhos mostram haver diferenças entre as fases do ciclo estral (VINCLER et al., 2001; LU et al., 2009), entretanto, os trabalhos diferem entre si com relação às fases do ciclo que poderiam interferir na sensibilidade à dor e à estimulação tátil. Assim, alguns dados indicam que fêmeas são mais sensíveis a estímulos nociceptivos no proestro (KAYSER et al., 1996; VINCLER et al., 2001), enquanto outros dados sugerem que há aumento da resposta a estes estímulos durante o estro (KEPLER et al., 1989; MARTINEZ-GOMEZ et al., 1994; BLEDNOV et al., 2003). É importante salientar que o proestro é caracterizado pela presença de concentrações elevadas de estrógeno e este hormônio vêm sendo considerado agente pró-nociceptivo (CRAFT, 2007; GAUMOND; SPOONER; MARCHAND, 2007; SANOJA e CERVERO, 2007). Por outro lado, alguns dados de literatura têm evidenciado que baixas concentrações de estradiol e progesterona estão associadas ao aumento da manifestação de fenômenos nociceptivos (SMITH et al., 2006; FISCHER et al., 2008), por um mecanismo de redução no funcionamento do sistema

opioidérgico endógeno (ZUBIETA et al., 2002). A controvérsia na literatura vem sendo correlacionada a vários fatores, como a utilização de diferentes modelos de indução e avaliação da nocicepção uma vez que são utilizados estímulos térmicos, mecânicos e químicos, diferenças na linhagem e no estado de sedação dos animais durante a realização dos estudos.

No presente estudo foi também avaliada a possível diferença na resposta nociceptiva de ratos machos e fêmeas, induzida pela administração intraplantar de prostaglandina E_2. Os resultados apresentados indicam que as fêmeas são mais sensíveis ao efeito hipernociceptivo da PGE_2 do que os machos, uma vez que nas fêmeas, a dose de prostaglandina necessária para a indução da diminuição do limiar nociceptivo foi menor do que nos machos (50 e 100 ng/pata, respectivamente).

Estes dados estão de acordo com dados da literatura mostrando que animais fêmeas são mais sensíveis à estímulos nociceptivos (BARRETT et al., 2002; CRAFT, 2007). Além dos dados experimentais, evidências clínicas têm mostrado que mulheres reportam dor de maior magnitude e apresentam menor tolerância, em relação à homens, em resposta à estímulos nociceptivos intensos (UNRUH, 1996; WALKER e CARMODY, 1998)

Estudos têm sugerido que a maior sensibilidade de fêmeas à agentes pró-nociceptivos pode ser decorrente, em parte, de alterações organizacionais de sistemas relacionados à nocicepção, promovidas por hormônios, bem como de possíveis diferenças anatomo-fisiológicas em sistemas endógenos de controle da dor, como a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e medula rostro ventromedial (RVM) (LOYD e MURPHY, 2006; BERNAL et al., 2007; LOYD e MURPHY, 2009). As alterações organizacionais promovidas pelos hormônios são permanentes, uma vez que essas alterações são responsáveis pela diferenciação sexual e modulação das funções do sistema nervoso, regulando a estrutura e circuitaria cerebral, sistema imune, ósseo e cardiovascular, desde a vida embrionária, definindo a fisiologia e comportamentos ligados aos gêneros masculino e feminino. (CICERO et al., 2002; LACROIX-FRALISH et al., 2005; CRAFT, 2007). Assim, em fêmeas, as estruturas relacionadas ao controle da dor, como a PAG e RVM, seriam menos ativas em decorrência das alterações promovidas por hormônios esteroidais gonadais, desde a fase neonatal (EVRARD, 2006; CRAFT e ULIBARRI, 2009).

Uma vez caracterizada a diferença entre os sexos na resposta à prostaglandina E_2, avaliamos o efeito da crotalfina na hipernocicepção acarretada por este agente, em ratos machos e fêmeas, por meio de estudo de curva dose - e tempo - resposta ao peptídeo. Os resultados obtidos mostram que em fêmeas, a dose de crotalfina capaz de inibir a hipernocicepção acarretada pela prostaglandina é menor do que aquela observada para os machos e indicam que fêmeas são mais sensíveis ao efeito antinociceptivo deste peptídeo. Esta maior sensibilidade das fêmeas foi confirmada pela determinação da dose efetiva 90%. Foi também verificada a possível influência do ciclo estral na ação da crotalfina. Os resultados obtidos mostram que o efeito antinociceptivo da crotalfina, no modelo de hipernocicepção induzida por PGE_2, não é influenciado pelas diferentes fases do ciclo estral. Estes resultados diferem dos dados da literatura, indicando que o ciclo estral modula o efeito antinociceptivo de fármacos com atividade opióide (maior potência no metaestro e proestro e menor potência no estro), contudo esta modulação está na dependência do modelo experimental utilizado para avaliação de dor e do tipo de opióide administrado. Usualmente, estas diferenças são observadas para a morfina e agonistas preferenciais de receptor *mu*, em modelos que utilizam estímulos térmicos para avaliação da nocicepção (STOFFEL et al., 2005; TERNER et al., 2006; SHANE et al., 2007).

Para a avaliação da duração do efeito antinociceptivo da crotalfina, foram utilizadas 3 doses: (a) a dose de 5 μg/kg, a qual, além de inibir a hipernocicepção acarretada por PGE_2, também induz aumento do limiar nociceptivo, em relação à medida basal. Esta dose foi utilizada uma vez que nos estudos anteriores, realizados em machos, foi sempre utilizada a dose capaz de promover aumento do limiar nociceptivo em relação à medida basal (KONNO et al., 2008); (b) a DE90 (0,07 μg/kg em fêmeas e 1,8 μg/kg em machos); (c) a menor dose capaz de bloquear o efeito hipernociceptivo da PGE_2 (0,008 μg/kg em fêmeas e 0,2 μg/kg em machos). Os resultados obtidos demonstram que, para a dose de 5 μg/kg, o efeito antinociceptivo da crotalfina em fêmeas, é também de longa duração e mais duradouro que em machos, uma vez que foi detectado por 144 h (6 dias) após sua administração, enquanto que em machos, esta dose acarretou efeito por 120 h (5 dias). Para a dose efetiva 90% o efeito do peptídeo foi detectado, em fêmeas, por 3 dias (72 h) após sua administração e em machos, a dose efetiva 90% acarretou

efeito antinociceptivo detectado por 120 h após a administração do peptídeo. Contudo, quando foi utilizada a menor dose capaz de bloquear a hipernocicepção (e que não altera o limiar nociceptivo dos animais, em relação à medida basal), o efeito antinociceptivo foi de 24 h em machos e 72 h em fêmeas.

Estes resultados em conjunto, indicam que a crotalfina induz, tanto em ratos machos quanto fêmeas, potente ação antinociceptiva, de longa duração; contudo, a duração do efeito é maior em fêmeas e dependente da dose utilizada.

Uma vez que a crotalfina tem ação tipo opióide, foi utilizada, presentemente a morfina como controle positivo. No presente trabalho, os dados obtidos com a morfina mostraram que, pelo menos no modelo de hipernocicepção mecânica induzida por PGE_2, as fêmeas são mais sensíveis ao efeito antinociceptivo do opióide. É importante lembrar que a maioria dos dados de literatura envolvendo modelos experimentais decorre de estudos que utilizam modelos de dor manifesta ou estímulos nociceptivos térmicos, enquanto nos nossos estudos foi utilizado o teste de pressão de pata de ratos, que emprega estímulo nociceptivo mecânico, fato que poderia contribuir para as diferenças observadas, com relação aos dados da literatura. Os trabalhos utilizam ainda, diferentes espécies ou linhagens de animais, em diferentes estágios da vida, ou ainda distintas vias de administração de fármacos (administração central ou periférica) (CICERO; NOCK; MEYER, 1997; KEST et al., 1999; COOK et al., 2000; MOGIL et al., 2000; HOLTMAN JR; JING; WALA, 2003; CRAFT et al., 2004; JI et al., 2006).

Assim, os dados da literatura, ainda controversos, tem mostrado que: (a) a morfina induz efeito mais pronunciado em machos do que em fêmeas (NEGUS e MELLO, 1999; COOK et al., 2000; CRAFT e BERNAL, 2001; HOSSEINI et al., 2010); (b) fêmeas apresentam maior resposta à estes opióides (ALI; SHARIF; ELKADI, 1995; MOGIL et al., 2000) (c) alguns estudos clínicos têm indicado que mulheres são mais sensíveis ao efeito analgésico da morfina (KEST et al., 2000); (d) homens apresentam maior sensibilidade ao efeito deste fármaco (CEPEDA e CARR, 2003; MILLER e ERNST, 2004); (e) em trabalho recente de revisão sistemática e meta-análise de estudos experimentais e clínicos, foram utilizados dados de trabalhos envolvendo o efeito de opióides em modelos de dor aguda. Foram avaliados cerca de 25 estudos clínicos que envolviam uso de agonistas *mu* opióides

(morfina, fentanil, buprenorfina e meperidina), totalizando 5971 homens e 6388 mulheres. Interessantemente, a integração dos dados destes estudos mostrou que agonistas *mu* opióides são mais eficazes em mulheres. A restrição das análises para estudos (totalizando 11 artigos) que empregavam apenas morfina como agonista *mu* opióide, mostraram que este fármaco possui efeito ainda maior em mulheres. Os dados apresentados neste trabalho, de que mulheres apresentam maior analgesia induzida por agonistas opióides, do que homens, são controversos em relação à grande parte dos trabalhos publicados nos últimos anos e indicam a necessidade da inclusão de animais fêmeas ou mulheres nos protocolos experimentais de estudos relacionados ao efeito de fármacos e sensibilidade dolorosa (NIESTERS et al., 2010).

Vários dados de literatura têm mostrado que a morfina, quando administrada em altas doses, interfere com a atividade motora dos animais (VASKO e DOMINO, 1978; KURIBARA, 1996). Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório, demonstraram que a morfina, até a dose de 5,0 mg/kg não causa alterações na atividade locomotora dos ratos machos, avaliada no teste do campo aberto, porém doses superiores induzem alterações motoras e na freqüência respiratória destes animais (GUTIERREZ et al., 2003). Assim, uma vez que foi detectada maior sensibilidade ao efeito antinociceptivo da morfina, nos animais fêmeas, e uma vez que o teste utilizado para avaliação da nocicepção emprega uma resposta motora, investigamos se a maior sensibilidade das fêmeas à morfina não seria decorrente de possíveis alterações na atividade motora destes animais. Os resultados dos estudos realizados no campo aberto demonstram que não existem alterações significativas nos parâmetros de locomoção e levantar dos ratos fêmeas tratados com morfina, sugerindo que o efeito antinociceptivo deste opióide em fêmeas não decorre de alterações da atividade motora.

As possíveis alterações na atividade motora dos animais causadas pela crotalfina, foram também presentemente avaliadas. Para estes estudos, foi também utilizado o teste do Campo Aberto. Cabe ressaltar que estudos anteriores realizados em nosso laboratório, em machos, indicam que pelo menos até a dose de 5 µg/kg, o peptídeo não interfere com a atividade locomotora dos animais (BRIGATTE et al., 2001; BRIGATTE et al., 2007; GUTIERREZ et al., 2008). Os resultados obtidos indicam que, nas fêmeas, as doses de crotalfina utilizadas não interferem com a

atividade locomotora dos animais, indicando que os efeitos observados para o peptídeo, nos modelos de nocicepção, não são conseqüência de alterações da atividade motora dos animais.

Após a caracterização das possíveis diferenças no efeito da crotalfina entre animais machos e fêmeas, avaliamos se houveram diferenças nos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo deste peptídeo, em ambos os sexos. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, em animais machos, indicaram que o efeito antinociceptivo da crotalfina é mediado pela ativação de receptores opióides periféricos, sendo que o tipo de receptor envolvido está na dependência do modelo experimental utilizado (GUTIERREZ et al., 2008; KONNO et al., 2008).

Assim, iniciamos a caracterização do tipo de receptor opióide envolvido no efeito da crotalfina em animais fêmeas, no modelo de hipernocicepção induzida por PGE_2. Os resultados obtidos mostraram que, da mesma forma que o observado para os machos, os receptores opióides do tipo *kappa* estão envolvidos no efeito antinociceptivo periférico da crotalfina, em fêmeas, neste modelo de hipernocicepção, uma vez que apenas o antagonista deste receptor foi capaz de promover reversão do efeito da crotalfina. Os dados mostrando que receptores opióides periféricos do tipo *kappa* medeiam o efeito da crotalfina e que em fêmeas a crotalfina induz efeito antinociceptivo mais potente e de maior duração do que em machos corroboram, pelo menos em parte, dados da literatura mostrando que agonistas de receptores opióides do tipo *kappa*, induzem antinocicepção de maior magnitude em fêmeas (BINDER et al., 2000; CLEMENTE et al., 2004).

A importância dos receptores opióides *kappa* em fêmeas, foi comprovada presentemente, nos ensaios *in vitro* de avaliação da expressão de receptores opióides. Os resultados mostraram que fêmeas expressam mais receptores opióides do tipo *kappa* (38%), em relação aos machos, não sendo detectadas diferenças para os outros tipos de receptores opióides. Com base nestes dados é possível sugerir que a maior efetividade da crotalfina em fêmeas, pode ser decorrente da maior disponibilidade de receptores do tipo *kappa* no tecido periférico. Ainda, a maior expressão de receptores *kappa* poderia contribuir para explicar a maior efetividade de agonistas *kappa* e de agonistas de ação mista, como por exemplo a pentazocina, nalbufina e butorfanol, em fêmeas e também em mulheres, conforme demonstram

dados da literatura (GEAR et al., 1996). Dados recentes da literatura têm evidenciado que os mecanismos reponsáveis pelas diferenças sexuais observadas, para os efeitos decorrentes da ativação de receptores kappa opióide podem ser mediados por diferenças nos cromossomos sexuais por influências organizacionais dos hormônios gonadais e/ou por influências ativacionais dos hormônios na expressão, distribuição e localização destes receptores (RASAKHAM e LIU-CHEN, 2011).

Estudos recentes sobre os mecanismos moleculares envolvidos no efeito dos opióides, têm mostrado que o efeito antinociceptivo de agonistas de receptores do tipo *mu* e *delta* pode ser decorrente, dentre outros fatores, da ativação da via da fosfoinositídeo-inositol-3-quinase (PI_3K) (NARITA et al., 2002; CUNHA et al., 2010). Ainda, estudos realizados em roedores têm mostrado que na substância cinzenta periaquedutal, uma região envolvida com o controle da dor, há co-localização de receptores opióides, principalmente do tipo *mu e delta*, e a PI_3K (NARITA et al., 2002). Este estudo demonstrou que o pré-tratamento, por via intra-cérebroventricular (i.c.v), com inibidor específico da PI_3K, acarreta acentuada inibição da antinocicepção induzida por agonistas dos receptores *mu e delta*. Estes dados indicam o possível envolvimento da PI_3K central na antinocicepção mediada por receptores opióides do tipo *mu e delta* (NARITA et al., 2002). A PI_3K pode ser ativada subsequentemente à ativação de vários tipos de receptores de membrana, como os receptores com atividade tirosina quinase e receptores acoplados à proteína G, como por exemplo, os receptores opióides (PAEZ e SELLERS, 2003). Subsequentemente à ativação desta quinase ocorre a ativação da proteína quinase B, ou Akt e assim, consecutivamente, ocorre ativação de diversas cascatas de quinases (NARITA et al., 2002).

Uma vez que confirmamos a participação de receptores opióides no efeito antinociceptivo da crotalfina, a próxima etapa do presente trabalho foi verificar se a PI_3K poderia estar envolvida no efeito da crotalfina em fêmeas e machos. Nestes estudos, a morfina foi utilizada como controle positivo. Assim foram empregados dois inibidores da PI_3K, um inibidor seletivo, covalente e irreversível, o wortmannin, e um inibidor reversível, menos potente que o primeiro, o LY294002 (dados não mostrados). Estes compostos não possuem relação estrutural entre si, permeiam

membranas celulares e possuem baixo peso molecular, características que os tornam inibidores bastante específicos para a maioria das PI_3K.

A administração do wortmannin reverteu o efeito antinociceptivo da morfina, confirmando o envolvimento da PI_3K na mediação deste opióide, em machos, (CUNHA et al., 2010), e caracterizando o envolvimento desta quinase também em fêmeas. Interessantemente, esta quinase não modula o efeito da crotalfina, em machos e fêmeas, no modelo de nocicepção presentemente empregado, uma vez que o wortmannin, administrado 90 minutos após a injeção de PGE_2 não interferiu com o efeito antinociceptivo do opióide. Cabe ressaltar que foram utilizados outros esquemas de tratamento (wortmannin administrado 1 h antes dos tratamentos com crotalfina ou então administrado 90 minutos após a crotalfina e PGE_2, dados não mostrados), e outro inibidor da PI_3K, o LY294002 (dados não mostrados), os quais não foram também capazes de reverter o efeito da crotalfina.

Com base nos dados obtidos, mostrando a participação de receptores do tipo *kappa* no efeito da crotalfina, em modelos de dor aguda, seria possível sugerir que a ausência de envolvimento da PI_3K no efeito da crotalfina poderia estar relacionado ao tipo de receptor opióide ativado. Para avaliar essa hipótese foi empregado, no nosso estudo, um agonista seletivo de receptores *kappa* opióides, o U 50,488. Nas nossas condições experimentais, o inibidor da PI_3K (wortmannin) foi capaz de reverter a ação do agonista, indicando que esta quinase pode ser ativada como consenquência também da ativação de receptores opióides do tipo *kappa.*

Estudos *in vitro* realizados recentemente pelo nosso grupo (ZAMBELLI, et al., em fase de elaboração), utilizando cultura de células do gânglio da raiz dorsal (DRG) obtidos de animais *naive*, mostraram que o agonista de receptor opióide do tipo *kappa,* mas não a crotalfina, é capaz de ativar a Akt, sugerindo que a crotalfina, diferentemente da morfina ou U 50,488, não ativa a via de sinalização PI_3K - Akt. Não temos até o momento, dados que possam explicar a ausência de ativação desta via, pela crotalfina. Contudo, é possível sugerir que a crotalfina promova a ativação do receptor *kappa* por mecanismos envolvendo a ativação de outras cascatas de quinases ou por mecanismos indiretos, não dependentes de ligação ao receptor.

A próxima etapa deste trabalho foi avaliar as possíveis diferenças na ação da crotalfina, em ratos machos e fêmeas, utilizando um modelo de dor crônica. Para

este estudo, foi escolhido o modelo de dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos, uma vez que a ação da crotalfina, neste modelo, já havia sido caracterizada em machos (GUTIERREZ et al., 2008). Neste modelo foram avaliados os fenômenos de hipernocicepção e alodinia, fenômenos clássicos associados ao desenvolvimento de neuropatias.

De acordo com os dados apresentados, a ligadura do nervo isquiático acarretou hipernocicepção e alodinia, detectados na 24ª h após a cirurgia e que se mantiveram presentes pelo menos até o 14° dia do pós - operatório. Neste modelo não foram detectadas diferenças na resposta nociceptiva, entre machos e fêmeas, à lesão nervosa. Por outro lado, a crotalfina, da mesma forma que o observado nos modelos de hipernocicepção induzida por prostaglandina, foi mais efetiva em inibir a dor neuropática em fêmeas do que em machos. Esta efetividade foi presentemente confirmada pelo cálculo das DE90 em ambos os sexos. Até o momento, poucos estudos em roedores têm sido realizados com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os sexos na vigência de dor neuropática. Diferentemente do detectado no nosso estudo, Tall et al. observaram que a hipernocicepção e alodinia induzidas pela CCI, são de maior magnitude em fêmeas, em relação à machos (TALL et al., 2001).

Na continuidade do desenvolvimento deste estudo, avaliamos a duração do efeito antinociceptivo da crotalfina nas fêmeas, neste modelo de dor neuropática. Dados anteriores, obtidos pelo nosso grupo, evidenciaram que em machos, o efeito antinociceptivo da crotalfina, em dose capazes de não só reverter a hipernocicepção e alodinia causadas pela constrição do nervo isquiático, mas também de induzir incremento do limiar nociceptivo dos animais, em comparação com a medida basal, é de longa duração e detectado por um período de 3 dias após a administração do peptídeo (Gutierrez et al., 2008). Os resultados ora obtidos indicam que, nas doses utilizadas, não há diferença na duração da ação da crotalfina, entre machos e fêmeas,.

O envolvimento de receptores opióides no efeito da crotalfina, neste modelo de dor neuropática, foi também avaliado em fêmeas. De acordo com dados obtidos previamente em nosso laboratório (GUTIERREZ et al., 2008), receptores opióides do tipo *kappa* e *delta* medeiam a antinocicepção induzida pela crotalfina neste modelo

de dor crônica, em ratos machos. Os dados obtidos no presente estudo, em fêmeas, demonstram, assim como observado anteriormente em machos, o envolvimento destes dois tipos de receptores opióides na antinocicepção induzida pela crotalfina, uma vez que os antagonistas seletivos de receptores *kappa e delta*, mas não de receptores opióides do tipo *mu,* foram capazes de reverter o efeito da crotalfina.

Vários estudos têm mostrado que as diferenças na resposta à dor e a analgésicos opióides, entre machos e fêmeas, são dependentes ou moduladas pela ação de hormônios gonadais (CRAFT, 2007; CRAFT et al., 2008; SANOJA e CERVERO, 2008; LU et al., 2009; SANOJA e CERVERO, 2010). Uma vez que os resultados apresentados mostraram que a crotalfina é mais efetiva em fêmeas que em machos, avaliamos o envolvimento dos hormônios esteroidais nesta maior eficácia da crotalfina em animais fêmeas. Para tanto, foi escolhido o modelo de hipernocicepção induzida por PGE_2. Fêmeas foram submetidas à cirurgia de ovariectomia e posteriormente à reposição hormonal. A efetividade da OVX e da reposição hormonal foi confirmada por técnicas amplamente utilizadas em diversos estudos, como a técnica de lavado vaginal, para análise das células presentes no lavado vaginal e a pesagem do útero (KREN et al., 2008; LU et al., 2009; ROBBINS et al., 2010).

Nossos resultados mostraram que fêmeas ovariectomizadas possuem limiares nociceptivos mais altos para a estimulação mecânica, em comparação com fêmeas com gônadas intactas ou falso-operadas, sendo equiparável ao limiar de machos. Esses dados estão de acordo com dados da literatura que mostram que na ausência de hormônios sexuais, decorrente da remoção dos órgãos responsáveis pela sua produção, há aumento do limiar nociceptivo de fêmeas (TERNER et al., 2002; CRAFT et al., 2004; CRAFT, 2007). O próximo passo deste estudo foi verificar se as alterações fisiológicas promovidas pela remoção dos ovários resultariam em alterações na resposta dos animais à hipernocicepção induzida pela PGE_2. Os resultados mostraram que fêmeas OVX apresentam acentuada diminuição do limiar nociceptivo, em resposta à PGE_2, de maneira similar aos animais machos.

A etapa seguinte foi confirmar se o limiar nociceptivo mais baixo em fêmeas é dependente dos hormônios esteroidais gonadais. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que fêmeas OVX submetidas à reposição hormonal, tiveram acentuada diminuição do limiar nociceptivo em relação às fêmeas castradas e

tratadas apenas com óleo vegetal. A reposição hormonal diminuiu também a resposta das fêmeas à PGE_2, em relação ao grupo controle (óleo vegetal). Estes dados indicam que os hormônios esteroidais em fêmeas, são importantes na regulação do limiar nociceptivo destes animais. Por outro lado, a crotalfina, na dose de 5 μg/kg, foi efetiva em bloquear a hipernocicepção, tanto em fêmeas OVX quanto em fêmeas OVX submetidas à reposição hormonal, indicando que a maior efetividade da crotalfina não é dependente da modulação pelos hormônios sexuais gonadais.

Trabalhos recentes têm mostrado que regimes de reposição hormonal em fêmeas submetidas à castração podem alterar o limiar nociceptivo destes animais (CRAFT, 2007; FILLINGIM et al., 2009; ROBBINS et al., 2010). Estes estudos também têm verificado não só a influência hormonal na nocicepção, como também na efetividade da morfina em bloquear hipernocicepção (STOFFEL; ULIBARRI; CRAFT, 2003; CRAFT et al., 2007). Entretanto, estes dados da literatura ainda permanecem controversos. Esses diferentes resultados podem estar correlacionados com os diferentes protocolos experimentais e/ou regimes de administração de hormônios, (administrações agudas ou crônicas, de estradiol e/ou progesterona, em diferentes doses e vias de administração) (CRAFT, 2007; LU et al., 2009; ROBBINS et al., 2010).

Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar essa interferência dos hormônios esteroidais gonadais na nocicepção e no efeito de fármacos analgésicos. Uma das linhas de investigação evidencia a co-localização de receptores para hormônios, como por exemplo, receptores de estrógeno do tipo ERα e ERβ, em regiões relacionadas ao processamento de informação nociceptiva. Estes receptores estariam amplamente distribuídos em neurônios do corno dorsal da medula espinal, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, sistema límbico, gânglio da raiz dorsal, regiões onde também estão amplamente distribuídos receptores opióides (TALEGHANY et al., 1999; PAPKA e STOREY-WORKLEY, 2002; PURVES-TYSON e KEAST, 2004; CHABAN e MICEVYCH, 2005; EVRARD, 2006). A distribuição dos receptores ER no SNC e periferia, evidencia o importante papel que estas substâncias desempenham no controle e manunteção de diversos processos.

Portanto, a influência hormonal em sistemas relacionados à nocicepção poderia ocorrer por meio da interferência direta na expressão de receptores opióides. Em

estudo realizado por Petersen e colaboradores, em animais com implantes hormonais, a progesterona foi capaz de aumentar a expressão do RNAm para receptores do tipo *mu*, em neurônios da área pré-óptica e núcleo arqueado (PETERSEN e LAFLAMME, 1997). Outros estudos têm sugerido que, além da interferência na expressão dos receptores, o estradiol e progesterona poderiam modular diretamente neurotransmissão mediada por receptores opióides, particularmente os do tipo *mu* (ZUBIETA et al., 2002; SMITH et al., 2006), uma vez que a administração de estradiol em ratas ovariectomizadas aumenta o “binding” de agonistas opióides a estes receptores (HAMMER JR; ZHOU; CHEUNG, 1994).

Em resumo, os resultados apresentados sugerem que fêmeas apresentam menor limiar nociceptivo e, dependendo do estímulo, maior sensibilidade à dor do que machos. A crotalfina apresenta maior potência e duração de ação antinociceptiva em fêmeas. Os dados indicam ainda, que as diferenças observadas se devem, pelo menos em partes, à presença dos hormônios sexuais e possivelmente, à alterações fisiológicas na expressão dos receptores opióides.

Atualmente, sabe-se que algumas patologias estão relacionadas exclusivamente ao sexo feminino e dados clínicos têm mostrado que mulheres apresentam maior prevalência de dores do tipo crônica, respondem menos à analgésicos e por vezes, necessitam de doses maiores destes medicamentos em intervalos de tempo menores, em relação aos homens. Assim, a descoberta de fármacos com maior efetividade em mulheres favorece as abordagens direcionadas ao tratamento dessas patologias associadas ao sexo ou com maior prevalência em mulheres. Assim, nossos estudos apontam para a importância da crotalfina como fármaco analgésico e aumentam as evidências que demonstram ser esta substância uma droga promissora para o tratamento da dor.

6 Conclusão

Com base nos resultados apresentados é possível sugerir que fêmeas apresentam menor limiar nociceptivo e maior sensibilidade à dor, em relação aos machos. Estas diferenças são decorrentes da presença de hormônios esteroidais gonadais. A crotalfina apresenta atividade antinociceptiva de longa duração e decorrente da ativação de receptores opióides do tipo *kappa,* em modelos de dor aguda*, e kappa e delta,* em modelo de dor neuropática, em ratos machos e fêmeas. Contudo, a crotalfina apresenta maior potência antinociceptiva em fêmeas. É possível sugerir, com base nos dados apresentados, que a maior potência da crotalfina em fêmeas possa ser decorrente da maior expressão de receptores opióides do tipo *kappa.*

Estes resultados evidenciam a importância da inclusão de animais fêmeas em estudos de avaliação de novos fármacos com atividade analgésica

REFERÊNCIAS*

ADAMS JR., C. A. et al. Acute lung injury after hemorrhagic shock is dependent on gut injury and sex. **Am. Surg.,** v. 66, n. 10, p. 905-913, 2000.

AIMONE, L. D.; YAKSH, T. L. Opioid modulation of capsaicin-evoked release of substance P from rat spinal cord in vivo. **Peptides,** v. 10, n. 6, p. 1127-1131, 1989.

ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **J. Neurosci.,** v. 19, n. 6, p. 2181-2186, 1999.

ALI, B. H.; SHARIF, S. I.; ELKADI, A. Sex differences and the effect of gonadectomy on morphine-induced antinociception and dependence in rats and mice. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.,** v. 22, n. 5, p. 342-344, 1995.

AMARANTE, L. H.; DUARTE, I. D. The kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 454, n. 1, p. 19-23, 2002.

AMAYA, F. et al. The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. **J. Neurosci.,** v. 26, n. 50, p. 12852-12860, 2006.

ATWEH, S. F.; KUHAR, M. J. Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Spinal cord and lower medulla. **Brain Res.,** v. 124, n. 1, p. 53-67, 1977.

BANERJEE, P.; CHATTERJEE, T. K.; GHOSH, J. J. Ovarian steroids and modulation of morphine-induced analgesia and catalepsy in female rats. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 96, n. 3-4, p. 291-294, 1983.

BARRETT, A. C.; SMITH, E. S.; PICKER, M. J. Sex-related differences in mechanical nociception and antinociception produced by mu- and kappa-opioid receptor agonists in rats. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 452, n. 2, p. 163-173, 2002.

BARRETT, A. C.; SMITH, E. S.; PICKER, M. J. Capsaicin-induced hyperalgesia and mu-opioid-induced antihyperalgesia in male and female Fischer 344 rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 307, n. 1, p. 237-245, 2003.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BECKETT, A. H.; CASY, A. F. Synthetic analgesics: stereochemical considerations. **J. Pharm. Pharmacol.,** v. 6, n. 12, p. 986-1001, 1954.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain,** v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988.

BERGLUND, L. A.; SIMPKINS, J. W. Alterations in brain opiate receptor mechanisms on proestrous afternoon. **Neuroendocrinology,** v. 48, n. 4, p. 394-400, 1988.

BERKLEY, K. J. Sex differences in pain. **Behav. Brain Sci.,** v. 20, n. 3, p. 371-380; discussion 435-513, 1997.

BERNAL, S. A. et al. PAG mu opioid receptor activation underlies sex differences in morphine antinociception. **Behav. Brain Res.,** v. 177, n. 1, p. 126-133, 2007.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet,** v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.

BEVAN, S. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Ed.). **Text Book of Pain.** Edinburgh: Chuchill-Livingstone, 1999. p. 85-103.

BIJUR, P. E. et al. Response to morphine in male and female patients: analgesia and adverse events. **Clin. J. Pain.,** v. 24, n. 3, p. 192-198, 2008.

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

BINDER, W. et al. Analgesic and antiinflammatory effects of two novel kappa-opioid peptides. **Anesthesiology,** v. 94, n. 6, p. 1034-1044, 2001.

BLEDNOV, Y. A. et al. A pervasive mechanism for analgesia: activation of GIRK2 channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 100, n. 1, p. 277-282, 2003.

BLYTH, F. M. et al. Self-management of chronic pain: a population-based study. **Pain,** v. 113, n. 3, p. 285-292, 2005.

BOBECK, E. N. et al. Drug dependent sex-differences in periaqueducatal gray mediated antinociception in the rat. **Pain,** v. 147, n. 1-3, p. 210-216, 2009.

BORNSCHEIN, R.; CROCKETT, R.; SMITH, R. Diurnal variations in the analgesic effectiveness of morphine in mice. **Neuroendocrinology,** v. 48, p. 394-400, 1977.

BOWEN, C. A. et al. Effects of mixed-action kappa/mu opioids on cocaine self-administration and cocaine discrimination by rhesus monkeys. **Neuropsychopharmacology,** v. 28, n. 6, p. 1125-1139, 2003.

BRADESI, S. Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception. **Neurogastroenterol. Motil.,** v. 22, n. 5, p. 499-511, 2010.

BRAZIL, V. **Do emprego da peçonha na terapêutica**. São Paulo: [s.n.], 1934.

BREEDLOVE, S. M. Sexual dimorphism in the vertebrate nervous system. **J. Neurosci.,** v. 12, n. 11, p. 4133-4142, 1992.

BREEDLOVE, S. M. Sexual differentiation of the human nervous system. **Annu. Ver. Psychol.,** v. 45, p. 389-418, 1994.

BRIAN M.; COX, A. B.; CALÓ, G. et al. **Opioid receptors, introductory chapter.**: IUPHAR database (IUPHAR-DB), 2009. Disponível em: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=50>. Acesso em: 02 maio 2011.

BRIGATTE, P. **Efeito antinociceptivo do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a dor de câncer em ratos. Inibição do crescimento tumoral pela crotoxina**. 2005. 152 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BRIGATTE, P. et al. Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms. **Toxicon,** v. 39, n. 9, p. 1399-1410, 2001.

BRIGATTE, P. et al. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. **J. Pain.,** v. 8, n. 5, p. 412-421, 2007.

BROADHURST, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschr. Psychosom. Med.,** v. 1, p. 63-69, 1960.

BROWNSTEIN, M. J. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 90, n. 12, p. 5391-5393, 1993.

CAIRASCO, N. G. **Ovariectomia/ Histerectomia. Fisiologia, FMRP, USP.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 2007. Disponível em: <http://www.cristina.prof.ufsc.br/endocrino/rato_gonadas.ppt.>. Acesso em: 05 ago 2008.

CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine,** v. 73, n. 1, p. 10-16, 2006.

CAVIEDES, B. E.; HERRANZ, J. L. Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain. **Rev. Neurol.,** v. 35, n. 11, p. 1037-1048, 2002.

CEPEDA, M. S.; CARR, D. B. Women experience more pain and require more morphine than men to achieve a similar degree of analgesia. **Anesth. Analg.,** v. 97, n. 5, p. 1464-1468, 2003.

CHABAN, V. V.; MICEVYCH, P. E. Estrogen receptor-alpha mediates estradiol attenuation of ATP-induced Ca2+ signaling in mouse dorsal root ganglion neurons. **J. Neurosci. Res.,** v. 81, n. 1, p. 31-37, 2005.

CHACUR, M. et al. Snake Venom Phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) Induce Mechanical Allodynia Upon Peri-Sciatic Administration: Involvement of Spinal Cord Glia, Proinflammatory Cytokines and Nitric Oxide. **Pain,** v. 108, n. 1, p. 180-191, 2004.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal or Neuroscience Methods,** v. 53, p. 55-63, 1994.

CICERO, T. J.; NEWMAN, K. S.; MEYER, E. R. Testosterone does not influence opiate binding sites in the male rat brain. **Life Sci.,** v. 33, n. 13, p. 1231-1239, 1983.

CICERO, T. J.; NOCK, B.; MEYER, E. R. Sex-related differences in morphine's antinociceptive activity: relationship to serum and brain morphine concentrations. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 282, n. 2, p. 939-944, 1997.

CICERO, T. J. et al. Role of steroids in sex differences in morphine-induced analgesia: activational and organizational effects. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 300, n. 2, p. 695-701, 2002.

CLEMENTE, J. T. et al. Sexual dimorphism in the antinociception mediated by kappa opioid receptors in the rat temporomandibular joint. **Neurosci. Lett.,** v. 372, n. 3, p. 250-255, 2004.

COOK, C. D. et al. Sex-related differences in the antinociceptive effects of opioids: importance of rat genotype, nociceptive stimulus intensity, and efficacy at the mu opioid receptor. **Psychopharmacology,** v. 150, n. 4, p. 430-442, 2000.

CORNIL, C. A.; BALL, G. F.; BALTHAZART, J. Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from? **Brain Res.,** v. 1126, n. 1, p. 2-26, 2006.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Pain: molecular mechanisms. **J. Pain,** v. 1, n. 3 p. 35-44, 2000.

CRAFT, R. M. Sex differences in opioid analgesia: "from mouse to man". **Clin. J. Pain,** v. 19, n. 3, p. 175-186, 2003.

CRAFT, R. M. Modulation of pain by estrogens. **Pain,** v. 132, p. S3-12, 2007. Suppl 1.

CRAFT, R. M. Sex differences in analgesic, reinforcing, discriminative, and motoric effects of opioids. **Exp. Clin. Psychopharmacol.,** v. 16, n. 5, p. 376-385, 2008.

CRAFT, R. M.; BERNAL, S. A. Sex differences in opioid antinociception: kappa and 'mixed action' agonists. **Drug Alcohol Depend.,** v. 63, n. 3, p. 215-228, 2001.

CRAFT, R. M. et al. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. **Eur. J. Pain,** v. 8, n. 5, p. 397-411, 2004.

CRAFT, R. M.; ULIBARRI, C. Sexual differentiation of rat reproductive versus opioid antinociceptive systems. **Gend. Med.,** v. 6, p. 208-224, 2009. Suppl 2.

CRAFT, R. M.; ULIBARRI, C.; LEITL, M. D. et al. Dose- and time-dependent estradiol modulation of morphine antinociception in adult female rats. **Eur. J. Pain,** v. 12, n.4, p.472-479, 2007.

CRAFT, R. M. et al. Dose- and time-dependent estradiol modulation of morphine antinociception in adult female rats. **Eur. J. Pain,** v. 12, n. 4, p. 472-479, 2008.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.,** v. 127, n. 3, p. 671-678, 1999.

CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 107, n. 9, p. 4442-4447, 2010.

DAI, Y. et al. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. **J. Neurosci.,** v. 22, n. 17, p. 7737-7745, 2002.

DAVIDSON, J. et al. Pethidine-augmented white cell scintigraphy in inflammatory bowel disease. **Eur. J. Nucl. Med.,** v. 27, n. 6, p. 656-659, 2000.

DHAWAN, B. N., CESSELIN, F., RAGHUBIR, R., REISINE, T., BRADLEY, P. B., PORTOGHESE, P. S. AND HAMON, M. International Union of Pharmacology. XII. Classification for opioid receptors. **Pharmacol. Rev.,** v. 48, p. 567-592, 1996.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. **Neuropharmacology,** v. 26, n. 8, p. 1235-1238, 1987.

DINA, O. A. et al. Sex hormones regulate the contribution of PKCepsilon and PKA signalling in inflammatory pain in the rat. **Eur. J. Neurosci.,** v. 13, n. 12, p. 2227-2233, 2001.

DINA, O. A. et al. Role of the sensory neuron cytoskeleton in second messenger signaling for inflammatory pain. **Neuron,** v. 39, n. 4, p. 613-624, 2003.

DRAKE, A. W.; KLAKAMP, S. L. A rigorous multiple independent binding site model for determining cell-based equilibrium dissociation constants. **J. Immunol. Methods,** v. 318, n. 1-2, p. 147-152, 2007.

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

DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 186, n. 2-3, p. 289-293, 1990.

DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch. Neurol.,** v. 60, n. 11, p. 1524-1534, 2003.

ENGLAND, S.; BEVIAN, S.; DOCHERTY, R. J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **J. Physiol.,** v. 495, pt. 2, p. 429-440, 1996.

EVRARD, H. C. Estrogen synthesis in the spinal dorsal horn: a new central mechanism for the hormonal regulation of pain. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,** v. 291, n. 2, p. R291-299, 2006.

FERREIRA, S. H. **Óxido Nítrico Endógeno y Farmacos Nitrovasodilatadores**. Cantabria: Serviço de Publicaciones de la Universidad de Cantabria, 1994.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 201, n. 1, p. 121-122, 1991.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B. Prostaglandin hyperalgesia, IV: a metabolic process. **Prostaglandins,** v. 21, n. 5, p. 789-792, 1981.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. **Neuropharmacology,** v. 33, n. 11, p. 1479-1485, 1994.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. **Neuropharmacology,** v. 33, p. 1479, 1995.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca2+ dependent process. **Prostaglandins,** v. 18, n. 2, p. 179-190, 1979.

FILLINGIM, R. B. et al. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. **J. Pain,** v. 10, n. 5, p. 447-485, 2009.

FISCHER, B. D. et al. Morphine in combination with metabotropic glutamate receptor antagonists on schedule-controlled responding and thermal nociception. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 324, n. 2, p. 732-739, 2008.

FLAKE, N. M.; HERMANSTYNE, T. O.; GOLD, M. S. Testosterone and estrogen have opposing actions on inflammation-induced plasma extravasation in the rat temporomandibular joint. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,** v. 291, n. 2, p. R343-348, 2006.

FLANAGAN-CATO, L. M. et al. Sexual behaviour induces the expression of activity-regulated cytoskeletal protein and modifies neuronal morphology in the female rat ventromedial hypothalamus. **J. Neuroendocrinol.,** v. 18, n. 11, p. 857-864, 2006.

FLANAGAN-CATO, L. M.; LEE, B. J.; CALIZO, L. H. Co-localization of midbrain projections, progestin receptors, and mating-induced fos in the hypothalamic ventromedial nucleus of the female rat. **Horm. Behav.,** v. 50, n. 1, p. 52-60, 2006.

FLECKNELL, P. A. et al. Comparison of the effects of oral or subcutaneous carprofen or ketoprofen in rats undergoing laparotomy. **Vet. Rec.,** v. 144, n. 3, p. 65-67, 1999.

FOLEY, K. M.; INTURRISI, C. E. Analgesic drug therapy in cancer pain: principles and practice. **Med. Clin. North. Am.,** v. 71, n. 2, p. 207-232, 1987.

GAUMOND, I.; ARSENAULT, P.; MARCHAND, S. Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. **Brain Res.,** v. 1052, n. 1, p. 105-111, 2005.

GAUMOND, I.; SPOONER, M. F.; MARCHAND, S. Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. **Neuroscience,** v. 146, n. 1, p. 366-374, 2007.

GEAR, R. W. et al. Gender difference in analgesic response to the kappa-opioid pentazocine. **Neurosci. Lett.,** v. 205, n. 3, p. 207-209, 1996.

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

GIOIOSA, L. et al. Sex chromosome complement affects nociception in tests of acute and chronic exposure to morphine in mice. **Horm. Behav.,** v. 53, n. 1, p. 124-130, 2008.

GIORGI, R.; BERNARDI, M. M.; CURY, Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from Crotalus durissus terrificus venom. **Toxicon,** v. 31, n. 10, p. 1257-1265, 1993.

GOUARDERES, C.; CROS, J.; QUIRION, R. Autoradiographic localization of mu, delta and kappa opioid receptor binding sites in rat and guinea pig spinal cord. **Neuropeptides,** v. 6, n. 4, p. 331-342, 1985.

GRANADOS-SOTO, V. et al. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 340, n. 2-3, p. 177-180, 1997.

GREENSPAN, J. D. et al. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. **Pain,** v. 132, p. S26-45, 2007. Suppl. 1.

GUPTA, A. et al. Conformation state sensitive antibodies to G-protein coupled receptors. **J. Biol. Chem.,** v. 282, n. 8, p. 5116-5124, 2006.

GUTIERREZ, V. et al. Efeito do veneno de Crotalus durissus terrificus sobre a dor neuropática. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA, 35., 2003, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Farmacologia, 2003. p.144.

GUTIERREZ, V. P. **Efeito do veneno de Crotalus durissus terrificus sobre a dor neuropática e a resposta imune**. 2005. 146 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GUTIERREZ, V. P. et al. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 594, n. 1-3, p. 84-92, 2008.

HAMMER JR., R. P.; ZHOU, L.; CHEUNG, S. Gonadal steroid hormones and hypothalamic opioid circuitry. **Horm. Behav.,** v. 28, n. 4, p. 431-437, 1994.

HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th ed. New York: Graw-Hill Professional, 2006.

HASSAN, A. H. et al. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. **Neuroscience,** v. 55, n. 1, p. 185-195, 1993.

HELENA, C. V.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A. Luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion is under locus coeruleus control in female rats. **Brain Res.,** v. 955, n. 1-2, p. 245-252, 2002.

HOLTMAN, J. R., JR.; JING, X.; WALA, E. P. Sex-related differences in the enhancement of morphine antinociception by NMDA receptor antagonists in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 76, n. 2, p. 285-293, 2003.

HOSSEINI, M. et al. Different responses of nitric oxide synthase inhibition on morphine-induced antinociception in male and female rats. **Pathophysiology,** 2010. In press.

HUCHO, T. B. et al.. Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism. **J. Neurosci.,** v. 25, n. 26, p. 6119-6126, 2005.

IASP. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. ISSN 978-0-931092-05-3. 2011. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Definitions#Pain>. Acesso em: 11 jan. 2011.

JI, R. R.; WOOLF, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol. Dis.,** v. 8, n. 1, p. 1-10, 2001.

JI, Y. et. al. Sex differences in morphine-induced analgesia of visceral pain are supraspinally and peripherally mediated. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,** v. 291, n. 2, p. R307-314, 2006.

JI, Y.; TANG, B.; TRAUB, R. J. The visceromotor response to colorectal distention fluctuates with the estrous cycle in rats. **Neuroscience,** v. 154, n. 4, p. 1562-1567, 2008.

JONGKAMONWIWAT, N. et al. The presence of opioid receptors in rat inner ear. **Hear Res.,** v. 181, n. 1-2, p. 85-93, 2003.

JOYAL, J. L. et al. Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase. **J. Biol. Chem.,** v. 272, n. 45, p. 28183-28186, 1997.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature,** v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

JUNIEN, J. L.; WETTSTEIN, J. G. Role of opioids in peripheral analgesia. **Life Sci.,** v. 51, n. 26, p. 2009-2018, 1992.

KAISER, I. I. et al. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bhothrops asper*. **Arch. Biochem. biophys.,** v. 278, p. 319-325, 1990.

KAVALIERS, M.; HIRST, M. Tolerance to the morphine-influenced thermal response in the terrestrial snail, Cepea nemoralis. **Neuropharmacology,** v. 22, n. 11, p. 1321-1326, 1983.

KAVALIERS, M.; INNES, D. G. Sex and day-night differences in opiate-induced responses of insular wild deer mice, Peromyscus maniculatus triangularis. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 27, n. 3, p. 477-482, 1987.

KAYSER, V. et al. Estrous and sex variations in vocalization thresholds to hindpaw and tail pressure stimulation in the rat. **Brain Res.,** v. 742, n. 1-2, p. 352-354, 1996.

KEPLER, K. L. et al. Roles of gender, gonadectomy and estrous phase in the analgesic effects of intracerebroventricular morphine in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 34, n. 1, p. 119-127, 1989.

KEST, B. et al. Gender differences in opioid-mediated analgesia: animal and human studies. **Anesthesiology,** v. 93, n. 2, p. 539-547, 2000.

KEST, B. et al. Sex differences in supraspinal morphine analgesia are dependent on genotype. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 289, n. 3, p. 1370-1375, 1999.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br. J. Anaesth.,** v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KIEFFER, B. L.; EVANS, C. J. Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. **Neuropharmacology,** v. 56, p. 205-212, 2009. Suppl. 1.

KIVELL, B.; PRISINZANO, T. E. Kappa opioids and the modulation of pain. **Psychopharmacology,** v. 210, n. 2, p. 109-119, 2010.

KOHNO, T. et al. Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. **Pain,** v. 117, n. 1-2, p. 77-87, 2005.

KONNO, K. et al. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake Crotalus durissus terrificus. **Peptides,** v. 29, n. 8, p. 1293-1304, 2008.

KREN, M. C. et al. The role of gonadal hormones on opioid receptor protein density in arthritic rats. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 578, n. 2-3, p. 177-184, 2008.

KURIBARA, H. Interval-dependent inhibition of morphine sensitization of ambulation in mice by post-morphine treatment with naloxone or restraint. **Psychopharmacology,** v. 125, n. 2, p. 129-134, 1996.

LACROIX-FRALISH, M. L. et al. The organizational and activational effects of sex hormones on tactile and thermal hypersensitivity following lumbar nerve root injury in male and female rats. **Pain,** v. 114, n. 1-2, p. 71-80, 2005.

LAUTENBACHER, S.; ROLLMAN, G. B. Sex differences in responsiveness to painful and non-painful stimuli are dependent upon the stimulation method. **Pain,** v. 53, n. 3, p. 255-264, 1993.

LAWSON, K. P. et al. Sex-specificity and estrogen-dependence of kappa opioid receptor-mediated antinociception and antihyperalgesia. **Pain,** v. 151, n. 3, p. 806-815, 2010.

LEWIS, J. et al. Opioids and pain regulation. **Pain Headache,** v. 9, p. 129-159, 1987.

LI, L. et al. Ablation of estrogen receptor alpha or beta eliminates sex differences in mechanical pain threshold in normal and inflamed mice. **Pain,** v. 143, n. 1-2, p. 37-40, 2009.

LILES, J. H.; FLECKNELL, P. A. A comparison of the effects of buprenorphine, carprofen and flunixin following laparotomy in rats. **J. Vet. Pharmacol. Ther.,** v. 17, n. 4, p. 284-290, 1994.

LORD, J. A.; WATERFIELD, A. A.; HUGHES, J. et al. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. **Nature,** v. 267, n. 5611, p. 495-499, 1977.

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrone-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflamm. Res.,** v. 45, n. 6, p. 308-311, 1996.

LOYD, D. R. et al. Morphine preferentially activates the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the male rat: A potential mechanism for sex differences in antinociception. **Neuroscience,** v. 147, n. 2, p. 456-468, 2007.

LOYD, D. R.; MURPHY, A. Z. Sex differences in the anatomical and functional organization of the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the rat: a potential circuit mediating the sexually dimorphic actions of morphine. **J. Comp. Neurol.,** v. 496, n. 5, p. 723-738, 2006.

LOYD, D. R.; MURPHY, A. Z. The role of the periaqueductal gray in the modulation of pain in males and females: are the anatomy and physiology really that different? **Neural. Plast.,** v. 2009, p. 462879, 2009.

LU, Y. C.; CHEN, C. W.; WANG, S. Y. et al. 17Beta-estradiol mediates the sex difference in capsaicin-induced nociception in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 331, n. 3, p. 1104-1110, 2009.

MAINGRET, F. et al. Neurotransmitter modulation of small-conductance Ca2+-activated K+ channels by regulation of Ca2+ gating. **Neuron,** v. 59, n. 3, p. 439-449, 2008.

MANSON, J. E. Pain: sex differences and implications for treatment. **Metabolism,** v. 59, p. S16-20, 2010. Suppl. 1.

MARCONDES, F. K. et al. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.,** v. 62, n. 4A, p. 609-614, 2002.

MARTIN, W. R. et al. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 197, n. 3, p. 517-532, 1976.

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

MARTINI, L. et al. Modulation of sex steroids of brain opioid receptors : implications for the control of gonadotropins and prolactin secretion. **J. Steroid Biochem.,** v. 33, p. 673-681, 1989.

MAURICE, T.; SU, T. P. The pharmacology of sigma-1 receptors. **Pharmacol. Ther.,** v. 124, n. 2, p. 195-206, 2009.

MCEVER, R. P. et al. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. **J. Clin. Invest.,** v. 84, n. 1, p. 92-99, 1989.

MEI, J.; PASTERNAK, G. W. Sigma1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 300, n. 3, p. 1070-1074, 2002.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.,** v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.,** v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MILLER, P. L.; ERNST, A. A. Sex differences in analgesia: a randomized trial of mu versus kappa opioid agonists. **South Med. J.,** v. 97, n. 1, p. 35-41, 2004.

MILLIGAN, E. D. et al. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. **Brain Res.,** v. 861, n. 1, p. 105-116, 2000.

MOGIL, J. S. et al. Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. **Neurosci. Biobehav. Rev.,** v. 24, n. 3, p. 375-389, 2000.

NARITA, M. et al. Implications of phosphoinositide 3-kinase in the mu- and delta-opioid receptor-mediated supraspinal antinociception in the mouse. **Neuroscience,** v. 113, n. 3, p. 647-652, 2002.

NEGUS, S. S.; MELLO, N. K. Opioid antinociception in ovariectomized monkeys: comparison with antinociception in males and effects of estradiol replacement. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 290, n. 3, p. 1132-1140, 1999.

NIESTERS, M. et al. Do sex differences exist in opioid analgesia? A systematic review and meta-analysis of human experimental and clinical studies. **Pain,** v. 151, n. 1, p. 61-68, 2010.

OLSSON, Y. Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. **Crit. Ver. Neurobiol.,** v. 5, n. 3, p. 265-311, 1990.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J. Clin. Invest.,** v. 120, n. 11, p. 3779-3787, 2010.

PAEZ, J.; SELLERS, W. R. PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. **Cancer Treat Res.,** v. 115, p. 145-167, 2003.

PALLER, C. J. et al. Sex-based differences in pain perception and treatment. **Pain Med.,** v. 10, n. 2, p. 289-299, 2009.

PAN, H. L. et al. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. **Pharmacol. Ther.,** v. 117, n. 1, p. 141-161, 2008.

PAPKA, R. E.; MOWA, C. N. Estrogen receptors in the spinal cord, sensory ganglia, and pelvic autonomic ganglia. **Int. Ver. Cytol.,** v. 231, p. 91-127, 2003.

PAPKA, R. E.; STOREY-WORKLEY, M. Estrogen receptor-alpha and -beta coexist in a subpopulation of sensory neurons of female rat dorsal root ganglia. **Neurosci. Lett.,** v. 319, n. 2, p. 71-74, 2002.

PATRICK, C. K.; WOODS, J. Comparison of antinociceptive effects induced by kappa-opioid agonists in male and female mice. **Analgesia,** v. 4, p. 397-404, 1999.

PETERSEN, S. L.; LAFLAMME, K. D. Progesterone increases levels of mu-opioid receptor mRNA in the preoptic area and arcuate nucleus of ovariectomized, estradiol-treated female rats. **Brain Res. Mol.,** v. 52, n. 1, p. 32-37, 1997.

PHIPPS, R. P. et al. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol. Today,** v. 12, n. 10, p. 349-352, 1991.

PICOLO, G.; CURY, Y. Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of Crotalus durissus terrificus snake venom, a delta- and kappa-opioid receptor agonist. **Life Sci.,** v. 75, n. 5, p. 559-573, 2004.

PICOLO, G.; GIORGI, R.; CURY, Y. Delta-Opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snale venom. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 391, p. 55-62, 2000.

PIVA, F. et al. Effects of steroids on the brain opioid system. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,** v. 53, n. 1-6, p. 343-348, 1995.

PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 429, n. 1-3, p. 79-91, 2001.

PUEHLER, W. et al. Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. **Neuroscience,** v. 129, n. 2, p. 473-479, 2004.

PURVES-TYSON, T. D.; KEAST, J. R. Rapid actions of estradiol on cyclic amp response-element binding protein phosphorylation in dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience,** v. 129, n. 3, p. 629-637, 2004.

QUIRION, R. Pain, nociception and spinal opioid receptors. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry,** v. 8, n. 4-6, p. 571-579, 1984.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. **Arch. Inst. Pharmacodyn.,** v. 111, p. 209-219, 1957.

RASAKHAM, K.; LIU-CHEN, L. Y. Sex differences in kappa opioid pharmacology. **Life Sci.,** v. 88, n. 1-2, p. 2-16, 2011.

RATKA, A.; SIMPKINS, J. W. Effects of estradiol and progesterone on the sensitivity to pain and on morphine-induced antinociception in female rats. **Horm. Behav.,** v. 25, n. 2, p. 217-228, 1991.

RECHTHAND, E.; RAPOPORT, S. I. Regulation of the microenvironment of peripheral nerve: role of the blood-nerve barrier. **Prog. Neurobiol.,** v. 28, n. 4, p. 303-343, 1987.

REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. The primary afferent nociceptor as pattern generator. **Pain,** p. S103-109, 1999. Suppl 6.

REISINE, T. et al. Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. **Ann. NY Acad. Sci.,** v. 780, p. 168-175, 1996.

RICHARDSON, J.; HOLDCROFT, A. Gender differences and pain medication. **Womens Health,** v. 5, n. 1, p. 79-90, 2009.

ROBBINS, M. T. et al. Effect of estrogen on bladder nociception in rats. **J. Urol.,** v. 183, n. 3, p. 1201-1205, 2010.

ROMANO, G. et al. Differential reggulation of proenkephalin gene expression by estrogen in the ventromedial hypothalamus of male and female rats: implications for the molecular basis of a sexually differentiated behavior. **Brain Res.,** v. 536, p. 63-68, 1990.

ROMERO, M. T. et. al. Gender determinants of opioid mediation of swim analgesia in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 29, n. 4, p. 705-709, 1988.

RYAN, S. M.; MAIER, S. F. The estrous cycle and estrogen modulate stress-induced analgesia. **Behav. Neurosci.,** v. 102, n. 3, p. 371-380, 1988.

SACHS, D. et al. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K+ channel pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 101, n. 10, p. 3680-3685, 2004.

SAEGUSA, H. et al. Structure and function of T-type calcium channels. **Clin. Calcium,** v. 12, n. 6, p. 792-796, 2002.

SANOJA, R. et al. Estrogen modulation of ovariectomy-induced hyperalgesia in adult mice. **Eur. J. Pain,** v. 12, n. 5, p. 573-581, 2008.

SANOJA, R.; CERVERO, F. Estrogen-dependent changes in visceral afferent sensitivity. **Auton. Neurosci.,** v. 153, n. 1-2, p. 84-89, 2010.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch. Surg.,** v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. Excitation ans sensitization of the articular afferents from cat´s knee joint by prostaglandins E2. **J. Physiol.,** v. 403, p. 91-104, 1988.

SCHEMELZ, M. et al. Senstitizaion of intensive branches of C nociceptors in human skin. **J. Physiology.,** v. 480, p. 389-394, 1994.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nat. Neurosci.,** v. 5, p. 1062-1067, 2002.

SCHULTZ, J.; GROSS, G. Opioids and cardioprotection. **Pharmac. Ther.,** v. 89, p. 123-137, 2001.

SHANE, R. et al. Estrus phase differences in female rats in morphine antinociception elicited from the ventrolateral periaqueductal gray. **Int. J. Neurosci.,** v. 117, n. 6, p. 811-822, 2007.

SHERMAN, J. J.; LERESCHE, L. Does experimental pain response vary across the menstrual cycle? A methodological review. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,** v. 291, n. 2, p. R245-256, 2006.

SINDRUP, S. H. et al. Tramadol relieves pain and allodynia in polyneuropathy: a randomised, double-blind, controlled trial. **Pain,** v. 83, n. 1, p. 85-90, 1999.

SMITH, Y. R. et al. Pronociceptive and antinociceptive effects of estradiol through endogenous opioid neurotransmission in women. **J. Neurosci.,** v. 26, n. 21, p. 5777-5785, 2006.

STAMFORD, J. A. Descending control of pain. **Br. J. Anaesth.,** v. 75, n. 2, p. 217-227, 1995.

STEIN, C. et al. Local opioid receptors mediating antinociception in inflammation: endogenous ligands. **Prog. Clin. Biol. Res.,** v. 328, p. 425-427, 1990.

STEIN, C.; GRAMSCH, C.; HERZ, A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin. **J. Neurosci.,** v. 10, n. 4, p. 1292-1298, 1990.

STEIN, C. et al. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 87, n. 15, p. 5935-5939, 1990.

STEIN, C.; ZOLLNER, C. Opioids and sensory nerves. **Handb. Exp. Pharmacol.,** n. 194, p. 495-518, 2009.

STOELTING. **Filamentos de von Frey (Stoelting Co. ®)**. Disponível em: <http://www.usneurologicals.com/pinwheel.html> Acesso em: 03 maio 2011.
.

STOELTING, C. **Teste de pressão de patas (Analgesímetro Ugo Basile ®).** Disponível em <http://www.stoeltingco.com/stoelting/stores/stoelting/categories/57215-L.jpg> Acesso em 03 maio 2011.

STOFFEL, E. C.; ULIBARRI, C. M.; CRAFT, R. M. Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. **Pain,** v. 103, n. 3, p. 285-302, 2003.

STOFFEL, E. C.; ULIBARRI, C. M.; FOLK, J. E. et al. Gonadal hormone modulation of mu, kappa, and delta opioid antinociception in male and female rats. **J. Pain,** v. 6, n. 4, p. 261-274, 2005.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Kappa- and delta-opioids block sympathetically dependent hyperalgesia. **J. Neurosci.,** v. 11, n. 4, p. 928-932, 1991.

TALEGHANY, N. et al. Differential expression of estrogen receptor alpha and beta in rat dorsal root ganglion neurons. **J. Neurosci. Res.,** v. 57, n. 5, p. 603-615, 1999.

TALL, J. M.; et al. Gender and the behavioral manifestations of neuropathic pain. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 68, n. 1, p. 99-104, 2001.

TERNER, J. M. et al. Influence of gonadectomy on the antinociceptive effects of opioids in male and female rats. **Psychopharmacology,** v. 163, n. 2, p. 183-193, 2002.

TERNER, J. M. et al. Influence of low doses of naltrexone on morphine antinociception and morphine tolerance in male and female rats of four strains. **Pain,** v. 122, n. 1-2, p. 90-101, 2006.

TERNER, J. M. et al. Influence of estrous cycle and gonadal hormone depletion on nociception and opioid antinociception in female rats of four strains. **J. Pain,** v. 6, n. 6, p. 372-383, 2005.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nat. Rev. Neurosci.,** v. 11, n. 12, p. 823-836, 2010.

TORRES-REVERON, A. et al. Ovarian steroids alter mu opioid receptor trafficking in hippocampal parvalbumin GABAergic interneurons. **Exp. Neurol.,** v. 219, n. 1, p. 319-327, 2009.

TOUSIGNANT-LAFLAMME, Y.; MARCHAND, S. Excitatory and inhibitory pain mechanisms during the menstrual cycle in healthy women. **Pain,** v. 146, n. 1-2, p. 47-55, 2009.

UNRUH, A. M. Gender variations in clinical pain experience. **Pain,** v. 65, n. 2-3, p. 123-167, 1996.

VAN RIJN, R. M. et al. Opioid-receptor-heteromer-specific trafficking and pharmacology. **Curr. Opin. Pharmacol.,** v. 10, n. 1, p. 73-79, 2010.

VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. **Med. Clin. North. Am.,** v. 91, n. 1, p. 1-12, 2007.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. **Pain,** v. 85, n. 1-2, p. 9-18, 2000.

VASKO, M. R.; DOMINO, E. F. Tolerance development to the biphasic effects of morphine on locomotor activity and brain acetylcholine in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 207, n. 3, p. 848-858, 1978.

VINCLER, M. et al. Estrous cycle modulation of nociceptive behaviors elicited by electrical stimulation and formalin. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 69, n. 3-4, p. 315-324, 2001.

WALKER, J. S.; CARMODY, J. J. Experimental pain in healthy human subjects: gender differences in nociception and in response to ibuprofen. **Anesth. Analg.,** v. 86, n. 6, p. 1257-1262, 1998.

WEILAND, N. G.; WISE, P. M. Estrogen and progesterone regulate opiate receptor densities in multiple brain regions. **Endocrinology,** v. 126, n. 2, p. 804-808, 1990.

WIESENFELD-HALLIN, Z. Sex differences in pain perception. **Gend. Med.,** v. 2, n. 3, p. 137-145, 2005.

WITTERT, G. et al. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 218, n. 3, p. 877-881, 1996.

WOOD, P. L. The significance of multiple CNS opioid receptor types: a review of critical considerations relating to technical details and anatomy in the study of central opioid actions. **Peptides,** v. 9, p. 49-55, 1988. Suppl 1.

WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiol. Dis.,** v. 7, n. 5, p. 504-510, 2000.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science,** v. 288, n. 5472, p. 1765-1769, 2000.

YAKSH, T. L. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. **Trends Pharmacol. Sci.,** v. 20, n. 8, p. 329-337, 1999.

ZHANG, X.; BAO, L.; SHI, T. J. et al. Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. **Neuroscience,** v. 82, n. 1, p. 223-240, 1998.

ZHANG, Y. et al. Intrathecal morphine reduces allodynia after peripheral nerve injury in rats via activation of a spinal A1 adenosine receptor. **Anesthesiology,** v. 102, n. 2, p. 416-420, 2005.

ZOLLNER, C. et al. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. **Mol. Pharmacol.,** v. 64, n. 2, p. 202-210, 2003.

ZUBIETA, J. K. et al. mu-opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women. **J. Neurosci.,** v. 22, n. 12, p. 5100-5107, 2002.