JOSÉ OSVALDO BARBOSA NETO

Influência do bloqueio androgênico com flutamida no comportamento de dor e expressão de canais de sódio voltagem dependentes, Nav_{1.7} e Nav_{1.8}, em um modelo de dor pós-operatória em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título
de Doutor em Ciências

Programa de Anestesiologia

Orientador: Prof. Dr. Hazem Adel Ashmawi

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**SÃO PAULO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barbosa Neto, José Osvaldo

Influência do bloqueio androgênico com flutamida
no comportamento de dor e expressão de canais de
sódio voltagem dependentes, Nav1.7 e Nav1.8, em um
modelo de dor pós-operatória em ratos / José Osvaldo
Barbosa Neto. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Anestesiologia.

Orientador: Hazem Adel Ashmawi.

Descritores: 1.Dor aguda 2.Testosterona 3.Dor pós-
operatória 4.Canais de sódio 5.Flutamida 6.Reação em
cadeia da polimerase

USP/FM/DBD-381/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

*A glória é tanto mais tardia quanto
mais duradoura há de ser, porque
todo fruto delicioso amadurece
lentamente.*

Schopenhauer

*Ao meu avô, José Osvaldo Barbosa
("in memoriam").*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Hazem Adel Ashmawi, por seus ensinamentos, incentivo, paciência e amizade ao longo do desenvolvimento desta tese. Sua humildade, lisura moral e imensurável paciência servirão sempre como inspiração para mim.

Ao Professor Dr. João Batista Santos Garcia, meu eterno mestre e amigo, por ter me guiado e motivado desde os primeiros passos na academia, estando ao meu lado para enfrentar os momentos difíceis, comemorar nas vitórias e chorar nos fracassos. De São Francisco á Cidade do México, da iniciação científica na UFMA à defesa de tese de Doutorado na FMUSP, nossa jornada foi longa e repleta de aprendizado, e oxalá continue por muitos anos mais.

Aos demais professores, colegas e funcionários da Equipe de Controle de Dor Hospital das Clínicas, do LIM 8 e LIM 29 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Laboratório experimental para estudo da dor da Universidade Federal do Maranhão, por seus ensinamentos e apoio.

À minha esposa, Liseana de Oliveira Barbosa, que, com seu irrepreensível otimismo e sorriso contagiante, sempre esteve ao meu lado ao longo desta jornada.

Ao meu pai, Francisco Alexandrino de Almeida Barbosa, que, ao ilustrar o quão solitário e assustador pode ser estar sozinho em um pequeno barquinho a remo em meio a um vasto oceano, em detrimento de estar em um grande navio, me mostrou o quão seguros estamos no nosso seio familiar. Sua jornada acadêmica como Mestre e professor da Universidade Estadual do Maranhão sempre foram fonte de muito orgulho e espelho para minhas ambições pessoais.

À Maria da Cruz de Gomes de Almeida Barbosa, mãe amorosa e médica dedicada, por me ensinar que dedicação, perseverança e resiliência tornam qualquer jornada possível, mesmo que árdua e cheia de obstáculos. Sua inabalável confiança em minha capacidade de atingir os objetivos me impulsiona e encoraja a enfrentar novos desafios.

A minha irmã, Alexandra Gomes de Almeida Barbosa, e demais membros de minha família pela paciência pelos momentos de ausência e pelo sentimento de orgulho que percebo em todos vocês por esta conquista da família Barbosa.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de quadros	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO	6
3	REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1	Diferença da percepção de dor entre sexos.....	9
3.1.1	Evidências de estudos em seres humanos: experimentais e clínicos	9
3.1.2	O papel dos hormônios sexuais na percepção de dor em humanos	13
3.1.3	Evidências de estudos com animais.....	14
3.2	Mecanismos envolvidos na diferenciação da percepção de dor entre sexos	18
3.2.1	Hipótese hormonal	20
3.2.2	Papel dos estrogênios	23
3.2.3	Papel da progesterona	24
3.2.4	Papel dos androgênios.....	26
3.3	Canais de sódio voltagem-dependente e dor	30
3.3.1	Nav _{1.3}	36
3.3.2	Nav _{1.7}	38
3.3.3	Nav _{1.8}	41
3.3.4	Nav _{1.9}	43
3.3.5	Nav _{1.7} e Nav _{1.8} e hormônios sexuais	44
4	MÉTODOS.....	46
4.1	Considerações éticas	47
4.2	Animais da pesquisa	47
4.3	Desenho do estudo	47
4.4	Tamanho da amostra.....	49
4.5	Modelo de dor aguda pós-operatória	50
4.6	Testes comportamentais.....	50
4.7	Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real	51
4.8	Análise estatística	53
5	RESULTADOS.....	54
5.1	Limiar de retirada da pata	55
5.2	Teste de proteção do membro	56
5.3	RT-PCR	58
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÃO	64
8	ANEXO	66
9	REFERÊNCIAS	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 α -diol	- 5 α -androstandio-3 α ,17 β -diol
ANO1	- Receptor anoctamin 1
ATM	- Articulação temporomandibular
ATP	- Adenosina trifosfato
BDGF	- Fator de crescimento derivado do cérebro
BTX	- Batracotoxina
CA1	- Corno de Ammon 1
CB1	- Receptor canabinoide
CD4	- <i>Cluster of differentiation 4</i>
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
Cnr1	- Receptor canabinoide 1
DHEA	- Dehidroepiandrosterona
DHT	- Dehidrotestosterona
DVS	- Domínio voltagem sensível
E	- Estradiol
ERK	- Cinase regulada por sinal extracelular
Est	- Estrogênio
F	- Fêmea
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GABA	- Ácido gama-aminobutírico
GPR30	- Receptor estrogênico acoplado à proteína G
GRD	- Gânglio da raiz dorsal
IL	- Interleucina
KOR	- Receptor opioide kappa
M	- Macho
MAPK	- Proteínas cinases ativadas por mitógenos
miRNA	- Micro RNA
MOR	- Receptor opioide mu
MRV	- Bulbo rostro ventral
Nav	- Canal de sódio voltagem-dependente
NGF	- Fator de crescimento neural
NMDA	- N-metil-D-aspartato
Oof	- Ooforectomia

OPRM1	- Gene do receptor opioide-mu
ORL1	- <i>Opioid receptor-like 1</i>
Orq	- Orquiectomia
P	- Progesterona
PAG	- Substância cinzenta periaquedutal
PGE2	- Prostaglandina E2
PPAR	- Receptor ativado proliferador de peroxima
R	- Resistente
RA	- Receptores androgênicos
RE	- Receptor de estrogênio
RE- α	- Receptor de estrogênio alfa
RE- β	- Receptor de estrogênio beta
RNA _m	- RNA mensageiro
RT-PCR	- Reação em cadeia de polimerase em tempo real
SCN10A	- Canal de sódio voltagem-dependente tipo 10, subunidade alfa
SCN10A	- Canal de sódio voltagem-dependente tipo 11, subunidade alfa
SCN1A	- Canal de sódio voltagem-dependente tipo 1, subunidade alfa
SCN2A	- Canal de sódio voltagem-dependente tipo 2, subunidade alfa
SCN3A	- Canal de sódio voltagem-dependente tipo 3, subunidade alfa
SCN4A	- Canal de sódio voltagem-dependente tipo 4, subunidade alfa
SCN5A	- Canal de sódio voltagem-dependente tipo 5, subunidade alfa
SCN6A	- Canal de sódio voltagem-dependente tipo 6, subunidade alfa
SCN8A	- Canal de sódio voltagem-dependente tipo 8, subunidade alfa
SCN9A	- Canal de sódio voltagem-dependente tipo 9, subunidade alfa
SNC	- Sistema nervoso central
SNP	- Sistema nervoso periférico
STX	- Saxitoxina
T	- Testosterona
TLR4	- Receptores Toll Like 4
TRPV1	- Receptor o tipo 1
TTX	- Tetodrotoxina
TTX-R	- Tetodroxina resistente
TTX-S	- Tetodroxina sensível

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos da dor entre os sexos em modelos animais.....	15
Quadro 2 - Mecanismos envolvidos no dimorfismo do comportamento doloroso entre os sexos	19
Quadro 3 - Canais de sódio voltagem dependente	32
Quadro 4 - Sítios receptores dos canais Nav	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Limiar de retirada da pata. O comportamento evolutivo do limiar de retirada da pata apresentado através da média e erro padrão (Teste de Von Frey).....	56
Gráfico 2 - Teste de proteção do membro. Dor espontânea representada pelos valores obtidos no teste de proteção do membro ao longo do tempo, para cada grupo	57
Gráfico 3 - Resultado do RT-PCR.....	58

RESUMO

Barbosa Neto JO. *Influência do bloqueio androgênico com flutamida sobre o comportamento doloroso e expressão de canais de sódio voltagem dependentes, Nav_{1.7} e Nav_{1.8}, em um modelo de dor pós-operatória em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: Estudos experimentais com animais sugerem que a testosterona atua reduzindo a resposta nociceptiva após estímulos inflamatórios e neuropáticos, porém, o mecanismo pela qual este hormônio atua ainda não foi completamente esclarecido. O objetivo deste estudo é avaliar se o bloqueio androgênico com flutamida promove aumento da nocicepção, e ainda, investigar se esta modulação do comportamento doloroso é decorrente de aumento da expressão de canais de sódio voltagem-dependente Nav_{1.7} e Nav_{1.8} no gânglio da raiz dorsal de ratos após incisão plantar.

Método: Os animais estudados foram divididos em um grupo que recebeu flutamida por via subcutânea, e em um grupo controle que recebeu apenas o veículo como placebo. Após o período de indução, foram submetidos a um modelo de incisão plantar, e posteriormente submetidos à avaliação comportamental nos tempos pré-operatório, 2 horas após a incisão, 1º, 2º, 3º e 7º dias de pós-operatório. O teste de von Frey foi utilizado para testar o limiar de retirada da pata, e a dor espontânea foi determinada pelo teste da proteção da pata. A expressão dos canais de sódio foi avaliada através da realização de reação de cadeia de polimerase quantitativa em tempo real para os canais Nav_{1.7} e Nav_{1.8} em amostra do gânglio da raiz dorsal correspondente à pata operada. **Resultados:** Os animais tratados com flutamida desenvolveram maior resposta a dor, tanto no teste de dor evocada quanto no teste da proteção da pata em todos os momentos estudados. Os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa no 1º, 2º, 3º e 7º dias de pós-operatório para o limiar de retirada da pata. No teste da proteção da pata, foram significantes nos tempos 2 horas, 3º e 7º dia de pós-operatório. Não houve diferença entre os grupos estudados para a expressão de Nav_{1.7} e Nav_{1.8}, para cada tempo. A análise de variância mostrou que a expressão de Nav_{1.7} variou em função do tempo em ambos os grupos, o que não ocorreu na expressão de Nav_{1.8}. **Conclusão:** Neste estudo foi possível demonstrar que o bloqueio androgênico provocou a redução do limiar para retirada da pata após o 1º dia de pós-operatório, e ainda um escore acumulado no teste de proteção do membro que foi mais elevado no tempo 2 horas, no 3º e 7º dia de pós-operatório. Estes dados sugerem que os androgênios apresentaram um efeito antinociceptivo após a incisão plantar, e ainda que este efeito foi independente dos canais Nav_{1.7} e Nav_{1.8} no gânglio da raiz dorsal.

Descritores: dor aguda; testosterona; dor pós-operatória; canais de sódio; flutamida; reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Barbosa Neto JO. *Influence of androgenic blockade with flutamide on pain behavior and expression of voltage-dependent sodium channels, Nav_{1.7} and Nav_{1.8}, in a model of postoperative pain in rats* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Introduction: Evidence accumulated over the years has placed sex hormones as key factors of the differences found between males and females. Experimental studies with animals suggest that testosterone acts to reduce the nociceptive response after inflammatory and neuropathic stimuli, but the mechanism by which this hormone acts has not yet been fully elucidated. The objective of this study was to evaluate if androgenic blockade with flutamide promotes increased nociception in rats and to investigate whether this modulation of the painful behavior is due to an increase in the expression of voltage-dependent sodium channels Nav_{1.7} and Nav_{1.8} in the Dorsal root ganglion of rats submitted to a postoperative pain model. **Methods:** The animals studied were divided into a group that received flutamide subcutaneously, and in a control group receiving only placebo. After the induction period, the animals were submitted to a model of plantar incision, and then submitted to behavioral evaluation in the preoperative times, 2 hours after incision, 1st PO, 2nd PO, 3rd PO and 7th PO. The animals were submitted to Von Frey's test to determine the evoked pain, and the spontaneous pain was determined by the paw protection test (Guarding Pain). The expression of the sodium channels was evaluated by performing real time quantitative polymerase chain reaction for Nav channels in the dorsal root ganglion sample corresponding to the incised hindpaw. **Results:** Animals treated with flutamide developed greater nociception in both the evoked pain test and the paw protection test at all times studied. Statistically significant differences were found in the times 1st PO, 2nd PO, 3rd PO and 7th PO for the paw withdrawal threshold. Guarding pain test showed significant results at 2 hours, 3rd PO and 7th PO. No difference was found between the studied groups for the expression of Nav_{1.7} or Nav_{1.8} at each time point. Variance analysis showed that Nav_{1.7} expression was dependent on time in both groups, but Nav_{1.8} expression did not change over time. **Conclusions:** In this study it was possible to demonstrate that flutamide caused a reduction in the paw withdrawal threshold after the 1st postoperative day, and also a guarding pain score that was higher 2 hours after incision, on the 3rd and 7th day of postoperative. Data presented in this study suggest an antinociceptive effect of androgens after plantar incision that was independent of Nav channels.

Descriptors: acute pain; testosterone; pain, postoperative; sodium channels; flutamide; polymerase chain reaction.

1 INTRODUÇÃO

A expressão do comportamento doloroso pode ser modificada por diversos sistemas no organismo, tais como sistema límbico, sistema adrenérgico, sistema opioide endógeno, dentre outros. Recentemente, a participação dos hormônios sexuais na modulação da dor tem recebido maior atenção da comunidade científica, e dados derivados de diversos estudos populacionais, têm sugerido que mulheres têm maior sensibilidade à dor do que homens^{1,2}.

A diferença existente entre sexos com relação à dor e analgesia têm diversas origens. Do ponto de vista histórico e sociocultural, a expectativa de uma suposta superioridade física e de maior tenacidade moral por parte dos homens pressupõe que estes deveriam ter maior tolerância à dor. A demonstração do contrário poderia ser interpretada como sinônimo de fragilidade e indício de fraqueza³. Na esfera biológica, fatores como variabilidade genética e a ação dos hormônios sexuais interferem nesta dinâmica⁴. No que tange a este tema, é importante ressaltar que Myers *et al.*⁵ descreveram uma importante diferença no uso dos termos sexo e gênero nesse campo de pesquisa. O termo sexo deve ser compreendido com a distinção biológica entre macho e fêmea, enquanto que gênero denota a masculinidade e feminilidade aprendida, e seus papéis sociais.

Diversas pesquisas, clínicas e experimentais, têm sido realizadas para estudar a relação entre os hormônios gonadais e a expressão de dor nos indivíduos. Foi percebido uma tendência de que os estrogênios podem intensificar o comportamento

doloroso^{4,6-8}. Seu papel na modificação do comportamento doloroso pôde ser observado ao longo do ciclo hormonal fisiológico das mulheres, que relataram maior percepção de dor na fase em que o estrogênio esteve em níveis mais elevados. De maneira análoga, a reposição de estrogênio em mulheres que se encontram na menopausa aumentou a incidência de dor na articulação temporomandibular^{9,10}. Mulheres em pós-operatório apresentam maior consumo de analgésicos que os homens, sugerindo maior sensibilidade à dor¹¹⁻¹³. E um estudo experimental, ratos machos que receberam injeção de estradiol nos ventrículos cerebrais por dois dias consecutivos apresentaram comportamento doloroso mais intenso quando comparados ao grupo controle⁶.

As evidências à cerca dos androgênios são escassas. Entretanto, dados obtidos a partir da observação de maior expressão de dor em indivíduos com níveis baixos de testosterona, sugerem propriedades anti-hipealgésicas deste hormônio⁴. Em ratos machos, os androgênios apresentaram efeito protetor em um experimento que utilizou modelo de osteoartrite¹⁴, enquanto que em animais gonadectomizados, o limiar de dor foi reduzido¹⁵ ou se manteve inalterado¹⁶. Contudo, o mecanismo pelo qual os hormônios sexuais produziram estas mudanças comportamentais ainda não é completamente compreendido.

Os estudos experimentais realizados neste campo utilizaram modelos dor inflamatória, (exe.: formalina, osteoartrite) e de dor neuropática (exe.: ligadura de nervo isquiático). No entanto, modelos de dor pós-operatória são incomuns¹⁷⁻²⁰.

A dor incisional apresenta dois componentes, um de dor não evocada e outro de dor evocada. O primeiro, em geral é de intensidade menor, contínua, de curta duração, e é percebida durante o repouso. Já a segunda, é geralmente intensa, de

longa duração, e em geral está relacionada a movimentos²¹⁻²⁴. Biologicamente, a dor pós-cirúrgica desencadeia uma série de alterações nos circuitos neuronais, desde a periferia até o sistema nervoso central (SNC), tais como redução no limiar periférico de dor, aumento na expressão de fatores que promovem plasticidade neuronal, e aumento da atividade cortical somatotópica²². Os neurônios do gânglio da raiz dorsal da medula (GRD) são diretamente afetados neste cenário, havendo aumento na expressão de interleucinas (IL-10), de fatores de crescimento (Fator neurotrófico derivado do cérebro [BDGF] e fator de crescimento neural [NGF]). O aumento destes fatores inflamatórios induz o aumento da expressão de canais de sódio voltagem-dependente no GRD, que por fim, leva à redução do limiar de dor e hiperalgesia na área correspondente^{22,25}.

Nos últimos anos foi dada maior atenção à participação de canais de sódio voltagem-dependentes na condução da nocicepção, especialmente os subtipos Nav_{1.7} e Nav_{1.8}^{26,27}, que têm suas expressões aumentadas no GRD nos quadros de inflamação^{26,28}.

Os canais de sódio voltagem-dependentes (Nav) são cruciais na excitação e sinalização neural, e são codificados a partir de nove genes diferentes que expressam os canais Nav_{1.1} a Nav_{1.9}. Sendo que quatro destes, o Nav_{1.3}, o Nav_{1.7}, o Nav_{1.8} e o Nav_{1.9}, são expressos nos aferentes primários e no gânglio da raiz dorsal (GRD). Estes canais são divididos também conforme a capacidade de a tetrodotoxina (TTX) inibir as suas correntes de sódio, podendo ser resistente a TTX ou sensível a TTX²⁶.

Um estudo demonstrou aumento da expressão do Nav_{1.7} no GRD após injeção de carragenina na pata do animal. O aumento da expressão deste canal pode contribuir para aumento da excitabilidade neuronal, e, portanto, está associado a

comportamento doloroso²⁸. Da mesma forma, o papel do Nav_{1.8} foi estabelecido nos quadros de dor inflamatória, onde animais que tiveram a expressão deste canal diminuída cursaram com redução da resposta a estímulos térmicos e químicos²⁹⁻³¹.

A hipótese deste estudo foi a de que o bloqueio androgênico com flutamida determinaria maior nocicepção após a incisão plantar. E ainda, que estes animais expressariam maior quantidade de canais Nav no GRD. A expressão de canais Nav não é conhecida na dor pós-operatória, tão pouco a influência que a testosterona teria sobre este mecanismo. Esta pesquisa é justificada pela escassez de dados experimentais que endossem a hipótese de que a testosterona possa interferir no comportamento doloroso ou na expressão de canais iônicos em quadro de dor pós-operatória.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do bloqueio periférico da ação da testosterona no comportamento doloroso de animais em um modelo de dor aguda pós-operatória. A expressão gênica dos canais Nav_{1.7} e Nav_{1.8} no GRD após o trauma cirúrgico e a influência do bloqueio androgênico sobre estes canais foram investigados com intuito de estabelecer o mecanismo fisiológico envolvido na diferença entre os sexos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Diferença da percepção de dor entre sexos

A diferença na sensibilidade à dor entre sexos é objeto de estudo desde a década de 1980, e, a partir das evidências obtidas desde então, foi sugerido que as mulheres teriam maior susceptibilidade à dor^{1,32,33}. No entanto, as bases fisiológicas envolvidas nestas diferenças ainda não foram totalmente elucidadas.

A percepção de dor deve ser entendida como uma experiência individual³⁴, e sujeita às diversas variáveis que a modificam, tais como os fatores biológicos (agressividade do trauma tecidual, acometimento de estruturas nervosas e capacidade analgésica do sistema endógeno) e psicossociais (tais como ansiedade e depressão) que contribuem para composição da experiência dolorosa. Em razão disto, as diferenças na percepção de dor entre os sexos podem ser oriundas de fatores genéticos, da interferência dos hormônios sexuais e de fatores socioculturais.

3.1.1 Evidências de estudos em seres humanos: experimentais e clínicos

A diferença na sensibilidade à dor entre homens e mulheres foi observada por alguns autores, tanto em estudos experimentais quanto em epidemiológicos. Testes em humanos saudáveis realizados em laboratório demonstraram que mulheres apresentavam menor limiar para dor e menor tolerância a um estímulo doloroso que os homens, independente do teste utilizado³⁵⁻³⁷. Tais técnicas consistiam em induzir dor através de estímulo mecânico (pressão, calor, frio), elétrico ou químico, e as

avaliações feitas utilizando testes de limiar e tolerância, uso de escalas de intensidade de dor, entre outros. A utilização de uma gama tão variada de técnicas se deveu ao fato destes estímulos divergirem no que tange ao local de aplicação no corpo, parâmetros temporais de estimulação, e tipo de dor provocada³³.

Um grupo de autores compilou estas informações em um estudo de metanálise com intuito de determinar se de fato havia diferença entre os sexos para de dor e sua magnitude, e se haveria variação da última em função do estímulo ou da forma de avaliação. Os estudos foram divididos inicialmente entre tolerância e limiar de dor, e, subdivididos em função do estímulo doloroso utilizado. Como resultado, as mulheres apresentaram menor tolerância e menor limiar para dor independente do teste utilizado³³. No entanto, em outra metanálise, que também avaliou pacientes submetidos a testes experimentais, publicados até o ano de 2008, os autores concluíram que não foi possível detectar com clareza um padrão definido de diferença na sensibilidade à dor entre os sexos nesta modalidade de estudo. Esta revisão mostrou que o limiar para detecção de dor foi comparável entre homens e mulheres para estímulo térmico (frio), isquêmico e pressórico². A maioria dos estudos incluídos também não conseguiu demonstrar diferença na tolerância à dor e desconforto pela dor entre os sexos. Por fim, os autores discutiram que a falta de padrão no comportamento dos sexos com relação aos testes comportamentais fala contra o conceito de uma sensibilidade aumentada nas mulheres². Um outro estudo, em que foi utilizada a pupilometria como medida objetiva de avaliação de dor em resposta a um estímulo mecânico, os autores demonstraram não ter havido diferença na variação do diâmetro pupilar entre homens e mulheres³⁸.

De maneira geral, as mulheres conseguem discriminar com maior precisão as variações em estímulos sensoriais, tais como mudanças de temperatura, estímulos

gustativos, olfatórios e visuais. Parece haver, ainda, uma relação entre esta maior acuidade sensitiva e resposta mais exacerbada aos estímulos dolorosos que a que ocorre entre os homens. No entanto, esta distinção no comportamento não parece advir de resposta física ou emocional à dor, mas sim desta percepção sensorial mais acurada³. Outros mecanismos fisiológicos participam da diferenciação encontradas entre homens e mulheres, tais como a individualidade na ativação dos circuitos de modulação descendente da dor, que parece ser mais eficiente nas mulheres, permitindo maior adaptação frente a estímulos dolorosos sustentados e aos estímulos dolorosos repetidos de longa duração^{3,39}.

As mulheres também são acometidas com maior frequência por doenças crônicas que cursam com dor, tais como intestino irritável, dor pélvica crônica, migrânea, disfunção temporomandibular, artrite, fibromialgia e cistite intersticial, e ainda, com frequência a dor está presente, mesmo sem uma doença comprovada⁴⁰⁻⁴⁵. A maior prevalência de dores crônicas neste público parece estar associada a uma maior sensibilidade ao estímulo doloroso térmico, em testes experimentais. Em estudo em que ambos os sexos foram submetidos a estímulo térmico, os autores pesquisaram queixas de dor no mês anterior ao estudo, e a partir destas informações puderam concluir que além de as mulheres estudadas apresentarem menor tolerância ao teste provocativo, houve uma correlação positiva entre intensidade da dor nestas mulheres e o número de episódios de dor anteriores ao estudo⁴⁶. Pacientes do sexo feminino, quando questionadas em relação à última semana, tiveram maior probabilidade de referir dor do que homens, em cada uma das 10 diferentes regiões anatômicas questionadas no estudo⁴⁷. Em estudo nacional que avaliou 1.620 adultos com história clínica de dor crônica, foi detectada prevalência de 50% de dor entre as entrevistadas, e apenas 28,3% do sexo masculino⁴⁸.

Ainda que exista diferença na percepção de dor entre homens e mulheres, não há consenso que haja uma correlação com a intensidade da dor, e os estudos que abordaram este tema produziram resultados conflitantes. Por exemplo, em revisão sistemática e metanálise que analisou trabalhos que envolveram pacientes com artrite causada por diferentes etiologias, foi identificado que, quando comparadas aos homens, as mulheres apresentaram dor com maior frequência, e escore de dor mais altos na escala analógica-visual, mesmo após terem sido submetidas ao tratamento⁴⁹. De maneira oposta, um estudo prospectivo que incluiu 1.741 pacientes portadores de dor crônica não conseguiu detectar diferença na intensidade de dor entre os sexos, independente da doença de base⁵⁰. Em concordância com o último, outra pesquisa que avaliou grupos de homens e mulheres portadores de dores crônicas de etiologia oncológica e não oncológica também não conseguiu demonstrar diferença na intensidade de dor entre os sexos⁵¹. Foi discutido, no entanto, a possibilidade de existência um viés nestes estudos, já que os pacientes com dor de menor intensidade em geral não são representados adequadamente⁴⁵. Em outro estudo que incluiu pacientes com dor lombar e com indicação de artrodese de coluna, apesar de ter sido encontrada uma diferença estatisticamente significativa pacientes do sexo masculino e feminino, esta diferença não se mostrou clinicamente significativa⁵². Estudo canadense que incluiu 728 pacientes portadores de dor crônica, os pesquisadores mostraram também não haver uma diferença clinicamente significativa entre os sexos na intensidade de dor, no impacto da dor na vida diária, na qualidade de vida, bem-estar mental ou no aspecto financeiro⁵³. Por fim, as investigações acerca da diferença de dor aguda entre sexos ainda não têm apresentado resultados consistentes^{13,54-57}.

3.1.2 O papel dos hormônios sexuais na percepção de dor em humanos

Conforme citado anteriormente, diferentes mecanismos biológicos podem estar implicados na diferenciação da percepção aos estímulos dolorosos entre os sexos. Dentre estes, em razão de sua distinta importância, o papel do sistema hormonal foi alvo de intensa investigação na determinação de sua participação na variabilidade da resposta aos estímulos dolorosos.

É importante notar que, nos quadros de dor, as diferenças encontradas entre os sexos começam a se tornar mais evidentes a partir da puberdade, em geral, após os 12 anos de idade. Antes disso, meninos e meninas têm resposta semelhante aos estímulos dolorosos⁵⁸. A partir desta etapa da vida, diferente dos homens, as mulheres passam a ter variações dos seus níveis hormonais durante as diferentes fases do ciclo menstrual, e este período coincide com a época em que as diferenças na percepção de dor em diversas situações clínicas são percebidas^{59,60}. Após a menopausa, a diferença que existia entre homens e mulheres volta a diminuir⁶⁰, fortalecendo a tese da influência do sistema hormonal sobre percepção de dor.

Algumas doenças parecem apresentar piora dos sintomas dolorosos durante a fase do ciclo menstrual em que existe uma concentração baixa de estrogênios, ou a sua queda abrupta, como no período menstrual, tais como a disfunção temporomandibular, migrânea, fibromialgia, síndrome do intestino irritável e artrite reumatoide. Já na fase lútea, quando a progesterona atinge níveis mais elevados, os sintomas dolorosos parecem ser menos intensos⁶¹⁻⁶³.

O efeito da administração exógena de hormônios também foi motivo de investigação. Diversos autores avaliaram a influência que o uso de anticoncepcionais orais poderia ter sobre a percepção de dor. A maioria dos estudos mostrou que os anticoncepcionais falharam em alterar a percepção de dor,

porém os resultados são limitados pela baixa qualidade metodológica encontrada nestas pesquisas ^{2,64}.

A testosterona ocorre predominantemente nos homens, apesar de também ocorrer em concentrações menores nas mulheres, e em ambos, parece ter um papel protetor contra a dor⁶⁵. Baixos níveis de testosterona estão associados a maior intensidade nas dores musculares de ombros e região cervical relacionadas ao trabalho⁶⁶. O hipogonadismo parece estar associado ao desenvolvimento de fibromialgia em mulheres⁶⁷ e cefaleia em salvas em homens⁶⁸. A reposição de testosterona parece reduzir a intensidade de dor em pacientes com fibromialgia⁶⁹. Um estudo experimental em mulheres mostrou que a testosterona apresentou um efeito protetor contra a dor provocada por estimulação elétrica, e este efeito não apresentou relação com a fase do ciclo menstrual⁷⁰.

3.1.3 Evidências de estudos com animais

Os estudos experimentais em animais trouxeram uma grande contribuição na compreensão da influência que os hormônios sexuais possuem sobre a percepção de dor.

Diversos testes foram utilizados nos modelos animais de dor para investigar a diferença entre os sexos, tais como: térmico, elétrico, mecânico e químico. Os três primeiros avaliam a resposta a estímulos agudos (fásicos), enquanto que o teste químico avalia a capacidade de resposta a um estímulo doloroso contínuo (tônico). Estes modelos foram extensamente utilizados na pesquisa básica ao longo das últimas décadas, sendo que os testes fásicos são orientados para estudo de dor aguda, e testes com estímulos tônicos são utilizados em estudos de dor crônica. No entanto, estas metodologias têm se mostrado limitadas na reprodutibilidade na prática clínica,

pois diferem bastante dos mecanismos envolvidos nas síndromes dolorosas clínicas^{7,71}. Os modelos mais utilizados de dor inflamatória são o teste da formalina, adjuvante completo de Freund, carragenina e capsaicina. A diferença entre sexos também foi estudada em modelos de dor neuropática, visceral, e mais raramente em dor pós-cirúrgica. O Quadro 1 reúne alguns destes estudos.

Quadro 1 - Estudos da dor entre os sexos em modelos animais

Modelo	Referências	Intervenção hormonal	Resultados
Dor inflamatória			
Formalina	Aloisi <i>et al.</i> ⁷²	Nenhuma	F>M
	Gaumont <i>et al.</i> ⁷	Castração	F>M F>oof orq > M orq = oof
	Aloisi <i>et al.</i> ⁷³	Testosterona	F>M F>F+T M = M + T
	Fischer <i>et al.</i> ⁷⁴	Castração Testosterona Estradiol	F, orq > M T protege M
	Aloisi <i>et al.</i> ⁷⁵	Nenhuma	F>M (Diferença na concentração de beta-enforfinas)
	Hagiwara <i>et al.</i> ⁷⁶	Castração 17β-estradiol	F>M oof + E > todos
Capsaicina			
	Berrett <i>et al.</i> ⁷⁷	Gonadectomia	F>M orq>M oof<F
	Chen <i>et al.</i> ⁷⁸	DHEA	M=F Inibição da alodínea pela capsaicina
	Lu <i>et al.</i> ⁷⁹	Castração Ciclo menstrual Estradiol Progesterona	F > M F proestro > F estro F=oof -3s F>oof - 6s E2 deixou F=oof P não reverteu F = oof+E2 M +E1 > M M = F
	Saloman <i>et al.</i> ⁸⁰	Nenhuma	M = F
	Niu <i>et al.</i> ⁸¹	Nenhuma	F = M Inibidor de canal K-ATP -> Reduz mais em M que F
	Carmichael <i>et al.</i> ⁸²	Nenhuma	F>M

Continua

Conclusão

Modelo	Referências	Intervenção hormonal	Resultados
Adjuvante de Freund	Bradshaw <i>et al.</i> ⁸³	Gonadectomia Ciclo menstrual	F proestro (E alto) > M, oof, orq, F estro (E baixo)
	Auh e Ro ⁸⁴	Nenhuma	F = M
Carragenina	Joseph <i>et al.</i> ⁸⁵	Castração	F < M orq = oof
	Tall e Crisp ⁸⁶	Castração	F < M orq = oof
	Teixeira <i>et al.</i> ⁸⁷	Nenhuma	F < M
NGF	Wong <i>et al.</i> ⁸⁸	Nenhuma	F (3 dias) > M (1 dia) Dias de hiperalgesia
Dor Visceral			
Estímulo colorretal	Ji <i>et al.</i> ⁸⁹	Nenhuma	F > M
	Ji <i>et al.</i> ⁹⁰	Nenhuma	F > M Morfina mais potente em M
Cálculo ureteral	Aloisi <i>et al.</i> ⁹¹	Estradiol Testosterona	F > M F + E = M (F + T) = F (M + T) = M
Dor Neuropática			
Constricção crônica de nervo periférico	DeLeo e Rutkowski ⁹²	Nenhuma	F > M
	Coyle <i>et al.</i> ⁹³	Nenhuma	F > M
Secção parcial de nervo	Tall <i>et al.</i> ⁹⁴	Castração	F > M
	Dominguez <i>et al.</i> ⁹⁵	Nenhuma	F > M
Radiculopatia	LaCroix-Fralish <i>et al.</i> ⁹⁶	Castração	M < F e Oof (oof + T) < oof Orq < M
	LaCroix-Fralish <i>et al.</i> ⁹⁷	Nenhuma	F > M
	LaCroix-Fralish <i>et al.</i> ⁹⁸	Nenhuma	F > M
Neuropatia induzida por álcool	Dina <i>et al.</i> ⁹⁹	Castração Estradiol	F > M Oof < F (Oof + E) F = (Oof + E)
Neuropatia induzida por paclitaxel	Hwang <i>et al.</i> ¹⁰⁰	Nenhuma	F = M
Dor Pós-operatória			
Modelo de incisão plantar	Kroin <i>et al.</i> ¹⁰¹	Nenhuma	F = M

Em ratos machos, os hormônios androgênicos parecem apresentar efeito protetor contra a dor. Este fenômeno pôde ser percebido em estudo que comparou animais, submetidos a estímulo doloroso induzido por formalina, no qual as fêmeas apresentaram um comportamento doloroso mais exacerbado em todas as fases do teste, exceto na fase III. Neste mesmo estudo foi demonstrado que a castração dos machos eliminava completamente esta diferença. Ainda os animais machos gonadectomizados tiveram maior expressão de dor⁷.

A presença da testosterona parece ser capaz de sustentar um estado de limiar sensitivo mais elevado. Este dado foi demonstrado em um experimento que utilizou doses supra fisiológicas de testosterona em ratos e ratas, com seu efeito imperceptível nos machos. Já as fêmeas, desenvolveram um comportamento semelhante ao dos machos⁷³. Foi demonstrado também que a testosterona determinava um efeito adaptativo inibitório sobre o comportamento de dor e resposta neural em animais submetidos à sucessivas sessões de estimulação dolorosa¹⁰².

Em estudos realizados com modelos de dor visceral, os machos apresentaram maior limiar de nocicepção, e os hormônios sexuais exerceram papel modulador sobre o comportamento doloroso, sendo que a testosterona apresentou efeito protetor em ambos os sexos^{91,103}. Já em um modelo de neuropatia diabética, a administração de metabólitos da testosterona [dehidrotestosterona (DHT) e 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol (3 α -diol)] promoveram importantes efeitos moduladores sobre a dor neuropática. O DHT foi responsável por reduzir os efeitos da diabetes sobre o limiar para estímulo mecânico doloroso, sobre o aumento de glutamato, sobre a imunoreatividade dos astrócitos, e sobre a indução da produção de interleucinas. Já o 3 α -diol reverteu os efeitos da neuropatia sobre o limiar para alodinia tátil, reduziu a quantidade de glutamato, reduziu a reatividade dos astrócitos, e reverteu a proliferação de substâncias inflamatórias¹⁰⁴.

Um grupo de pesquisadores buscou compreender o papel da testosterona no desenvolvimento de dor na articulação temporomandibular (ATM), e para isso, utilizou um modelo experimental de injeção intra-articular de formalina. Perceberam que a testosterona, em doses supra fisiológicas, foi capaz de prevenir o desenvolvimento de nocicepção na ATM, enquanto que os estrogênios não desempenharam o mesmo papel⁷⁴. Em um estudo mais recente, a ação protetora da testosterona foi confirmada, também em um modelo de dor na ATM, no qual os autores compararam a injeção de formalina em ratos gonadectomizados, ratos submetidos a procedimento sham, ratos orquiectomizados recebendo reposição de testosterona, e animais controle. A resposta comportamental induzida pela formalina foi significativamente maior nos animais gonadectomizados, cujos níveis de testosterona, dosados durante o estudo, eram significativamente menores que os dos outros animais¹⁰⁵.

3.2 Mecanismos envolvidos na diferenciação da percepção de dor entre sexos

De maneira geral, os estudos com ratos e camundongos sugerem que as fêmeas apresentam uma resposta comportamental mais exacerbada aos estímulos nociceptivos que os machos^{7,72,106}. No entanto, devido à grande variabilidade de resultados encontrados nestes estudos, os efeitos dos hormônios femininos, estrogênio e progesterona, na modificação do comportamento doloroso ainda não são bem compreendidos.

O Quadro 2 apresenta um resumo dos mecanismos moleculares e estruturais envolvidos na diferenciação do comportamento doloroso entre os sexos. Os temas relacionados às diferenças estruturais não serão aprofundados nesta revisão, e o enfoque será dado para a influência dos hormônios sexuais.

Quadro 2 - Mecanismos envolvidos no dimorfismo do comportamento doloroso entre os sexos

Mecanismo		Detalhes
Diferenças estruturais e funcionais das vias dolorosas		- Maior densidade de fibras em mulheres ¹⁰⁷
	Nervos periféricos	- Maior limiar para despolarizar neurônios do gânglio da raiz dorsal ¹⁰⁸
	Via PAG-MRV-Medula	- Nos homens há maior concentração de MOR; maior ativação de neurônios PAG-MRV; PAG recebe projeções da área pré-óptica, do núcleo parabraquial e do locus cerúleo ¹⁰⁹ - Nas mulheres há uma maior quantidade de projeções de PAG no MRV; e PAG recebe projeções da amígdala, hipotálamo ventro-medial, núcleo paraventricular ¹¹⁰
	Via GABAérgica	- Inibição da via GABAérgica sobre PAG é inibida em vigência de estímulo inflamatório nas mulheres ¹¹¹
	Via espinoparabraquial	- Nos homens, apresenta maior expressão de MOR e é ativada por dor visceral ¹¹⁰
	Ação sobre o controle descendente inibitório	- Maior atividade durante ovulação: Est>P ¹¹²
Hipótese Hormonal	Ação dos estrogênicos	- Reduz inibição GABA _A sobre células piramidais CA1 e sobre o hipocampo ¹¹³ - Variabilidade de neurotransmissores ¹¹⁴ - Presença de receptores estrogênicos no SNC ¹¹⁴ - Redução da expressão de receptor ORL1 ¹¹⁵ - Expressão de receptores opioides endógenos ⁶⁰ - Modulação da inflamação ⁶⁰ - Aumento da expressão de TRPV1 e ANO1 ¹¹⁶ - Inibição das correntes de sódio TTX-R e TTX-S no GRD ¹¹⁷
	Ação dos androgênicos	- Ação agonista GABA _A ¹¹² - Regulação da transcrição de MOR ¹¹⁸ - Regulação da expressão de Cnr1 ¹¹⁹ - ORL1 ¹²⁰
	Sistema imune	- Ativação do TLR4 espinhal (presente na micróglia) produz alodínea na dependência da presença de testosterona ¹²¹ - Androgênicos aumentam expressão de PPAR α , e inibe expressão de PPAR δ nos CD4 ¹²¹

GABA: Ácido gama-aminobutírico; TRPV1: Receptor vaniloides tipo 1; ANO1: Receptor anoctamin 1; TTX-R: Tetodroxina resistente; TTX-S: Tetodroxina sensível; MOR: Receptor opioide um; ORL1: Opioid Receptor-like 1; Cnr1: Receptor canabinoide 1; PPAR: Receptor ativado proliferador de peroxima; Est: Estrogênio; P: Progesterona; PAG: Substância cinzenta periaquedutal; MRV: Bulbo rostro ventral; TRL4: receptores Toll Like 4, CA1: Corno de Ammon 1, CD4: Cluster of differentiation 4.

3.2.1 Hipótese hormonal

Os hormônios sexuais são produzidos a partir de colesterol nos ovários, nos testículos e nas glândulas adrenais. São eles, os estrogênios (estradiol, estriol e estrona), as progestinas (progesterona), e os androgênios (testosterona). Além da produção ocorrida nas glândulas citadas, o estradiol também é produzido em tecidos periféricos a partir da conversão de testosterona por ação da enzima aromatase⁴. Estes hormônios têm a regulação do sistema reprodutor como seu principal objetivo, no entanto, dialogam com outros sistemas orgânicos, inclusive com o SNC, e especialmente em áreas cerebrais e medulares dedicadas à transmissão e processamento dos estímulos nociceptivos. Em decorrência desta relação com importantes áreas das vias dolorosas que ganhou força a hipótese de que os hormônios sexuais poderiam ter influência sobre a percepção da dor^{112,122}.

Estes hormônios estão profundamente envolvidos no desenvolvimento organizacional do SNC, através da modulação de neurotransmissores e da excitabilidade neuronal, sendo, portanto, denominados esteroides neuro-ativos. Estes esteroides modificam a excitabilidade neuronal através da ação sobre os receptores de neurotransmissores e de canais iônicos. Esta interação pode ocorrer através de influência sobre a expressão gênica, modulando a expressão de canais iônicos e de diferentes receptores no SNC. Porém, estudos indicam que os hormônios sexuais podem atuar de maneira direta, ligando-se diretamente a seus receptores e aos canais iônicos¹¹⁴. Por exemplo, os estrogênios participam da sinalização neuronal através da maior expressão de NGF no GRD¹²³, da maior expressão de c-fos no hipocampo¹²⁴ e da ativação das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), por um mecanismo independente da ligação a receptor estrogênico¹²⁵. Estas modificações

induzidas pelos estrogênios estão implicadas no aumento da susceptibilidade à dor, e, portanto, a densidade de receptor estrogênico participa diretamente no controle promovido pelos hormônios sexuais. A população de receptores pode ser modificada por diferentes estímulos. Por exemplo, em animais ooforectomizados, foi demonstrado aumento da densidade de receptores no neuroeixo após as primeiras 72 horas, e em outras áreas cerebrais após um período ainda maior. O tratamento com estradiol contrapôs o efeito da cirurgia, e devolveu a população de receptores para valores anteriores ao procedimento^{114,126}.

Os efeitos dos androgênios no SNC, no entanto, são controversos, uma vez que possuem atividade excitatória, que pode estar relacionada à sua conversão periférica para o estradiol. Porém, estes hormônios parecem também contrapor os efeitos produzidos pelos estrogênios, e até mesmo provocar a redução da densidade de seus receptores no cérebro¹¹⁴. Outros estudos sugerem que existe diferença na ação dos hormônios sexuais sobre os neurônios, e que este fato parece se dever à influência do sexo sobre a diferenciação do hipocampo, e de outras áreas cerebrais. Ainda, a excitabilidade de alguns neurônios parece ser maior nos machos que nas fêmeas, e ademais, a resposta a um mesmo hormônio pode variar entre as diferentes regiões cerebrais¹¹⁴.

O padrão hormonal circulante no período perinatal é determinante na organização do desenvolvimento do SNC, e está diretamente implicado na diferenciação que ocorre entre os sexos, e parece ter implicação sobre comportamentos específicos de cada sexo. O surto de elevação da testosterona no período neonatal de machos permite que haja uma masculinização do seu SNC, e nisto se inclui o desenvolvimento e a distribuição adequada de receptores

androgênicos (RA). Está claro que o desenvolvimento das vias nociceptivas depende parcialmente da organização e distribuição de receptores androgênicos e estrogênicos^{114,127}. Apesar disso, os hormônios sexuais também exercem efeitos ativadores, porém transitórios, sobre determinados padrões de comportamento, influenciados pelos níveis hormonais circulantes do momento, e não com a exposição neonatal¹²⁸.

Em um estudo animal que abordou este tema, foi demonstrada uma redução na resposta à morfina em ratos que foram gonadectomizados no período neonatal, mas não foi detectada mudança quando a castração ocorreu em idade adulta¹⁰².

Em um modelo de dor neuropática, a castração no período neonatal ou no período adulto não foi determinante na modificação do comportamento. Por outro lado, os autores mostraram que apenas os hormônios circulantes em animais fêmeas foram capazes de modificar a percepção aos estímulos dolorosos⁹⁶. O impacto dos hormônios na diferenciação do SNC pode ser evidenciado com maior clareza em estudos que utilizaram um protocolo de analgesia induzida por estresse pelo nado em água fria. Esta técnica obteve êxito em promover analgesia semelhante em machos e fêmeas, porém, sua atividade modulatória é alcançada por mecanismos diferentes. Enquanto machos têm sua analgesia modulada através do receptor NMDA, a inibição desta via é incapaz de reverter o efeito analgésico em fêmeas. No entanto, a suplementação hormonal de fêmeas, desde o período neonatal, com testosterona resulta em analgesia mediada pelo receptor NMDA no teste de estresse^{129,130}. Já em um modelo de dor inflamatória, com injeção de carragenina intra-articular, os efeitos anti-hiperalgésicos da testosterona se desenvolveram durante o desenvolvimento dos animais, e foram mantidos pelos seus níveis plasmáticos na vida adulta. Além disso,

foi sugerido que a influência do sistema hormonal sobre a capacidade analgésica dos opioides se desenvolve durante a diferenciação sexual¹²⁸.

3.2.2 Papel dos estrogênios

Os receptores para estrogênios (RE- α , RE- β e GPR3¹³¹) foram identificados em regiões do SNC que estão implicadas na transmissão, modulação e percepção dos estímulos dolorosos, tais como o gânglio do nervo trigêmeo, as células do gânglio da raiz dorsal da medula, o hipotálamo, a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e o núcleo dorsal da rafe. Esta distribuição permitiria que os estrogênios exercessem influência sobre as vias ascendentes e descendentes da dor, tendo suas atividades moduladas em função da variação da concentração plasmática circulante deste hormônio⁶⁰.

Foi descrita, uma relação entre os hormônios sexuais e a capacidade de analgesia mediada por opioides⁴. Os estudos que avaliaram esta relação se utilizaram de manipulação hormonal, através de castração e de reposição hormônios, para tentar compreender a diferenciação na analgesia por opioides entre machos e fêmeas. Apesar da grande variabilidade nos resultados obtidos por estes estudos, alguns aspectos importantes puderam ser observados acerca da implicação dos estrogênios. Ao estudar o impacto que o ciclo menstrual em ratas teria sobre o efeito analgésico da morfina, foi percebido que os animais que se encontravam no período do estro (período que coincide com a menor concentração plasmática circulante de estradiol e progesterona) tinham uma resposta reduzida aos opioides, em comparação com todos os outros períodos (proestro e diestro)⁴. No entanto, aparentemente o estradiol parece ter maior influência que a progesterona. Em estudo que comparou animais gonadectomizados, e alguns recebendo reposição hormonal, o autor demonstrou que a

morfina teve mais poder analgésico em animais que recebiam reposição de progesterona, em comparação aos que recebiam estrogênio e aos que recebiam estrogênio e progesterona, simultaneamente¹³². No entanto, este efeito parece estar mais relacionado ao receptor opioide mu (MOR), pois, de maneira oposta, foi demonstrado um aumento de potência dos receptores opioides kappa (KOR) em presença de estradiol¹³³.

Os estrogênios estão implicados também na modulação da ação de canais iônicos. Os estrogênios parecem atuar nestes canais por mecanismos não genômicos¹³⁴, como a inibição de corrente nos receptor vanilóides tipo 1 TRPV1 induzidos pela exposição à Capsaicina, ou por mecanismo genômico, pelo qual provoca o aumento da expressão dos receptores vanilóides TRPV1, e do receptor anoctamin 1 (ANO1), no gânglio do trigêmeo, participando da modulação da nocicepção através destes receptores¹¹⁶. Ainda, foi proposta a influência destes hormônios sobre os Nav, que participam diretamente da transmissão de dor através do sistema nervoso periférico. Um estudo demonstrou que o 17 β -estradiol promoveu inibição rápida das correntes iônicas por estes canais, no GRD, que se mostrou reversível e concentração dependente. Os autores concluíram que este efeito é dependente de uma via de sinalização ativada pelo receptor estrogênico presente na membrana celular e mediada pelas proteínas cinases C e A¹¹⁷.

3.2.3 Papel da progesterona

O papel da progesterona na diferença da percepção de dor entre os sexos ainda não é completamente compreendido. Contudo, este mesmo hormônio demonstrou propriedades anti-inflamatórias no SNC^{135,136}. Estudos experimentais também mostraram efeito analgésico da progesterona, através da ação do seu

metabólito $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroprogesterona, cuja produção é mediada pela enzima 5α -reductase¹³⁷. Este metabólito da progesterona promove uma modulação alostérica positiva sobre o receptor do ácido gama-aminobutírico A (GABA_A) no bulbo¹³⁸. Camundongos geneticamente modificados para não sintetizar esta enzima não apresentavam analgesia após reposição de progesterona¹³⁷.

Foi demonstrado que a progesterona preveniu o desenvolvimento de alodinia em animais submetidos à ligadura do nervo ciático, além de reduzir a expressão de receptores da subunidade 1 do receptor NMDA e da proteína cinase C, sugerindo assim, um potencial papel na dor neuropática¹³⁹. Porém este resultado é controverso, pois em um estudo anterior, ratas ooforectomizadas foram divididas em um grupo que não recebeu hormônio e outro grupo que recebeu doses fisiológicas de progesterona, e o tratamento com progesterona restaurou o comportamento doloroso após ligadura de raiz de L5, que foi atenuado no grupo gonadectomizados⁸. Um possível mecanismo envolvido neste processo é o aumento da expressão de neuregulina-1 mediada especificamente pela presença de progesterona. Este fator de crescimento, no contexto de dor neuropática, age como uma citocina pró-inflamatória¹⁴⁰. Em um modelo de dor visceral, a exposição à reposição de progesterona reduziu a resposta motora visceral produzida pela suplementação de estradiol em animais ooforectomizados. Os autores concluem que a progesterona aparenta ter efeito antagônico ao do estradiol na sensibilidade colônica¹⁴¹.

3.2.4 Papel dos androgênios

As evidências acumuladas na última década sugerem um papel protetor da testosterona contra a dor^{73,74,128,142,143}. No entanto, diferentemente dos estrogênios, os mecanismos dos efeitos analgésicos dos androgênios ainda são pouco esclarecidos. Alguns mecanismos foram propostos para explicar o efeito anti-hiperalgésico da testosterona. Neste sentido, o envolvimento de vias inibitórias descendentes tem sido alvo de destes estudos ao longo das últimas duas décadas. A ação da testosterona sobre as vias gabaérgicas, sobre as monoaminas centrais, sobre receptores canabinoides, e sobre os receptores opioides recebeu maior atenção dos pesquisadores. Ainda, uma possível ação sobre canais iônicos nas vias periféricas de transmissão de dor também foi explorada.

Da mesma maneira que os estrogênios, os androgênios agem como neuroesteroides, através da ativação dos receptores androgênicos (RA) que se encontram distribuídos pelo SNC, além de cornos anterior e posterior da medula. No entanto, muitos dos efeitos produzidos pelos androgênios dependem em parte da conversão periférica para estrogênio através da ação da aromatase, e posterior ativação de seus respectivos receptores. Importante notar ainda que os RAs têm sua concentração aumentada em presença de maior concentração de testosterona, e ainda, que os RAs são capazes de regular a expressão da enzima aromatase, e, portanto, da taxa de conversão de testosterona para estradiol¹¹⁴. Os androgênios são vitais para o desenvolvimento e manutenção de sistema reprodutor masculino, mas também são importantes na preservação do bem-estar nas fêmeas. Assim como os outros hormônios já discutidos, os níveis plasmáticos da testosterona variam ao longo do ciclo hormonal das fêmeas¹⁴⁴.

A testosterona, de maneira similar à progesterona, também exerce efeito analgésico a partir da estimulação da atividade dos receptores GABA_A, através de seu metabólito 3 α -androstane-20 α -diol, localizados no hipocampo. Estudos experimentais demonstraram um comportamento doloroso reduzido em animais tratados com este metabólito da testosterona. Estes achados ressaltam a importância da enzima α 5-reductase, que responsável pela transformação de testosterona em seu metabólito neurologicamente ativo¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Ainda, a morfina promove uma maior ativação da dos neurônios da PAG, que se projetam para rostro ventral do bulbo (MRV), em machos, ainda que nas fêmeas, estas projeções sejam quantitativamente superiores. A injeção de um agonista MOR nesta região promove uma analgesia superior também nos machos¹⁴⁸. Nesta região, a analgesia decorre da desinibição dos neurônios da PAG ventro-lateral através da remoção da ação inibitória promovida pelos receptores GABA_A¹⁴⁹.

Diversos estudos têm mostrado que os hormônios sexuais parecem também exercer influência sobre a analgesia promovida pelos opioides. No entanto, existem divergências entre os estudos com humanos e estudos em animais. Em uma metanálise em que foi avaliada a eficácia da morfina em humanos, os autores demonstraram maior eficácia deste analgésico entre as mulheres, tanto em estudos clínicos quanto experimentais¹⁵⁰. Porém, dados provenientes de estudos com animais contradizem estes resultados, uma vez que a exposição aos opioides parece favorecer os machos¹⁵¹, além de permitir um maior intervalo de tempo para o desenvolvimento de hiperalgesia induzida por opioides¹⁵².

A razão da existência deste dimorfismo entre os sexos relacionados aos opioide ainda não foi completamente esclarecido. Um grupo de autores sugeriu uma participação dos receptores opioides como mediadores destas diferenças, pois, enquanto agonistas

opioides μ (como a morfina) promoveram maior resposta analgésica em machos, a utilização de opioide com afinidade pelo receptor opioide κ (como a oxicodona) favoreceu as fêmeas¹⁵². No entanto, esta hipótese não encontrou sustentação em outras publicações que abordaram este tema. Na maior parte dos estudos, a analgesia promovida por agonistas KOR é mais pronunciada nos machos¹⁵³⁻¹⁵⁵.

O papel dos hormônios masculinos na modulação do efeito dos opioides tem se tornado mais claro. Já foi demonstrado, em estudos animais, que a castração de machos ou a exposição de fêmeas a androgênios no período neonatal é capaz de suprimir a diferença existente entre os sexos nos ratos adultos^{156,157}. Além disso, diversos autores detectaram menor eficácia de agonistas MOR após orquiectomia em modelos de dor aguda. Por exemplo, um estudo em que foi avaliada a eficácia de diferentes opioides em aumentar o limiar para retirada da cauda, exposta a estimulação térmica com água quente, os autores concluíram que a castração de machos promovia uma redução no efeito dos analgésicos opioides testados¹⁵⁸. Foi observado que a morfina promoveu maior latência para retirada da pata após estímulo térmico em machos não castrados, ou nos que foram submetidos a castração seguida de reposição de testosterona ou de uma combinação de estradiol e dehidrotestosterona¹³². Em um estudo já discutido anteriormente, em que foi utilizado modelo animal de dor em ATM, os autores puderam concluir, utilizando antagonistas para MOR e KOR, que o efeito analgésico da testosterona foi mediado pela ação destes receptores¹⁰⁵. Estes dados estão de acordo com os publicados anteriormente, em modelo de dor crônica, onde a testosterona foi determinante na potencialização da analgesia proporcionada por agonistas MOR¹⁵⁹. A influência da testosterona sobre os receptores opioides também se reflete na expressão hormônio-dependente, em quadros inflamatórios induzido por

citocinas, de MOR na PAG e nos GRD¹⁰⁹. Por fim, alguns autores foram capazes de determinar a co-expressão de RA e TRPV1 em neurônios do gânglio do nervo trigêmeo, sugerindo a capacidade de modular estes canais vaniloides por androgênios. No entanto, o achado mais interessante desta pesquisa foi a co-expressão de RA e MOR nestes neurônios, o que reforça a teoria de que a testosterona pode modular a expressão ou ação de MOR. Estes autores também puderam demonstrar que o RA possui um sítio de ligação na região promotora do gene do receptor opioide-mu (OPRM1) (gene que sintetiza o MOR). Foi demonstrado ainda que o complexo composto de testosterona-RA foi capaz de aumentar a expressão do receptor opioide, e que o bloqueio do receptor inibiu a expressão de RNAm de MOR em animais submetidos a estímulo inflamatório¹²⁶.

A administração de agonista do receptor semelhante a opioide 1 (ORL1) no sistema trigeminal promove analgesia em ratos machos pela inibição das ações mediadas pelos receptores n-metil-d-aspartato (NMDA), através do aumento da condutância ao potássio e redução da condutância ao cálcio¹¹⁵. A influência dos hormônios sexuais sobre este receptor promove alterações sobre sua função, que, em última análise, podem explicar o dimorfismo entre machos e fêmeas. O estrogênio limita a expressão de ORL1 no SNC, além de desacoplar este receptor de seu canal de potássio, impedindo que seja promovida a hiperpolarização do neurônio, e, portanto, o efeito antinociceptivo. De maneira inversa, em presença de baixos níveis de estrogênio ou de níveis elevados de testosterona, este desacoplamento não ocorre. No entanto, ainda não foi esclarecido se o efeito antinociceptivo mediado por ORL1 está relacionado a aumento da expressão destes receptores em função da testosterona^{115,120}.

Os receptores Toll Like 4 (TLR4) medulares são receptores presentes na microglia, e que estão relacionados ao estabelecimento da alodinia mecânica frente a estímulos inflamatórios e neuropáticos. O desenvolvimento deste comportamento doloroso parece ser dependente da testosterona, ocorrendo exclusivamente em machos. A alodinia mediada por este receptor pode ser completamente revertida somente em machos, pelo uso de um antagonista específico¹⁶⁰.

A capsaicina, componente pungente da pimenta, atua através da ativação do receptor vaniloide TRPV1, presente especialmente no SNC, onde modula o fluxo de Na^+ e Ca^{2+} . Estes receptores também são ativados por estímulos dolorosos induzidos por calor ou acidez. Em um estudo, os androgênios (especificamente a DHEA) inibiram as correntes induzidas pela capsaicina de maneira concentração-dependente⁷⁸. A testosterona, por sua vez, parece ser determinante na expressão de receptores canabinoides (CB1) induzida por citocinas inflamatórias, como a IL-1 e IL-6, no gânglio do nervo trigêmeo¹⁶¹. Outro estudo demonstrou que o aumento da expressão do CB1 era independente da concentração de estrogênios, e identificou ainda que a região promotora do gene responsável pela codificação do receptor canabinoide continha um RA, tal qual o gene OPRM1. De forma semelhante, os androgênios são capazes de modular a expressão dos CB1¹¹⁸.

3.3 Canais de sódio voltagem-dependente e dor

Os canais Nav são proteínas transmembrana, e exercem papel crucial na excitação e sinalização neural através da entrada rápida de sódio. A existência destas correntes foi confirmada em axônios de lulas gigantes, na década de 1950, mas apenas no final da década de 1970 que estes canais foram isolados pela primeira

vez¹⁶². Estes canais são formados por uma subunidade α , cuja estrutura pseudo-tetramérica forma um poro através do qual ocorre o fluxo de Na^+ , associada a uma ou duas subunidades β . É a subunidade α que determina a especificidade tecidual para a expressão destes canais (Quadro 3)¹⁶². A subunidade β parece modificar a cinética e a dependência de voltagem dos canais. E ainda, ao interagir com as moléculas que promovem adesão celular, com a matriz extracelular e com o citoesqueleto intracelular, parece estar envolvida tanto na estabilização da subunidade α , na membrana, quanto na sua localização em domínios específicos. Foram identificados pelo menos quatro destas subunidades ($\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$)¹⁶³.

Foram descritos nove subtipos de Nav ($\text{Nav}_{1.1}$ - $\text{Nav}_{1.9}$), baseados na subunidade α . E são codificados pelos genes SCN1A - SCN9A, respectivamente¹⁶³. Estes canais apresentam responsividade diferente à exposição a uma neurotoxina extraída do peixe baiacu, denominada tetrodotoxina. Os $\text{Nav}_{1.5}$, $\text{Nav}_{1.8}$ e $\text{Nav}_{1.9}$ são bloqueados por concentrações elevadas de tetrodotoxina, eles foram classificados como TTX-resistentes (TTX-R), enquanto os demais, por serem bloqueados por concentrações baixas da toxina, foram chamados de TTX-sensíveis (TTX-S) (Quadro 3)¹⁶². Os canais iônicos também foram classificados quanto ao seu estado funcional. Eles podem se encontrar fechados e em estado de repouso; abertos, quando permitem a condução de íons; e em um estado inativado, não permitindo a passagem de Na^{+26} .

Quadro 3 - Canais de sódio voltagem dependente

Canais	TTX	Gene	Local de Expressão
Nav1.1	S	SCN1A	SNC
Nav1.2	S	SCN2A	SNC
Nav1.3	S	SCN3A	SNC
Nav1.4	S	SCN4A	Músculo esquelético e cardíaco
Nav1.5	R	SCN5A	Músculo esquelético e cardíaco
Nav1.6	S	SCN8A	SNC e SNP
Nav1.7	S	SCN9A	SNP
Nav1.8	R	SCN10A	SNP
Nav1.9	R	SCN11A	SNP

TTX: Tetrodoxina; R: Resistente; S: Sensível; SNC: Sistema nervoso central; SNP: Sistema nervoso periférico.

Recentemente, foi descrito o canal de sódio Nav₂, que é expresso em diversos sistemas do organismo, inclusive em partes do SNC, e parece ter papel na sensibilidade central à concentração plasmática de sódio, e também na regulação do comportamento de ingestão de sal¹⁶⁴.

Do ponto de vista de arquitetura molecular, as subunidades se estruturam em quatro domínios (DI-DIV) formados por seis hélices transmembrana (S1-S6), e um poro formado por uma circunvolução (loop) entre os segmentos S5 e S6 (Figura 1). Esta circunvolução delimita a porção externa mais estreita que serve como entrada do poro, enquanto que S5 e S6 delimitam a parte mais interna e larga, que representa a porção de saída do poro. Já os segmentos S1-S4 formam o domínio voltagem-sensível (DVS), e se organizam em volta do poro do canal, e atuam na regulação da abertura dos canais. Na hélice S4 existem resíduos de aminoácidos, lisina e arginina, carregados com cargas positivas que podem se mover através da membrana para iniciar a ativação do canal em resposta a uma despolarização. O DVS está conectado ao poro através de uma ligação entre as hélices S4 e S5, e após a despolarização, o

movimento sofrido por S4 é transmitido para o poro, levando a uma mudança conformacional, e consequente abertura para as correntes de sódio. A porção que inativa o Nav é formada por um pequeno loop intracelular que conecta DIII e DIV, que, após despolarização sustentada da membrana, se dobra em direção à estrutura do canal, e bloqueia a parte interna no poro. Após a repolarização, gradualmente S4 retorna à posição original, e se torna disponível para o próximo ciclo^{162,163}.

Diversas neurotoxinas encontradas na natureza são capazes de modular a função dos canais Nav. Além da TTX, a saxitoxina (STX), a batracotoxina (BTX), peptídeos tóxicos isolados do veneno de escorpião, aranha, anêmona do mar e lesma bloqueiam o canal de sódio através de ligação com um de pelo menos seis sítios receptores, designados sítio 1 a sítio 6 (Quadro 4)¹⁶⁵.

Fonte: Adaptado de Lara Ruiz *et al.*¹⁶²

Figura 1 - Arquitetura do canal Nav. (A) Topologia das subunidades α do canal Nav humano. Estas proteínas consistem em quatro domínios homólogos, o Domínio DI (verde), o DII (rosa), o DIII (azul) e o DIV (amarelo), conectados por ligantes intracelulares. Cada domínio contém seis segmentos de hélice transmembrana (S1-S6). Os segmentos S1-S4 formam os domínios sensíveis a voltagem. O sinal + no S4 representa o sensor de voltagem carregado positivamente (contém um número de resíduos de lisina ou arginina). O movimento de S6 determina a abertura do canal, em resposta à despolarização da membrana. Os segmentos S5 e S6, e as circunvoluções do poro que os conectam, formam o poro deste canal. O loop intracelular que conecta DIIIS6 e DIVS1 funciona como um portal de inativação, fechando o poro do canal durante a fase de inativação rápida. **(B) Visão extracelular da estrutura cristalizada do canal NavMs, pertencente a uma bactéria marinha chamada *Magnetococcus sp.*, na conformação aberta.** Os quatro domínios idênticos estão coloridos de maneira análoga às encontradas em (A), para realçar as semelhanças com a estrutura do Nav humano. **(C) Visão lateral da estrutura cristalizada do canal NavMs, na conformação aberta.** O filtro de seleção e o portal de ativação estão indicados na porção central e intracelular do poro do canal, respectivamente. Esta é uma tradução extraoficial de um artigo proveniente de uma publicação da ACS. A ACS não endossou o conteúdo desta tradução, ou o contexto de seu uso

Os ligantes dos canais Nav podem apresentar afinidade específica por um determinado estado funcional (modulador estado-dependente), ou ser indiferente a que estado o canal se encontra (modulador estado-independente)¹⁶⁵.

Quadro 4 - Sítios receptores dos canais Nav

Sítio Receptor	Toxina ou droga	Domínio
Receptor de neurotoxina Sítio 1	TTX, STX, μ -Conotoxina	IS2-S6, IIS2-S6
Receptor de neurotoxina Sítio 1	Veratrinida, BTX, Graianotoxina	IS6, IVS6
Receptor de neurotoxina Sítio 1	α -toxina do escorpião, toxina da anêmona do mar	IS5-IS6, IVS3-S4, IVS5-S6
Receptor de neurotoxina Sítio 1	β -toxina do escorpião	IIS1-S2, IIS3-S4
Receptor de neurotoxina Sítio 1	Brevetoxina, ciguatoxina	IS6, IVS5
Receptor de neurotoxina Sítio 1	δ -Conotoxina	IVS3-S4
Receptor de anestésico local	Anestésicos locais, antiarrítmicos, antiepiléticos	IS6, IIS6, IVS6

Fonte: Adaptado de Catterall *et al.*¹⁶³

Funcionalmente estes canais estão envolvidos na geração das correntes rápidas de sódio responsáveis pela iniciação e propagação do potencial de ação em nervos. E por serem capazes de determinar a excitabilidade de neurônios, influenciam na intensidade que um estímulo doloroso é percebido pelo sistema nervoso.

A mutação dos canais de sódio, ou desregulação na sua expressão, nos componentes da via dolorosa do SNP e SNC contribuem para o desenvolvimento e manutenção de estados patológicos de dor¹⁶⁶. Mutações no Nav_{1.7} estão associadas ao desenvolvimento síndromes dolorosas que estão relacionadas ao surgimento de correntes de Na⁺ aberrantes no GRD^{167,168}. Este fluxo de sódio pode ser potencializado por mediadores inflamatórios, como bradicinina, histamina, prostaglandina E2 e ATP¹⁶⁹.

As mutações relacionadas à perda, ou ganho, de função também repercutem na capacidade do organismo de perceber a dor. Por exemplo, uma mutação que produz perda de função no Nav_{1.7} é responsável pelo surgimento da síndrome de insensibilidade congênita a dor. Do contrário, uma mutação que produz ganho de função no mesmo canal Nav é responsável pelo desenvolvimento de síndromes dolorosas hereditárias, como a eritromelalgia¹⁶².

Dentre os canais Nav, os subtipos 1.3, 1.7, 1.8 e 1.9 foram identificados como protagonistas na sinalização de estímulos dolorosos tanto no SNP quanto no SNC. Foi demonstrado aumento da expressão de Nav_{1.1}, Nav_{1.7}, Nav_{1.8} e Nav_{1.9} no gânglio da raiz dorsal de ratos ooforectomizados, após a reposição de 17β-estradiol¹⁷⁰.

3.3.1 Nav_{1.3}

O Nav_{1.3} é um canal de sódio tetrodotoxina sensível (TTX-sensível) expresso normalmente durante a embriogênese, tendo sua concentração reduzida no GRD e cérebro na fase adulta. No entanto, foi demonstrado que mesmo na fase adulta é possível encontrar este subtipo de canal nos neurônios dos gânglios simpáticos¹⁷¹, e em tecido cerebral de humanos, após o nascimento¹⁷². As correntes produzidas pelo Nav_{1.3} exibem similaridade com o Nav_{1.7}, dada a velocidade com que são ativados e inativados. E ainda, a recuperação do estado inativado pode atingir uma velocidade até três vezes superior a dos canais Nav_{1.7}¹.

O papel deste subtipo na dor ainda é controverso. Foi demonstrado que o RNAm e as proteínas do Nav_{1.3} estão significativamente aumentadas no gânglio da raiz dorsal de animais submetidos à axonotomia²⁶, outros tipos de lesão neuropática¹⁷³ e estímulos inflamatórios¹⁷⁴.

No entanto, a ausência de um bloqueador específico para este canal limita a compreensão de sua participação na dor. A terapia antisense, onde um oligonucleotídeo é utilizado para bloquear a expressão proteica de um determinado RNAm, tem sido utilizada para sobrepujar esta limitação. Por exemplo, em um estudo baseado em modelo de constrição crônica de nervo isquiático, a administração intratecal de oligonucleotídeos direcionados para Nav_{1.3} promoveram a redução da expressão proteica e do RNAm, além de reverter o comportamento doloroso dos animais¹⁷³. Enquanto que, em outro estudo em modelo de dor neuropática foi encontrada uma redução na expressão do Nav_{1.3} no GRD, porém sem modificação do comportamento doloroso¹⁷⁵.

Foram utilizados camundongos knockout para Nav_{1.3} para avaliar o impacto da ausência deste canal na expressão comportamental de dor, porém, a ausência do gene não teve impacto sobre o desenvolvimento de dor inflamatória ou neuropática nos animais mutantes. Os autores concluíram que este achado põe em xeque a relevância deste canal de sódio no desenvolvimento de dor decorrente de trauma em nervo periférico¹⁷⁶. Posteriormente, foram utilizados microRNAs (miRNAs), administrados por via intratecal em ratos, para modular a expressão do gene SCN3A. Foi demonstrado que o miR-96 e miR-183 foram capazes de reduzir a dor neuropática em ratos e a expressão de Nav_{1.3} no GRD induzida por lesão de nervo^{177,178}. Recentemente, foi demonstrada uma modificação fenotípica na expressão dos canais Nav, frente a uma lesão neuropática, em que houve um aumento da expressão de Nav_{1.3} (TTX-S) em detrimento da redução de Nav_{1.7}, Nav_{1.8} e Nav_{1.9} (TTX-R) no GRD lesionado, o que poderia levar a aumento dos disparos de potenciais ectópicos, com consequência sobre a dor neuropática^{179,180}.

3.3.2 Nav_{1.7}

O canal Nav_{1.7} é expresso predominantemente nos terminais periféricos dos neurônios sensitivos, dentro do soma neuronal do GRD, e nos terminais centrais de aferentes neuronais localizados na lâmina superficial da medula espinhal, bem como nos gânglios simpáticos, no gânglio do nervo trigêmeo, e nos gânglios dos nervos sensitivos viscerais e olfatórios¹⁶². Além disso, este canal, assim como o Nav_{1.8}, é expresso em nociceptores funcionantes¹⁸¹.

Este canal de sódio possui características que sugerem que ele tenha um papel na inicialização, e potencialização, do potencial de ação decorrente da despolarização de neurônios sensitivos, frente a um estímulo nociceptivo, o que o torna diferente do Nav_{1.8}, que tem papel na potencialização do potencial de ação nos neurônios sensitivos, e é essencial para sensibilidade de dor pelo frio, e do Nav_{1.9} que, por sua vez, influencia o limiar de dor através da manutenção de corrente contínua que modifica o potencial de repouso da membrana neuronal¹⁸¹.

O Nav_{1.7} é ativado e inativado rapidamente, e se recupera lentamente do período de inativação. Esta particularidade de lenta recuperação do estado inativado o torna adaptado a produzir disparos de baixa frequência em fibras C, e inadequado para neurônios que trabalham com alta frequência de disparo¹⁸¹. Ainda, este canal permite que pequenas despolarizações, geradas por estímulos subliminares, provoquem o surgimento de correntes em rampa, liberando os disparos neuronais. As correntes ressurgentes também foram descritas para este Nav no GRD¹⁶².

O fato de este canal ser expresso em neurônios do GRD, inclusive em 85% dos nociceptores funcionantes identificados, somado as suas características eletroquímicas, sugerem que o Nav_{1.7} exerça um papel importante na sinalização de dor¹⁸¹.

Durante estados inflamatórios, há um aumento da expressão de Nav_{1.7} no GRD, bem como das correntes sensíveis à TTX, que superam a do Nav_{1.3}¹⁸². Esta informação pôde ser constatada em um estudo que demonstrou um aumento na expressão de canais Nav_{1.7} no GDR de animais submetidos à injeção de carragenina na pata. E este aumento contribui para excitabilidade neuronal, que está associada ao desenvolvimento do comportamento doloroso²⁸. A reversão da hiperalgesia pelo uso de bloqueadores seletivos do Nav_{1.7} reforça a importância do papel deste canal na sinalização de dor¹⁸³. Este dado foi corroborado por achados obtidos de um estudo utilizando animais knockout ou knockdown do gene SCN9A¹⁸¹. Em animais que tiveram a função deste gene limitada, foi possível reduzir o comportamento de dor após estimulação com adjuvante de Freund¹⁸⁴. Já animais com *knockout* para este gene, porém, com preservação da expressão de Nav_{1.8}, tiveram a hiperalgesia térmica completamente abolida após lesão inflamatória e por queimadura. No entanto, não alterou o desenvolvimento de alodinea ou hiperalgesia mecânicas, considerados sinais de dor neuropática pelos autores^{185,186}.

Em modelo de inflamação induzida por injeção subcutânea de adjuvante de Freund, foi demonstrado aumento importante da expressão de Nav_{1.7} no GRD destes animais nas primeiras 24 horas, e esta alteração perdurou por até dois meses. Neste estudo, o aumento da expressão dos canais de sódio ocorreu dentro de quatro dias¹⁸⁷. Porém, um estudo que utilizou modelo de dor articular em joelho de ratos decorrente de injeção de adjuvante de Freund, demonstrou um aumento na produção de Nav_{1.7} e Nav_{1.8} nos dias 14 e 28. Enquanto que o Nav_{1.9} teve maior expressão nos dias 14, 21 e 28 após indução. Este fato sugere uma participação destes canais na manutenção de dor inflamatória crônica¹⁸⁸.

O uso de anti-inflamatórios não hormonais atenuou a hiperalgesia induzida pelo adjuvante de Freund, bem como inibiu a expressão de Nav_{1.7} no gânglio do trigêmeo, sugerindo papel de mediadores inflamatórios na modulação da expressão de canais Nav¹⁸⁹. Estudo semelhante revelou que a inflamação da ATM induziu aumento da fosforilação da cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2) que ocorre exclusivamente na glia. E mais, que o bloqueio deste fenômeno provocou a inibição do aumento de expressão de Nav_{1.7} no gânglio do nervo trigêmeo¹⁹⁰. O NGF, importante citocina inflamatória, pode contribuir para o aumento da expressão deste canal iônico no gânglio da raiz dorsal em situação de lesão inflamatória, através da indução da expressão de Nav_{1.7}^{191,192}.

O papel do Nav_{1.7} no desenvolvimento da dor neuropática ainda é controverso. Em um modelo animal de neuropatia diabética, os animais afetados apresentaram maiores correntes TTX-S e maior densidade de correntes de rampa, e foi demonstrado um aumento concomitante da produção e Nav_{1.7} no GDR destes animais. Porém, os mesmos animais exibiram um aumento das correntes TTX-R, e da expressão de Nav_{1.6} e Nav_{1.8}¹⁹³. No entanto, a deleção do Nav_{1.7} dos nociceptores não foi suficiente para impedir o surgimento de dor neuropática¹⁹⁴. Em um estudo mais recente, os autores investigaram, dentre outros, o papel do Nav_{1.7} no desenvolvimento de dor em modelos animais de dor neuropática (constricção crônica do nervo isquiático, secção de raiz de nervo espinal e decorrente de quimioterapia) e de dor oncológica. Foi observado que o surgimento de dor induzida por quimioterapia e de dor oncológica foi independente da atuação de canais de sódio. No mesmo estudo, animais submetidos à constricção do nervo ciático, que não expressavam Nav_{1.7} em neurônios sensitivos, deixaram de desenvolver dor

neuropática. Porém, para que o mesmo ocorresse nos animais submetidos à secção de raiz de nervo espinhal, foi necessário que os Nav_{1.7} fossem inibidos, tanto nos neurônios sensitivos quanto em neurônios simpáticos. Estas diferenças demonstram que um mesmo fenótipo de dor pode decorrer de diferentes mecanismos celulares e moleculares, reforçando a complexidade da sinalização de dor¹⁹⁵.

3.3.3 Nav_{1.8}

O Nav_{1.8} é considerado um canal sensitivo específico de neurônios sensitivos, e é expresso preferencialmente nos GRD e no gânglio trigeminal, porém, também pode ser encontrado na periferia, ao longo de axônios, e em terminações livres na pele e na córnea¹⁷¹. Este canal contribui para a corrente de sódio transmembrana que ocorre durante a fase de elevação do potencial de ação¹⁹⁶. Possui alto limiar de ativação, produz correntes TTX-R de inativação lenta, e possui uma rápida cinética de reiniciação¹⁷¹.

O papel do Nav_{1.8} foi bem estabelecido nos quadros de dor inflamatória. E diversos trabalhos experimentais já associaram este canal ao processamento de estímulos nociceptivos¹⁷¹. A injeção de carragenina na pata de rato foi correlacionada com aumento da expressão de Nav_{1.8} no GRD¹⁸². Resultado semelhante foi obtido a partir de cultura de neurônios do GRD de camundongos que receberam administração periférica de fator de necrose tumoral alfa¹⁹⁷. Prostaglandina E2 (PGE2), serotonina, adenosina, adrenalina, endotelina-1 e o NGF também foram relacionados ao aumento da expressão de Nav_{1.8} no GDR²². A injeção de adjuvante de Freund na pata de animais, em modelo de inflamação crônica, não foi capaz de aumentar a expressão de Nav_{1.8} no GRD, mas promoveu a migração deste canal para

os axônios do nervo periférico correspondente¹⁷¹. No entanto, quando o adjuvante foi injetado na articulação do rato, promoveu o aumento da expressão do canal de sódio no GRD, como visto anteriormente¹⁸⁸. Animais que tiveram a expressão deste canal reduzida, também apresentaram resposta atenuada frente aos estímulos térmicos e químicos, tanto somáticos quanto viscerais²⁹⁻³¹.

O papel deste canal na dor neuropática também é controverso. De maneira semelhante ao Nav_{1.7}, animais manipulados geneticamente para não expressar o Nav_{1.8} permanecem aptos a desenvolver dor neuropática¹⁹⁴. Porém, foi demonstrado que mutações de ganho de função neste canal estão relacionadas a síndromes dolorosas neuropáticas, tais como a neuropatia de fibras finas, devido a um aumento da excitabilidade no GRD^{198,199}. Um estudo, que utilizou a técnica antisense, demonstrou que o bloqueio específico do Nav_{1.8} atenuou a alodinea provocada por lesão de nervo²⁰⁰. No entanto, estudos posteriores revelaram uma redução paradoxal da expressão deste canal no GRD que contém os neurônios lesionados, revelada pela queda do RNAm e da proteína do canal, bem como das correntes produzidas pelo Nav_{1.8}^{201,202}. Foi proposto que os canais de sódios presentes nos neurônios que não foram afetados, ou a translocação de canais Nav_{1.8}, seriam responsáveis pela excitabilidade no GRD, e, conseqüentemente, pela hiperalgesia associada a lesões que cursam com dor neuropática²⁶. Esta hipótese se fortaleceu com dados obtidos posteriormente que mostraram um aumento na expressão de Nav_{1.8} nos axônios poupados e nos corpos celulares dos neurônios^{203,204}. No entanto, maiores informações ainda são necessárias para a maior compreensão do papel deste canal na dor neuropática.

3.3.4 Nav_{1.9}

O Nav_{1.9} foi o último receptor deste grupo a ser descoberto²³. Eles são preferencialmente expressos em neurônios de pequeno diâmetro localizados no GRD, mas podem ser encontrados no gânglio do nervo trigêmeo, em neurônios mioentéricos, além de terminações livres na pele e córnea¹⁷¹. A corrente de sódio produzida por este canal é TTX-R, sua ativação é voltagem-dependente, e por ser um canal hiperpolarizado, seu limiar é próximo ao potencial de repouso da membrana dos neurônios. Sua inativação é muito lenta, o que leva ao surgimento de correntes persistentes, que podem ser inibidas pelo *knockout* deste canal¹⁷¹. Sua cinética ultralenta sugere que o Nav_{1.9} não participa da iniciação do potencial de ação, mas, sim, da sua potencialização e de prolongamento da resposta até níveis subliminares de despolarização^{205,206}, além de reduzir o limiar para potenciais de ação individuais e para disparos repetidos¹⁷¹.

Estudos realizados em modelos animais sugerem um papel do Nav_{1.9} na dor inflamatória e na dor neuropática decorrente do diabetes. Animais com inflamação na pata tiveram aumento concomitante da expressão deste canal no GRD¹⁷¹.

Ratos diabéticos cursam com aumento da expressão do canal em neurônios de maior calibre, sugerindo uma participação na dor neuropática por esta etiologia²⁰⁷. Contudo, modelos de dor neuropática têm evidenciado uma redução na expressão de RNAm e proteínas, e da densidade das correntes do canal Nav_{1.9}^{201,208}. Ratos *knockout* para Nav_{1.9}, apesar de apresentarem abrandamento do comportamento doloroso por inflamação, apresentam resposta de dor neuropática preservada²⁰⁹.

De maneira geral, as evidências indicam que o Nav_{1.9} participa da dor inflamatória e decorrente de neuropatia diabética, no entanto, seu papel na dor neuropática ainda não foi completamente elucidado¹⁷¹.

3.3.5 Nav_{1.7} e Nav_{1.8} e hormônios sexuais

Os hormônios sexuais são capazes de modificar o comportamento celular através da ativação de receptores existentes tanto no núcleo (via nuclear clássica), quanto na membrana celular (via cascata de transdução de sinal)²¹⁰. Na via clássica, o estrogênio, por exemplo, se difunde para o interior da célula e se liga a RE, e este complexo, por sua vez, se conecta a áreas responsivas a estrogênio existentes na região promotora de alguns genes, e terminam por modular a produção de RNAm e síntese proteica²¹¹. Esta região responsiva ao estrogênio foi identificada em alguns genes, apesar de a sequência de nucleotídeo sofrer pequenas variações²¹². Já o mecanismo não nuclear depende da ativação da via de segundo mensageiro, que é ativada por um receptor estrogênico acoplado à proteína G (GPR30)¹³¹.

A hipótese de que os estrogênios poderiam participar da modulação da expressão dos canais de sódio, particularmente do Nav_{1.7}, surgiu a partir de dados de estudos com *patch clamps* que mostraram que a administração aguda do estradiol foi capaz de aumentar as correntes de sódio no núcleo hipotalâmico de ratos²¹³ e em cultura de células mamárias de humanos²¹⁴. De maneira oposta, bisfenol A, que é um composto estrogênico, inibiu as correntes TTX-S e TTX-R no GRD de ratos por uma via não genômica²¹⁵.

A reposição de estradiol em animais ooforectomizadas promoveu o aumento da expressão de Nav_{1.1}, Nav_{1.6}, Nav_{1.7}, Nav_{1.8} e Nav_{1.9}. No entanto, quando animais *knockout* para RE- α e RE- β foram submetidos a tratamento com estradiol, a expressão de Nav_{1.7} não foi alterada, sugerindo um mecanismo não nuclear para esta modulação. Já o aumento da expressão de Nav_{1.8} dependeu da presença de RE- β ¹⁷⁰.

Outra teoria proposta para a modulação da expressão dos canais de sódio voltagem dependente, após lesões inflamatórias, sugere que pode haver uma

influência direta de mediadores inflamatórios, tais como o NGF, liberados durante a inflamação, e transportados retrogradamente pelos axônios para o neurônio afetado²¹⁶. O NGF é uma proteína neurotrófica que é liberada em resposta à presença de histamina e bradicinina, e age através dos receptores de tirosina cinase A localizados nas terminações nervosas periféricas de nociceptores do GRD, aumentando a produção de neuropeptídeos, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina^{216,217}. E num estudo que utilizou modelo de inflamação crônica, foi evidenciado que o aumento da expressão de canais de sódio, encontrado em animais controle, foi inibido após o bloqueio do NGF por um antagonista específico, demonstrando a importância deste mediador²¹⁶. Ademais, a expressão de receptores para NGF no GRD parece ser intensificada pela presença de estrogênios¹²³, o que, frente a um estado inflamatório, criaria um ambiente propício a aumento da expressão de Nav, e portanto, de maior excitabilidade do GRD.

Os efeitos da testosterona sobre a expressão de canais Nav, e sua relação com os diferentes modelos de dor (inflamatório, visceral ou neuropático), até o momento não foram objeto de estudo.

4 MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

As recomendações da Associação Internacional Para o Estudo da Dor (IASP - International Society for the Study of Pain) e do National Institutes of Health²⁵ para a realização de estudos experimentais em dor envolvendo animais conscientes foram atendidas. Antes do início da coleta de dados, o projeto desta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (Protocolo de Pesquisa nº 008/14) (Anexo A).

4.2 Animais da pesquisa

Foram utilizados ratos Wistar adultos, machos, entre 2 e 3 meses de idade e pesando entre 250 g e 300 g, provenientes do Centro de Biotérios da FMUSP. Os animais foram abrigados em ambiente limpo, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e disponibilidade de água e comida por livre demanda.

4.3 Desenho do estudo

Este estudo foi dividido em uma avaliação comportamental, para avaliar diferença de resposta a estímulos dolorosos, e em um ensaio de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), para avaliar a expressão gênica dos canais de sódio Nav_{1.7} e Nav_{1.8}. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em um grupo Flutamida (F) e um grupo Controle (C) através de sorteio.

Anteriormente a cada uma das etapas que compõem o estudo, os animais foram submetidos a um preparo com Flutamida, administrada por um pesquisador diferente do que realizou os testes comportamentais. Os ratos do grupo F receberam Flutamida (Sigma-Aldrich, Brasil) na dose de 0,050 µg/g de peso do animal/dia, injetado no dorso do animal por via subcutânea durante os sete dias que antecederam o experimento. A medicação foi diluída em solução de propilenoglicol e etanol 10%, em função da solubilidade deste veículo ser superior à dos óleos vegetais. Os animais do grupo C receberam somente a solução de propilenoglicol e etanol 10% pela mesma via de administração. A Flutamida é uma medicação não hormonal que produz um efeito anti-androgênico através de sua ligação aos receptores androgênicos, impedindo o seu acoplamento, e reduzindo a captação de testosterona pelos tecidos periféricos¹⁰³. Após a fase de preparo, os animais foram submetidos ao mesmo modelo de dor aguda pós-operatória, tanto para o estudo comportamental quanto para o de expressão gênica. Para que o pesquisador encarregado das etapas experimentais não pudesse detectar a que grupo cada animal pertencia, o preparo foi mantido encoberto (Figura 2).

Os testes comportamentais foram realizados nos tempos: Pré-incisão (PRE); 2 horas após incisão (2h); no 1º dia pós-operatório (D1); no 2º dia pós-operatório (D2); no 3º dia pós-operatório (D3); e no 7º dia pós-operatório (D7). A coleta de material para expressão gênica foi feita nos tempos: PRE, D3 e D7.

Figura 2 - Fluxograma do estudo

4.4 Tamanho da amostra

Na avaliação comportamental, cada grupo foi constituído por nove animais (n=9). Para o ensaio de biologia molecular, as amostras de GRD foram obtidas a partir de sete animais para cada tempo e para cada grupo estudado (n=7). Para realização deste estudo, foram utilizados um total de 60 animais.

4.5 Modelo de dor aguda pós-operatória

Sob anestesia geral com isoflurano 2% a 3%, os animais foram submetidos à incisão plantar da pata posterior direita. O procedimento foi realizado de maneira asséptica conforme descrito por Brennan *et al.*⁷¹. Foi realizada uma incisão de 1 cm de comprimento na pata designada, seguido de uma incisão longitudinal e divulsão das fibras do músculo flexor digital curto. Posteriormente, foi feito a aproximação das bordas através de sutura simples com fio de nylon 4.0.

4.6 Testes comportamentais

Limiar de retirada da pata⁷¹: Os ratos foram colocados em caixas individuais, com espaço suficiente para mobilidade do animal, acomodados sobre uma tela metálica com aberturas de 1 cm² de área. Após o período de adaptação ao local, foram realizadas medidas de limiar de retirada da pata após estímulo mecânico com o algesímetro digital de Von Frey (Insight Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O estímulo foi limitado a 60 g para prevenir agravamento da lesão, e foi aplicado na região plantar da pata posterior direita, próximo à cicatriz da incisão. Foram obtidas cinco medidas, cada medida com intervalos de 2 minutos, e a partir destas foi calculada a média que representou o valor final para este teste.

Teste Guarding Pain⁷¹: Foi utilizado um escore cumulativo para avaliar o comportamento doloroso não evocado, e foi realizado sempre anteriormente ao teste de dor evocada, para evitar confundimento. De maneira semelhante ao teste anterior, os animais foram colocados caixas sobre uma tela metálica com orifícios de aproximadamente 1 cm² de área.

As patas, incisada e não incisada, foram visualizadas atentamente durante um período de 1 minuto, sendo este procedimento repetido a cada 5 minutos por 1 hora. Durante a avaliação, foram atribuídas notas que variaram de 0 a 2, dependendo do posicionamento adotado por cada pata do animal, a maior parte do tempo durante este período de observação.

As notas foram atribuídas da seguinte forma: 0 = A ferida operatória da pata do animal está totalmente em contato, esbranquiçada ou mesmo distorcida, pela rede. 1 = A pata do animal toca gentilmente a rede, porém sem distorção da ferida operatória ou não estando esbranquiçada. 2 = A pata não faz contato com a rede.

O somatório das 12 notas (0-24) obtidas durante 1 hora de observação foi registrado. A diferença entre as notas obtidas entre a pata saudável e a operada representa o escore de dor cumulativa.

Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia através de exsanguinação por punção cardíaca sob anestesia geral com Isoflurano.

4.7 Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

A avaliação de expressão do RNA mensageiro (RNAm) através da RT-PCR foi utilizada para determinar se a hiperalgesia relacionada ao trauma cirúrgico decorre do aumento da expressão de canais de sódio voltagem dependente no GRD, e se esta expressão poderia ser modulada pelo bloqueio dos receptores de testosterona.

Para a obtenção das amostras de GRD, os animais foram anestesiados conforme protocolo. Com intuito de diminuir o sangramento no campo operatório, e consequentemente reduzir o tempo para obtenção das amostras, os animais foram submetidos à toracotomia, e sacrificados de maneira semelhante à descrita

anteriormente. Em seguida, foi realizada a laminectomia para obtenção dos gânglios das raízes dorsais de L4 e L5 ipsilaterais à incisão plantar. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas em reservatório à -80 C° até o momento da extração.

O RNA total foi extraído utilizando o kit ReliaPrep™ RNA Miniprep Systems (Promega Biotecnologia do Brasil, Brasil). O RNA obtido foi submetido à quantificação espectrofotométrica com Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltman, MA) e somente as amostras com relação A260/A280 maior que 1,8 foram usadas. Algumas amostras foram selecionadas aleatoriamente para análise de integridade do RNA com o Agilent 2100 TapeStation Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) para determinar a qualidade do material. A síntese do cDNA por transcriptase reversa foi realizado a partir de uma amostra de 0,5 µg de RNA total usando o kit TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, EUA). Para a reação de RT-PCR foram acrescentados os primers de cada canal estudado, além de um controle endógeno (TaqMan Gene Expression Assays: Applied Biosystems, EUA). O controle interno utilizado para normalização foi o TBP (TATA box protein).

A sequência de primers utilizada foi a seguinte: Nav_{1.7} f - CAGCAAAGAGAGACGGAACC; Nav_{1.7} r - CCCTCAGTGTCCGTAGAGATT; Nav_{1.8} f - CTCAGAGGCCAAGAACCACATTGC; e Nav_{1.8} r - AGCTCGGGGATCTTCCTCAGGAT.

4.8 Análise estatística

Todas as análises comportamentais foram feitas no software Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., EUA). A normalidade dos dados foi testada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. As tabelas foram apresentadas com as medianas, valor máximo e mínimo, e nos gráficos os dados foram representados por média e erro padrão. A variância dos resultados obtidos nos testes comportamentais e na expressão dos canais de sódio em função do tempo foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis, e a diferença entre os grupos foi determinada pelo teste de Mann-Whitney para cada tempo. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Limiar de retirada da pata

Após a implementação do modelo de dor pós-operatória por incisão plantar, ambos os grupos desenvolveram hiperalgesia mecânica, havendo uma redução do limiar para retirada da pata, atingindo menor valor em 2H (15,28 vs 24,14; para grupo Flutamida e Controle, respectivamente). Os animais tratados com flutamida apresentaram menor limiar de dor para retirada da pata que o grupo controle e esta diferença foi significativa em D1, D2, D3 e D7 (Tabela 1). Todos os animais evoluíram progressivamente para recuperação da hiperalgesia, porém, até o 7º dia de pós-operatório, não recuperaram os níveis iniciais.

Tabela 1 - Limiar de retirada da pata, em gramas, para cada grupo ao longo do tempo

Tempo	Flutamida	Controle	p
PRE	56,99 (50,49-58,79)	58,19 (56,49-60)	0,4206
2 horas	15,28 (15,24-16,24)	24,14 (10,78-24,23)	0,1349
D1	15,83 (15,56-24,11)	24,16 (23,39-25,06)	0,0159*
D2	22,23 (18,15-25,01)	26,94 (24,28-28,8)	0,0238*
D3	23,69 (22,98-24,45)	26,81 (25-38,1)	0,0079*
D7	36,5 (35,01-45,66)	46,29 (40,28-50,86)	0,0317*

N = 9 ratos machos Wistar. Dados obtidos pelo teste de Von Frey eletrônico, e apresentados como mediana (máximo e mínimo). A comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Mann-Whitney para cada tempo estudado. A análise de variância (teste de Kruskal-Wallis) mostrou que o tempo teve influência sobre o limiar de retirada da pata ($p=0,0001$).

* $p<0,05$.

Diferença estatística entre os grupos foi encontrada nos tempos D1, D2, D3 e D7.

O Gráfico 1 mostra o comportamento da hiperalgesia mecânica ao longo do tempo.

Gráfico 1 - Limiar de retirada da pata. O comportamento evolutivo do limiar de retirada da pata apresentado através da média e erro padrão (Teste de Von Frey)

A diferente entre os grupos foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

5.2 Teste de proteção do membro

Os animais evitaram tocar as grades do piso da gaiola com maior frequência após a incisão plantar em ambos os grupos, sendo que este comportamento foi mais evidente na avaliação realizada duas horas após a cirurgia, atingindo escores de 18 e 14 nos ratos tratados com flutamida e nos controles, respectivamente. A análise de variância mostrou que os escores obtidos no teste de proteção do membro foram influenciados pelo tratamento com flutamida ($H=88,9$; e $p < 0,0001$). Os animais que receberam a medicação apresentaram escores mais elevados ao longo de todo o período de avaliação, e esta diferença foi significativa nos tempos 2 horas, D3 e D7. A Tabela 2 apresenta os dados relativos a este teste.

Tabela 2 - Escores obtidos no teste de proteção do membro, para cada grupo, ao longo do tempo, e apresentado através de mediana, valores máximo e mínimo

Tempo	Flutamida	Controle	<i>p</i>
PRE	0 (0-0)	0 (0-0)	ns
2 horas	18 (15-24)	14 (11-17)	0,0011*
D1	11 (6-16)	9 (4-14)	0,1875
D2	9 (4-12)	7 (3-11)	0,1277
D3	7 (2-10)	2 (1-9)	0,0319*
D7	4 (0-10)	1 (0-8)	0,0183*

N = 9 ratos machos Wistar. Dados obtidos pelo teste de proteção do membro, e apresentados como mediana (máximo e mínimo). Comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Mann-Whitney. A análise de variância (teste de Kruskal-Wallis) demonstrou que o tempo teve influência sobre o teste de proteção do membro ($p < 0.0001$). * $p < 0,05$.

Da mesma forma que no teste de dor evocada, o comportamento dos animais tendeu a retornar para os padrões pré-operatórios, apresentando escores baixos em D7 (4 vs 1 para grupo flutamida e controle, respectivamente). O Gráfico 2 demonstra o comportamento dos grupos ao longo do tempo.

Gráfico 2 - Teste de proteção do membro. Dor espontânea representada pelos valores obtidos no teste de proteção do membro ao longo do tempo, para cada grupo

A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

5.3 RT-PCR

Após a incisão plantar, os animais de ambos os grupos apresentaram um aumento da expressão de Nav_{1.7} (H=13,11; p=0,0224), mas não Nav_{1.8} (H=6,578; p=0,254). A expressão de canais Nav_{1.7} foi significativamente maior em D7, comparado com o PRE, em ambos os grupos. A expressão dos canais de sódio, representado pelo valor $-2^{\Delta\Delta C_t}$, não diferiu entre os grupos (Gráfico 3) em nenhum dos tempos estudados.

Gráfico 3 - Resultado do RT-PCR (N= pool de RNAm obtido a partir de 7 animais por tempo e por grupo)

O teste de Mann-Whitney mostrou não haver diferença entre o grupo controle e o grupo flutamida para a expressão de Nav_{1.7} e Nav_{1.8}, para cada tempo. A análise de variância (Kruskal-Wallis test) que a expressão de Nav_{1.7} sofreu influência do tempo em ambos os grupos estudados, mas não modificou a expressão de Nav_{1.8} em função do tempo. *Grupo Flutamida: D7>PRE (p<0.05); Grupo Controle: D7>PRE (p<0.05).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, o bloqueio androgênico promoveu uma maior exacerbação na expressão de dor, evidenciado por um limiar menor para retirada da pata e por um comportamento de proteção do membro afetado mais evidente. O estudo de expressão gênica molecular demonstrou que houve um aumento na expressão do Nav_{1.7} (mas não no Nav_{1.8}) após o trauma cirúrgico, e que este aumento não foi modificado pela utilização da flutamida.

O modelo de incisão plantar tem sido utilizado por melhor reproduzir os mecanismos encontrados na dor aguda pós-cirúrgica, facilitando a translação dos resultados obtidos para os seres humanos e para a prática clínica⁷¹. A incisão plantar provoca um estado de hiperalgesia por induzir a produção de citocinas inflamatórias locais, NGF²¹⁸ e do fator de crescimento derivado do cérebro no GRD²², além de um aumento na atividade espontânea dos neurônios do GRD⁷¹.

Os escores obtidos pelo teste de proteção do membro foram semelhantes para os dois grupos, atingindo um pico em 2 horas, e diminuindo progressivamente ao longo do tempo. O mesmo ocorreu com limiar de retirada da pata, que, em ambos os grupos, apresentou menor resultado no tempo 2 horas, com aumento gradual até o 7º PO. Este comportamento é semelhante ao encontrado em outros estudos que utilizaram o mesmo modelo experimental, onde o pico de hiperalgesia ocorre nas primeiras horas de pós-operatório, e com resolução espontânea em torno do 10º PO^{71,218,219}.

Os animais tratados com flutamida apresentaram limiar de retirada da pata inferior aos controles, bem como escores mais elevados no teste de dor espontânea. Os resultados obtidos nos testes comportamentais sugerem maior preponderância da hiperalgesia nos animais cuja ação da testosterona foi bloqueada pela flutamida. A ação anti-hiperalgésica da testosterona já foi demonstrada na dor inflamatória aguda. Animais orquiectomizados que receberam injeção de carragenina na pata apresentaram maior exacerbação do quadro de hiperalgesia do que os controles, e reposição de testosterona reverteu esta diferença¹²⁸. Ainda, após a injeção de formalina, machos orquiectomizados tiveram o comportamento doloroso potencializado, enquanto que fêmeas que receberam testosterona apresentaram menos dor^{7,73}. O modelo de incisão plantar também foi utilizado para comparar a dor pós-operatória entre machos e fêmeas, porém não foi observado diferença no comportamento doloroso ou na resposta aos analgésicos opioides¹⁰¹.

Embora diversos estudos tenham optado por utilizar a castração como meio de induzir hipogonadismo, este método apresenta desvantagens, por comprometer os mecanismos fisiológicos de controle endócrino dos hormônios sexuais, com consequente manutenção de níveis hormonais inadequadamente elevados ou depletados²²⁰. Ratos Wistar e Sprague-Dawley, apresentaram concentrações plasmáticas de estradiol elevadas em decorrência da orquiectomia, alcançando níveis equivalentes aos encontrados em fêmeas destas espécies⁴. A Flutamida é utilizada para a obtenção do bloqueio androgênico sem as complicações da castração cirúrgica¹⁰³. Em estudo recente, autores demonstraram que o efeito analgésico da testosterona é dependente da ativação do receptor de testosterona, e que a flutamida produziu a reversão desta proteção, após a injeção de formalina na ATM¹⁴².

As evidências acumuladas na última década corroboram com os resultados comportamentais obtidos no presente estudo, sugerindo um papel protetor da testosterona contra a dor^{73,74,128,142,143}, e no caso específico de nosso trabalho, na dor pós-operatória. No entanto, os mecanismos de ação dos androgênios sobre a nocicepção e seus efeitos anti-hiperalgésico ainda são pouco esclarecidos. O envolvimento do sistema opioide como mediador da ação anti-hiperalgésico da testosterona foi demonstrado em um estudo em que inflamação na ATM foi obtida com injeção de formalina¹⁰⁵. O aumento da expressão de canais de sódio voltagem dependente, particularmente o Nav_{1.7} e Nav_{1.8}, já foi demonstrado em estudos anteriores em modelo de dor inflamatória (modelo com adjuvante de Freund e de punção de disco intervertebral)^{183,221,222}. Foi sugerido que o Estradiol possa modular a expressão destes canais²¹⁰, o que foi confirmado em um estudo em que animais tratados com um bloqueador do receptor de estrogênio (RE) (ICI 182,780), em um modelo de inflamação da articulação temporomandibular, apresentaram aumento da expressão de Nav_{1.7} no gânglio trigeminal, concomitante ao aumento da hiperalgesia mecânica²²³.

No presente estudo foi demonstrado um aumento da expressão do Nav_{1.7}, mas não no Nav_{1.8} decorrente de trauma cirúrgico. Esta ausência de incremento na expressão de Nav_{1.8} corrobora com dados obtidos de estudos anteriores que avaliaram o papel dos canais de sódio na dor pós-operatória^{221,224}. Entretanto, apesar de haver aumento na expressão de Nav_{1.7}, este aumento não parece ser mediado por testosterona, não participando dos mecanismos responsáveis pela analgesia induzida por testosterona. Assim, os resultados deste estudo evidenciaram que o bloqueio androgênico aumenta o comportamento de dor em ratos, sugerindo um papel anti-

hiperalgésico da testosterona, no entanto, este efeito foi independente do aumento da expressão de canais de sódio.

Algumas limitações podem ser consideradas neste estudo. O teste de proteção do membro para avaliar dor espontânea apresenta algum grau de subjetividade, o que pode afetar a obtenção dos escores. Ainda, a utilização da via subcutânea, apesar de proporcionar maior praticidade na execução, incorre no risco de absorção errática. Por fim, os tempos escolhidos para avaliar níveis de expressão dos Nav_{1.7} e Nav_{1.8} podem não ter sido ideais para obtenção de curva evolutiva da expressão destes canais.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível demonstrar que o bloqueio da testosterona provocou a redução do limiar para retirada da pata após estímulo mecânico, e ainda um escore acumulado mais elevado na avaliação da dor espontânea. Estes dados sugerem que o bloqueio do receptor androgênico facilitou o desenvolvimento de um estado hiperalgésico após a incisão plantar.

Ainda, os canais de sódio voltagem dependente Nav_{1.7} tiveram sua expressão aumentada durante o pós-operatório, porém sem diferença entre animais tratados com flutamida e os controles, afastando que este canal seja responsável pelo efeito anti-hiperalgésico da testosterona.

Anexo A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/02/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **008/14** intitulado: “**INFLUÊNCIA DA TESTOSTERONA NA EXPRESSÃO DE CANAIS DE SÓDIO VOLTAGEM DEPENDENTES NAV1.3, NAV1.7 EM MODELO DE DOR AGUDA PÓS-OPERATÓRIA.**” que utilizará **60** animais da espécie **ratos Wistar**, apresentado pelo **Departamento de CIRURGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: HAZEM ADEL ASHMAWI

Pesquisador (a) Executante: JOSÉ OSVALDO BARBOSA NETO

CEP-FMUSP, 11 de Fevereiro de 2014.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo B - Teste Guarding Pain

Visualizar patas trazeiras para pontuar de acordo com o seguinte esquema:

Observação	Pontuação
Pata completamente em contato com a grade, apresentando pele esbranquiçada ou distorcida no local do contato.	0
Pata toca delicadamente a grade, sem os sinais descritos anteriormente.	1
Pata suspensa, sem contato com a grade.	2

Tempo de observação por medida: 1 minuto

Intervalo de observação: 5 minutos

Tempo total do teste: 60 minutos

Resultados

Grupo _____ Tempo do estudo _____

Medidas	Animal 1		Animal 2		Animal 3		Animal 4		Animal 5		Animal 6		Animal 7		Animal 8		Animal 9	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
10																		
11																		
12																		

Escore de dor acumulado:

$$EAD = [\text{Somatório pata D}] - [\text{Somatório pata E}].$$

9 REFERÊNCIAS

1. Fillingim RB, Maixner W. Gender differences in the responses to noxious stimuli. *Pain Forum*. 1995;4(4):209-21.
2. Racine M, Tousignant-Laflamme Y, Kloda LA, Dion D, Dupuis G, Choinire M. A systematic literature review of 10 years of research on sex/gender and experimental pain perception - Part 1: Are there really differences between women and men? *Pain*. 2012;153(3):602-18.
3. Hashmi JA, Davis KD. Deconstructing sex differences in pain sensitivity. *Pain*. 2014;155(1):10-3.
4. Craft RM, Mogil JS, Maria Aloisi A. Sex differences in pain and analgesia: The role of gonadal hormones. *Eur J Pain*. 2004;8(5):397-411.
5. Myers CD, Robinson ME, Riley JL, Sheffield D. Sex, gender, and blood pressure: contributions to experimental pain report. *Psychosom Med*. 2001;63(4):545-50.
6. Aloisi AM, Ceccarelli I. Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. *Neuroscience*. 2000;95(2):559-66.

7. Gaumond I, Arsenault P, Marchand S. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res.* 2002;958(1):139-45.
8. Lacroix-Fralish ML, Tawfik VL, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA. Progesterone mediates gonadal hormone differences in tactile and thermal hypersensitivity following L5 nerve root ligation in female rats. *Neuroscience.* 2006;138(2):601-8.
9. Marcus DA. Interrelationships of neurochemicals, estrogen, and recurring headache. *Pain.* 1995;62(2):129-39.
10. LeResche L. Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(3):291-305.
11. Aubrun F, Salvi N, Coriat P, Riou B. Sex- and age-related differences in morphine requirements for postoperative pain relief. *Anesthesiology.* 2005;103(1):156-60.
12. Cepeda MS, Carr DB. Women experience more pain and require more morphine than men to achieve a similar degree of analgesia. *Anesth Analg.* 2003;97(5):1464-8.
13. Rosseland LA, Stubhaug A. Gender is a confounding factor in pain trials : women report more pain than men after arthroscopic surgery. *Pain.* 2004;112(3):248-53.
14. Harbuz MS, Perveen-Gill Z, Lightman SL, Jessop DS. A protective role for testosterone in adjuvant-induced arthritis. *Br J Rheumatol.* 1995;34(12):1117-22.

15. Pednekar JR, Mulgaonker VK. Role of testosterone on pain threshold in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*. 1995;39(4):423-4.
16. Bodnar RJ, Romero MT, Kramer E. Organismic variables and pain inhibition: roles of gender and aging. *Brain Res Bull*. 1988;21(6):947-53.
17. Banik RK, Ph D, Woo YC, Ph D, Park SS, Ph D, et al. Strain and Sex Influence on Pain Sensitivity after Plantar. *Anesthesiology*. 2006;105(6):1246-53.
18. Apfelbaum JL, Chen C, Mehta SS, Gan TJ. Postoperative pain experience: Results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. *Anesth Analg*. 2003;97(2):534-40.
19. American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. Practice guidelines for acute pain management in the perioperative setting: An updated report by the American society of anesthesiologists task force on acute pain management. *Anesthesiology*. 2012;116(2):248-73.
20. Kuusniemi K, Pöyhiä R. Present-day challenges and future solutions in postoperative pain management: Results from PainForum 2014. *J Pain Res*. 2016;9:25-36.
21. Mariano ER, Miller B, Salinas F V. The Expanding Role of Multimodal Analgesia in Acute Perioperative Pain Management. *Adv Anesth*. 2013;31(1):119-36.

22. Yuan XH, Liu XY, Tang QP, Deng YL. Pain-related mediators underlie incision-induced mechanical nociception in the dorsal root ganglia. *Neural Regen Res.* 2013;8(35):3325-33.
23. Xu J, Brennan TJ. The pathophysiology of acute pain. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2011;24(5):508-14.
24. Pogatzki-Zahn EM, Zahn PK, Brennan TJ. Postoperative pain-clinical implications of basic research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2007;21(1):3-13.
25. Bennett DLH. Neurotrophic factors: important regulators of nociceptive function. *Neuroscientist.* 2001;7(1):13-7.
26. Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain.* 2007;131(3):243-57.
27. Gardiner M. Molecular genetics of infantile nervous system channelopathies. *Early Hum Dev.* 2006;82(12):775-9.
28. Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG. From genes to pain: Na v 1.7 and human pain disorders. *Trends Neurosci.* 2007;30(11):555-63.
29. Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J, et al. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat Neurosci.* 1999;2(6):541-8.
30. Kerr BJ, Souslova V, McMahon SB, Wood JN. A role for the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in NGF-induced hyperalgesia, but not neuropathic pain. *Neuroreport.* 2001;12(14):3077-80.

-
31. Laird JMA, Souslova V, Wood JN, Cervero F. Deficits in visceral pain and referred hyperalgesia in Nav1.8 (SNS/PN3)-null mice. *J Neurosci.* 2002;22(19):8352-6.
 32. Paulson PE, Minoshima S, Morrow TJ, Casey KL. Gender differences in pain perception and patterns of cerebral activation during noxious heat stimulation in humans. *Pain.* 1998;76(1-2):223-9.
 33. Riley JL, Robinson ME, Wise EA, Myers CD, Fillingim RB. Sex differences in the perception of noxious experimental stimuli: a meta-analysis. *Pain.* 1998;74(2-3):181-7.
 34. IASP Terminology Working Group. *Classification of Chronic Pain*. 2nd Edition. Seattle: IASP Press; 1994.
 35. Sarlani E, Farooq N, Greenspan JD. Gender and laterality differences in thermosensation throughout the perceptible range. *Pain.* 2003;106(1-2):9-18.
 36. Chesterton LS, Barlas P, Foster NE, Baxter GD, Wright CC. Gender differences in pressure pain threshold in healthy humans. *Pain.* 2003;101(3):259-66.
 37. Frot M, Feine JS, Bushnell MC. Sex differences in pain perception and anxiety. A psychophysical study with topical capsaicin. *Pain.* 2004;108(3):230-6.
 38. Bertrand AL, Garcia JB, Viera EB, Santos AM, Bertrand RH. Pupillometry: the influence of gender and anxiety on the pain response. *Pain Physician.* 2013;16(3):E257-66.

-
39. Hashmi JA, Davis KD. Effects of temperature on heat pain adaptation and habituation in men and women. *Pain*. 2010;151(3):737-43.
 40. Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ. Aspects of fibromyalgia in the general population: sex, pain threshold, and fibromyalgia symptoms. *J Rheumatol*. 1995;22(1):151-6.
 41. Keogh E, McCracken LM, Eccleston C. Do men and women differ in their response to interdisciplinary chronic pain management? *Pain*. 2005;114(1-2):37-46.
 42. Cervero F, Laird JMA. Role of ion channels in mechanisms controlling gastrointestinal pain pathways. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(6):608-12.
 43. Howard FM. Chronic pelvic pain. *Obstet Gynecol*. 2003;101(3):594-611.
 44. Unruh AM. Gender variations in clinical pain experience. *Pain*. 1996;65(2-3):123-67.
 45. Bartley EJ, Fillingim RB. Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *Br J Anaesth*. 2013;111(1):52-8.
 46. Fillingim RB, Edwards RR, Powell T. The relationship of sex and clinical pain to experimental pain responses. *Pain*. 1999;83(3):419-25.
 47. Gerdle B, Björk J, Cöster L, Henriksson K, Henriksson C, Bengtsson A. Prevalence of widespread pain and associations with work status: a population study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008;9(1):102.

-
48. Vieira EB de M, Garcia JBS, Silva AAM da, Araújo RLTM, Jansen RCS, Bertrand ALX. Chronic pain, associated factors, and impact on daily life: are there differences between the sexes? *Cad Saude Publica*. 2012;28(8):1459-67.
 49. Barnabe C, Bessette L, Flanagan C, Leclercq S, Steiman A, Kalache F, et al. Sex differences in pain scores and localization in inflammatory arthritis: a systematic review and metaanalysis. *J Rheumatol*. 2012;39(6):1221-30.
 50. Robinson ME, Wise EA, Iii JLR, Atchison JW, Riley III JL, Atchison JW, et al. Sex Differences in Clinical Pain: A Multisample Study. *J Clin Psychol Med Settings*. 1998;5(4):413-24.
 51. Turk DC, Okifuji A. Does sex make a difference in the prescription of treatments and the adaptation to chronic pain by cancer and non-cancer patients? *Pain*. 1999;82(2):139-48.
 52. Gautschi OP, Corniola M V., Smoll NR, Joswig H, Schaller K, Hildebrandt G, et al. Sex differences in subjective and objective measures of pain, functional impairment, and health-related quality of life in patients with lumbar degenerative disc disease. *Pain*. 2016;157(5):1065-71.
 53. Racine M, Dion D, Dupuis G, Guerriere DN, Zagorski B, Choinière M, et al. The canadian STOP-PAIN project: The burden of chronic pain - Does sex really matter? *Clin J Pain*. 2014;30(5):443-52.
 54. Averbuch M, Katzper M. A search for sex differences in response to analgesia. *Arch Intern Med*. 2000;160(22):3424-8.

-
55. Taenzer AH, Clark C, Curry CS. Gender affects report of pain and function after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. *Anesthesiology*. 2000;93(3):670-5.
 56. Chia Y-Y, Chow L-H, Hung C-C, Liu K, Ger L-P, Wang P-N. Gender and pain upon movement are associated with the requirements for postoperative patient-controlled iv analgesia: a prospective survey of 2,298 Chinese patients. *Can J Anaesth*. 2002;49(3):249-55.
 57. Vetthus M, Berhane T, Søreide O, Søndena K. Pain persists in many patients five years after removal of the gallbladder: observations from two randomized controlled trials of symptomatic, noncomplicated gallstone disease and acute cholecystitis. *J Gastrointest Surg*. 2005;9(6):826-31.
 58. Boerner KE, Birnie KA, Caes L, Schinkel M, Chambers CT. Sex differences in experimental pain among healthy children: A systematic review and meta-analysis. *Pain*. 2014;155(5):983-93.
 59. LeResche L, Mancl LA, Drangsholt MT, Saunders K, Korff M Von. Relationship of pain and symptoms to pubertal development in adolescents. *Pain*. 2005;118(1):201-9.
 60. Craft RM. Modulation of pain by estrogens. *Pain* 2007;132(SUPPL. 1):S3-12.
 61. Iacovides S, Avidon I, Baker FC. Does pain vary across the menstrual cycle? A review. *Eur J Pain (United Kingdom)*. 2015;19(10):1389-405.

-
62. Colangelo K, Haig S, Bonner A, Zelenietz C, Pope J. Self-reported flaring varies during the menstrual cycle in systemic lupus erythematosus compared with rheumatoid arthritis and fibromyalgia. *Rheumatology*. 2011;50(4):703-8.
 63. Martin VT. Ovarian hormones and pain response: a review of clinical and basic science studies. *Gend Med*. 2009;6 Suppl 2:168-92.
 64. Baad-Hansen L, Poulsen HF, Jensen HM, Svensson P. Lack of sex differences in modulation of experimental intraoral pain by diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). *Pain*. 2005;116(3):359-65.
 65. Cairns BE, Gazerani P. Sex-related differences in pain. *Maturitas*. 2009;63(4):292-6.
 66. Kaergaard A, Hansen AM, Rasmussen K, Andersen JH. Association between plasma testosterone and work-related neck and shoulder disorders among female workers. *Scand J Work Environ Health*. 2000;26(4):292-8.
 67. White HD, Robinson TD. A novel use for testosterone to treat central sensitization of chronic pain in fibromyalgia patients. *Int Immunopharmacol*. 2015;27(2):244-8.
 68. Stillman MJ. Testosterone replacement therapy for treatment refractory cluster headache. *Headache*. 2006;46(6):925-33.
 69. White HD, Brown LAAJJ, Gyurik RJ, Manganiello PD, Robinson TD, Hallock LS, et al. Treatment of pain in fibromyalgia patients with testosterone gel: Pharmacokinetics and clinical response. *Int Immunopharmacol*. 2015;27(2):249-56.

-
70. Bartley EJ, Palit S, Kuhn BL, Kerr KL, Terry EL, DeVentura JL, et al. Natural Variation in Testosterone is Associated with Hypoalgesia in Healthy Women. *Clin J Pain*. 2015;31(8):730-9.
 71. Brennan TJ. Pathophysiology of postoperative pain. *Pain*. 2011;152(3 Suppl):S33-40.
 72. Aloisi AM, Albonetti ME, Carli G. Sex differences in the behavioural response to persistent pain in rats. *Neurosci Lett*. 1994;179(1-2):79-82.
 73. Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P, De Padova AM, Massafra C. Testosterone affects formalin-induced responses differently in male and female rats. *Neurosci Lett*. 2004;361(1-3):262-4.
 74. Fischer L, Clemente JT, Tambeli CH. The protective role of testosterone in the development of temporomandibular joint pain. *J Pain*. 2007;8(5):437-42.
 75. Aloisi AM, Sacerdote P, Albonetti ME, Carli G. Sex-related effects on behaviour and beta-endorphin of different intensities of formalin pain in rats. *Brain Res*. 1995;699(2):242-9.
 76. Hagiwara H, Ishida M, Arita J, Mitsushima D, Takahashi T, Kimura F, et al. The cAMP response element-binding protein in the bed nucleus of the stria terminalis modulates the formalin-induced pain behavior in the female rat. *Eur J Neurosci*. 2009;30(12):2379-86.
 77. Barrett AC, Smith ES, Picker MJ. Capsaicin-induced hyperalgesia and mu-opioid-induced antihyperalgesia in male and female Fischer 344 rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307(1):237-45.

-
78. Chen S-C, Chang T-J, Wu F-S. Competitive Inhibition of the Capsaicin Receptor-Mediated Current by Dehydroepiandrosterone in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311(2):529-36.
 79. Lu Y-C, Chen C-W, Wang S-Y, Wu F-S. 17Beta-estradiol mediates the sex difference in capsaicin-induced nociception in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331(3):1104-10.
 80. Saloman JL, Niu KY, Ro JY. Activation of peripheral delta-opioid receptors leads to anti-hyperalgesic responses in the masseter muscle of male and female rats. *Neuroscience*. 2011;190:379-85.
 81. Niu K, Saloman JL, Zhang Y, Ro JY. Sex differences in the contribution of ATP-sensitive K⁺ channels in trigeminal ganglia under an acute muscle pain condition. *Neuroscience*. 2011;180:344-52.
 82. Carmichael NME, Charlton MP, Dostrovsky JO. Sex differences in inflammation evoked by noxious chemical, heat and electrical stimulation. *Brain Res*. 2009;1276:103-11.
 83. Bradshaw H, Miller J, Ling Q, Malsnee K, Ruda MA. Sex differences and phases of the estrous cycle alter the response of spinal cord dynorphin neurons to peripheral inflammation and hyperalgesia. *Pain*. 2000;85(1-2):93-9.
 84. Auh Q-S, Ro JY. Effects of peripheral κ opioid receptor activation on inflammatory mechanical hyperalgesia in male and female rats. *Neurosci Lett*. 2012;524(2):111-5.

-
85. Joseph EK, Parada CA, Levine JD. Hyperalgesic priming in the rat demonstrates marked sexual dimorphism. *Pain*. 2003;105(1-2):143-50.
 86. Tall JM, Crisp T. Effects of gender and gonadal hormones on nociceptive responses to intraplantar carrageenan in the rat. *Neurosci Lett*. 2004;354(3):239-41.
 87. Teixeira JM, Dias EV, Parada CA, Tambeli CH. Intra-Articular Blockade of P2X7 Receptor Reduces the Articular Hyperalgesia and Inflammation in the Knee Joint Synovitis Especially in Female Rats. *J Pain*. 2017;18(2):132-43.
 88. Wong H, Kang I, Dong XD, Christidis N, Ernberg M, Svensson P, et al. NGF-induced mechanical sensitization of the masseter muscle is mediated through peripheral NMDA receptors. *Neuroscience*. 2014;269:232-44.
 89. Ji Y, Tang B, Cao DY, Wang G, Traub RJ. Sex differences in spinal processing of transient and inflammatory colorectal stimuli in the rat. *Pain*. 2012;153(9):1965-73.
 90. Ji Y, Murphy AZ, Traub RJ. Sex differences in morphine-induced analgesia of visceral pain are supraspinally and peripherally mediated. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291(2):R307-14.
 91. Aloisi AM, Affaitati G, Ceccarelli I, Fiorenzani P, Lerza R, Rossi C, et al. Estradiol and testosterone differently affect visceral pain-related behavioural responses in male and female rats. *Eur J Pain*. 2010;14(6):602-7.
 92. DeLeo JA, Rutkowski MD. Gender differences in rat neuropathic pain sensitivity is dependent on strain. *Neurosci Lett*. 2000;282(3):197-9.

-
93. Coyle DE, Sehlhorst CS, Mascari C. Female rats are more susceptible to the development of neuropathic pain using the partial sciatic nerve ligation (PSNL) model. *Neurosci Lett*. 1995;186(2-3):135-8.
 94. Tall JM, Stuesse SL, Cruce WL, Crisp T. Gender and the behavioral manifestations of neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001;68(1):99-104.
 95. Dominguez CA, Kouya PF, Wu W-P, Hao J-X, Xu X-J, Wiesenfeld-Hallin Z. Sex differences in the development of localized and spread mechanical hypersensitivity in rats after injury to the infraorbital or sciatic nerves to create a model for neuropathic pain. *Gen Med*. 2009;6:225-34.
 96. LaCroix-Fralish ML, Tawfik VL, DeLeo JA. The organizational and activational effects of sex hormones on tactile and thermal hypersensitivity following lumbar nerve root injury in male and female rats. *Pain*. 2005;114(1-2):71-80.
 97. LaCroix-Fralish ML, Rutkowski MD, Weinstein JN, Mogil JS, Deleo JA. The magnitude of mechanical allodynia in a rodent model of lumbar radiculopathy is dependent on strain and sex. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30(16):1821-7.
 98. LaCroix-Fralish ML, Tawfik VL, Spratt KF, DeLeo JA. Sex differences in lumbar spinal cord gene expression following experimental lumbar radiculopathy. *J Mol Neurosci*. 2006;30(3):283-95.
 99. Dina OA, Gear RW, Messing RO, Levine JD. Severity of alcohol-induced painful peripheral neuropathy in female rats: role of estrogen and protein kinase (A and Cepsilon). *Neuroscience*. 2007;145(1):350-6.

100. Hwang B-Y, Kim E-S, Kim C-H, Kwon J-Y, Kim H-K. Gender differences in paclitaxel-induced neuropathic pain behavior and analgesic response in rats. *Korean J Anesthesiol.* 2012;62(1):66-72.
101. Kroin JS, Buvanendran A, Nagalla SKS, Tuman KJ. Postoperative pain and analgesic responses are similar in male and female Sprague-Dawley rats. *Can J Anesth.* 2003;50(9):904-8.
102. Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Massafra C, Aloisi AM. The behavioral and neuronal effects induced by repetitive nociceptive stimulation are affected by gonadal hormones in male rats. *Pain.* 2003;104(1-2):35-47.
103. Affaitati G, Ceccarelli I, Fiorenzani P, Rossi C, Pace MC, Passavanti MB, et al. Sex differences in the analgesic effects of ICI 182,780 and Flutamide on ureteral calculosis in rats. *Horm Behav.* 2011;59(1):9-13.
104. Calabrese D, Giatti S, Romano S, Porretta-Serapiglia C, Bianchi R, Milanese M, et al. Diabetic neuropathic pain: A role for testosterone metabolites. *J Endocrinol.* 2014;221(1):1-13.
105. Macedo CG, Fanton LE, Fischer L, Tambeli CH. Coactivation of mu- and kappa-Opioid receptors may mediate the protective effect of testosterone on the development of temporomandibular joint nociception in male rats. *J Oral Facial Pain Headache.* 2016;30(1):61-7.
106. Chanda ML, Mogil JS. Sex differences in the effects of amiloride on formalin test nociception in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291(2):R335-42.

-
107. Mowlavi A, Cooney D, Febus L, Khosraviani A, Wilhelmi BJ, Akers G. Increased cutaneous nerve fibers in female specimens. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(5):1407-10.
 108. Hendrich J, Alvarez P, Joseph EK, Ferrari LF, Chen X, Levine JD. In vivo and in vitro comparison of female and male nociceptors. *J Pain*. 2012;13(12):1224-31.
 109. Loyd DR, Murphy AZ. Androgen and estrogen (alpha) receptor localization on periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medulla in the male and female rat. *J Chem Neuroanat*. 2008;36(3-4):216-26.
 110. Murphy AZ, Suckow SK, Johns M, Traub RJ. Sex differences in the activation of the spinoparabrachial circuit by visceral pain. *Physiol Behav*. 2009;97(2):205-12.
 111. Tonsfeldt KJ, Suchland KL, Beeson KA, Lowe JD, Li M-H, Ingram SL. Sex Differences in GABA A Signaling in the Periaqueductal Gray Induced by Persistent Inflammation. *J Neurosci*. 2016;36(5):1669-81.
 112. Melchior M, Poisbeau P, Gaumond I, Marchand S. Insights into the mechanisms and the emergence of sex-differences in pain. *Neuroscience*. 2016;338:63-80.
 113. Zheng F, Khanna S. Intra-hippocampal tonic inhibition influences formalin pain-induced pyramidal cell suppression, but not excitation in dorsal field CA1 of rat. *Brain Res Bull*. 2008;77(6):374-81.

-
114. Aloisi AM, Bonifazi M. Sex hormones, central nervous system and pain. *Horm Behav.* 2006;50(1):1-7.
115. Flores CA, Shughrue P, Petersen SL, Mokha SS. Sex-related differences in the distribution of opioid receptor-like 1 receptor mRNA and colocalization with estrogen receptor mRNA in neurons of the spinal trigeminal nucleus caudalis in the rat. *Neuroscience.* 2003;118(3):769-78.
116. Yamagata K, Sugimura M, Yoshida M, Sekine S, Kawano A, Oyamaguchi A, et al. Estrogens exacerbate nociceptive pain via up-regulation of trpv1 and ano1 in trigeminal primary neurons of female rats. *Endocrinology.* 2016;157(11):4309-17.
117. Wang Q, Cao J, Hu F, Lu R, Wang J, Ding H, et al. Effects of estradiol on voltage-gated sodium channels in mouse dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 2013;1512:1-8.
118. Lee KS, Zhang Y, Asgar J, Auh QS, Chung MK, Ro JY. Androgen receptor transcriptionally regulates μ -opioid receptor expression in rat trigeminal ganglia. *Neuroscience.* 2016;331:52-61.
119. Lee KS, Asgar J, Zhang Y, Chung M-K, Ro JY. The role of androgen receptor in transcriptional modulation of cannabinoid receptor type 1 gene in rat trigeminal ganglia. *Neuroscience.* 2013;254:395-403.
120. Claiborne J, Nag S, Mokha SS. Activation of opioid receptor like-1 receptor in the spinal cord produces sex-specific antinociception in the rat: estrogen attenuates antinociception in the female, whereas testosterone is required for the expression of antinociception in the male. *J Neurosci.* 2006;26(50):13048-53.

-
121. Rosen S, Ham B, Mogil JS. Sex differences in neuroimmunity and pain. *J Neurosci Res.* 2017;95(1-2):500-8.
122. Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1007:232-7.
123. Lanlua P, Decorti F, Gangula PR, Chung K, Taglialatela G, Yallampalli C. Female steroid hormones modulate receptors for nerve growth factor in rat dorsal root ganglia. *Biol Reprod.* 2001;64(1):331-8.
124. Rudick CN, Woolley CS. Estradiol induces a phasic Fos response in the hippocampal CA1 and CA3 regions of adult female rats. *Hippocampus.* 2000;10(3):274-83.
125. Toran-Allerand CD, Singh M, Sétáló G. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20(2):97-121.
126. Study E, Mohamed MK, Abdel-Rahman AA. Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *Eur J Endocrinol.* 2000;142(3):307-14.
127. Yu WH, McGinnis MY. Androgen receptors in cranial nerve motor nuclei of male and female rats. *J Neurobiol.* 2001;46(1):1-10.
128. Borzan J, Fuchs PN. Organizational and activational effects of testosterone on carrageenan-induced inflammatory pain and morphine analgesia. *Neuroscience.* 2006;143(3):885-93.

-
129. Mogil JS, Sternberg WF, Kest B, Marek P, Liebeskind JC. Sex differences in the antagonism of swim stress-induced analgesia: effects of gonadectomy and estrogen replacement. *Pain*. 1993;53(1):17-25.
130. Sternberg WF, Mogil JS, Kest B, Page GG, Leong Y, Yam V, et al. Neonatal testosterone exposure influences neurochemistry of non-opioid swim stress-induced analgesia in adult mice. *Pain*. 1995;63(3):321-6.
131. Filardo EJ, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16(8):362-7.
132. Stoffel EC, Ulibarri CM, Craft RM. Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. *Pain*. 2003;103:285-302.
133. Stoffel EC, Ulibarri CM, Folk JE, Rice KC, Craft RM. Gonadal hormone modulation of mu, kappa, and delta opioid antinociception in male and female rats. *J Pain*. 2005;6(4):261-74.
134. Xu S, Cheng Y, Keast JR, Osborne PB. 17beta-estradiol activates estrogen receptor beta-signalling and inhibits transient receptor potential vanilloid receptor 1 activation by capsaicin in adult rat nociceptor neurons. *Endocrinology*. 2008;149(11):5540-8.
135. Müller E, Kerschbaum HH. Progesterone and its metabolites 5-dihydroprogesterone and 5-3-tetrahydroprogesterone decrease LPS-induced NO release in the murine microglial cell line, BV-2. *Neuroendocrinol Lett*. 2006;27(5):675-8.

-
136. Labombarda F, González S, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, et al. Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2011;231(1):135-46.
137. Frye CA, Walf AA, Rhodes ME, Harney JP. Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 1 5 α -reductase. *Brain Res*. 2004;1004(1-2):116-24.
138. Charlet A, Lasbennes F, Darbon P, Poisbeau P. Fast non-genomic effects of progesterone-derived neurosteroids on nociceptive thresholds and pain symptoms. *Pain*. 2008;139(3):603-9.
139. Coronel MF, Labombarda F, Roig P, Villar MJ, De Nicola AF, González SL. Progesterone Prevents Nerve Injury-Induced Allodynia and Spinal NMDA Receptor Upregulation in Rats. *Pain Med*. 2011;12(8):1249-61.
140. LaCroix-Fralish ML. Sex-specific pain modulation: The growth factor, neuregulin-1, as a pro-nociceptive cytokine. *Neurosci Lett*. 2008;437(3):184-7.
141. Ji Y, Tang B, Traub RJ. Modulatory effects of estrogen and progesterone on colorectal hyperalgesia in the rat. *Pain*. 2005;117(3):433-42.
142. Fanton LE, Macedo CG, Torres-Chávez KE, Fischer L, Tambeli CH. Activational action of testosterone on androgen receptors protects males preventing temporomandibular joint pain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2017;152:30-5.

-
143. Torres-Chávez KE, Sanfins JM, Clemente-Napimoga JT, Pelegrini-Da-Silva A, Parada CA, Fischer L, et al. Effect of gonadal steroid hormones on formalin-induced temporomandibular joint inflammation. *Eur J Pain*. 2012;16(2):204-16.
144. Aloisi AM. Gonadal Hormones and Sex Differences in Pain Reactivity. *Clin J Pain*. 2003;19(3).
145. Edinger KL, Frye CA. Testosterone's analgesic, anxiolytic, and cognitive-enhancing effects may be due in part to actions of its 5 α -reduced metabolites in the hippocampus. *Behav Neurosci*. 2004;118(6):1352-64.
146. Edinger KL, Frye CA. Testosterone's anti-anxiety and analgesic effects may be due in part to actions of its 5 α -reduced metabolites in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*. 2005;30(5):418-30.
147. Meyer L, Patte-Mensah C, Taleb O, Mensah-Nyagan AG. Neurosteroid 3 α -androstenediol efficiently counteracts paclitaxel-induced peripheral neuropathy and painful symptoms. *PLoS One*. 2013;8(11):e80915.
148. Linnman C, Beucke JC, Jensen KB, Gollub RL, Kong J. Sex similarities and differences in pain-related periaqueductal gray connectivity. *Pain*. 2012;153(2):444-54.
149. Bobeck EN, McNeal AL, Morgan MM. Drug dependent sex-differences in periaqueductal gray mediated antinociception in the rat. *Pain*. 2009;147(1-3):210-6.

-
150. Niesters M, Dahan A, Kest B, Zacny J, Stijnen T, Aarts L, et al. Do sex differences exist in opioid analgesia? A systematic review and meta-analysis of human experimental and clinical studies. *Pain*. 2010;151(1):61-8.
151. Kest B, Sarton E, Dahan A, Fisher DM. Gender differences in opioid-mediated analgesia animal and human studies. *Anesthesiology*. 2000;93(2):539-47.
152. Holtman JR, Wala EP. Characterization of morphine-induced hyperalgesia in male and female rats. *Pain*. 2005;114(1-2):62-70.
153. Barrett AC, Cook CD, Turner JM, Roach EL, Syvanthong C, Picker MJ. Sex and rat strain determine sensitivity to κ opioid-induced antinociception. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002;160(2):170-81.
154. Barrett AC, Smith ES, Picker MJ. Sex-related differences in mechanical nociception and antinociception produced by μ - and κ -opioid receptor agonists in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002;452(2):163-73.
155. Rasakham K, Liu-Chen LY. Sex differences in kappa opioid pharmacology. *Life Sci*. 2011; 88(1-2):2-16.
156. Cicero TJ, Nock B, O'Connor L, Meyer ER. Role of steroids in sex differences in morphine-induced analgesia: activational and organizational effects. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300(2):695-701.
157. Krzanowska EK, Ogawa S, Pfaff DW, Bodnar RJ. Reversal of sex differences in morphine analgesia elicited from the ventrolateral periaqueductal gray in rats by neonatal hormone manipulations. *Brain Res*. 2002;929(1):1-9.

-
158. Turner JM, Barrett AC, Grossell E, Picker MJ. Influence of gonadectomy on the antinociceptive effects of opioids in male and female rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002;163(2):183-93.
159. Bai X, Zhang X, Li Y, Lu L, Li B, He X. Sex differences in peripheral mu-opioid receptor mediated analgesia in rat orofacial persistent pain model. *PLoS One*. 2015;10(3):e0122924.
160. Sorge RE, LaCroix-Fralish ML, Tuttle AH, Sotocinal SG, Austin J-S, Ritchie J, et al. Spinal cord toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. *J Neurosci*. 2011;31(43):15450-4.
161. Niu KY, Zhang Y, Ro JY. Effects of gonadal hormones on the peripheral cannabinoid receptor 1 (CB1R) system under a myositis condition in rats. *Pain*. 2012;153(11):2283-91.
162. de Lera Ruiz M, Kraus RL, Ruiz MDL, Kraus RL. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem*. 2015;58(18):7093-118.
163. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev*. 2005;57(4):397-409.
164. Watanabe E, Fujikawa A, Matsunaga H, Yasoshima Y, Sako N, Yamamoto T, et al. Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. *J Neurosci*. 2000;20(20):7743-51.

-
165. Cestèle S, Catterall WA. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*. 82(9-10):883-92.
166. Dib-Hajj SD, Black JA, Waxman SG. Voltage-gated sodium channels: therapeutic targets for pain. *Pain Med*. 2009;10(7):1260-9.
167. Lampert A, Eberhardt M, Waxman SG. Altered sodium channel gating as molecular basis for pain: contribution of activation, inactivation, and resurgent currents. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;221:91-110.
168. Jarecki BW, Piekarz AD, Jackson JO, Cummins TR. Human voltage-gated sodium channel mutations that cause inherited neuronal and muscle channelopathies increase resurgent sodium currents. *J Clin Invest*. 2010;120(1):369-78.
169. Tan Z-Y, Piekarz AD, Priest BT, Knopp KL, Krajewski JL, McDermott JS, et al. Tetrodotoxin-resistant sodium channels in sensory neurons generate slow resurgent currents that are enhanced by inflammatory mediators. *J Neurosci*. 2014;34(21):7190-7.
170. Hu F, Wang Q, Wang P, Wang W, Qian W, Xiao H, et al. 17 β -Estradiol regulates the gene expression of voltage-gated sodium channels: role of estrogen receptor α and estrogen receptor β . *Endocrine*. 2012;41(2):274-80.
171. Dib-hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG. Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci*. 2010;33(1):325-47.

-
172. Whitaker WR, Faull RL, Waldvogel HJ, Plumpton CJ, Emson PC, Clare JJ. Comparative distribution of voltage-gated sodium channel proteins in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;88(1-2):37-53.
173. Hains BC, Saab CY, Klein JP, Craner MJ, Waxman SG. Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2004;24(20):4832-9.
174. Black JA, Cummins TR, Plumpton C, Chen YH, Hormuzdiar W, Clare JJ, et al. Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons. *J Neurophysiol*. 1999;82(5):2776-85.
175. Lindia JA, Köhler MG, Martin WJ, Abbadie C. Relationship between sodium channel NaV1.3 expression and neuropathic pain behavior in rats. *Pain*. 2005;117(1-2):145-53.
176. Nassar MA, Baker MD, Levato A, Ingram R, Mallucci G, McMahon SB, et al. Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Nav1.3 null mutant mice. *Mol Pain*. 2006;2:33.
177. Chen H-P, Zhou W, Kang L-M, Yan H, Zhang L, Xu B-H, et al. Intrathecal miR-96 inhibits Nav1.3 expression and alleviates neuropathic pain in rat following chronic constriction injury. *Neurochem Res*. 2014;39(1):76-83.
178. Lin C-R, Chen K-H, Yang C-H, Huang H-W, Sheen-Chen S-M. Intrathecal miR-183 delivery suppresses mechanical allodynia in mononeuropathic rats. *Eur J Neurosci*. 2014;39(10):1682-9.

-
179. Casals-Díaz L, Casas C, Navarro X. Changes of voltage-gated sodium channels in sensory nerve regeneration and neuropathic pain models. *Restor Neurol Neurosci.* 2015;33(3):321-34.
180. Yin R, Liu D, Chhoa M, Li C-M, Luo Y, Zhang M, et al. Voltage-gated sodium channel function and expression in injured and uninjured rat dorsal root ganglia neurons. *Int J Neurosci.* 2016;126(2):182-92.
181. Dib-Hajj SD, Yang Y, Black JA, Waxman SG. The Na V 1 . 7 sodium channel : from molecule to man. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(January):49-62.
182. Black JA, Liu S, Tanaka M, Cummins TR, Waxman SG. Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain.* 2004;108(3):237-47.
183. McGowan E, Hoyt SB, Li X, Lyons KA, Abbadie C. A peripherally acting Nav1.7 sodium channel blocker reverses hyperalgesia and allodynia on rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Anesth Analg.* 2009;109(3):951-8.
184. Stirling LC, Forlani G, Baker MD, Wood JN, Matthews EA, Dickenson AH, et al. Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous NaV1.8-Cre recombinase mice. *Pain.* 2005;113(1-2):27-36.
185. Minett MS, Nassar MA, Clark AK, Passmore G, Dickenson AH, Wang F, et al. Distinct Nav1.7-dependent pain sensations require different sets of sensory and sympathetic neurons. *Nat Commun.* 2012;3(1):791-9.

-
186. Shields SD, Cheng X, Uceyler N, Sommer C, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Sodium Channel Nav1.7 Is Essential for Lowering Heat Pain Threshold after Burn Injury. *J Neurosci*. 2012;32(32):10819-32.
187. Gould HJ 3rd, England JD, Liu ZP, Levinson SR. Rapid sodium channel augmentation in response to inflammation induced by complete Freund's adjuvant. *Brain Res*. 1998;802(1-2):69-74.
188. Strickland IT, Martindale JC, Woodhams PL, Reeve AJ, Chessell IP, McQueen DS. Changes in the expression of NaV1.7, NaV1.8 and NaV1.9 in a distinct population of dorsal root ganglia innervating the rat knee joint in a model of chronic inflammatory joint pain. *Eur J Pain*. 2008;12(5):564-72.
189. Bi RY, Ding Y, Gan YH. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Attenuate Hyperalgesia and Block Upregulation of Trigeminal Ganglionic Sodium Channel 1.7 after Induction of Temporomandibular Joint Inflammation in Rats. *Chin J Dent Res*. 2016;19(1):35-42.
190. Bi R-Y, Kou X-X, Meng Z, Wang X-D, Ding Y, Gan Y-H. Involvement of trigeminal ganglionic Nav 1.7 in hyperalgesia of inflamed temporomandibular joint is dependent on ERK1/2 phosphorylation of glial cells in rats. *Eur J Pain*. 2013;17(7):983-94.
191. Gould HJ, England JD, Soignier RD, Nolan P, Minor LD, Liu ZP, et al. Ibuprofen blocks changes in nav 1.7 and 1.8 sodium channels associated with complete freund's adjuvant-induced inflammation in rat. *J Pain*. 2004;5(5):270-80.

-
192. Toledo-Aral JJ, Brehm P, Halegoua S, Mandel G. A single pulse of nerve growth factor triggers long-term neuronal excitability through sodium channel gene induction. *Neuron*. 1995;14(3):607-11.
193. Hong S, Morrow TJ, Paulson PE, Isom LL, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Biol Chem*. 2004;279(28):29341-50.
194. Nassar MA, Levato A, Stirling LC, Wood JN. Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Na(v)1.7 and Na(v)1.8. *Mol Pain*. 2005;1:24.
195. Minett MS, Falk S, Santana-Varela S, Bogdanov YD, Nassar MA, Heegaard A-M, et al. Pain without Nociceptors? Nav1.7-Independent Pain Mechanisms. *Cell Rep*. 2014;6(2):301-12.
196. Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG. Contribution of Nav1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J Neurophysiol*. 2001;86(2):629-40.
197. Jin X, Gereau RW. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci*. 2006;26(1):246-55.
198. Huang J, Yang Y, Zhao P, Gerrits MM, Hoeijmakers JGJ, Bekelaar K, et al. Small-fiber neuropathy Nav1.8 mutation shifts activation to hyperpolarized potentials and increases excitability of dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*. 2013;33(35):14087-97.

-
199. Faber CG, Lauria G, Merkies ISJ, Cheng X, Han C, Ahn H-S, et al. Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(47):19444-9.
 200. Lai J, Gold MS, Kim C, Bian D, Ossipov MH, Hunter JC, et al. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. *Evaluation.* 2002;95:143-52.
 201. Decosterd I, Ji R, Abdi S, Tate S, Woolf CJ. The pattern of expression of the voltage-gated sodium channels Na(v)1.8 and Na(v)1.9 does not change in uninjured primary sensory neurons in experimental neuropathic pain models. *Pain.* 2002;96(3).
 202. Cummins TR, Waxman SG. Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. *J Neurosci.* 1997;17(10):3503-14.
 203. Gold MS, Weinreich D, Kim C-S, Wang R, Treanor J, Porreca F, et al. Redistribution of Na(V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J Neurosci.* 2003;23(1):158-66.
 204. Zhang X-F, Zhu CZ, Thimmapaya R, Choi WS, Honore P, Scott VE, et al. Differential action potentials and firing patterns in injured and uninjured small dorsal root ganglion neurons after nerve injury. *Brain Res.* 2004;1009(1-2):147-58.

-
205. Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA, Akopian AN, Wood JN, Waxman SG. A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *J Neurosci*. 1999;19(24):RC43.
206. Herzog RI, Cummins TR, Waxman SG. Persistent TTX-resistant Na⁺ current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons. *J Neurophysiol*. 2001;86(3):1351-64.
207. Craner MJ, Klein JP, Renganathan M, Black JA, Waxman SG. Changes of sodium channel expression in experimental painful diabetic neuropathy. *Ann Neurol*. 2002;52(6):786-92.
208. Sleeper AA, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Hormuzdiar W, Tyrrell L, Waxman SG, et al. Changes in expression of two tetrodotoxin-resistant sodium channels and their currents in dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury but not rhizotomy. *J Neurosci*. 2000;20(19):7279-89.
209. Amaya F, Wang H, Costigan M, Allchorne AJ, Hatcher JP, Egerton J, et al. The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci*. 2006;26(50):12852-60.
210. Bi R-YY, Ding Y, Gan Y-HH. A new hypothesis of sex-differences in temporomandibular disorders: Estrogen enhances hyperalgesia of inflamed TMJ through modulating voltage-gated sodium channel 1.7 in trigeminal ganglion? *Med Hypotheses*. 2015;84(2):100-3.
211. Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IM., Wieser F, Huber JC. Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15(2):73-8.

-
212. Driscoll MD, Sathya G, Muyan M, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem*. 1998;273(45):29321-30.
213. Kow L-M, Devidze N, Pataky S, Shibuya I, Pfaff DW. Acute estradiol application increases inward and decreases outward whole-cell currents of neurons in rat hypothalamic ventromedial nucleus. *Brain Res*. 2006;1116(1):1-11.
214. Fraser SP, Ozerlat-Gunduz I, Onkal R, Diss JKJ, Latchman DS, Djamgoz MBA. Estrogen and non-genomic upregulation of voltage-gated Na(+) channel activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells: role in adhesion. *J Cell Physiol*. 2010;224(2):527-39.
215. Wang Q, Cao J, Zhu Q, Luan C, Chen X, Yi X, et al. Inhibition of voltage-gated sodium channels by bisphenol A in mouse dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*. 2011;1378:1-8.
216. Gould HJ, Gould TN, England JD, Paul D, Liu ZP, Levinson SR. A possible role for nerve growth factor in the augmentation of sodium channels in models of chronic pain. *Brain Res*. 2000;854(1-2):19-29.
217. Woolf CJ, Safieh-Garabedian B, Ma QP, Crilly P, Winter J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience*. 1994;62(2):327-31.
218. Spofford CM, Brennan TJ. Gene expression in skin, muscle, and dorsal root ganglion after plantar incision in the rat. *Anesthesiology*. 2012;117(1):161-72.

-
219. Wu C, Erickson MA, Xu J, Wild KD, Brennan TJ. Expression profile of nerve growth factor after muscle incision in the rat. *Anesthesiology*. 2009;110(1):140-9.
220. Greenspan JD, Craft RM, LeResche L, Arendt-Nielsen L, Berkley KJ, Fillingim RB, et al. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: A consensus report. *Pain*. 2007;132(Suppl. 1):26-45.
221. Joshi SK, Mikusa JP, Hernandez G, Baker S, Shieh CC, Neelands T, et al. Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. *Pain*. 2006;123(1-2):75-82.
222. Sadamasu A, Sakuma Y, Suzuki M, Orita S, Yamauchi K, Inoue G, et al. Upregulation of Nav1.7 in dorsal root ganglia after intervertebral disc injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014;39(7):E421-6.
223. Bi R-YY, Meng Z, Zhang P, Wang X-DD, Ding Y, Gan Y-HH. Estradiol upregulates voltage-gated sodium channel 1.7 in trigeminal ganglion contributing to hyperalgesia of inflamed TMJ. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178589.
224. Li L, Fan X, Warner M, Xu XJ, Gustafsson JÅ, Wiesenfeld-Hallin Z. Ablation of estrogen receptor α or β eliminates sex differences in mechanical pain threshold in normal and inflamed mice. *Pain*. 2009;143(1-2):37-40.