CLÁUDIA CARNEIRO DE ARAÚJO PALMEIRA

**Influência da idade, sexo e dos hormônios
gonadais na percepção dolorosa em modelo de
dor neuropática em ratos**

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

Programa de Anestesiologia

Orientador: Prof. Dr. Irimar de Paula Posso

**SÃO PAULO
2014**

“Patience is not sitting and waiting, it is foreseeing. It is looking at the thorn and seeing the rose, looking at the night and seeing the day. Lovers are patient and know that the moon needs time to become full.”

Rumi, 13th-century Persian Poet

“Researchers are patient too”

Ao Tarik e Omar que despertaram os meus melhores genes.

Ao Hazem pelos sonhos tornados possíveis.

Para vocês com todo o meu amor.

À minha irmã Cléa Palmeira Rêgo.

Aos meus pais Maria do Socorro e Caetano Palmeira.

Aos meus sogros Salwa El Ghalayini e Adel Ashmawi (*in memoriam*).

Ao Professor Helm Nasr.

À amiga Eliana Rita da Silva Moscatelli.

À amiga Sandra Hu Yen.

Por tantas alegrias compartilhadas, com um incomensurável afeto.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Irimar de Paula Posso pela orientação, apoio e a grande amizade ao longo dos anos, e por toda ajuda.

Ao Prof. Dr. Hazem Adel Ashmawi, por ter me instigado ao desafio de estudar idade, sexo e dor, pelo brilhantismo e generosidade. E também por todo o apoio e inestimável ajuda, sem a qual esta tese não seria possível.

Ao Dr. Timothy J. Brennan, *The University of Iowa Hospitals and Clinics*, por ter generosamente aberto as portas do seu laboratório para mim, tornando possível a experiência do convívio com um grande pesquisador.

À Dra. Diva Reale, por de modo tão generoso e competente me ajudar a perceber que a vida é cheia de possibilidades.

Ao amigo Gilberto Nascimento, pela inestimável ajuda no LIM-08 durante os experimentos, e por ter transformado o tempo de pesquisa numa agradável experiência.

À Dra. Denise Aya Otsuki, por toda a disponibilidade e ajuda durante o projeto e pelos momentos agradáveis ao fazer pesquisa.

À Profa. Dra. Edna Frasson de S. Monteiro, por ter permitido que eu utilizasse o microscópio do Laboratório de Fisiopatologia Cirúrgica, LIM-62 e aos técnicos do laboratório Marcos e Mário por toda a ajuda oferecida.

Ao Dr. Gabriel Guimarães, por toda a ajuda estatística e pela paciência.

À Carolina Bullara de Andrade, pela colaboração durante sua iniciação científica e pelos momentos de alegria compartilhados.

A todos os meus amigos e colegas que, de certo modo, mostraram-se

disponíveis a me ouvir e apoiar durante a execução deste projeto.

À Cláudia Pereira, por toda a ajuda prestimosa na pós-graduação do programa em Anestesiologia.

À Norma Cleide Pereira Moura, por cuidar da minha família e da nossa casa com tanto afeto e de forma tão generosa, tornando possível minha dedicação ao trabalho.

Aos meus filhos, Tarik e Omar, por serem tão maduros e generosos ao compreenderem os momentos de dedicação ao estudo e sempre, cada um do seu modo, nos apoiar e estimularem a sermos cada vez melhores.

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 tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1	Sexo, Gênero e Dor.....	7
3.2	Sistema Nervoso Central, Hormônios Gonadais e Dor	9
3.3	Estudos em Humanos	14
3.4	Estudos em Animais.....	16
3.5	Envelhecimento e Percepção Dolorosa.....	18
3.6	Estudos em Humanos	20
3.7	Estudos em Animais.....	21
3.8	Dor Neuropática	23
4	MÉTODOS	25
4.1	Animais.....	26
4.2	Grupos Experimentais	26
4.3	Procedimentos Experimentais	27
4.3.1	Técnica anestésica.....	27
4.3.2	Ooforectomia bilateral	28
4.3.3	Reposição de 17 β -estradiol.....	28
4.3.4	Orquiectomia bilateral.....	29
4.3.5	Ligadura de raiz de L5.....	29
4.4	Estudo Comportamental.....	30
4.4.1	Limiar de retirada da pata após estímulo mecânico	30
4.4.2	Tempos de observação nos grupos	31
4.5	Tamanho da Amostra	31
4.6	Análise Estatística	31
4.7	Sacrifício dos Animais	32
5	RESULTADOS.....	33
5.1	Comparação entre Ratos Jovens e Idosos Não-Orquiectomizados	35
5.2	Comparação entre Ratos Jovens e Idosos Orquiectomizados	36
5.3	Comparação entre Ratos Idosos Com e Sem Orquiectomia	37
5.4	Comparação entre Ratos Jovens Com e Sem Orquiectomia	38
5.5	Comparação entre Ratas Jovens Ooforectomizadas Com e Sem Reposição de 17 β -estradiol.....	39
5.6	Comparação entre Ratas Idosas e Ratos Idosos Orquiectomizados.....	40

5.7	Comparação entre Ratas Jovens Ooforectomizadas com Reposição de 17 β -estradiol e Ratos Jovens Não-Orquiectomizados.....	41
5.8	Comparação entre Ratas Jovens Ooforectomizadas Sem Reposição de 17 β -estradiol e Ratos Jovens Orquiectomizados	42
5.9	Comparação entre Ratas Idosas e Ratas Jovens Ooforectomizadas Sem Reposição de 17 β -estradiol	43
6	DISCUSSÃO	44
6.1	Modelo Experimental	45
6.2	Idade, Sexo e Hormônios Gonadais	46
6.3	Considerações Finais	53
7	CONCLUSÕES	55
8	ANEXOS	57
9	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICES	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	- Serotonina
ACh	- Acetilcolina
CIDN	- Controle inibitório difuso nociceptivo
DA	- Dopamina
ERK	- Proteína reguladora de sinal no corno dorsal
FIO ₂	- Fração inspirada de oxigênio
GABA	- Ácido aminogamabutírico
GLU	- Glutamato
IASP	- <i>International Association for the Study of Pain</i>
L4	- Quarta raiz lombar
L5	- Quinta raiz lombar
L6	- Sexta raiz lombar
NGF	- Fator de crescimento neuronal
NMDA	- N-metil-D-aspartato
O ₂	- Oxigênio
REs	- Receptores de estradiol
RE α	- Receptor de estradiol alfa
RE β	- Receptor de estradiol beta
SC	- Via subcutânea
SNC	- Sistema nervoso central
USP	- Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Limiar de retirada da pata nos ratos jovens e idosos não-orquiectomizados, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão).....	35
Tabela 2 -	Limiar de retirada da pata em ratos jovens e idosos orquiectomizados, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)	36
Tabela 3 -	Limiar de retirada da pata nos ratos idosos com e sem orquiectomia, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)	37
Tabela 4 -	Limiar de retirada da pata nos ratos jovens com e sem orquiectomia, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)	38
Tabela 5 -	Limiar de retirada da pata nas ratas jovens ooforectomizadas com e sem reposição de 17 β -estradiol, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão).....	39
Tabela 7 -	Limiar de retirada da pata em ratas jovens ooforectomizadas com reposição de 17 β -estradiol e ratos jovens não-orquiectomizados, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão).....	41
Tabela 8 -	Limiar de retirada da pata em ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17 β -estradiol e ratos jovens orquiectomizados, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão).....	42
Tabela 9 -	Limiar de retirada da pata em ratas idosas e ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17 β -estradiol, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão).....	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Limiar de retirada da pata em ratos jovens e idosos não- orquiectomizados submetidos à ligadura de raiz de L5	35
Gráfico 2 -	Limiar de retirada da pata em ratos jovens e idosos orquiectomizados submetidos à ligadura de raiz de L5	36
Gráfico 3 -	Limiar de retirada da pata em ratos idosos com e sem orquiectomia submetidos à ligadura de raiz de L5	37
Gráfico 4 -	Limiar de retirada da pata em ratos jovens com e sem orquiectomia submetidos à ligadura de raiz de L5	38
Gráfico 5 -	Limiar de retirada da pata em ratas jovens ooforectomizadas com e sem reposição de 17 β -estradiol, submetidas à ligadura de raiz de L5	39
Gráfico 6 -	Limiar de retirada da pata em ratas idosas e ratos idosos orquiectomizados, submetidos à ligadura de raiz de L5	40
Gráfico 7 -	Limiar de retirada da pata ratas jovens ooforectomizadas com reposição de 17 β -estradiol e ratos jovens não-orquiectomizados, submetidos à ligadura de raiz de L5	41
Gráfico 8 -	Limiar de retirada da pata em ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17 β -estradiol e ratos jovens orquiectomizados, submetidos à ligadura de raiz de L5	42
Gráfico 9 -	Limiar de retirada da pata em ratas idosas e ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17 β -estradiol, submetidos à ligadura de raiz de L5	43

RESUMO

Palmeira CCA. *Influência da idade, sexo e dos hormônios gonadais na percepção dolorosa em modelo de dor neuropática em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

Os fatores idade e sexo modificam a experiência dolorosa em animais e seres humanos. Os efeitos dos hormônios gonadais têm sido estudados em diversos modelos experimentais de dor, no entanto, o efeito do envelhecimento na percepção à dor carece de mais investigação. O efeito do envelhecimento na dor neuropática ainda não está bem estabelecido. Neste estudo se procurou avaliar possíveis variações na percepção da dor da hiperalgesia mecânica, em função da idade, presença e ausência de hormônios gonadais e sexo em ratos Wistar machos e fêmeas, jovens e idosos no modelo de dor neuropática, ligadura da quinta raiz lombar. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: ratos jovens orquiectomizados e não-orquiectomizados, ratos idosos orquiectomizados e não-orquiectomizados, ratas jovens ooforectomizadas com ou sem reposição de 17β -estradiol e ratas idosas. Foi testado o limiar de retirada da pata após estímulo mecânico antes da ligadura e no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a ligadura. Os resultados mostraram que todos os animais apresentaram comportamento hiperalgésico após ligadura da quinta raiz lombar durante os 28 dias de observação. A hiperalgesia ocorreu independentemente do sexo do animal, da presença ou ausência de hormônios gonadais ou idade. Não houve diferença entre ratos jovens e idosos não-orquiectomizados ($p = 0,420$), entre ratos jovens e idosos orquiectomizados ($p = 0,560$). Entre os ratos idosos com e sem orquiectomia houve diferença no 14º ($p = 0,038$) e 28º ($p = 0,002$) dias. Ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17β -estradiol apresentaram menor hiperalgesia que ratas ooforectomizadas com reposição durante todo o período ($p = 0,001$). Não houve diferença entre ratos idosos orquiectomizados e ratas

idosas ($p = 0,09$). Ratos jovens não-orquiectomizados apresentaram menor hiperalgesia mecânica que ratas jovens ooforectomizadas com reposição de 17β -estradiol ($p = 0,001$), o mesmo não ocorreu entre machos e fêmeas jovens gonadectomizados sem reposição hormonal ($p = 0,511$). Ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17β -estradiol e ratas idosas mostraram diferença apenas no 7º dia ($p = 0,002$). Os resultados permitiram concluir que a reposição de 17β -estradiol aumentou a hiperalgesia mecânica aos estímulos mecânicos após ligadura da quinta raiz lombar em ratas jovens ooforectomizadas, a hiperalgesia mecânica não diferiu entre os sexos em ratos jovens machos e fêmeas, a presença da gônada masculina diminuiu a hiperalgesia mecânica em ratos idosos e que houve diminuição da hiperalgesia mecânica em ratas idosas.

Descritores: Dor. Envelhecimento. Hormônios esteroides gonadais. Estradiol. Testosterona. Ratos Wistar. Ovariectomia. Orquiectomia. Raízes nervosas espinhais. Medição da dor. Comportamento animal. Aumento de peso.

SUMMARY

Palmeira CCA. *Influence of age, sex and gonadal hormones on pain perception in neuropathic pain model in rats* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

Age and sex modify the pain experience in animals and humans. The effects of gonadal hormones have been studied in various experimental pain models, however, the effect of aging on pain perception needs further investigation. The effect of aging on neuropathic pain is not well established. In this study, we sought to determine how aging and gonadal hormones affect mechanical hyperalgesia using spinal nerve ligation as a neuropathic pain model in aged and young male and female Wistar rats. Animals were divided into seven groups: aged female, ovariectomized young females with 17 β -estradiol replacement, ovariectomized young females without 17 β -estradiol replacement, orchiectomized and non-orchiectomized aged and young males. Rats were tested for mechanical hyperalgesia in the plantar surface of the left hindpaw before nerve ligation and on days 7, 14, 21 and 28 after nerve ligation. All animals of all groups showed mechanical hyperalgesic behavior after spinal nerve ligation during entire period of 28 days. Hyperalgesia was independent of the sex of the animal, the presence or absence of gonadal hormones or age. There was no difference between non-orchiectomized aged and young males ($p = 0.420$), and between orchiectomized aged and young males ($p = 0.560$). There was difference between aged male rats with and without orchiectomy in days 14 ($p = 0.038$) and 28 ($p = 0.002$). Young ovariectomized female rats without 17 β -estradiol replacement had less hyperalgesia than young ovariectomized female rats with replacement ($p = 0.001$). There was no difference between aged orchiectomized male rats and old female rats ($p = 0.09$). Young non-orchiectomized male rats showed less mechanical hyperalgesia than young

ovariectomized female rats with 17β -estradiol replacement ($p = 0.001$), that did not occur between young orchiectomized males rats and young ovariectomized females rats without 17β -estradiol replacement ($p = 0.51$). Young ovariectomized female rats without 17β -estradiol replacement and old female rats showed differences only on day 7 ($p = 0.002$). These data suggest that estradiol presented a pronociceptive effect in young female rats in mechanical hyperalgesia in the neuropathic pain model, spinal nerve ligation, withdrawal threshold did not differ between sex, the presence of male gonadal hormones reduces mechanical hyperalgesia in old male rats and there is reduced mechanical hyperalgesia in aged female rats.

Keywords: Pain. Aging. Gonadal hormones. Estradiol. Testosterone. Wistar rats. Ovariectomy. Orchiectomy. Spinal nerve ligation. Pain assessment. Animal behavior. Gain weight.

1 INTRODUÇÃO

A dor encontra-se inserida na evolução histórica da humanidade e desde os primórdios foi considerada, juntamente com as doenças, como castigo divino, uma provação existencial ou um mal necessário. Para alcançar o paraíso, deveria ser suportada, pois fazia parte da evolução natural do homem. Diante desta percepção desfocada em relação à dor, o avanço do seu estudo se deu a partir da abolição da visão religiosa, o que possibilitou o entendimento de sua existência física, seus mecanismos e controle.

Ao longo do tempo, muitos avanços foram realizados na compreensão dos mecanismos da dor, das dimensões da experiência dolorosa e dos tratamentos mais adequados. No século passado, até a década de sessenta, a dor era definida apenas como uma resposta inevitável à lesão tecidual, sendo pouco valorizados os aspectos afetivos, cognitivos, diferenças genéticas, idade, gênero, ansiedades e expectativas.

A *International Association for the Study of Pain* (IASP), ao procurar levar em consideração os aspectos citados anteriormente, propôs a definição de dor uma sensação e experiência emocional desagradável associada à lesão tecidual, real ou potencial, ou descrita em termo desta lesão (Turk e Rudy, 1987). A dor é sempre subjetiva, onde cada indivíduo aprende a aplicação do termo por meio de experiências relacionadas às lesões prévias (Turk, 1994).

A dor é uma experiência presente no mundo animal, principalmente como um mecanismo de defesa, alerta contra agressões que vêm do meio ambiente que colocam em risco a integridade do organismo, sua sobrevivência e a possibilidade de reprodução. Nos seres humanos, a dor sofre grande influência sociocultural e emocional, tornando mais difícil o estudo de seus mecanismos e da influência da idade e sexo.

Os fatores sexo e idade modificam a experiência dolorosa em animais e seres humanos. Várias doenças e síndromes que cursam com dor têm prevalências e se apresentam de formas diversas em homens e mulheres assim como entre adultos e idosos. As influências da idade e sexo na percepção dolorosa têm sido estudadas, mas há várias controvérsias no assunto, assim como há tipos de dor onde essas variáveis ainda não foram avaliadas.

O melhor conhecimento das diferenças na percepção da dor inflamatória, neuropática, mista e pós-operatória entre os sexos, e em diferentes idades como no adulto e no idoso, possibilitará que os métodos de tratamento da dor levem em conta as particularidades decorrentes do sexo e do envelhecimento, o que poderá contribuir para que sejam instituídos tratamentos mais adequados.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste projeto em modelo de dor neuropática de ligadura de raiz da quinta raiz lombar (L5) em ratos machos e fêmeas, jovens e idosos, foram:

- a) Avaliar possíveis variações na percepção da dor em função de sexo.
- b) Avaliar possíveis variações na percepção da dor em função da idade.
- c) Avaliar possíveis variações na percepção da dor em função dos hormônios gonadais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sexo, Gênero e Dor

Diferenças na percepção dolorosa têm sido documentadas na literatura, onde mulheres percebem e relatam mais dor que homens (Greenspan *et al.*, 2007), procuram auxílio médico com maior frequência que homens e fazem uso de analgésicos em maior quantidade (Isacson e Bingefors, 2002). Comparadas a homens de idade semelhante, as mulheres correm maior risco de transtornos relacionados ao estresse e dores crônicas como, por exemplo, na fibromialgia (Wolfe *et al.*, 1995; Keogh *et al.*, 2005). A dor é um sintoma frequente em condições como cólon irritável, endometriose e cistite intersticial, e com frequência está presente sem uma doença demonstrável (Triadafilopoulos *et al.*, 1998; Cervero e Laird, 2003).

As mulheres relatam dor mais intensa, episódios mais frequentes, mais difusos anatomicamente e mais duradouros do que os homens com doenças semelhantes, mesmo quando alterações específicas para o sexo, como dor urológica masculina e ginecológica, são excluídas da análise. Nos últimos vinte anos várias evidências surgiram a respeito das diferenças na resposta à dor entre os sexos, incluindo o limiar de dor e a tolerância aos tratamentos estabelecidos (Hurley e Adams, 2008; Palmeira *et al.*, 2011).

A definição de dor da IASP não diferencia a experiência dolorosa sentida pela mulher da experimentada pelo homem, e essa questão permanece em aberto (Greenspan *et al.*, 2007).

Mulheres têm maior prevalência de várias síndromes dolorosas que os homens (Howard, 2003). Síndromes como fibromialgia, síndrome de cólon irritável, algia pélvica crônica, cistite intersticial, dores musculoesqueléticas e quadros autoimunes, como a artrite reumatoide e o lúpus, são mais frequentes nelas (Wolfe *et al.*, 1995; Triadafilopoulos *et al.*, 1998; Cervero e Laird, 2003; Howard, 2003; Bingefors e Isacson, 2004; Keogh *et al.*, 2005; Hurley e Adams, 2008; Vincent, 2009). O sexo feminino também é fator preditor de dor pós-operatória, principalmente quando associado à ansiedade, dor prévia e idade jovem (Schnabel e Pogatzki-Zahn, 2010).

Os fatores sociais, culturais e biológicos associados às diferenças na percepção da dor entre os sexos mostram-se extremamente relevantes (Bernades *et al.*, 2008).

É importante definirmos os termos sexo e gênero, pois até a poucos anos a grande maioria dos trabalhos usava os termos de forma indiscriminada. O grupo de estudos especiais para sexo, gênero e dor da IASP elaborou um consenso de diretrizes para pesquisa nessa área, onde esta questão foi abordada (Greenspan *et al.*, 2007).

Sexo se refere às diferenças biológicas entre homens e mulheres de acordo com seus órgãos reprodutivos, enquanto gênero se refere a uma questão mais complexa relacionada a aspectos psicológicos, ambientais e socioculturais. Diferente do sexo, o gênero tem relação com as expectativas sobre o papel a ser desempenhado pelo homem ou pela mulher em determinada sociedade, apresentando variações entre exclusivamente feminino e exclusivamente masculino (Myers *et al.*, 2003; Bernades *et al.*, 2008).

Crenças e expectativas sobre a percepção da dor relacionadas ao gênero são aprendidas ao longo da vida, influenciadas pelo meio ambiente e têm demonstrado importância significativa nas diferenças entre homens e mulheres à dor. No que se refere ao comportamento em resposta a quadros dolorosos, o papel esperado para o gênero feminino é estereotipado com mais queixas e maior sofrimento, enquanto que para o gênero masculino é esperado comportamento mais estoico (Robinson *et al.*, 2001).

Muitos são os fatores considerados responsáveis pelas diferenças entre os sexos na percepção da dor e pela grande prevalência de dores crônicas em mulheres (Tousignant-Laflamme e Marchand, 2009). Mais recentemente, fatores biológicos como os hormônios gonadais têm sido levados em consideração para explicar as diferenças na percepção à dor entre homens e mulheres. Inúmeros dados na literatura, em animais (Fillingim *et al.*, 2004; Gaumond *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2008; Hagiwara *et al.*, 2010) e em humanos (Berkley, 1997; Fillingim e Gear, 2004) dão suporte a esta possibilidade.

3.2 Sistema Nervoso Central, Hormônios Gonadais e Dor

Os hormônios gonadais e o controle endógeno da dor estão inter-relacionados. Boa parte dos efeitos dos hormônios na dor e analgesia que, inicialmente eram atribuídos apenas à liberação gonadal de hormônios, podem ser devidos à síntese de estradiol (Amateu *et al.*, 2004; Kretz *et al.*, 2004) e progesterona (Sinchak *et al.*, 2003; Howard, 2009). Estruturas nervosas envolvidas na fisiologia da dor e analgesia como a substância

cinzenta periaquedutal, medula e gânglios das raízes dorsais, contêm receptores para estrogênios e androgênios e podem sintetizar esteroides (Bennett *et al.*, 2003; Evrard, 2006).

Os estrógenos atuam na neurotransmissão no sistema nervoso central (SNC), e a presença ou ausência de receptores de estradiol (REs) nesta região influencia a dinâmica da neurotransmissão. Dois clássicos REs, receptor de estradiol alfa (RE α) e receptor de estradiol beta (RE β) estão presentes em várias regiões do SNC em animais e humanos, e a expressão destes receptores varia entre as mesmas e diferentes espécies, sugerindo função biológica distinta para cada subtipo de receptor (Balthazar e Ball, 2000; Martin e Behbehani, 2006; Craft, 2007; Fan *et al.*, 2007).

Existem evidências que os esteroides sexuais têm efeitos significativos não apenas na organização do desenvolvimento do sistema nervoso, mas também na dinâmica deste sistema, atuando como neuromoduladores. Agem como esteroides neuroativos, termo usado para hormônios esteroides que modulam a excitabilidade neuronal por meio de interações específicas com receptores e canais iônicos (Paul e Purdy, 1992; Rupprecht *et al.*, 2001; Robichaud e Debonnel, 2005; Micevych e Christensen, 2012).

Os esteroides neuroativos, como os estrógenos e andrógenos podem ser sintetizados no SNC, especialmente no hipocampo, a partir do colesterol endógeno (Beyenburg *et al.*, 2001; Shibuya *et al.*, 2003). O termo neuroesteroide foi aplicado para definir todos os esteroides que são sintetizados no encéfalo (Mellon, 1994). Sob essa definição geral, o estradiol seria classificado como um neuroesteroide, pois pode ser sintetizado a partir

da testosterona circulante em diversas regiões encefálicas (Balthazar e Ball, 2000). Em contraste com os neuromensageiros de primeira geração como glutamato (GLU), ácido aminogamabutírico (GABA) e acetilcolina (ACh), que são armazenados nas vesículas pré-sinápticas e rapidamente liberados, os neuroesteroides são produzidos nas mitocôndrias e nos microsossomos dos neurônios e células da glia, sendo liberados lentamente por difusão passiva (Shibuya *et al.*, 2003).

Além de desempenharem papel relevante na ativação da cascata molecular envolvida no ajuste plástico das funções celulares, os estrógenos também interagem com as proteínas envolvidas na transdução do sinal mediado pelos fatores de crescimento neuronais ou neurotransmissores. Os estrógenos aumentam a concentração de fator de crescimento neuronal (NGF) no gânglio da raiz dorsal (Rudick e Woolley, 2000) e induzem a expressão de c-fos no hipocampo (Toran-Alleran *et al.*, 1999).

A atividade elétrica neuronal é influenciada pela ação genômica, pela regulação da transcrição dos canais iônicos e de receptores de neurotransmissores. As ações genômicas requerem um período de mais de trinta minutos para serem eficazes, tipicamente de horas a dias (Aloisi e Bonifazi, 2006). As ações não genômicas incluem a ligação dos esteroides aos receptores de membrana associados a canais iônicos e receptores de transmissores por meio de segundos mensageiros, como proteína-G, nucleotídeos cíclicos e quinases, ou pela interação alostérica direta dos esteroides com receptores de neurotransmissores (Rupprecht e Holsboer, 1999).

O estradiol potencializa a ligação do GLU ao receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Foy *et al.*, 1999) e aumenta os potenciais pós-sinápticos no hipocampo pela ampliação das correntes mediadas pelos receptores de cainato (McEwen, 1999).

A interação do estradiol no SNC com o sistema GABA é importante na modulação dos mecanismos de dor (Rudick e Woolley, 2000; McEwen *et al.*, 2012). As alterações nos níveis plasmáticos de estrógenos também influenciam outros neurotransmissores, incluindo a serotonina (5-HT), ACh, a dopamina (DA) e as β -endorfinas.

É provável que a redução no nível plasmático de estrógeno em algumas fases do ciclo hormonal diminua os níveis de 5-HT e como consequência diminua a ação inibitória deste, o que parece estar relacionado ao aumento da incidência de cefaleia durante determinado período, visto que o estrógeno atua sobre o sistema serotoninérgico central e opioide modulando tanto a atividade neuronal quanto à densidade dos receptores (Silberstein, 2001; Martin e Behbehani, 2006). Entretanto, estudos em animais e humanos evidenciam controvérsias na ação do estradiol, e ainda não se estabeleceu se sua ação maior é pró ou antinociceptiva (Sanoja e Cervero, 2010).

Em relação aos androgênios, alguns dados sugerem interações recíprocas entre os receptores de androgênio e estradiol no SNC, os andrógenos regulam a atividade da enzima aromatase, responsável pela conversão de testosterona em estradiol (Zuloaga *et al.*, 2008). Os esteroides agem em diferentes receptores de membrana, com ação excitatória ou

inibitória em específicas regiões cerebrais, com aumento da excitabilidade neuronal pela ação do estrógeno, por aumentar a eficácia do GLU e diminuir a ação GABA, e ação menos precisa da testosterona, que depende de um equilíbrio na sua conversão ao estradiol (Beyenburg *et al.*, 2001).

Os opioides endógenos agonistas do receptor μ atuam de forma significativa na modulação da dor, sua supressão e na resposta ao estresse (Zubieta *et al.*, 2002). Receptores para os hormônios gonadais e para os opioides localizam-se nos neurônios no SNC e no sistema nervoso periférico, e podem modular um ao outro. Ambos os receptores alfa e beta de estradiol são encontrados nos neurônios sensitivos e no SNC, e o estradiol e a testosterona modulam o sistema opioide endógeno (Wiesenfeld-Hallin, 2005).

Os hormônios gonadais esteroides podem influenciar a sensibilidade à dor e analgesia no desenvolvimento do organismo, efeito organizacional, atuam sobre a diferenciação sexual no SNC, no aspecto morfológico e neurobiológico no período tardio pré-natal e precoce pós-natal. As consequências desta ação definem machos e fêmeas em termos fisiológicos tornando o SNC mais sensível à ação ativacional dos hormônios gonadais durante a puberdade (Cicero *et al.*, 2002).

3.3 Estudos em Humanos

Trabalhos experimentais e clínicos indicam o envolvimento dos hormônios sexuais em diversas síndromes dolorosas, no entanto, os resultados são contraditórios em relação às ações dos hormônios gonadais na sensibilidade à dor.

Linhas convergentes de pesquisa demonstraram que o efeito dos hormônios sexuais nos mecanismos inibitórios da dor é um fator importante. As diferenças sexuais na percepção da dor possivelmente devem-se à hiperalgesia nas mulheres, mas também à hipoatividade do sistema inibitório no sexo feminino. O controle inibitório difuso nociceptivo (CIDN), um mecanismo endógeno de controle à dor (LeBars *et al.*, 1979), é particularmente importante, já que o déficit no CIDN está associado ao desenvolvimento de dor crônica (Edwards, 2005).

Estudo cujo objetivo era desenvolver um desenho experimental simples, que permitisse desencadear e medir múltiplos mecanismos nociceptivos envolvidos no desenvolvimento e na persistência da dor crônica, como somação temporal da dor e CIDN, avaliou a percepção à dor de 83 indivíduos saudáveis de ambos os sexos, e comprovou que os escores médios e o pico de dor, mas não a somação temporal, apresentavam redução significativa pelo CIDN (Tousignant-Laflamme *et al.*, 2008).

Estudos prévios sobre as diferenças sexuais no CIDN apresentaram resultados contraditórios: dois deles não demonstraram diferenças entre os sexos na efetividade desse mecanismo (France e Suchowiecki, 1999; Baad-Hansen *et al.*, 2005), enquanto que quatro estudos apontaram maior CIDN

nos homens (Staud *et al.*, 2003; Serrao *et al.*, 2004). Essa divergência pode ser explicada pelo uso de desenhos experimentais e métodos diferentes na quantificação da efetividade do CIDN. É necessário que sejam realizados mais estudos para melhor compreensão dos mecanismos endógenos de inibição da dor em homens e mulheres.

Em alguns estudos as respostas de homens e mulheres no tratamento multidisciplinar da dor crônica apresentaram resultados contraditórios. Protocolo no qual os indivíduos de ambos os sexos, que sofriam de dores crônicas foram submetidos a tratamento multidisciplinar, foi observado que tanto os homens quanto as mulheres apresentaram melhora após o tratamento, no entanto, decorridos três meses os índices de melhora eram maiores nos homens, enquanto que as mulheres retrocederam aos sintomas dolorosos presentes antes do início do tratamento (Keogh *et al.*, 2005).

Outro estudo que investigou a diferença entre os sexos em resposta a intensivo programa multimodal de tratamento à dor mostrou que as mulheres se beneficiaram mais que os homens, com melhora significativa da dor relacionada às atividades diárias (Pieh *et al.*, 2012). Bingefors e Isacson (2004) analisaram a epidemiologia, doenças concomitantes e o impacto na qualidade de vida relacionada à saúde e queixas de cefaleia e dor musculoesquelética do ponto de vista do gênero. A prevalência, as morbidades e os problemas psiquiátricos foram maiores nas mulheres. A qualidade de vida relacionada à saúde foi diferente entre os gêneros, e piores condições socioeconômicas estavam associadas ao aumento da dor em ambos os sexos.

Revisão sistemática da literatura que analisou 122 artigos sobre a diferença entre os sexos à percepção da dor para estímulo térmico, isquêmico, elétrico, químico e visceral, e dor a pressão em indivíduos saudáveis, evidenciou que homens e mulheres têm limiares comparáveis para dor isquêmica e ao frio, porém o limiar para dor à pressão é menor em mulheres que em homens. Há evidência que as mulheres toleram menos a dor ao calor e a pressão que os homens, mas não ocorre o mesmo quanto à tolerância à dor isquêmica, que é comparável em ambos os sexos. A maioria dos estudos que avaliou a intensidade da dor e a sensação desagradável em relação à mesma não evidenciou diferenças entre os sexos (Racine *et al.*, 2012).

3.4 Estudos em Animais

Os efeitos dos hormônios gonadais na percepção dolorosa têm sido avaliados em trabalhos experimentais com animais submetidos à gonadectomia e a reposição hormonal. Fatores como as variações no nível dos hormônios, as diferentes fases do ciclo sexual das fêmeas, os tipos de estímulos nociceptivos e as espécies de animais, têm sido responsabilizados pelos resultados contraditórios entre os experimentos sobre os efeitos dos hormônios gonadais na sensibilidade à dor (Greenspan *et al.*, 2007).

Diversos modelos experimentais de dor têm sido usados para avaliar os efeitos dos hormônios gonadais. A dor induzida pela formalina, modelo de dor nociceptiva e inflamatória tem sido amplamente utilizada (Dubuisson e Dennis, 1977). Estudo com esse modelo para avaliar as diferenças sexuais quanto à percepção à dor, evidenciou que fêmeas gonadectomizadas

apresentaram limiar maior à dor por formalina do que fêmeas não-gonadectomizadas (Ceccarelli *et al.*, 2006).

A reposição hormonal com 17β -estradiol em ratas ovariectomizadas e de testosterona em ratos orquiectomizados evidenciou que a reposição do estradiol atuou apenas na fase intermediária do teste da formalina, com discreta ação antinociceptiva, enquanto que a testosterona diminuiu o comportamento doloroso na fase aguda e na fase tônica do teste. Os resultados permitiram aos autores inferir que a testosterona desempenha papel protetor na percepção da dor (Gaumond *et al.*, 2005).

Estudo que utilizou o modelo de dor visceral pela distensão colorretal, para avaliar o envolvimento do receptor espinhal alfa de estradiol na nocicepção, evidenciou que o estradiol intratecal facilitou a nocicepção agindo no receptor espinhal e na modulação espinhal da atividade de proteína reguladora de sinal no corno dorsal (ERK), sugerindo ação pronociceptiva do estradiol para a dor visceral (Li *et al.*, 2011).

Outro estudo que utilizou o modelo de calculose ureteral para estudar dor visceral, avaliou a diferença entre os sexos e o efeito analgésico do ICI 182.780, que é um antagonista de receptor de estradiol, e da Flutamida, que é um antagonista de testosterona, sobre o número e a duração das crises de cólica ureteral, evidenciou aumento nos níveis plasmáticos hormonais apenas nos machos, e os antagonistas de estradiol e testosterona induziram analgesia apenas nas fêmeas, sugerindo ação moduladora na resposta comportamental induzida pela dor dos antagonistas hormonais apenas no sexo feminino (Affaitati *et al.*, 2011).

Ao avaliar a ação do estradiol sobre o receptor de NMDA espinhal em fêmeas no modelo de distensão colorretal, o estudo evidenciou que o estímulo doloroso foi fortemente atenuado pela administração intratecal de antagonista de NMDA nas fêmeas ovariectomizadas, sem reposição hormonal, comparadas às ovariectomizadas que receberam o hormônio. O resultado deste experimento sugere que o estradiol age na modulação do processamento noceptivo espinhal pelo aumento da expressão e da fosforilação da subunidade NR1 dos receptores de NMDA, contribuindo para a ampliação da atividade deste receptor (Tang *et al.*, 2008).

Em um modelo de neuropatia periférica induzida por etanol em ratos machos e fêmeas, essa substância induziu hiperalgesia mais rapidamente e com maior intensidade nas fêmeas comparadas com os machos. No entanto, após a ovariectomia cirúrgica o álcool não mais causou hiperalgesia, porém com a reposição de estradiol o quadro algico se manifestou de forma acentuada sugerindo significativa ação hormonal (Dina *et al.*, 2007).

3.5 Envelhecimento e Percepção Dolorosa

O envelhecimento da população humana é fenômeno recente na história da humanidade e vem ocorrendo em velocidade crescente nos últimos 50 anos, já não mais se limitando aos países ditos desenvolvidos, mas tornando-se um fenômeno mundial. O envelhecimento traz consigo morbidades que são específicas da idade e outras que se tornam mais frequentes com o envelhecer, como é o caso da dor, cuja prevalência é maior em pessoas mais velhas que em populações mais jovens (Ashmawi, 2011).

A dor é o sintoma mais comum para procura de tratamento médico. Cerca de 80% das queixas em consultório geral são relacionadas à dor (Turk, 1996). Estudos populacionais na Ásia, África, Europa e Américas evidenciaram que 21,5% dos entrevistados relataram terem sentido dor nos últimos seis meses (Gureje *et al.*, 1998). Na população idosa, a prevalência de dor é bastante elevada (Helme e Gibson, 1999). A incidência de dor crônica em idosos varia entre 25 a 80%. Nos idosos residentes em seus próprios domicílios, a prevalência variou entre 25 e 50% (Helme e Gibson, 1999; Blyth *et al.*, 2001). Nos idosos residentes em clínicas de longa permanência, a prevalência foi bastante significativa, sendo que 45 a 80% eram portadores de dor moderada ou forte subtratada (Ferrel, 1995; Bernabei *et al.*, 1998).

Prover analgesia em pacientes idosos é um grande desafio. A dor aguda ou crônica é um grande obstáculo para melhorar a qualidade de vida. Dores articulares, como osteoartrite e dores musculoesqueléticas são mais frequentes em idosos, assim como alguns tipos de dor neuropática, como a neuropatia diabética dolorosa, a neuralgia pós-herpética e a doença discal degenerativa (Chiba e Ashmawi, 2011). Idosos apresentam maior vulnerabilidade às lesões teciduais e têm maior chance de evoluir com cronificação da dor.

A dor no idoso é uma das mais importantes causas de morbidade, pois se relaciona fortemente com a incapacidade de manutenção de uma vida mais saudável e independente, devido às importantes limitações funcionais, mesmo para atividades simples diárias. Como muitas síndromes geriátricas, a dor e a limitação funcional possivelmente representam um

fenômeno que ocorre simultaneamente e que necessita ser diagnosticado e tratado de forma eficaz (Andrews *et al.*, 2013).

Na prática diária, a avaliação da dor no idoso é particularmente difícil devido a alterações motoras, cognitivas, sensoriais e de comunicação frequentes que, em algumas situações, podem dificultar a avaliação. A base biológica das alterações que ocorrem na nocicepção com o envelhecimento permanece desconhecida (Pickering *et al.*, 2002).

Pouco se conhece a respeito das diferenças na percepção dolorosa entre os sexos em pessoas idosas.

3.6 Estudos em Humanos

Estudo prospectivo, realizado entre 1998 e 2008, que incluiu 2.283 participantes acima de 60 anos, entre os quais 18% tinham dor forte, evidenciou que as mulheres tinham 65% de chances de terem dor, os homens 54% e os participantes com maiores queixas de dor desenvolveram maior incapacidade funcional, no entanto, não apresentaram maior risco de morte (Andrews *et al.*, 2013).

Outro estudo que avaliou a relação entre dor e limitação funcional na meia idade e na idade avançada, incluiu 18.531 participantes com queixas de dor, classificados de acordo com o grau de limitação para as atividades diárias, evidenciou que 24% dos participantes tinham dor forte e apresentavam importantes limitações funcionais. O grau de limitação funcional foi semelhante nos participantes de meia idade com dor quando comparados aos de idade avançada que não tinham dor (Covinsky *et al.*, 2009).

Estudo que avaliou a prevalência de dores crônicas em idosos que vivem na própria residência ou em instituições geriátricas no Canadá, mostrou que 38% dos idosos institucionalizados sentiam dores regularmente enquanto que apenas 27% dos que viviam em casa referiam dores. Em ambos os grupos a incidência de dores crônicas foi maior em mulheres que em homens. Os pesquisadores concluíram que a dor crônica é um dos maiores problemas de saúde para idosos, particularmente para os que vivem em instituições, sendo necessário ter mais estudos para melhor controle da dor crônica nos pacientes institucionalizados (Ramage-Morin, 2008).

Com a idade, o controle inibitório endógeno à dor parece apresentar um declínio funcional (Iwata *et al.*, 1999), provavelmente devido às mudanças relacionadas à idade no funcionamento do SNC, acompanhadas de alterações no sistema opioide endógeno, o que pode em parte explicar as frequentes queixas de dor no idoso.

3.7 Estudos em Animais

Existem poucos modelos experimentais de dor em animais idosos. É aceito que a percepção dolorosa muda com o envelhecimento, entretanto, essa mudança não é uniforme. Gagliese e Ferrel (2005) observaram que alguns estudos em animais que avaliaram os efeitos da idade sobre a sensibilidade cutânea à dor em diferentes modelos experimentais apresentaram resultados conflitantes, como aumento, diminuição ou ausência de alterações dessa sensibilidade.

A resposta hiperalgésica a estímulos mecânicos em modelo de dor neuropática evidenciou diferenças ao longo do tempo em ratos jovens e idosos. Inicialmente, três dias após a realização da lesão, não foi encontrada diferença, entretanto, a resposta hiperalgésica cessou nos animais jovens no vigésimo primeiro dia, mas se manteve até o trigésimo quinto dia nos animais idosos (Novak *et al.*, 1999).

Ao avaliar a influência da idade e a relação entre dor crônica e alterações cognitivas como locomoção, exploração do ambiente, comportamento de ansiedade e depressão, memória espacial, memória espacial recente e flexibilidade, em ratos com três, 10 e 22 meses em modelo de dor neuropática crônica, pela lesão dos nervos tibial e peroneal, ramos do nervo isquiático, os autores verificaram que os ratos idosos tiveram mais alterações cognitivas e comportamentais, mostrando-se mais vulneráveis que os jovens e os de meia idade (Leite-Almeida *et al.*, 2009).

O comportamento doloroso após a lesão neuropática em modelo de constrição de nervo isquiático foi menor em ratos muito idosos com idade entre 36 e 39 meses, do que em ratos adultos com idade entre quatro e seis meses, e em ratos idosos com 24 meses de idade, no entanto, para estímulos que causaram dor aguda os ratos muito idosos apresentaram maior sensibilidade comparados com os demais (Pickering *et al.*, 2006).

Outro estudo que comparou a resposta à dor neuropática e inflamatória em dois modelos de lesão nervosa periférica em ratos jovens com quatro e seis meses e ratos idosos com 24 e 26 meses, evidenciou diferença na hiperalgesia mecânica em função do modelo de dor neuropática utilizado (Crisp *et al.*, 2003).

A dor muscular não tem sido muito estudada. Estudo comparativo entre ratos jovens com dois meses e idosos com 30 meses evidenciou que a dor muscular após exercício foi mais prolongada em ratos idosos do que em animais jovens (Taguchi *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que os estudos citados foram realizados em ratos do sexo masculino, e não foram localizados estudos que relacionam os efeitos do envelhecimento na percepção dolorosa nas ratas idosas.

3.8 Dor Neuropática

A dor neuropática é definida como dor causada por lesão ou doença do sistema nervoso somatossensitivo (von Hehn *et al.*, 2012). Para satisfazer a definição de dor neuropática é necessária a ocorrência de lesão ou doença demonstrável que atenda aos critérios diagnósticos neurológicos (Jensen *et al.*, 2011).

A dor neuropática aflige milhões de pessoas em todo o mundo, e sua prevalência na população geral varia entre 1% e 2% (Bouhassira *et al.*, 2008). Existem problemas nos estudos epidemiológicos sobre dor neuropática em razão da modificação da definição que ocorreu em 2010, o que provavelmente contribuiu para dificultar a avaliação da prevalência geral da dor neuropática na população humana.

As dores neuropáticas podem ser decorrentes de lesões no SNC e/ou periférico. Após a lesão do nervo ocorrem mudanças adaptativas nos neurônios sensitivos e também nas vias nociceptivas e SNC, o que resulta em dor espontânea e hipersensibilidade. Como resultado a síndrome da dor

neuropática apresenta uma complexa combinação de sintomas, os quais variam de indivíduo para indivíduo. Essa variação depende de diferentes mecanismos fisiopatológicos, como resultado da convergência de fatores etiológicos, genotípicos e ambientais (von Hehn *et al.*, 2012).

Diversas doenças comuns, lesões e intervenções podem causar dor neuropática. As causas podem ser de origem tóxico-metabólicas, pós-traumáticas, compressivas, imunológicas, infecciosas e hereditárias (Woolf e Mannion, 1999).

O estudo experimental da dor neuropática é feito em modelos animais que simulam o quadro clínico pertinente a essa condição, possibilitando aos pesquisadores entender o mecanismo da dor e o desenvolvimento de terapias mais eficientes (Jaggi *et al.*, 2011). Existem diferentes modelos de dor neuropática como a constrição de nervo isquiático, a transecção parcial do nervo isquiático, a transecção completa do nervo isquiático, a neuropatia diabética, a neuropatia inflamatória do nervo isquiático, ligadura de raiz espinhal entre outros (Jaggi *et al.*, 2011). Neste estudo optou-se pelo modelo de ligadura de raiz espinhal de L5 descrito por Kim e Chung (1992).

4 MÉTODOS

4.1 Animais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), sob o número 130/10 (Anexo A), e obedeceu às recomendações para experimentos que envolvem dor em animais conscientes (Zimmermann, 1983).

Todos os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos e fêmeas, jovens e idosos, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP. Para fins deste estudo foram considerados como jovens, ratos com três semanas de idade para as fêmeas e dois meses de idade para os machos, e como idosos os ratos machos e fêmeas com 24 meses de idade.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram alocados aleatoriamente em grupos. O pesquisador que realizou as avaliações comportamentais não sabia a que grupo experimental pertencia o animal.

Foram estudados os seguintes grupos experimentais:

- Ratos jovens orquiectomizados.
- Ratos jovens não-orquiectomizados.
- Ratos idosos orquiectomizados.

- Ratos idosos não-orquiectomizados.
- Ratas jovens ooforectomizadas sem reposição 17β -estradiol.
- Ratas jovens ooforectomizadas com reposição 17β -estradiol.
- Ratas idosas.

4.3 Procedimentos Experimentais

4.3.1 Técnica anestésica

Para a indução da anestesia geral para realização dos procedimentos, os animais foram colocados em uma câmara de vidro transparente com medidas de 15 x 25 x 15 cm, dotada de cobertura transparente para possibilitar visualização do animal, e com orifício na parte anterior e posterior para permitir entrada e saída de oxigênio (O_2), gases anestésicos e gás carbônico (CO_2), respectivamente. O agente utilizado na indução anestésica foi o isoflurano, na concentração de 2 a 4% em fração inspirada de oxigênio (FiO_2) de 1; administrado por vaporizador calibrado e mantido pelo tempo necessário para que o animal apresentasse perda dos reflexos posturais. A seguir o animal era retirado da câmara e posicionado, com uma máscara facial para ratos, pela qual continuava a ser administrado o isoflurano como na câmara. A avaliação da profundidade da anestesia geral foi realizada pelo monitoramento dos movimentos das patas, coloração das mucosas, frequência respiratória e expansão torácica.

4.3.2 Ooforectomia bilateral

Ratas com três semanas de idade (pré-púberes) sob anestesia geral com isoflurano, foram colocadas em decúbito dorsal horizontal e, após antissepsia local com iodopovidine, submetidas à incisão de 1 cm na linha média abdominal. Os ovários foram, então, localizados e, realizada a ligadura dos ovidutos com fio de seda 4-0, incluindo os vasos sanguíneos em seu terço distal. Os ovidutos foram seccionados e os ovários removidos. A musculatura e a pele foram suturadas com fio mononylon 4-0 (adaptado de Dina *et al.*, 2007). Ao final da anestesia, o animal recebeu morfina 0,1 mg por via subcutânea (SC) para analgesia. Após cinco dias as suturas de pele foram retiradas sob anestesia geral.

4.3.3 Reposição de 17 β -estradiol

Sete dias após a ooforectomia foi iniciada a reposição de 17 β -estradiol, conjugado a pastilhas (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA). As pastilhas foram implantadas na região dorsal do animal, sob anestesia geral. Cada pastilha tinha o diâmetro de 3 mm. Foram utilizadas pastilhas de 0,36 mg, que liberavam 6 μ g/dia (25 μ g/kg). As pastilhas tinham liberação contínua de hormônio por 60 dias. A reposição nos grupos foi realizada por 14 dias antes do início dos experimentos comportamentais, e mantida ao longo de todo o período de observação, que foi de 28 dias.

4.3.4 Orquiectomia bilateral

Ratos com três meses de idade sob anestesia geral com isoflurano foram colocados em decúbito dorsal horizontal e, após antissepsia local com iodopovidine, submetidos à incisão de 1 cm na linha média da bolsa escrotal. O acesso a cada testículo foi feito através da túnica vaginal, que foi aberta, e após identificação do testículo, o mesmo foi retirado juntamente com o ducto deferente ipsilateral. O procedimento foi realizado nos dois testículos, as túnicas fechadas com fio mononylon 4-0, e realizada a sutura da pele com o mesmo fio. Ao final da anestesia, o animal recebeu 0,1 mg de morfina SC para analgesia. A sutura da pele foi retirada sob anestesia geral, cinco dias após a orquiectomia.

4.3.5 Ligadura de raiz de L5

Sob anestesia geral com isoflurano, o rato foi colocado em posição prona, feita tricotomia, antissepsia com iodopovidine, incisão da pele na região dorsal, divulsão da musculatura paraespinal dos processos espinhosos da quarta raiz lombar (L4) até o início da região sacral. Os processos transversos de L5 e da sexta raiz lombar (L6) foram cuidadosamente retirados até a visualização das raízes nervosas, ao nível da raiz sensitiva, posterior. Foi feita a ligadura da raiz de L5 do lado esquerdo com fio de seda 6-0, e em seguida realizada a secção do nervo 1 mm distal à ligadura. Foi feita hemostasia rigorosa na região e, posteriormente, realizada sutura da pele com fio mononylon 4-0. Antes da emergência da anestesia, o animal recebeu 0,1 mg de morfina SC para

analgesia pós-operatória (adaptado de Kim e Chung, 1992). A retirada dos pontos foi feita no quinto dia pós-operatório sob anestesia geral. Nos dias seguintes à cirurgia, os animais que apresentaram distúrbios de marcha, por lesão motora, foram excluídos do estudo. O limiar de retirada depois do estímulo mecânico foi testado na pata posterior esquerda.

4.4 Estudo Comportamental

4.4.1 Limiar de retirada da pata após estímulo mecânico

Os estudos comportamentais foram realizados entre às 9:00 e às 15:00 horas. Todos os animais, jovens e idosos foram colocados em gaiolas com livre acesso à água e alimentação, em número de dois animais por gaiola.

Os ratos foram colocados sobre tela plástica com aberturas de, aproximadamente 1 cm². Após período de trinta minutos para adaptação ao local das medições, foram realizadas medidas de limiar de retirada da pata após estímulo mecânico utilizando o analgesímetro digital Von Frey (Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil). O estímulo foi aplicado na região plantar da pata posterior esquerda. Os valores foram obtidos em gramas, a carga máxima foi limitada a 60 g para evitar lesões teciduais na pata. Foram obtidas cinco medidas, com intervalo de quatro minutos entre cada medida e calculadas as médias.

4.4.2 Tempos de observação nos grupos

Os animais foram testados antes da ligadura e no sétimo, 14º, 21º e 28º dia pós-ligadura. Esse período foi escolhido baseado nos critérios estabelecidos para o tempo de hiperalgesia mecânica, que pode durar até 70 dias, sendo mais intensa nas primeiras semanas, portanto a opção foi de sete dias, período agudo, até 28 dias, período de hiperalgesia mais evidente (Kim e Chung, 1992). A escolha deste período de avaliação de 28 dias também considerou a idade avançada dos ratos idosos, que apresentavam risco de morte, o que poderia aumentar as perdas caso o período de observação fosse mais prolongado.

4.5 Tamanho da Amostra

O tamanho da amostra foi calculado para permitir a identificação das diferenças entre os grupos, utilizando $\alpha = 0,05$ e o poder do teste estatístico = 0,80, foi de oito animais por grupo. O número total de animais foi estimado em 59 animais, porém com as perdas estimadas em 15%, em função da técnica, o número aumentou para 68 animais.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada comparando os grupos em função da reposição hormonal, idade e sexo. Após confirmação da distribuição normal dos dados, os mesmos foram comparados sendo utilizado o teste ANOVA com medidas repetidas para dois fatores: grupo e tempo. Em caso de distribuição não normal foram utilizados testes não paramétricos.

4.7 Sacrifício dos Animais

Ao final dos experimentos todos os animais foram sacrificados com excesso de CO₂ e, posteriormente, toracotomia e secção dos átrios cardíacos para sangramento, sendo levados ao setor de descarte de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

5 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados com média $\pm$ erro padrão em tabelas e gráficos, sempre comparando os resultados entre dois dos grupos de animais submetidos ao experimento.

Os dados evidenciaram que durante os 28 dias de observação todos os animais apresentaram comportamento hiperalgésico após a ligadura da raiz de L5.

A hiperalgesia ocorreu independentemente do sexo do animal, da presença ou ausência de hormônios gonadais ou da idade.

A hiperalgesia mecânica foi mais intensa nos primeiros dias de observação, com tendência a diminuição no 28º dia.

5.1 Comparação entre Ratos Jovens e Idosos Não-Orquiectomizados

Não houve diferença na hiperalgesia mecânica, quando se comparou os ratos jovens não-orquiectomizados com os ratos idosos não-orquiectomizados, sendo os resultados semelhantes do sétimo ao 28º dia após a ligadura (Tabela 1 e Gráfico 1).

Tabela 1 - Limiar de retirada da pata nos ratos jovens e idosos não-orquiectomizados, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)

Momento da Avaliação	Ratos jovens não-orquiectomizados	Ratos idosos não-orquiectomizados
Basal	55,7 $\pm$ 3,9	53 $\pm$ 3,9
7º dia	17,9 $\pm$ 7,8	18,5 $\pm$ 7,2
14º dia	23,8 $\pm$ 6,4	22,6 $\pm$ 8,9
21º dia	22,5 $\pm$ 6,2	28,8 $\pm$ 15,4
28º dia	26,7 $\pm$ 7,5	32,4 $\pm$ 8,3

Gráfico 1 - Limiar de retirada da pata em ratos jovens e idosos não-orquiectomizados submetidos à ligadura de raiz de L5

5.2 Comparação entre Ratos Jovens e Idosos Orquiectomizados

Não houve diferença na hiperalgesia mecânica, quando se comparou os ratos jovens orquiectomizados com os ratos idosos orquiectomizados, sendo os resultados semelhantes do 7º ao 28º dia após a ligadura (Tabela 2 e Gráfico 2).

Tabela 2 - Limiar de retirada da pata em ratos jovens e idosos orquiectomizados, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)

Momento da Avaliação	Ratos jovens orquiectomizados	Ratos idosos orquiectomizados
Basal	54,4 $\pm$ 2,8	51,5 $\pm$ 4,9
7º dia	14,3 $\pm$ 5,8	16,6 $\pm$ 7,9
14º dia	16,7 $\pm$ 7,6	14,2 $\pm$ 7,6
21º dia	17,7 $\pm$ 6,1	19,4 $\pm$ 10
28º dia	24,4 $\pm$ 14,2	19,4 $\pm$ 8,1

Gráfico 2 - Limiar de retirada da pata em ratos jovens e idosos orquiectomizados submetidos à ligadura de raiz de L5

5.3 Comparação entre Ratos Idosos Com e Sem Orquiectomia

Quando se comparou ratos idosos com e sem orquiectomia em relação à hiperalgesia mecânica após a ligadura, houve diferença no 14º ($14,2 \pm 7,6$ g vs $22,6 \pm 8,9$ g, $p = 0,038$) e 28º ($19,4 \pm 8,1$ g vs $32,4 \pm 8,3$ g, $p = 0,002$) dias após a ligadura, com tendência à significância no 21º dia ($19,4 \pm 10$ g vs $28,8 \pm 15,4$ g, $p = 0,09$)(Tabela 3 e Gráfico 3).

Tabela 3 - Limiar de retirada da pata nos ratos idosos com e sem orquiectomia, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)

Momento da Avaliação	Ratos idosos orquiectomizados	Ratos idosos não-orquiectomizados
Basal	51,5 $\pm$ 4,9	53 $\pm$ 3,9
7º dia	16,6 $\pm$ 7,9	18,5 $\pm$ 7,2
14º dia	14,2 $\pm$ 7,6	22,6 $\pm$ 8,9
21º dia	19,4 $\pm$ 10	28,8 $\pm$ 15,4
28º dia	19,4 $\pm$ 8,1	32,4 $\pm$ 8,3

Gráfico 3 - Limiar de retirada da pata em ratos idosos com e sem orquiectomia submetidos à ligadura de raiz de L5

5.4 Comparação entre Ratos Jovens Com e Sem Orquiectomia

Quando se comparou ratos jovens com e sem orquiectomia em relação à hiperalgesia mecânica após a ligadura, não se evidenciou diferença no limiar de retirada da pata após a ligadura de L5 durante todo o período, no entanto, houve discreta tendência à significância no 14º dia ($16,7 \pm 7,6$ g vs $23,8 \pm 6,4$ g, $p = 0,065$) (Tabela 4 e Gráfico 4).

Tabela 4 - Limiar de retirada da pata nos ratos jovens com e sem orquiectomia, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)

Momento da Avaliação	Ratos jovens orquiectomizados	Ratos jovens não-orquiectomizados
Basal	54,4 $\pm$ 2,8	55,7 $\pm$ 3,9
7º dia	14,3 $\pm$ 5,8	17,9 $\pm$ 7,8
14º dia	16,7 $\pm$ 7,6	23,8 $\pm$ 6,4
21º dia	17,7 $\pm$ 6,1	22,5 $\pm$ 6,2
28º dia	24,4 $\pm$ 14,2	26,7 $\pm$ 7,5

Gráfico 4 - Limiar de retirada da pata em ratos jovens com e sem orquiectomia submetidos à ligadura de raiz de L5

5.5 Comparação entre Ratas Jovens Ooforectomizadas Com e Sem Reposição de 17 β -estradiol

As ratas jovens que receberam a reposição de 17 β -estradiol apresentaram menor limiar de retirada da pata após a ligadura de L5 quando comparadas às que não receberam a reposição de 17 β -estradiol, no 7º dia ($9,7 \pm 2,9$ g vs $14,3 \pm 4,4$ g, $p = 0,026$), no 14º dia ($13,9 \pm 7,8$ g vs $21,8 \pm 4,6$ g, $p = 0,028$), no 21º dia ($13 \pm 4,1$ g vs $28,3 \pm 12,3$ g, $p = 0,005$) e no 28º dia ($17,4 \pm 4,3$ g vs $30,5 \pm 8,8$ g, $p = 0,002$) (Tabela 5 e Gráfico 5).

Tabela 5 - Limiar de retirada da pata nas ratas jovens ooforectomizadas com e sem reposição de 17 β -estradiol, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)

Momento da Avaliação	Ratas jovens ooforectomizadas com reposição de 17 β -estradiol	Ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17 β -estradiol
Basal	45,1 $\pm$ 3,1	49 $\pm$ 4,2
7º dia	9,7 $\pm$ 2,9	14,3 $\pm$ 4,4
14º dia	13,9 $\pm$ 7,8	21,8 $\pm$ 4,6
21º dia	13 $\pm$ 4,1	28,3 $\pm$ 12,3
28º dia	17,4 $\pm$ 4,3	30,5 $\pm$ 8,8

Gráfico 5 - Limiar de retirada da pata em ratas jovens ooforectomizadas com e sem reposição de 17 β -estradiol, submetidas à ligadura de raiz de L5

5.6 Comparação entre Ratas Idosas e Ratos Idosos Orquiectomizados

A comparação entre ratas idosas e ratos idosos orquiectomizados em relação à hiperalgesia mecânica após a ligadura, não demonstrou diferença no limiar de retirada da pata após a ligadura de L5 durante todo o período (Tabela 6 e Gráfico 6).

Tabela 6 - Limiar de retirada da pata nas ratas idosas e nos ratos idosos orquiectomizados, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)

Momento da Avaliação	Ratas idosas	Ratos idosos orquiectomizados
Basal	54,8 $\pm$ 4,3	51,5 $\pm$ 4,9
7º dia	24,2 $\pm$ 5,6	16,6 $\pm$ 7,9
14º dia	18,7 $\pm$ 6,4	14,2 $\pm$ 7,6
21º dia	24,3 $\pm$ 9,2	19,4 $\pm$ 10
28º dia	23,6 $\pm$ 6,7	19,4 $\pm$ 8,1

Gráfico 6 - Limiar de retirada da pata em ratas idosas e ratos idosos orquiectomizados, submetidos à ligadura de raiz de L5

5.7 Comparação entre Ratas Jovens Ooforectomizadas com Reposição de 17 β -estradiol e Ratos Jovens Não-Orquiectomizados

As ratas jovens ooforectomizadas com reposição de 17 β -estradiol apresentaram menor limiar de retirada da pata quando comparadas aos ratos jovens não-orquiectomizados no 7º (17,9 $\pm$ 7,8 g vs 9,7 $\pm$ 2,9 g, p = 0,023), no 14º (23,8 $\pm$ 6,4 g vs 13,9 $\pm$ 7,8 g, p = 0,008), no 21º (22,5 $\pm$ 6,2 g vs 13 $\pm$ 4,1 g, p = 0,008) e no 28º dias (26,7 $\pm$ 7,5 g vs 17,4 $\pm$ 4,3 g, p = 0,006) (Tabela 7 e Gráfico7).

Tabela 7 - Limiar de retirada da pata em ratas jovens ooforectomizadas com reposição de 17 β -estradiol e ratos jovens não-orquiectomizados, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)

Momento da Avaliação	Ratas jovens ooforectomizadas com reposição hormonal	Ratos jovens não-orquiectomizados
Basal	45,1 $\pm$ 3,1	55,7 $\pm$ 3,9
7º dia	9,7 $\pm$ 2,9	17,9 $\pm$ 7,8
14º dia	13,9 $\pm$ 7,8	23,8 $\pm$ 6,4
21º dia	13 $\pm$ 4,1	22,5 $\pm$ 6,2
28º dia	17,4 $\pm$ 4,3	26,7 $\pm$ 7,5

Gráfico 7 - Limiar de retirada da pata ratas jovens ooforectomizadas com reposição de 17 β -estradiol e ratos jovens não-orquiectomizados, submetidos à ligadura de raiz de L5

5.8 Comparação entre Ratas Jovens Ooforectomizadas Sem Reposição de 17 β -estradiol e Ratos Jovens Orquiectomizados

A comparação entre ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17 β -estradiol e ratos jovens orquiectomizados não evidenciou diferença em relação à hiperalgesia mecânica após a ligadura de raiz de L5 (Tabela 8 e Gráfico 8).

Tabela 8 - Limiar de retirada da pata em ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17 β -estradiol e ratos jovens orquiectomizados, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)

Momento da Avaliação	Ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17 β -estradiol	Ratos jovens orquiectomizados
Basal	49 $\pm$ 4,2	54,4 $\pm$ 2,8
7º dia	14,3 $\pm$ 4,4	14,3 $\pm$ 5,8
14º dia	21,8 $\pm$ 4,6	16,7 $\pm$ 7,6
21º dia	28,3 $\pm$ 12,3	17,7 $\pm$ 6,1
28º dia	30,5 $\pm$ 8,8	24,4 $\pm$ 14,2

Gráfico 8 - Limiar de retirada da pata em ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17 β -estradiol e ratos jovens orquiectomizados, submetidos à ligadura de raiz de L5

5.9 Comparação entre Ratas Idosas e Ratas Jovens Ooforectomizadas Sem Reposição de 17β -estradiol

A comparação entre ratas idosas com ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17β -estradiol em relação à hiperalgesia mecânica após a ligadura evidenciou maior limiar para a retirada da pata nas ratas idosas apenas no sétimo dia ($24,2 \pm 5,6$ g vs $14,3 \pm 4,4$ g, $p = 0,002$) (Tabela 9 e Gráfico 9).

Tabela 9 - Limiar de retirada da pata em ratas idosas e ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17β -estradiol, em gramas (Dados apresentados com média $\pm$ erro padrão)

Momento da Avaliação	Ratas idosas	Ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17β -estradiol
Basal	$54,8 \pm 4,3$	$49 \pm 4,2$
7º dia	$24,2 \pm 5,6$	$14,3 \pm 4,4$
14º dia	$18,7 \pm 6,4$	$21,8 \pm 4,6$
21º dia	$24,3 \pm 9,2$	$28,3 \pm 12,3$
28º dia	$23,6 \pm 6,7$	$30,5 \pm 8,8$

Gráfico 9 - Limiar de retirada da pata em ratas idosas e ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17β -estradiol, submetidos à ligadura de raiz de L5

6 DISCUSSÃO

6.1 Modelo Experimental

No início deste projeto, o objetivo era estudar vários modelos de dor e envelhecimento, como dor aguda inflamatória com os clássicos modelos carragenina e formalina, e dor pós-inflamatória com o modelo da incisão plantar (Brennan *et al.*, 1996). No entanto, era necessário o envelhecimento de animais.

O processo de envelhecimento foi realizado no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP. Os ratos eram liberados pelo biotério com idade adulta entre seis e sete meses, e deixados para envelhecer em outro local do biotério até completar dois anos de idade. O processo era longo e a taxa de mortalidade dos animais foi bastante alta, o que impossibilitou a realização dos estudos com animais idosos para todos os modelos propostos.

A opção foi pelo modelo de dor neuropática uma vez que os resultados dos estudos experimentais até o momento são controversos para o sexo feminino, e inexistentes para as fêmeas idosas.

O modelo de dor neuropática escolhido foi o de ligadura de raiz espinhal de L5, sendo estudadas as variáveis: sexo, presença de hormônios gonadais e envelhecimento. A escolha deste modelo foi considerada adequada para este estudo, pois a opção por outros modelos de dor

neuropática não se mostrou apropriada, pois o modelo de constrição do nervo isquiático apresenta certo grau de variação nos animais quanto à hiperalgesia, o que pode complicar as análises quantitativas, ou o modelo de completa transecção do nervo isquiático, que ao ser seccionado induz ao animal um comportamento de autotomia (Jaggi *et al.*, 2011).

O modelo de ligadura de raiz espinal de L5 é considerado um dos mais refinados, pois neste modelo a alodínia, dor espontânea, hiperalgesia mecânica e térmica surgem a partir de 24 a 48 horas e persistem por aproximadamente 10 a 16 semanas. Comparado com outros modelos a ligadura de raiz espinal de L5 tem como vantagem a separação entre segmento nervoso lesado e intacto mais precisa, e com isso menos lesão dos nervos periféricos, porém, este modelo necessita de maior acurácia e é mais complicado que os demais devido ao risco de hemorragia e morte dos animais (Kim e Chung, 1992; Jaggi *et al.*, 2011).

6.2 Idade, Sexo e Hormônios Gonadais

A maior parte dos estudos sobre dor neuropática em modelos experimentais foi realizada até o momento em ratos machos jovens (Jasmin *et al.*, 1998; Porreca *et al.*, 1999; Robinson e Meert, 2005; Obara *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2013; Acosta *et al.*, 2014). A opção pelo sexo masculino decorre do fato que o componente hormonal não varia como nas fêmeas em consequência do ciclo estral, o que pode interferir com a interpretação dos resultados.

Apesar da maior parte dos estudos em dor neuropática terem sido obtidos com ratos machos jovens, existem alguns estudos de

envelhecimento em modelos experimentais de dor neuropática em machos adultos ou idosos (Leite-Almeida *et al.*, 2009; Pickering *et al.*, 2006; Crisp *et al.*, 2003).

Estudos de dor neuropática no sexo feminino são escassos (Dina *et al.*, 2007), e não foram encontrados estudos em modelos de dor neuropática em animais idosos do sexo feminino, o que pode aumentar a relevância dos resultados obtidos nesta pesquisa.

O efeito do envelhecimento na dor neuropática ainda não está bem estabelecido. Alguns estudos mostraram que ratos idosos evoluíram com hiperalgesia mecânica após lesão de nervo (Kim *et al.*, 1995). Foram encontradas diferenças na hiperalgesia térmica em função do modelo de dor neuropática utilizado (Crisp *et al.*, 2003), no qual os ratos idosos apresentaram comportamento doloroso mais intenso em modelo de ligadura parcial de nervo isquiático do que em modelo de constrição deste nervo, ou seja, modelo de inflamação neurogênica, e a hiperalgesia mecânica manteve-se por tempo mais prolongado em animais idosos do que em jovens (Novak *et al.*, 1999).

Por outro lado, ratos muito idosos, com 36 meses exibiram comportamento doloroso menos exuberante que ratos adultos ou idosos com 24 meses após constrição de nervo isquiático, e os ratos idosos ou muito idosos apresentaram maior sensibilidade a estímulos que causaram dor aguda (Pickering *et al.*, 2006). Ratos de meia idade com 15 meses apresentaram resposta hiperalgésica menos robusta que ratos jovens ou adultos (Chung *et al.* 1995).

Neste estudo, além do efeito envelhecimento sobre a dor neuropática, estudou-se também o efeito do sexo e dos hormônios gonadais. Ao contrário de outros estudos, os resultados apresentaram consistência.

Neste estudo houve a preocupação de estudar a influência da variável hormonal em machos, evento não realizado em pesquisas anteriores (Kim *et al.*, 1995; Novak *et al.*, 1999; Crisp *et al.*, 2003), não sendo identificada a diferença entre ratos jovens e idosos orquiectomizados. Também não houve diferença entre ratos não-orquiectomizados jovens e idosos. Estes dados diferem dos evidenciados por outros autores, que comprovaram alterações na percepção à dor em outros modelos de dor neuropática com o envelhecimento em machos (Kim *et al.*, 1995; Novak *et al.*, 1999; Crisp *et al.*, 2003).

Entretanto, os ratos idosos não-orquiectomizados, apresentaram menor hiperalgesia mecânica que os ratos idosos orquiectomizados. A diferença ocorreu no décimo quarto e vigésimo oitavo dias após a ligadura da raiz de L5, sugerindo ação antinociceptiva da testosterona nos animais idosos.

A testosterona parece desempenhar importantes efeitos organizacionais no processamento da dor no SNC e periférico ao longo do desenvolvimento. A administração de testosterona reverteu o aumento da sensibilidade à estimulação mecânica em modelo de dor inflamatória em ratos orquiectomizados em idade adulta, porém ratos que foram orquiectomizados ao nascer não apresentaram resposta semelhante. O efeito organizacional da testosterona sugere que a presença deste hormônio ao longo dos anos tem importância na antinocicepção (Borzan e Fuchs, 2006).

O efeito analgésico da testosterona entre ratos orquiectomizados e não-orquiectomizados já foi demonstrado em modelo de dor pós-operatória e formalina (Ashmawi, 2011) e em modelo de dor visceral (Affaitati *et al.*, 2011). A presença da testosterona é necessária para a analgesia induzida por clonidina (Thompson *et al.*, 2008; Nag e Mokha, 2009).

O efeito antinociceptivo da testosterona foi menos evidente em ratos jovens. Não houve diferença entre ratos jovens orquiectomizados e não-orquiectomizados, mas houve tendência à significância ($p = 0,065$) entre o limiar de retirada da pata, com diminuição do limiar de retirada da pata nos ratos gonadectomizados, possivelmente devido à ação antinociceptiva da testosterona, demonstrada em estudo no qual a gonadectomia em animais adultos aumentou a resposta ao estímulo mecânico em modelo de dor inflamatória, e o efeito foi revertido pela administração de testosterona (Borzan e Fuchs, 2006).

A diminuição dos níveis de estradiol decorrente da menopausa, que em ratas ocorre ao redor dos 16 meses de vida (Sone *et al.*, 2007), e a ausência total de testosterona em ratos idosos orquiectomizados, permitiu comparar a variável sexo no envelhecimento. Este estudo evidenciou que ratos idosos orquiectomizados e ratas idosas não apresentaram diferenças no limiar de retirada da pata após a ligadura de raiz de L5, sugerindo que a percepção à dor entre os sexos não se altera no envelhecimento.

A presença dos hormônios gonadais em animais jovens foi avaliada em ratos jovens não-orquiectomizados e ratas jovens com reposição de 17β -estradiol. Os ratos jovens não-orquiectomizados apresentaram limiares de retirada mais altos que as fêmeas com reposição hormonal, sugerindo tanto

efeito antinociceptivo da testosterona como efeito pró-nociceptivo do 17 β -estradiol.

A variável sexo, em animais jovens, foi avaliada comparando os ratos jovens orquiectomizados com as ratas jovens sem reposição de 17 β -estradiol, não sendo evidenciada diferença no limiar de retirada da pata durante todo o período, sugerindo que apenas o sexo, sem a presença dos hormônios gonadais, não interfere na percepção dolorosa, entretanto, os hormônios gonadais são importantes.

Diferenças entre machos e fêmeas em modelos de dor neuropática já foram demonstrados em modelo de ligadura parcial de nervo isquiático (Coyle *et al.*, 1996), lesão do nervo infraorbital e isquiático (Domingues *et al.*, 2009), ligadura de raiz de L5 (LaCroix-Fralish *et al.*, 2005), lesão medular (Hubscher *et al.*, 2010). Em lesão de nervo isquiático a ablação dos RE α e β eliminou a diferença entre os sexos (Li *et al.*, 2009). Os estudos comprovaram aumento de alodinia tátil ou térmica em fêmeas, o que sugere importante ação do estradiol no limiar da dor.

Ao avaliar a ação dos hormônios gonadais no modelo de dor neuropática este estudo comprovou que a presença do estradiol é importante para a expressão da dor.

Foi demonstrado neste estudo efeito pró-nociceptivo do estradiol, uma vez que as ratas jovens com reposição de 17 β -estradiol apresentaram limiar de retirada menor que ratas jovens sem reposição durante todo o período após a ligadura de raiz de L5, evidenciando assim o efeito pró-nociceptivo desse hormônio.

A expressão espinhal de REs ocorre durante a embriogênese, e estes também contribuem para a morfogênese no desenvolvimento dos interneurônios no corno dorsal, visto que nesta região há o processamento da informação dolorosa e o estradiol desempenha papel importante na nocicepção (Fan *et al.*, 2007).

O estradiol injetado em fêmeas ovariectomizadas 48 horas antes do estímulo doloroso diminuiu a antinocicepção mediada pela ação da clonidina, agonista no receptor α_2 -adrenérgico, proteína G ligada a receptor, presente no corno dorsal da medula e mediador da inibição descendente à dor (Nag e Mokha, 2006; Thompson *et al.*, 2008).

A ação do estradiol na redução da antinocicepção induzida pela clonidina no teste de retirada da cauda em fêmeas foi mediada por este hormônio no corno dorsal, ativando a ERK I/II, responsável pelo aumento na excitabilidade neuronal, enquanto que o antagonista dos REs no corno dorsal aboliu sua ação sobre o receptor α_2 -adrenérgico. Por ser de ação rápida esse mecanismo provavelmente é não-genômico (Nag e Mokha, 2014).

O efeito nociceptivo do estradiol também ocorreu em modelo de dor neuropática induzido por etanol em ratas jovens (Dina *et al.*, 2007).

As ratas jovens sem reposição de 17β -estradiol apresentaram limiar de retirada da pata mais baixo que as ratas idosas apenas no sétimo dia após a ligadura, sendo semelhantes nos outros tempos observados. Torna-se difícil atribuir este efeito à idade, já que nos outros momentos observados, não houve diferença entre os grupos. Esse resultado pode estar

relacionado ao efeito agudo pró-nociceptivo do estradiol, que nos primeiros dias após a ooforectomia se manteve presente. Supondo que as ratas idosas estão no período de menopausa, ou seja, com níveis muito baixos de estradiol, a diferença aguda na percepção dolorosa em ratas jovens, pela diminuição nos níveis de estradiol, pode significar que a exposição da fêmea aos estrogênios durante a fase reprodutiva de sua vida seja responsável pela maior intensidade da dor, que ocorreu nas ratas jovens, na primeira semana após a ligadura.

Os efeitos ativacionais agudos dos hormônios gonadais foram observados em modelo de lesão de raiz de L5, nos quais houve diminuição da sensibilidade mecânica e térmica pós-lesão em fêmeas púberes e adultas ovariectomizadas seis semanas antes da lesão, no entanto, nas fêmeas ovariectomizadas duas semanas antes da lesão houve aumento da sensibilidade, demonstrando que o efeito do estradiol se mantém por algum tempo, mesmo depois da ovariectomia (LaCroix-Fralish *et al.*, 2005).

Um aspecto do processo de envelhecimento não controlado neste estudo foi o enfado ou monotonia que ocorre em animais colocados em gaiolas por longos períodos de tempo até o envelhecimento (Olsson e Dahlborn, 2002). O envelhecimento dos animais foi realizado em gaiolas, sendo colocados dois animais por gaiola, em caso de morte de um dos animais, o animal sobrevivente foi mantido só. Neste tipo de ambiente houve pouca estimulação externa e escassa interação do animal com o meio, o que poderia causar tipos de comportamentos diferentes dos animais que envelheceram em grupos maiores ou em locais mais espaçosos.

O efeito do enfado e monotonia sobre a dor não é bem conhecido, mas não foi evidenciada diferença entre animais que envelheceram em ambientes mais ricos ou isolados no único teste comportamental de dor estudado, o teste da placa quente, embora tenha ocorrido aumento na expectativa de vida em animais que envelheceram em ambientes ricos quando comparados com animais que envelheceram em ambientes isolados (Altun *et al.*, 2007).

6.3 Considerações Finais

Este trabalho procurou estudar influências do envelhecimento, sexo e hormônios gonadais sobre a dor neuropática, em particular, no modelo de ligadura de raiz espinal de L5 em ratos. Os resultados forneceram subsídios que evidenciaram o papel pró-nociceptivo do estradiol em ratas jovens e o efeito antinociceptivo das gônadas masculinas em ratos idosos.

O tratamento das dores neuropáticas é complexo, e as respostas ainda não são as mais adequadas. Existem diversos fármacos utilizados no tratamento dos pacientes, no entanto a eficácia é muitas vezes imprevisível, o manejo das doses é em algumas situações difícil e a ocorrência de efeitos adversos é frequente (Haanpää *et al.*, 2011).

Atualmente as variáveis envelhecimento e sexo ainda não são muito consideradas, tanto na avaliação da dor quanto na prescrição de tratamentos analgésicos. O conhecimento dos múltiplos fatores envolvidos na dor neuropática, como a diferença entre os sexos e no processo do envelhecimento, pode orientar para o desenvolvimento de terapêuticas analgésicas mais adequadas, que nos permitam obter melhores resultados.

E desejável, que no futuro próximo, a avaliação da dor seja cada vez mais individualizada levando em consideração sexo e idade, o que proporcionará a prescrição de tratamentos mais eficazes às diferentes populações de indivíduos portadores de dor em geral, e dor neuropática em particular.

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este estudo, a análise dos resultados permite inferir as seguintes conclusões:

a) A hiperalgesia mecânica após ligadura de raiz de L5 foi semelhante entre ratos jovens machos e fêmeas.

b) Houve diminuição da hiperalgesia mecânica após ligadura de raiz de L5 em ratas idosas.

c) A presença da gônada masculina diminuiu a hiperalgesia mecânica após ligadura de raiz de L5 em ratos idosos.

d) A reposição de 17β -estradiol aumentou a hiperalgesia mecânica ao estímulo mecânico após a ligadura de raiz de L5 em ratas jovens ooforectomizadas.

Anexo A - Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20.10.2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **130/10** intitulado: **"INFLUÊNCIA DO SEXO E IDADE (ADULTOS E IDOSOS) NA PERCEPÇÃO DOLOROSA EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR EM RATOS."** 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: Claudia Carneiro de Araújo Palmeira

CEP-FMUSP, 20 de outubro de 2010.

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

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

Anexo B - Valor do limiar de retirada da pata dos animais estudados

Ratos idosos orquiectomizados

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9	Rato 10	Rato 11
Basal	51,3	47	55,3	50,5	52,7	53,6	52,7	55,6	50,5	39,6	57,3
7º dia	14,7	18,8	8,8	28,2	8,9	8,5	29,9	14,3	23,3	18,5	8,5
14º dia	22,3	12,6	7,3	8,1	6,3	9,9	31,2	14,2	20,72	11	12,2
21º dia	11,7	18	30,4	7,2	15,8	12,3	34,9	26	33,8	12	11,6
28º dia	15,5	33,3	17,7	13,6	24,8	11,1	29,9	12,7	28,4	12,4	13,6

Ratos jovens orquiectomizados

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8
Basal	55,5	51,5	55,9	59,3	53,2	50,5	53,9	55
7º dia	15,1	17,3	16,1	25,4	8,9	6,7	10,6	14,5
14º dia	9,6	17,6	26,7	29,4	9,9	11,4	15,8	12,9
21º dia	9,9	18,8	25,6	26,9	18	12,5	16,8	12,7
28º dia	7,7	26,5	25,5	41,8	46,4	12,9	24,2	10,2

Ratos idosos não orquiectomizados

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9
Basal	60	52,4	47,7	51,3	51,3	50,7	58,1	54,4	51,3
7º dia	26,3	31,2	8,9	21,9	12,8	11,4	19,1	17,3	17,6
14º dia	30,4	14,8	9,5	29,4	17,6	12,8	31,4	31,5	26,2
21º dia	28,25	13,8	25,1	28,4	18,4	11,3	48,8	26,9	58
28º dia	34,5	15,8	33,1	37,1	38,1	31,5	45,6	26,7	29,5

Ratos jovens não orquiectomizados

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8
Basal	59,8	56,5	54,4	60	56,6	58,3	50,8	49,3
7º dia	30,9	14,1	14,5	25,5	21,6	10,1	8	18,9
14º dia	19,8	32,3	21,2	30,4	30,8	15,6	21,3	18,9
21º dia	26	18,7	28,4	30,8	19,8	26,6	15,2	14,9
28º dia	24,6	27,7	19,9	37,7	38,6	21,7	23,9	19,6

Ratas idosas

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7
Basal	58	56,9	56,3	56,9	57,8	46,8	50,7
7º dia	28,36	15,66	32,72	22,26	22,1	26,7	21,3
14º dia	29	19,4	19,4	23,8	10,4	13	15,8
21º dia	43,6	23,9	26,3	21,9	17,9	15,3	21,1
28º dia	26,3	34,2	28,9	22,9	20,8	19,3	13,8

Ratas jovens ooforectomizadas com reposição de 17 β -estradiol

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8
Basal	47,1	44,7	47,6	44,2	48,9	42,6	39,3	46,4
7º dia	14	9	13	11,7	8,6	8,4	6	6,6
14º dia	26,1	3,95	25,4	10,6	12,4	13,4	9,6	10,4
21º dia	18,8	5,7	15,8	11,9	10,7	10,8	14,1	16,4
28º dia	21,6	13,7	22,2	10,3	14,4	19,6	17,3	20,4

Ratas jovens ooforectomizadas sem reposição de 17 β -estradiol

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8
Basal	48,9	52,6	44,7	55,5	46,3	52,5	47,9	43,7
7º dia	16,3	11,3	7,3	13,8	14,3	22,8	14,4	14,2
14º dia	20,3	17,6	17,8	21,5	26,8	25,6	16,4	28,5
21º dia	20,7	36,4	13,4	50,6	23,8	37,4	26,5	17,7
28º dia	31,7	37,1	16,5	40,9	40,8	27,6	21,8	27,9

9 REFERÊNCIAS

Acosta C, Djouhri L, Watkins R, Berry C, Bromage K, Lawson SN. TREK2 expressed selectively in IB4-binding C-fiber nociceptors hyperpolarizes their membrane potentials and limits spontaneous pain. *J Neurosci*. 2014; 34:1494-509.

Affaitati G, Ceccarelli I, Fiorenzani, Rossi P, Pace MC, Passavanti MB, Aurilio C, Sorda G, Danielli B, Giamberardino MA, Aloisi AM. Sex differences in the analgesic effects of ICI 182,780 and flutamide on ureteral calculosis in rats. *Horm Behav*. 2011; 59:9-13.

Aloisi AM, Bonifazi M. Sex hormones, central nervous system and pain. *Horm Behav*. 2006; 50:1-7.

Altun M, Bergman E, Edström E, Johnson H, Ulfhake B. Behavioral impairments of the aging rat. *Physiol Behav*. 2007; 92:911-23.

Amateu SK, Alt JJ, Stamps CL, McCarthy MM. Brain estradiol content in newborn rats: sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology*. 2004; 145: 2906-17.

Andrews JS, Senzer IS, Yelin E, Covinsky KE. Pain as a risk factor for disability or death. *J Am Geriatr Soc*. 2013; 61:583-9.

Ashmawi HA. *Influência do envelhecimento e das gônadas masculinas na percepção dolorosa em ratos*. Tese (livre-docência) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Baad-Hansen L, Poulsen HF, Jensen HM, Svenson P. Lack of sex differences in modulation of experimental intraoral pain by diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). *Pain*. 2005; 116:359-65.

Balthazart J, Ball GF. Fast regulation of steroid biosynthesis: a further piece in the neurosteroid puzzle. *Trends Neurosci*. 2000; 23:57-8.

Bennett HL, Gustafsson JA, Keast JR. Estrogen receptor expression in lumbosacral dorsal root ganglion cells innervating the female rat urinary bladder. *Auton Neurosci*. 2003; 105:90-100.

Berkley KJ. Sex differences in pain. *Behav Brain Sci*. 1997; 20:371-80.

Bernabei R, Gambassi G, Lapane K, Landi F, Gatsonis C, Dunlop R, Lipsitz L, Steel K, Mor V. Management of pain in elderly patients with cancer. SAGE Study Group (Systematic Assessment of Geriatric Drug Use via Epidemiology). *JAMA*. 1998; 279:1877-82.

Bernades SF, Keoh E, Lima ML. Bridging the gap between pain and gender research: a selective literature review. *Eur J Pain*. 2008; 12:427-40.

Beyenburg S, Stoffel-Wagner B, Bauer J, Watzka M, Blümcke I, Bidlingmaier F, Elger CE. Neuroactive steroids and seizure susceptibility. *Epilepsy Res*. 2001; 44:141-53.

Bingefors K, Isacson D. Epidemiology, co-morbidity, and impact on health-related quality of life of self-reported headache and musculoskeletal pain—a gender perspective. *Eur J Pain*. 2004; 8:435-50.

Blyth FM, March LM, Jorm LR, Brnabic AJ, Williamson M, Cousins MJ. Chronic pain in Australia: a prevalence study. *Pain*. 2001; 89:127-34.

Borzan J, Fuchs PN. Organizational and activational effects of testosterone on carrageenan-induced inflammatory pain and morphine analgesia. *Neuroscience*. 2006; 143:885-93.

Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*. 2008; 136:380-87.

Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996; 64:493-501.

Ceccarelli I, Fiorezani P, Massafra C, Aloisi AM. Repeated nociceptive stimulation induces different behavioral and neuronal responses in intact and gonadectomized female rats. *Brain Res*. 2006; 1106:142-9.

Cervero F, Laird JM. Role of ion channels in mechanisms controlling gastrointestinal pain pathways. *Curr Opin Pharmacol*. 2003; 3:608-12.

Chiba T, Ashmawi H A. *Diagnóstico e tratamento da dor*. In: Viana de Freitas E, Py L. (Orgs.). *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, p. 1214-25.

Chung JM, Choi Y, Yoon YW, Na HS. Effects of age on behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *Neurosci Lett*. 1995; 183:54-7.

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; 300:695-701.

Covinsky KE, Lindquist K, Dunlop DD, Yelin E. Pain, functional limitations, and aging. *J Am Geriatr Soc*. 2009; 57:1556-61.

Coyle DE, Sehlhorst CS, Behbehani MM. Intact female rats are more susceptible to the development of tactile allodynia than ovariectomized female rats following partial sciatic nerve ligation (PSNL). *Neurosci Lett*. 1996; 203:37-40.

Craft R. Modulation of pain by estrogens. *Pain*. 2007; 132:S3-S12.

Crisp T, Giles JR, Cruce WLR, McBurney DL, Stuesse SL. The effects of aging on thermal hyperalgesia and tactile-evoked allodynia using two models of peripheral mononeuropathy in the rat. *Neurosci Lett*. 2003; 339:103-6.

Dina OA, Gear EW, Messing RO, Levine GD. Severity of alcohol-induced painful peripheral neuropathy in female rats: role of estrogen and protein kinase (A and C). *Neuroscience*. 2007; 145:350-6.

Domingues CA, Kouya PF, Wu WP, Hao J-X, Xu X-J, Weinsenfled-Halin Z. Sex differences in the development os localized and spread mechanical hypersensitivity in rats after injury to the infraorbital or sciatic nerves to create a model for neuropathic pain. *Gender Med*. 2009; 6:225-34.

Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: A quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*. 1977; 4:161-74.

Edwards RR. Individual differences in endogenous pain modulation as a risk factor for chronic pain. *Neurology*. 2005; 65:437-43.

Evrard HC. Estrogen synthesis in the spinal dorsal horn: a new central mechanism for the hormonal regulation of pain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 291:R291-9.

Fan X, Kim H-J, Warner M, Gustafsson J-A. Estrogen receptor β is essential for sprouting of nociceptive primary afferents and for morphogenesis and maintenance of the dorsal horn interneurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:13696-701.

Ferrel BA. Pain evaluation and management in the nursing home. *Ann Intern Med*. 1995; 123:681-7.

Fillingim RB, Gear RW. Sex differences in opioid analgesia: clinical and experimental findings. *Eur J Pain*. 2004; 8:413-25.

Fillingim RB, Ness TJ, Glover TL, Campbell CM, Price DD, Staud R. Experimental pain models reveal no sex differences in pentazocine analgesia in humans. *Anesthesiology*. 2004; 100:1263-70.

Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW. 17β -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol*. 1999; 81:925-9.

France CR, Suchowiecki S. A comparison of diffuse noxious inhibitory controls in men and women. *Pain*. 1999; 81:77-84.

Gagliese L, Farrel MJ. *The neurobiology of aging, nociception and pain. An integration of animal and human experimental evidence*. In: Gibson SJ, Weiner DK, eds. *Pain in Older Persons*. Seattle, WA: IASP Press; 2005:25-44.

Gaumont I, Arsenault P, Marchand S. Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. *Brain Res*. 2005; 1052:105-11.

Greenspan JD, Craft RM, LeResche L, Arendt-Nielsen L, Berkley KJ, Fillingim RB, Gold MS, Holdcroft A, Lautenbacher S, Mayer EA, Mogil JS, Murphy AZ, Traub RJ. Consensus Working Group of the Sex, Gender, and Pain SIG of the IASP. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: A consensus report. *Pain*. 2007; 132:26-45.

Gureje O, Von Korff M, Simon GE, Gater R. Persistent pain and well-being. A World Health Organization Study in primary care. *JAMA*. 1998; 280:147-51.

Haanpää M, Attal N, Backonja M, Baron R, Bennet M, Bouhassira D, Cruccu G, Hansson P, Haythornthwaite JA, Iannetti GD, Jenssen TS, Kauppila T, Nurmikko TJ, Rice ASC, Rowbotham M, Serra J, Sommer C, Smith BH, Treede RD. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain*. 2011; 152:14-27.

Hagiwara H, Kimura F, Mitsushima D, Funabashi T. Formalin-induced nociceptive behavior and c-Fos expression in middle-aged female rats. *Physiol Behav*. 2010; 100:101-4.

Helme RD, Gibson SJ. *Pain in older people*. In: Crombie, IK, Croft PR, Linton SJ, eds. *Epidemiology of Pain*. Seattle: IASP Press, 1999, pp 103-12.

Howard FM. Chronic pelvic pain. *Obstet Gynecol*. 2003; 101:594-611.

Howard FM. Endometriosis and mechanisms of pelvic pain. *J Minim Invasive Gynecol*. 2009; 5:540-50.

Hubscher CH, Fell JD, Gupta DS. Sex and hormonal variations in the development of at-level allodynia in a rat chronic spinal cord injury model. *Neurosci Lett*. 2010; 477:153-6.

Hurley RW, Adams MCB. Sex, gender and pain: An overview of a complex field. *Anesth Analg*. 2008; 107:309-17.

Isacson D, Bingefors K. Epidemiology of analgesic use: a gender perspective. *Eur J Anaesthesiol Suppl*. 2002; 26:5-15.

Iwata K, Tsuboi Y, Nomoto E, Tashiro A, Imai T, Sumino R, Konda K. Effect of aging on spinal dorsal horn neuronal activity and nociceptive behavior in the rat. Abstract, 9th Congress on Pain, Vienna, Austria, August 22-27, 1999.

Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol*. 2011; 25:1-28.

Jasmin L, Kohan L, Franssen M, Janni G, Goff JR. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain*. 1998; 75:367-82.

Jensen TS, Baron R, Haanpää M, kalso E, Loeser JD, Rice AS, Treed RD. A new definition of neuropathic pain. *Pain*. 2011; 152:2204-5.

Keogh E, McCracken LM, Eccleston C. Do men and women differ in their response to interdisciplinary chronic pain management? *Pain*. 2005; 114:137-46.

Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 1992; 50:355-63.

Kim WY, Na HS, Yoon YW, Nahm SH, Ko KH, Hong SK. Mechanical allodynia is more strongly manifested in older rats in an experimental model of peripheral neuropathy. *Neurosci Lett*. 1995; 199:158-60.

Kretz O, Fester L, Wehrenberg U, Zhou L, Brauckmann S, Zhao S, Prange-Kiel J, Naumann T, Jarry H, Frotscher M, Rune GM. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J Neurosci*. 2004; 24:5913-21.

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; 114:71-80.

LeBars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). Effects on dorsal horn convergent neurons in the rat. *Pain*. 1979; 6:283-304.

Leite-Almeida H, Almeida-Torres L, Mesquita AR, Pertovaara A, Sousa N, Cerqueira JJ, Almeida A. The impact of age on emotional and cognitive behaviours triggered by experimental neuropathy in rats. *Pain*. 2009; 144:57-65.

Li L, Fan X, Warner M, Xu X-J, Gustafsson J-A, Weinsiefel-Hallin Z. Ablation of estrogen receptor α e β eliminates sex differences in mechanical pain threshold in normal and inflamed mice. *Pain*. 2009; 143:37-40.

Martin VT, Behbehani M. Ovarian hormones and migraine headache: understanding mechanisms and pathogenesis- part I. *Headache* 2006; 46:3-23.

McEwen BS, Akama KT, Spencer-Segal JL, Milner TA, Waters EM. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav Neurosci*. 2012; 126:4-16.

McEwen BS. Permanence of brain sex differences and structural plasticity of the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:7128-20Mellon SH. Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 78:1003-8.

Micevych P, Christensen A. Membrane-initiated estradiol actions mediate structural plasticity and reproduction. *Frontiers in Neuroendocrinol*. 2012; 33:331-41.

Miller TR, Wetter JB, Jarvis MF, Bitner RS. Spinal microglial activation in rat models of neuropathic and osteoarthritic pain: an autoradiographic study using [3H]PK11195. *Eur J Pain*. 2013; 17:692-703.

Myers CD, Riley III JL, Robinson ME. Psychosocial contributions to sex correlated differences in pain. *Clin J Pain*. 2003; 19:225-32.

Nag S, Mokha SS. Activation of a GQ-coupled membrane estrogen receptor rapidly attenuates α 2-adrenoceptor-induced antinociception via an ERK I/II-dependent, non-genomic mechanism in the female rat. *Neuroscience*. 2014; 267:122-34.

Nag S, Mokha SS. Activation of α 2-adrenoceptors in the trigeminal region produces sex-specific modulation of nociception in the rat. *Neuroscience*. 2006; 142:1255-62.

Nag S, Mokha SS. Testosterone is essential for α 2-adrenoceptor induced antinociception in the trigeminal region of the male rat. *Neurosci Lett*. 2009; 467:48-52.

Novak JC, Lovell JA, Stuesse SL, Cruce WL, McBurney DL, Crisp T. Aging and neuropathic pain. *Brain Res*. 1999; 883:308-10.

Obara I, Parkitna JR, Korostynski M, Makuch W, Kaminska D, Przewlocka B, Przewlocki R. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain*. 2009; 141:283-91.

Olsson AS, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab Animals*. 2002; 36:243-70.

Palmeira, CCA, Ashmawi, HA, Posso, IP. Sex Gender and pain perception and analgesia. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011; 61:814-28.

Paul SM, Purdy RH. Neuroactive Steroids. *FASEB J.* 1992; 6:2311-22.

Pickering G, Jourdan D, Eschalier A, Dubray C. Impact of age, gender and cognitive functioning on pain perception. *Gerontology.* 2002; 48:112-8.

Pickering G, Jourdan D, Millecamps M, Chapuy E, Alliot J, Eschalier A. Age-related impact of neuropathic pain on animal behaviour. *Eur J Pain.* 2006; 10:749-55.

Pieh C, Altmeppen J, Neumeier S, Lowe T, Angerer M, Lahmann C. Gender differences in outcomes of a multimodal pain management program. *Pain.* 2012; 153:197-202.

Porreca F, Lai J, Bian D, Wegert S, Ossipov MH, Eglen RM, Kassotakis L, Novakovic S, Rabert DK, Sangameswaran L, Hunter JC. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:7640-4. Review. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:10548.

Racine M, Tousignant-Laflamme Y, Kloda LA, Dion D, Dupuis G, Choinière M. A systematic literature review of 10 years of research on sex/gender and pain perception- Part 2: Do biopsychosocial factors alter pain sensitivity differently in women and men? *Pain.* 2012; 153:619–35.

Ramage-Morin PL. Chronic pain in Canadian seniors. *Health Rep.* 2008; 19:37-52.

Robichaud M, Debonnel D. Oestrogen and testosterone modulate the firing activity of dorsal raphe nucleus serotonergic neurones in both male and female rats. *J Neuroendocrinol.* 2005; 17:179-85.

Robinson I, Meert TF. Stability of neuropathic pain symptoms in partial sciatic nerve ligation in rats is affected by suture material. *Neurosci Lett.* 2005; 373:125-9.

Robinson ME, Riley JR 3rd, Myers CD, Papas RK, Wise EA, Waxenberg LB, Fillingim RB. Gender role expectations of pain: relationship to sex differences in pain. *J Pain.* 2001; 5:251-7.

Rudick CN, Woolley CS. Estradiol induces a phasic c fos response in the hippocampal CA1 and CA3 regions of adult female rats. *Hippocampus.* 2000; 10:274-83.

Rupprecht R, di Michele F, Hermann B, Strohler A, Lancel M, Romeo F, Holsboer F. Neuroactive steroids: molecular mechanisms of action and implications for neuropsychopharmacology. *Brain Res Rev.* 2001; 37:59-67.

Rupprecht R, Holsboer F. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* 1999; 22:410-6.

Sanoja R, Cervero F. Estrogen-dependent changes in visceral afferent sensitivity. *Auton Neurosci.* 2010; 153:84-9.

Schnabel A, Pogatzki-Zahn E. Predictors of chronic pain following surgery. What do we know? *Schmerz*. 2010; 24:517-31.

Serrao M, Rossi P, Sandrini G, Parisi L, Amabile GA, Nappi G, Pirelli F. Effects of diffuse noxious inhibitory controls on temporal summation of the RIII reflex in humans. *Pain*. 2004; 112:353-60.

Shibuya K, Takata N, Hojo Y, Furukawa A, Yasumatsu N, Kimoto T, Enami T, Suzuki K, Tanabe M, Ishii H, Mukai H, Takahashi T, Hattori T, Kawato S. Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1619:301-6.

Silberstein SD. Headache and female hormones: what you need to know. *Curr Opin Neurol*. 2001; 14:323-33.

Sinchak K, Mills RH, Tao L, LaPolt P, Lu JK, Micevych P. Estrogen induces de novo progesterone synthesis in astrocytes. *Dev Neurosc*. 2003; 25:343-8.

Sone K, Yamamoto-Sawamura T, Kuwahara S, Nishijima K, Ohno T, Aoyama H, Tanaka S. Changes of estrous cycles with aging in female F344/n rats. *Exp Anim*. 2007; 56:139-48.

Staud R, Robinson ME, Vierck Jr CJ, Price DD. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) attenuate temporal summation of second pain in normal males but not in normal females or fibromyalgia patients. *Pain*. 2003; 101:167-74.

Taguchi T, Matsuda T, Mizumura K. Change with age in muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contraction in rats. *Neurosci Res.* 2007; 57:331-8.

Tang B, Ji Y, Traub RJ. Estrogen alters spinal NMDA receptor activity via a PKA signaling pathway in a visceral pain model in the rat. *Pain.* 2008; 137:540-9.

Thompson AD, Angelotti T, Nag Subodh, Mokha S. Sex-specific modulation of spinal nociception by alpha-adrenoceptors: differential regulation by estrogen and testosterone. *Neuroscience.* 2008; 153:1268-77.

Toran-Alleran CD, Singh M, Sétáló G Jr. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players and an old story. *Front Neuroendocrinol.* 1999; 20:97-121.

Tousignant-Laflamme Y, Marchand S. Excitatory and inhibitory pain mechanisms during the menstrual cycle in healthy women. *Pain.* 2009; 146:47-55.

Tousignant-Laflamme Y, Pagé S, Goffaux P, Marchand S. An experimental model to measure excitatory and inhibitory pain mechanisms in humans. *Brain Res.* 2008; 1230:73-9.

Triadafilopoulos G, Finlayson M, Grellet C. Bowel dysfunction in postmenopausal women. *Women Health.* 1998; 27:55-66.

Turk DC, Merchenbaum D. *A cognitive behavioral approach to pain management* In: Wall PD, Melzack R. *Textbook of pain*. Edinburgh, Churchill Livingstone 1994, p. 1337-1348.

Turk DC, Rudy TE. IASP taxonomy of chronic pain syndromes: preliminary assessment of reliability. *Pain*. 1987; 30:177-89.

Turk DC. Clinicians' attitudes about prolonged use of opioids and the issue of patient heterogeneity. *J Pain Symptom Manage*. 1996; 11:218-30.

Vincent K. Chronic pelvic pain in women. *Postgrad Med J*. 2009; 85:24-9.

von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron*. 2012; 73:638-52.

Wiesenfeld-Hallin Z. Sex differences in pain perception. *Gender Med*. 2005; 2:137-45.

Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ. Aspects of fibromyalgia in the general population: sex, pain threshold, and fibromyalgia symptoms. *J Rheumatol*. 1995; 22:151-6.

Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*. 1999; 353:1959-64.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983; 16:109-10.

Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, Meyer CR, Koeppe RA, Stohler CS. Mu-opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women. *J Neurosci*. 2002; 22:5100-7.

Zuloaga DG, Puts DA, Jordan CL, Breedlove SM. The Role of Androgen Receptors in the Masculinization of Brain and Behavior: What we've learned from the Testicular Feminization Mutation. *Horm Behav*. 2008; 53:613-26.

APÊNDICES

Apêndice A - Artigo publicado

Rev Bras Anestesiol
2011; 61: 6: 814-828

REVIEW ARTICLE

Sex and Pain Perception and Analgesia

Cláudia Carneiro de Araújo Palmeira ¹, Hazem Adel Ashmawi, TSA ², Irimar de Paula Posso, TSA ³

Summary: Palmeira CCA, Ashmawi HA, Posso IP – Sex and Pain Perception and Analgesia.

Sex is an important factor in painful experience modulation. Large volume of evidence shows that experience is different for males and females, as well as the answer to some classes of analgesics. Laboratory experiments suggest that women have a lower pain threshold than men related to pain from noxious stimuli such as heat, cold, pressure and electrical stimulation. Pain is a dynamic phenomenon under the influence of various mechanisms of excitatory and inhibitory control. The differences in pain perception related to sex may be associated with hyperalgesia in women, but also to the hypoactivity of the inhibitory system of pain in females. The purpose of this review besides showing some relationship for gonadal hormones, central nervous system and pain is to provide reference points for the discussion of one of the most intriguing aspects of the pathophysiology of pain: the differences in the presence of painful stimuli related to gender.

Keywords: Sex Factors; Pain; Gonadal Steroid Hormones.

©2011 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

INTRODUCTION

Differences between men and women regarding pain prevalence, prevalence of seeking medical treatment due to pain conditions, as well as pain behavior and response to treatments have long been noted. The role of social, cultural and biological factors concerning the difference in pain perception between the sexes has been discussed. During the last 20 years, a large body of data has been collected concerning differences between the sexes in response to pain, including pain thresholds, and tolerance and response to pain treatments ¹. However, the exact differences as well as their relevance are far from clear.

Sex differences in pain perception have been clearly documented in the literature. It has been shown that women perceived more pain than men ². This has been demonstrated regarding clinical pain ³, experimental pain in humans ⁴ and in animal models ⁵.

According to the International Association for the Study of Pain, pain is an unpleasant sensory and emotional experience arising from actual or potential tissue damage or described in terms of such damage ⁶. This definition does not differentiate

between pain as a woman experiences it from pain as a man experiences it, and thus fundamental questions still remain ².

Sex differences in pain perception are frequently substantial in magnitude, with moderate to large effect sizes. Our knowledge of sex differences in central nervous system (CNS) morphology and function is becoming more detailed day by day, in both humans and animals ^{7,8}. Many factors are considered responsible for sex differences in pain perception and for the great prevalence of chronic pain conditions in women ⁹; biological factors such as sex hormones are thought to be one of the main mechanisms which explain sex differences in pain perception. This is supported by numerous findings from the animal ¹⁰⁻¹³ and human literature ^{14,15}.

Epidemiology of sex differences in pain

Compared with men of similar age, women have a higher risk for stress related disorders, such as fibromyalgia ¹⁶ and chronic pain ¹⁷. Pain is a frequent symptom of conditions, such as the irritable bowel syndrome, chronic pelvic pain and interstitial cystitis, and is often present without a demonstrable pathology ^{18,19}. These conditions are highly prevalent in women, with a general occurrence rate in this population of around 3.8% ^{20,21}.

Females report more severe pain, more frequent bouts of pain, more anatomically diffuse and long-lasting pain than males with similar disease processes, even when male and female specific disorders including male urologic and female gynecologic pain are excluded from the analyses ¹.

Women have a more frequent prevalence of pain related to musculoskeletal or visceral origin, as well as pain related to autoimmune disease. They are more likely to visit a physician and to report pain as a symptom than males ²², use pain-relieving medications significantly more often even when equating the sexes on pain frequency and severity ²³.

Received from Laboratório de Investigação Médica, LIM-08, Anestesiologia Experimental at Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Brazil.

1. Anesthesiologist; Ph.D. student, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)

2. Ph.D.; Professor Collaborator in Surgery Department, Faculdade de Medicina da USP; Anesthesiologist for the Pain Control Group, Anesthesia Division, Instituto Central do Hospital das Clínicas of the FMUSP

3. Associate Professor, Surgery Department, FMUSP; Supervisor Pain Control Group, Anesthesia Division, Instituto Central do Hospital das Clínicas of the FMUSP

Submitted on November 16, 2010.
Approved on February 21, 2011.

Correspondence to:
Dr. Hazem Adel Ashmawi
Av. Dr. Arnaldo, 455, 2o andar
01246-903 – São Paulo, SP, Brasil
E-mail: hazem@hconet.usp.br

SEX AND PAIN PERCEPTION AND ANALGESIA

Physiology of gonadal steroid hormones

The gonadal steroid hormones are produced by the ovaries and testes (gonads). The main products of the testes are androgens, testosterone, and dihydrotestosterone; and the main products of the ovaries are two types of steroid hormones: estrogens (e.g., estradiol, estriol, estrone) and progestins (e.g., progesterone). Androgens are also produced by the adrenal cortex and are released in response to adrenocorticotrophic hormone. Testosterone is a precursor to estradiol, so the ovaries also synthesize testosterone, and the testes also produce some estrogens because estradiol is a metabolite of testosterone.

The aromatization of testosterone to estradiol is greatly facilitated by the enzyme aromatase. This means that tissues containing aromatase can convert testosterone to estrogen and thereby make use of estrogen via estrogen receptors. In women, testosterone is produced in the adrenal cortex (25%) and ovaries (25%) and by transformation (50%) in the liver, kidneys, bowel, lungs, adipose tissue, and CNS²⁴.

Menopause induces changes in the endogenous hormone balance: ovarian production of estrogens dramatically decreases. Thereafter, the adrenal cortex becomes responsible for estrogen production via aromatization of androgens to estradiol in peripheral tissue (e.g., fat).

Of functional significance is the fact that many of the actions of gonadal steroids are tissue-specific due to tissue-specific coregulators, proteins that can initiate, amplify or extinguish a transcriptional signal²⁵. In addition, steroid hormone receptors may be activated by a variety of factors other than their cognate ligands. Specifically, progestins, androgens and glucocorticoids can bind to each other's receptors. Moreover, gonadal steroid hormone receptors account for a considerable amount of signal diversity because progesterone and estrogen receptors exist in different isoforms^{26,27}. Interestingly, estrogens stimulate their own receptor early in development, inhibit it during adulthood, and stimulate it again in the context of brain injury²⁸.

Gonadal steroids hormones - CNS, sex differences and pain

The precise roles of gonadal steroid hormones in pain are not well understood. Many hormone effects on pain/analgesia that were initially thought to be due to gonadal release of hormone may actually be due to *de novo* hormone synthesis in tissues such as the brain and spinal cord (e.g., progesterone^{29,30}, estradiol³¹⁻³³). Many of the central regions implicated in pain and analgesia (i.e., periaqueductal gray, spinal cord, dorsal root ganglion) contain receptors for both estrogens and androgens and have the ability to synthesize steroids locally³⁴⁻³⁶. Binding of specific steroids to their receptors within these central and peripheral regions is likely involved in ligand-dependent transcriptional events, thereby influencing the expression of various neurotransmitters and receptors².

Converging line of evidence suggested that sex steroids have profound effects not only on developmental organization but also on ongoing dynamics of the nervous system. In adults, sex steroids affect brain functions by modulating neurotransmission³⁷⁻³⁹. In this case, sex hormones act as neuroactive steroids - this term has been used for steroid hormones that modulate neuronal excitability via specific interactions with neurotransmitter receptors and ion channels⁴⁰⁻⁴². The action of neuroactive steroids can be genomic or non-genomic. In their genomic action, steroids influence the electrical activity of neurons by regulating the transcription of ion channels and neurotransmitter receptors. Genomic actions require a period longer than 30 min to be effective (typically from hours to days)⁵.

In the mid-1970s the observation of rapid and reversible changes in neuronal excitability (*in vitro*) after application of sex steroids indicated that these hormones could also act via membrane-bound receptors⁴³. Because of the rapidity of these non-genomic effects (from milliseconds to minutes), these mechanisms can be studied more easily through electrophysiological techniques³⁸. Non-genomic actions include binding of steroids to membrane receptors coupled to ion channels and transmitter receptors by second messengers such as G-proteins, cyclic nucleotides, and kinases or direct allosteric interaction of steroids with neurotransmitter receptors⁴¹.

However, neuroactive steroids such as estrogens and androgens can be synthesized in the central nervous system *de novo* from endogenous cholesterol, especially in the hippocampus^{44,45}. The term neurosteroid has been coined to define all steroids that are synthesized in the brain⁴⁶. Under this general definition, estradiol would be classified as a neurosteroid since it can be synthesized from circulating testosterone in various brain regions⁴⁷. In contrast to the first-generation neuromessengers (such as glutamate, GABA, and acetylcholine) which are stored in presynaptic vesicles and quickly released, neurosteroids are produced in mitochondria and microsomes of neurons and glial cells and are released slowly by passive diffusion. Since neurosteroids also reach cells near the steroidogenic cells, it has been suggested that they can act both as intracrine and paracrine modulators⁴⁸.

In addition to playing a role in activation of the molecular cascade involved in plastic adjustment of cellular functions, estrogens show close interactions, cross-coupling, and reciprocal regulation with proteins involved in signal transduction mediated by neural growth factors or neurotransmitters. For instance, estrogens increase nerve growth factor (NGF) in the dorsal root ganglia⁴⁹, induce *c-fos* expression in the hippocampus⁴⁹, and activate MAP-kinase (a growth factor) not related to estrogen receptors activation⁵⁰.

Estradiol potentiates glutamate binding to N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor⁵¹ and increases postsynaptic potentials in the hippocampus by increasing currents mediated by kainate receptors⁵²; however, inhibitory actions in this structure have also been described³⁸.

An interaction of estradiol that is important in the modulation of pain mechanisms is that with the GABA system in the

PALMEIRA, ASHMAWI, POSSO

CNS, although the effects of estrogens on GABA system are controversial⁴⁹. Changes in estrogen plasma levels are also accompanied by changes in a variety of other neurotransmitters, including serotonin (5-HT), acetylcholine (ACh), dopamine (DA), and β -endorphins. Thus, the decrease of central 5-HT accompanying estrogen withdrawal may be associated with a reduced self-inhibitory effect at the 5-HT receptor level. This effect seems to be associated with an increased occurrence of headache⁵⁰.

Regarding androgens, some data suggest reciprocal interactions between androgens receptors and estrogens receptors in the brain, and androgens regulate the activity of the enzyme aromatase in several brain areas⁵⁴. The effects of androgens on neuronal excitability are controversial, and the observed excitatory effects of testosterone are probably due to its conversion to estradiol⁴⁴.

Animal studies

Animal studies have produced contradictory results regarding the effects of gonadal hormones on pain sensitivity.

In an experiment of ureteral calculosis, a model of visceral pain, female had a higher number and duration of stone-induced crisis than male, and a treatment with estradiol or testosterone differently affected the behavioral and hormonal parameters in both sexes, supraphysiological levels of estradiol, but not of testosterone, were analgesic only in female⁵⁵. On the other hand, the same group showed that estradiol and androgen receptor antagonists induced analgesia, but only in female⁵⁶.

Surgical ovariectomy (OVX) induces a permanent reduction in estrogen levels generating a hyperalgesic state of slow onset and long duration that can be prevented or reversed by exogenous administration of estrogen, these results were obtained in somatic pain models⁵⁷. Thermal hypersensitivity following OVX in mice is progressive remaining significant for the duration of the experiment (week 10 after surgery), and was also sensitive to estrogen treatment. Interestingly, no difference occurred in mechanical hyperalgesia^{58,59}.

Estrogen seems to present a central effect, sex-related differences in glutamate-evoked afferent discharge result from estrogen-related modulation of the activity and/or expression of peripheral N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in female rats. Estrogen levels in normally cycling rats were positively correlated with NMDA-evoked masseter afferent discharge, and the treatment of OVX female rats with high dose of estrogen significantly increased NMDA discharge. There was a significant sex-related difference in the response of a masseter muscle afferent fibers to activation of peripheral NMDA receptor that was strongly correlated with plasma estrogen levels⁶⁰.

In a model of visceral pain, colorectal nociceptive response was attenuated by intrathecal NMDA antagonist in OVX rats compared to OVX with estradiol replacement rats. It was concluded that estradiol increases spinal processing of visceral nociception by increasing NMDA receptor NR1 subunit ex-

pression and increasing site specific receptor phosphorylation in the NR1 subunit contributing to an increase in NMDA receptor activity⁶¹.

In a model of painful peripheral neuropathy induced by ethanol in rats, ethanol induced hyperalgesia with more rapid onset and severity in females. Following OVX, alcohol failed to induce hyperalgesia, however, estrogen replacement reinstated alcohol neuropathy in the female rat⁶².

Formalin pain model, a nociceptive and inflammatory pain model, has been widely used for the study of sex differences in pain perception. In a study of hormone replacement in gonadectomized (GDX) female and male rats to observe the effects of sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses, the nociceptive responses were divided into three distinct phases: acute (phase I), inhibitory (interphase), and tonic (phase II). It was observed that testosterone had a hypoalgesic effect on phases I and II of the formalin test, female hormones acted only on the interphase: The results permitted to believe that testosterone plays a protective role in pain perception¹¹. Female gonadal hormones regarding the responses to repetition of a nociceptive stimulus in the formalin test showed that these hormones affect behavioral and neuronal responses to repeated nociceptive stimulation, indicating a possible role of ovarian hormones in determining sex differences in pain⁶³.

In another experiment on formalin-induced behavior during phase I and II, the effects of graded doses of estradiol or progesterone were examined in OVX rats. Graded doses of estradiol reduced formalin-induced behavior by 35% to 49% during phase II but not during phase I. The maximal response was seen with 20% estradiol. The antihyperalgesic effect of 20% estradiol was significant at eight days after implantation and persisted after 21 days. In contrast, graded doses of progesterone had no effect on either phase of formalin pain induced behaviors. Tamoxifen, an estrogen receptor antagonist, completely prevented the antihyperalgesic effect of the 20% estradiol implant. Formalin-induced behavior during phase II were significantly less in proestrus females and OVX rats given 20% estradiol compared to OVX control rats⁶⁴. Focusing on the effects of the estrous cycle in middle-aged (11 months old) rats with unchanged serum estradiol levels in the response to formalin, and analyzing c-Fos expression in order to determine the cerebral region associated with middle-age-related changes in pain response, it was found that middle-aged female rats are more sensitive to formalin-induced nociceptive stimuli, irrespective of estrous cyclicity¹³. They speculate that the hypersensitivity to nociceptive stimuli is due to age, and this response is unrelated to reproductive ability.

In an experiment investigating whether testosterone mediates the antinociceptive effect of clonidine in the trigeminal region of male rat, the results showed that orchietomy, and thus the absence of testosterone, resulted in a complete lack of an effect of clonidine treatment in males. Testosterone replacement in GDX rats restored clonidines antinociceptive effect. The abolition of clonidines antinociceptive effect in the absence of testosterone was observed on both NMDA-induced nociceptive scratching behavior and on heat-evoked

SEX AND PAIN PERCEPTION AND ANALGESIA

head withdrawal test, suggesting that testosterone is essential for the expression of clonidine antinociceptive effects on different modalities of pain processing⁶⁵.

Hippocampal TRPV1 (transient receptor potential vanilloid1) expression in OVX rats that received estradiol was investigated, and estradiol potentiated hippocampal TRPV1 expression and mechanical allodynia of inflamed TMJ⁶⁶. Their results suggested that estradiol could modulate TMJ pain through the TRPV1 signaling pathway in the hippocampus.

In a study to determine whether hormonal modulation of opioid antinociception in adult rats extends to opioids other than the prototypic μ agonist morphine, gonadectomized (GDX) male and female rats were replaced with estradiol, progesterone, testosterone, and no hormone. Nociception was evaluated on the 50°C hot plate and warm water tail withdrawal tests before and after subcutaneous administration of hydromorphone, buprenorphine, U50, 488, or SNC80. In males, gonadectomy tended to decrease, and testosterone tended to increase antinociception produced by 3 of the 4 agonists. In females, gonadectomy and hormone treatment had more variable effects, although estradiol tended to decrease μ opioid antinociception. These results suggested that reproductive hormones such as testosterone in males and estradiol in females do not consistently modulate sensitivity to the analgesic effects of opioids in the adult organism⁶⁷.

Interestingly, the more potent analgesic responses of morphine and clonidine in male mice failed to be observed in mice with a "knock-out" of G protein-coupled inwardly rectifying potassium channel subtype (GIRK-2), suggesting a role for this molecular modulator in the expression of sex differences⁶⁸.

Investigating systematically whether activation of opioid receptor-like 1 receptor (ORL1) by orphanin FQ (OFQ) produced sex-specific modulation of spinal nociception and whether estrogen or testosterone contributes to these differences in two behavioral models in rats, using the NMDA and heat-induced nociceptive tests; it was found that intrathecal microinjection of OFQ in male, OVX, and diestrous (low estradiol) rats produced a significant antinociceptive effect on both tests. OFQ failed to produce antinociception in proestrous rats, the phase of the estrous cycle with the highest levels of circulating estradiol, and produced a dose-dependent effect in OVX females treated with 1 ng to 100 μ g of estradiol. OFQ was ineffective in GDX males, whereas testosterone replacement restored the antinociceptive effect of OFQ in GDX males. They concluded that ORQ produces sex-specific modulation of spinal nociception; estrogen attenuates antinociception in female in parallel with normal cycling of estrogen levels, and testosterone is required for the expression of antinociception in male⁶⁹.

In mice of both sexes lacking the estrogen receptor α and β in respective wild types, nociceptive responses to mechanical stimulation under normal conditions were assessed after inflammation of a hindpaw or peripheral nerve injury. They observed a sex difference in withdrawal threshold to mechanical stimulation in both sets of wild-type mice, with females exhibiting significantly lower response than males. This difference was seen in both strains of wild-type mice. Carrageenan-

induced inflammation of a hindpaw, all wild-type and knock-out mice exhibited similar local edema with no difference between sexes. Hypersensitivity (allodynia) to mechanical stimulation was developed in the wild-type mice, which was more profound in females than in males. Again, such sex difference was not observed in the knock-outs of either estrogen receptor. Photochemically induced partial sciatic nerve injury caused similar persistent mechanical hypersensitivity in the wild types and both estrogen receptor knock-outs with no difference between the sexes. These results suggested that sex difference in basal mechanical pain threshold and inflammatory hypersensitivity is eliminated in mice lacking either the estrogen α receptors or β receptors. However, these receptors do not seem to be directly involved in mediating pain sensitivity in general or in the development of neuropathic pain. It was not clear whether the elimination of sex differences observed in the knock-outs reflects an ongoing effect of estrogen acting through its receptors in females or the developmental changes that predominantly affect females⁷⁰.

Gonadal steroid hormones and opioid analgesia

The endogenous opioid neurotransmitters and μ opioid receptors are centrally implicated in responses to stress, in the suppression of pain, and in the action of opiate analgesic drugs⁷¹. Brain regional μ -opioid receptor concentrations have also been shown to differ between men and women, and may also be regulated by age and circulating gonadal steroids⁷².

Gonadal hormones and endogenous pain control are known to be interrelated. Receptors for opioids and gonadal steroids are colocalized on neurons in the central and peripheral nervous systems, and can modulate each other. Both α and β estrogen receptors are found on sensory neurons and in the CNS, and the endogenous opioid system is modulated by estrogen and testosterone⁷³.

Gonadal steroid hormones can influence sensitivity to analgesia during development of the organism (organizational effects) and/or during adulthood (activational effects)^{74,75}. There are numerous studies reporting that the variability in responses to opioids is attributable to subject-patient sex. Human experiments consistently show that μ opioids have increased potency in females⁷⁶. Some studies of sex differences in opioid analgesia showed that women given opioids have significantly greater analgesia than men after dental surgery⁷⁷.

The periaqueductal gray (PAG) and its descending projections to the rostral ventral medulla (RVM) and spinal cord dorsal horn constitute an essential neural circuit for opioid based analgesia, but the neural mechanisms underlying the sexually dimorphic actions of morphine remain poorly understood⁷⁸.

Including gender as an independent variable, it is almost clear that morphine does not produce the same degree of antinociception in male and female, especially following the induction of persistent pain⁷⁹. Interestingly, while animal studies show a tendency for opioids to act more efficaciously in male, human studies are less clear in the presence and direction of any sex effect⁷⁸.

PALMEIRA, ASHMAWI, POSSO

Human studies

Experimental and clinical data indicate the involvement of sex hormones in many pain syndromes, however, like animal studies, human studies have produced contradictory results regarding the effects of gonadal hormones on pain sensitivity.

Studying the influence of an individual gender role expectations of pain (GREP) on experimental pain report, female and male subjects underwent thermal testing and were asked to report pain threshold, pain tolerance, visual analogue scales (VAS) ratings of pain intensity and unpleasantness, and a computerized VAS rating of pain intensity during the procedure. This study revealed two primary findings. First, significant sex differences emerged for measures of pain threshold, pain tolerance, and pain unpleasantness. Second, after statistically controlling for age GREP scores were significant predictors of threshold, tolerance, and pain unpleasantness. Male indicated significantly greater pain endurance than females, while females reported greater willingness to report pain⁸⁰.

Another study evaluated how men and women differ in their response to interdisciplinary chronic pain management. Chronic pain patients who completed a series of measures relating to pain and distress at three different time points: immediately prior, on completion, and three months following an interdisciplinary pain management intervention were analyzed. The results showed that the pain management intervention produced improvements in a range of domains of outcomes for both men and women, such effects were sustained three months following treatment. However, complete reduction was only maintained at the 3-months follow-up time point in men. Women exhibited a return towards baseline levels on these three measures. This study suggested that gender plays a role in reports of pain and distress following interdisciplinary chronic pain management¹⁷. Interestingly is that there are inconsistencies in the results. Women, but not men, benefited more from an intervention^{81,82}, while in other study male patients with low back pain benefited most from physiotherapy and women benefited from back exercises⁸. Thus, although gender differences in treatment effect for pain and distress were found, more research is needed to determine whether such differences are of actual importance in terms of day-to-day performance.

Epidemiology, comorbidity, and impact on health-related quality of life of self-reported headache and musculoskeletal pain, from a gender perspective, were analyzed in a Swedish study²³. They studied prevalence of pain conditions, especially headache, and found that it was higher among women who also reported more severe pain. Comorbidity between pain conditions and psychiatric or somatic problems was higher among women. Health-related quality of life (HRQoL) differed by gender and type of pain condition. The physical dimensions of HRQoL were more affected by headache among men; psychological dimensions were more affected among women. In both sexes, pain conditions were associated with poorer socioeconomic conditions and life-style factors but there were gender differences.

Pain may be influenced by the menstrual cycle. While the mechanisms underlying these effects are unclear, it is possible that menstrual phase-related changes contribute to endogenous pain modulation. Studying the response to cold pressor, heat, and ischemic pain test in men and women, each woman was tested at three points in their menstrual cycle, the early follicular, late follicular, and luteal phases. Women were significantly more sensitive to cold pain, heat pain, and ischemic pain than men, however, pain perception during each task was not influenced by the menstrual cycle in women, nor did the menstrual cycle influence the magnitude of the gender differences in pain sensitivity⁸⁴. Another study evaluated the levels of sex hormones and pain sensitivity at different phases of a menstrual cycle in regularly menstruating women with fibromyalgia age-matched to healthy women. They showed that women with fibromyalgia had lower pain threshold and tolerance relative to healthy women throughout the menstrual cycle. The authors suggested that the disproportionate prevalence of females with fibromyalgia is not likely to be attributable to hormonal factors⁸⁵.

Many studies show that women are more sensitive to pain than men^{4,86,87}. Of the different types of experimental pain, pressure pain in particular seems to be sensitive to sex differences. In a meta-analysis of gender differences in pain report⁴, pressure pain had one of the highest effect sizes. In an experimental pain study that employed the mechanical pressure test in order to examine potential differences in pain report among men, normally menstruating women, and women taking monophasic oral contraceptives, the results demonstrated subtle menstrual-cycle effects in normally menstruating women and women taking monophasic oral contraceptives. Sex differences were few with more group differences and trends emerging between women taking oral contraceptives and men, as opposed to men and normally menstruating women⁸⁸.

The diversity of the gonadal hormones effects implies that regions of the brain outside the hypothalamus are involved. The hypothalamus has been the traditional site for the study of ovarian steroid receptors and their role in the control of reproductive function⁸². The association between supraphysiological levels of estradiol and response patterns to experimental pain was analyzed via quantitative sensory test (QST)⁸⁹. A repeated measures design was used on 31 women, treated with the same *in vitro* fertilization protocol. Interestingly, great pain response was associated only with supraphysiological levels of estradiol, no other differences in pain perception between the different hormonal levels were observed.

One factor that has been neglected in many previous studies is the effect of sex hormones on endogenous pain inhibitory mechanisms. Sex differences in pain perception may be due to hyperalgesia in women but could also be related to hypoactivity in women's pain inhibitory system. Diffuse noxious inhibitory control (DNIC), an endogenous pain control mechanism⁹⁰, is of particular interest since a deficit in DNIC is associated with the development of chronic pain⁹¹. In a study where the aim was to develop a simple experimental design that would enable to elicit and measure multiple nociceptive

SEX AND PAIN PERCEPTION AND ANALGESIA

mechanisms reported to play a role in the development and persistency of chronic pain, such as temporal summation (TS) and DNIC, eighty-three healthy subjects of both sexes were examined for pain perception. It was found that the mean pain ratings and peak pain but not TS were significantly reduced by DNIC. No sex differences were observed in DNIC analgesia⁹². Previous studies on sex difference in DNIC have yielded equivocal results: two studies have shown no sex differences in DNIC effectiveness^{93,94}, while four studies did show greater DNIC in men⁹⁵⁻⁹⁸. The divergence in these results may be explained by the use of different experimental designs and different methods to quantify DNIC effectiveness. Further research is needed in order to better understand endogenous pain inhibitory mechanism in men and women.

Trying to establish whether pain perception and DNIC vary across the menstrual cycle, the study of excitatory and inhibitory pain mechanisms during the menstrual cycle in healthy women, showed that significantly more pain inhibition (DNIC effectiveness) during the ovulatory phase occurs compared to the menstrual and luteal phases⁹. The main finding of their study was the observation that only inhibitory mechanisms (DNIC analgesia) and not excitatory pain mechanisms vary throughout the menstrual cycle. The mean reduction in pain intensity was greater during the ovulatory than the menstrual phase. They concluded that DNIC varies with menstrual cycle.

Recently, clinical studies in humans have also reported sex differences in morphine analgesia. Of the limited number of studies that examined gender or sex as an independent variable, it has been reported that males experience greater morphine analgesia compared to females^{99,100}. In fact, one study reported that females required 30% more morphine to reach the same level of analgesia as male⁹⁹. Sex influences analgesic responses to different drugs. K-receptor agonists appeared to be more potent analgesics in women than in men. After surgical removal of the third molar tooth, the k-opioid agonist pentazocine and other k-opioid agonists had significantly stronger analgesic effects in women than in men¹⁰¹. K-opioid agonists had an antianalgesic effect in men, increasing their postoperative pain^{77,102}. In another interesting study, women who had two variants of the melanocortin-1 receptor (Mc1r) gene, associated with red hair and fair skin, displayed altered k-opioid analgesia. They found that women with two variant Mc1r alleles displayed significantly greater analgesia from the k-opioid, pentazocine, than women without variants, while in men, pentazocine produced modest analgesia¹⁰³.

While it is clear that sex differences in opioid analgesia are not a simple and straightforward phenomenon, when sex differences are reported they are not trivial in magnitude¹⁰⁴.

Imaging studies of the brain have shown differences between men and women in the spatial pattern and intensity of response to acute pain. Brain activity in young women and

men in response to a painful stimulus (injection of hypertonic saline into the masseter muscle) and in response to carfentanil, a μ -receptor agonist, presents different patterns. The painful stimulus was injection of hypertonic saline into the masseter muscle, with the volume adjusted so that the response of women to pain was similar to that of men. Women were studied during the follicular phase of the menstrual cycle, when pain sensitivity is lowest, again so that their pain response would be similar to that of men. The results demonstrated that at equivalent levels of pain intensity, men and women differ in the magnitude and direction of response of the mu-opioid system in distinct brain nuclei⁷¹.

Examining both baseline mu-opioid receptor levels and the activation of this neurotransmitter system during sustained pain using positron emission tomography in a sample of young healthy men and women, women were studied twice, during low and high estrogen states. The high-estrogen state was associated with regional increases in baseline mu-opioid receptor availability *in vivo* and a greater activation of endogenous opioid neurotransmission during the pain stressor. The latter did not differ from that obtained in males. During the low estrogen conditions, however, significant reductions in endogenous opioid tone were observed at the level of thalamus, nucleus accumbens, and amygdala, which were associated with hyperalgesic responses. Estrogen-associated variations in the activity of mu-opioid neurotransmission correlated with individual ratings of the sensory and affective perceptions of the pain and the subsequent recall of that experience. It was demonstrated a significant role of estrogen in modulating endogenous opioid neurotransmission and associated psychophysical responses to a pain stressor in humans¹⁰⁵.

CONCLUSIONS

Pain perception is influenced by complex interactions between biological variables – gonadal hormones, genetics, pain circuitry pathways and CNS variation, and psychosocial variables – depression, anxiety, culture, sex role expectancies, social learning factors, pain related appraisal. There are substantial differences in these variables within individuals, and from the point of gonadal hormones and pain, the variability is profound.

This review is summary of an enormous and growing field. Both the animal and human literatures are rife with disagreement and conflicting findings within species and, more important, among species. More researches need to be done to elucidate the basic biological and psychosocial factors responsible for the differences that are described. These are important questions that should be analyzed not just for the joy of intellectual and scientific curiosity, but also to allow better therapy to our female and male patients.

Apêndice B - Submissão artigo

Elsevier Editorial System(tm) for Neuroscience
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Pain sensitivity after spinal nerve ligation in aged and young female rats

Article Type: Research Paper

Section/Category: Pain Mechanisms and Sensory Neuroscience

Keywords: Spinal nerve ligation; Aging; Gonadal hormones; Sex differences; Animal behavior; Wistar rats.

Corresponding Author: Dr.Med. Claudia Carneiro de Araujo Palmeira, M.D

Corresponding Author's Institution: Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo

First Author: Claudia Carneiro de Araujo Palmeira, M.D

Order of Authors: Claudia Carneiro de Araujo Palmeira, M.D; Gabriel M Guimarães, M.D; Carolina B Andrade, medical student, Faculdade de Medicina da Universidade; Irimar P Posso, M.D.,Ph.D; Hazem A Ashmawi, M.D, Ph.D

Abstract: In experimental and clinical pain studies, aging and female sex are rarely taken into account, even if nociceptive inputs appear to be processed and modulated by partially distinct neural mechanisms in each sex and throughout aging. In this study, we sought to determine how aging and female gonadal hormones affect mechanical hyperalgesia using L5 spinal nerve ligation as a neuropathic pain model in aged and young female rats. Animals were divided into five groups: aged female, ovariectomized (OVx) young females with 17 β -estradiol (E2) replacement, OVx young females without E2 replacement and aged and young orchiectomized male rats. Rats were tested for mechanical hyperalgesia in the plantar surface of the left hindpaw before nerve ligation and on days 7, 14, 21 and 28 after nerve ligation. Aged female rats were less hyperalgesic than the OVx young female rats that received E2 replacement at baseline and on post-operative day (POD)7 and POD21 and were less hyperalgesic than OVx young females without E2 replacement at POD7. Female OVx young rats with E2 replacement exhibited lower mechanical thresholds than OVx young rats without E2 replacement on days 7, 14, 21 and 28 after nerve ligation. These data suggest that 17 β -estradiol presented a pronociceptive effect in young female rats and that the withdrawal threshold did not differ with the aging process in this neuropathic pain model of spine nerve ligation.

Suggested Reviewers: Fernando Cervero
McGill University
fernando.cervero@mcgill.ca

Opposed Reviewers:

Cover Letter

São Paulo, June 3th, 2014.

Dear Editor,

We are submitting the manuscript: "Pain sensitivity after spinal nerve ligation in aged and young female rats", by Palmeira et al. In the study, we evaluated pain sensitivity after spinal nerve ligation in aged and young rats, focusing on female rats. Further, we explored the impacts of ovarian removal and estradiol replacement on nociception on young female.

I have read and have abided by the statement of ethical standards for manuscripts submitted to Neuroscience.

The importance of this study is due to the fact that few studies assess pain sensitivity with aging in females. Until 2005, around 79% of the studies used male rodents only (Mogil JS, Chanda ML. The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. *Pain* 2005; 117:1-5) and the situation has not changed so far (Mogil JS. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13:859-66). And no study on neuropathic pain in aged female rats has been published. We found interesting data concerning mechanical hyperalgesia in aged females which did not differ from aged male, a novel data and less hyperalgesia than young female, in our opinion related to the presence of estradiol.

The subfield of sex differences in pain is at an interesting juncture: some still doubt that there is anything to be studied, others are well into their search for underlying mechanisms and we tried to add the aging variable to this issue.

The manuscript consists of:

- Two figures
- One table
- 11 pages

We state that all the authors have read and approved the paper. We disclose any conflict of interest in this article.

- Description of how each author contributed to the manuscript:

- Claudia C A Palmeira – conception and design of the study, acquisition of data, analysis and interpretation of data, writing manuscript.
- Gabriel MN Guimarães – analysis and interpretation of data
- Carolina B de Andrade – acquisition of data
- Irimar P Posso – analysis and interpretation of data, writing manuscript
- Hazem A Ashmawi - conception and design of the study, acquisition of data, analysis and interpretation of data, writing the manuscript, final approval of the version to be submitted.

Best regards,

The authors

*Manuscript (Clear Copy)
[Click here to view linked References](#)

Pain sensitivity after spinal nerve ligation in aged and young female rats

Cláudia Carneiro de Araújo Palmeira^a, M.D., Gabriel Magalhães Nunes Guimarães^b, M.D., Carolina Bullara de Andrade^c, Irimar de Paula Posso^d, Hazem Adel Ashmawi^e

^aStaff of Pain Service, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

^bStaff of Department of Anesthesia, Hospital Universitário da Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

^cMedical student, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

^dFormer Associate Professor of Anesthesia of the Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

^eHead of the Pain Service, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo and Researcher of the Laboratório de Anestesiologia Experimental - LIM-08, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brazil.

The manuscript consists of:

- Two figures
- One table
- 11 pages

Corresponding author:
Cláudia Carneiro de Araújo Palmeira
Rua Sabará, 427 apto 82
01239-011, São Paulo, SP, Brazil
Phone: 55-11-96623-4337
email: ccapalmeira@usp.br or ccapalmeira@gmail.com

Abbreviations: OVx, ovariectomized; E2, 17 β -estradiol; POD, post-operative day.

Abstract

In experimental and clinical pain studies, aging and female sex are rarely taken into account, even if nociceptive inputs appear to be processed and modulated by partially distinct neural mechanisms in each sex and throughout aging. In this study, we sought to determine how aging and female gonadal hormones affect mechanical hyperalgesia using L5 spinal nerve ligation as a neuropathic pain model in aged and young female Wistar rats. Animals were divided into five groups: aged female, ovariectomized (OVx) young females with 17 β -estradiol (E2) replacement, OVx young females without E2 replacement and aged and young orchiectomized male rats. Rats were tested for mechanical hyperalgesia in the plantar surface of the left hindpaw before nerve ligation and on days 7, 14, 21 and 28 after nerve ligation. Aged female rats were less hyperalgesic than the OVx young female rats that received E2 replacement at baseline and on post-operative day (POD) 7 and POD 21 and were less hyperalgesic than OVx young females without E2 replacement at POD7. Female OVx young rats with E2 replacement exhibited lower mechanical thresholds than OVx young rats without E2 replacement on days 7, 14, 21 and 28 after nerve ligation. These data suggest that 17 β -estradiol presented a pronociceptive effect in young female rats and that the withdrawal threshold did not differ with the aging process in this neuropathic pain model of spine nerve ligation.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Keywords:

Spinal nerve ligation; Aging; Gonadal hormones; Sex differences; Animal behavior; Wistar rats.

Differences between men and women with respect to pain prevalence, pain behaviors and responses to treatments have long been noted, as have differences in pain throughout the aging process. A large body of data has been collected concerning differences between the sexes in terms of their responses to pain, including pain thresholds, pain tolerance and responses to pain treatments (Porreca et al., 1999; Racine et al., 2011). Epidemiological studies demonstrated higher prevalence of painful disorders such as migraine, temporomandibular joint disorder, fibromyalgia, arthritis, and interstitial cystitis, as well as higher susceptibility to nociceptive stimuli and more frequent use of analgesic medications in women than in men (Greenspan et al., 2007). However, the effects of sex on nociceptive processing and pain responsiveness have not been deeply investigated. The exact differences and their relevance remain unclear.

Sex differences in pain perception have been documented in the literature and have been demonstrated in clinical and experimental pain studies in humans (Porreca et al., 1999; Mogil and Bailey, 2010), and in animal models (Greenspan et al., 2007). Biological factors such as sex hormones are thought to be one of the important mechanisms underlying sex differences in pain perception.

Less is known about the effects of aging on pain. Experimental models on the effects of aging on pain perception remain largely unexplored. It is accepted that pain perception changes with the aging process; neuropathic pain increases with age (Majeed, 1992a, b; Kim et al., 1995; Crisp et al., 2003), and delayed muscle onset soreness (Taguchi et al., 2007) and responses to acute pain stimuli are prolonged in old rats (Pickering et al., 2002). Although the results demonstrate that neuropathic pain may increase with aging, most studies were performed in male young and old rats but not in female rats, justifying the need to address the issue of identifying eventual differences in pain perception in a neuropathic pain model in female rats.

This study aimed to compare mechanical hyperalgesia in aged female rats compared with aged male rats and young female rats in an L5 spinal nerve ligation model.

2. Experimental procedures

2.1 Animals and animal care

The experiments were performed after the approval from the Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP and according to the Committee for Research and Ethical Issues of the IASP (Zimmermann, 1983). All experiments were performed on Wistar male and female rats supplied by the breeding facilities of the University of São Paulo Faculty of Medicine. All behavioral experiments were conducted between 9:00 am and 3:00 pm. All animals, young and aged, were housed in cages with bedding and free access to food and water. Only aged animals in good health were used. Each cage contained two rats. The same experimenter, who was blinded to the group assignments, performed all of the behavioral testing described herein to minimize inter-experimenter variation. All surgical procedures were performed under general anesthesia with isoflurane induced in an induction cage and maintained with a nose mask at concentrations of 2 to 4% in 100% O₂.

2.2 Oophorectomy

Three-week-old female rats were anesthetized with 2-3% isoflurane and were then positioned and subjected to a midline incision. The ovaries were identified, and bilateral ligation of the oviducts was accomplished using 4-0 silk sutures. The oviducts were sectioned, and the muscles and skin were sutured using 4-0 mononylon sutures (adapted from Dina et al., 2007). At the end of anesthesia, each animal received 0.1 mg of SC morphine for postoperative analgesia. The sutures were removed after five days under general anesthesia.

2.3 17 β -estradiol replacement

1
2
3
4 Seven days after oophorectomy, 17 β -estradiol replacement began using 17 β -estradiol
5
6 conjugated pellets (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA), which were implanted into the
7
8 dorsal region, close to the neck. Each pellet contained 0.36 mg of 17 β -estradiol delivered continuously at
9
10 a rate of 6 μ g/day. Spinal nerve ligation was performed after 14 days of hormonal replacement.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2.4 Orchiectomy

Three-month-old rats under general anesthesia with isoflurane were placed in the supine position, and after local disinfection with iodopovidone, a 1-cm midline incision was made in the scrotum. Access to each testicle was accomplished through the *tunica vaginalis*, which was opened. After identification of the testis, the organ was removed along with the ipsilateral *vas deferens*. The procedure was performed on both testes, and the *tunica* and skin were sutured with 4-0 nylon thread. At the end of anesthesia, the animals received 0.1 mg of SC morphine for analgesia. Skin sutures were removed under general anesthesia five days after orchiectomy.

2.5 L5 Spinal nerve ligation

Under general anesthesia, the rats were placed in a prone position, and a trichotomy was performed in the lumbar region. The skin was incised; the paraspinal muscles were separated; and the L4, L5 and L6 spinous processes were identified. The L5 and L6 spinous processes were excised until the dorsal roots could be visualized. The left L5 dorsal root was ligated with 6-0 silk, and the root was sectioned 1 mm distal to the ligation. After achieving hemostasis, the incision was sutured using 4-0 mononylon. Before awakening from anesthesia, the animal received 0.1 mg of morphine SC for post-operative analgesia. The sutures were removed on the 5th day. On the days following surgery, animals exhibiting gait disorders were excluded. Withdrawal thresholds after mechanical stimuli were tested on the left hindpaw.

2.6 Mechanical hyperalgesia

Withdrawal latency was measured using an electronic von Frey anesthesiometer (Insight Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil). The rats were placed in a clear, elevated acrylic cage (21 x 27 x 15 cm) with a 12 x 12 mm nylon mesh floor that allowed clear access to the plantar surface of the right hind paw. A stimulus was applied, five times at 4-minute intervals, from underneath the floor through the mesh, perpendicular to the plantar surface of the left hindpaw, and the mean was calculated. A response was

defined as the withdrawal of the stimulated paw. A cutoff value of 60 g was used to prevent tissue damage.

Before all behavioral assessments, the animals were allowed to acclimate to the surroundings in the observation chamber for 20 minutes. The paw withdrawal threshold of the animals was tested after mechanical stimuli before nerve ligation and then on post-operative days 7, 14, 21 and 28 (POD7, POD14, POD21 and POD28) after nerve ligation. All animals were weighed before gonadal removal and on POD28, after which euthanasia was performed.

2.7 Experimental design

The animals were divided into five groups: orchiectomized young and aged males, aged females, ovariectomized (OVx) young females with E2 replacement and OVx young females without E2 replacement. Each group contained 8 to 10 animals.

2.8. Statistical analysis

All data were analyzed using Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Repeated measures ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test for comparisons within groups were used. Data are presented as the means $\pm$ SEM. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

All animals exhibited mechanical hyperalgesia following nerve ligation. Mechanical hyperalgesia lasted the entire 28 days of observation and was more intense in the first days of observation. Aged female rats exhibited less mechanical hyperalgesia than the young female rats that received E2 replacement at baseline (54.8 ± 4.3 vs. 45.1 ± 3.1), POD7 (24.2 ± 5.6 vs. 9.7 ± 2.9) and POD21 (24.3 ± 9.2 vs. 13 ± 4.1). Aged female rats were less hyperalgesic on POD7 than young females with no E2 replacement (24.2 ± 5.6 vs. 14.3 ± 4.4). Mechanical hyperalgesia was more intense in aged female rats than in aged male rats, but the difference did not reach statistical significance ($P = 0.09$) (Figure 1 and Table 1).

Young OVx rats without E2 replacement were less hyperalgesic than young OVx rats with E2 replacement at POD7 (14.3 ± 4.4 vs. 9.7 ± 2.9), POD14 (21.8 ± 4.6 vs. 13.9 ± 7.8), POD21 (28.3 ± 12.3 vs. 13 ± 4.1) and POD28 (30.5 ± 8.8 vs. 17.4 ± 4.3) (Figure 1 and Table 1).

Young female rats gained weight throughout the observation period as a result of their ovariectomies. Rats without E2 replacement exhibited a greater increase in weight than rats with E2 replacement. Aged animals lost weight throughout the experiment; the weight loss in the aged male rats was more intense than that in the aged female rats (Figure 2).

4. Discussion

In this study, we evaluated pain sensitivity after spinal nerve ligation in aged and young rats, focusing on female rats. Further, we explored the impacts of ovarian removal and estradiol replacement on nociception to provide normalized behavioral data.

Numerous studies on both animal and human subjects have demonstrated the potential effects of gonadal hormones, such as estrogens, on pain processing, but the literature can be contradictory (Amandusson and Blomqvist, 2013). Studies on neuropathic pain usually use young male rats (Jasmin et al., 1998; Porreca et al., 1999; Robinson and Meert, 2005; Obara et al., 2009; Miller et al., 2013; Acosta et al., 2014). One reason for the preference for males is related to the fact that gonadal hormone variation is absent when compared with young females due to the estrous cycle. However, one study addressed the role of gonadal hormones in females in an ethanol-induced neuropathic pain model (Dina et al., 2007). The effect of aging on pain processing has also been studied almost exclusively in males (Pickering et al., 2002; Crisp et al., 2003; Leite-Almeida et al., 2009), and the effects of aging in female rats are not yet understood.

Aged female rats exhibited less mechanical hyperalgesia when compared with young females, and this difference was larger when compared with young females receiving E2 replacement. Young female rats without hormone replacement exhibited lower withdrawal thresholds than aged female rats only on the seventh day after spinal nerve ligation. This fact could be explained by an estradiol

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

activational pronociceptive effect that persists after ovariectomy and decreases with time (LaCroix-Fralish et al., 2005). It is difficult to attribute the difference between aged and young females to age. Mechanical hyperalgesia in young females receiving hormone replacement lasted throughout the entire period of observation, and it is probable that estradiol is more important in nociception than the aging process. Unfortunately, it is difficult to compare our data in aged females due to the lack of studies on neuropathic pain in female aged rats.

In aged male rats, neuropathic pain seems to change with aging, increasing mechanical hyperalgesia (Kim et al., 1995) and thermal hyperalgesia (Crisp et al., 2003) and decreasing neuropathic pain in very old rats (Pickering et al., 2002). We compared aged male and female animals. To compare only sex, excluding the variable of gonadal hormones, the comparison was between orchiectomized aged male and aged female rats, which undergo menopause by 16 months of age (Sone et al., 2007); in both groups, gonadal hormone levels were low. This result suggests that pain perception after spinal nerve ligation is not influenced by sex in aged rats.

In our study, one aspect of the aging process was not controlled: the boredom of animal life in a cage or non-enriched environment for long periods (Olsson and Dahlborn, 2002). This boredom could affect the animals' performance after long durations in cages. However, it seems that although enriched environments increase life span expectancy, they do not affect scores in behavioral pain tests (Altun et al., 2007).

This study is the first to address the effects of aging in female rats using behavioral pain models. The finding of less intense mechanical hyperalgesia in a spinal nerve ligation model in aged females brings a new perspective to the effect of aging on pain sensitivity in this sex.

The importance of this study is due to the fact that few studies assess aging on pain sensitivity in females, most of the papers published, around 79% of the experiments used male rodents only (Mogil and Chanda, 2005), and there are very few studies that assessed the presence of estradiol in neuropathic pain in aged female,

Conflict of interest

We certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material reported in the manuscript.

References

- Acosta C, Djouhri L, Watkins R, Berry C, Bromage K, Lawson SN (2014) TREK2 expressed selectively in IB4-binding C-fiber nociceptors hyperpolarizes their membrane potentials and limits spontaneous pain. *J Neurosci* 34:1494-1509.
- Altun M, Bergman E, Edström E, Johnson H, Ulfhake B (2007) Behavioral impairments of the aging rat. *Physiol Behav* 92:911-923.
- Amandusson Å, Blomqvist A (2013) Estrogenic influences in pain processing. *Front Neuroendocrinol* 34:329-349.
- Crisp T, Giles JR, Cruce WL, McBurney DL, Stuesse SL (2003) The effects of aging on thermal hyperalgesia and tactile-evoked allodynia using two models of peripheral mononeuropathy in the rat. *Neurosci Lett* 339:103-106.
- Dina OA, Gear EW, Messing RO, Levine GD (2007) Severity of alcohol-induced painful peripheral neuropathy in female rats: role of estrogen and protein kinase (A and C). *Neuroscience* 145:350-356.
- Greenspan JD, Craft RM, LeResche L, Arendt-Nielsen L, Berkley KJ, Fillingim RB, Gold MS, Holdcroft A, Lautenbacher S, Mayer EA, Mogil JS, Murphy AZ, Traub RJ (2007) Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. *Pain* 132 Suppl 1:S26-45.
- Jasmin L, Kohan L, Franssen M, Janni G, Goff JR (1998) The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain* 75:367-382.
- Kim WY, Na HS, Yoon YW, Nahm SH, Ko KH, Hong SK (1995) Mechanical allodynia is more strongly manifested in older rats in an experimental model of peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 199:158-160.
- LaCroix-Fralish ML, Tawfik VL, DeLeo JA (2005) The organizational and activational effects of sex hormones on tactile and thermal hypersensitivity following lumbar nerve root injury in male and female rats. *Pain* 114:71-80.

- Leite-Almeida H, Almeida-Torres L, Mesquita AR, Pertovaara A, Sousa N, Cerqueira JJ, Almeida A (2009) The impact of age on emotional and cognitive behaviours triggered by experimental neuropathy in rats. *Pain* 144:57-65.
- Majeed SK (1992a) Survey on spontaneous peripheral neuropathy in aging rats. *Arzneimittelforschung* 42:1372-1376.
- Majeed SK (1992b) Survey on spontaneous peripheral neuropathy in aging rats. *Arzneimittelforschung* 42:986-990.
- Miller TR, Wetter JB, Jarvis MF, Bitner RS (2013) Spinal microglial activation in rat models of neuropathic and osteoarthritic pain: an autoradiographic study using [3H]PK11195. *Eur J Pain* 17:692-703.
- Mogil JS, Bailey AL (2010) Sex and gender differences in pain and analgesia. *Prog Brain Res* 186:141-157.
- Mogil JS, Chanda ML (2005) The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. *Pain* 117:1-5.
- Obara I, Parkitna JR, Korostynski M, Makuch W, Kaminska D, Przewlocka B, Przewlocki R (2009) Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain* 141:283-291.
- Olsson IA, Dahlborn K (2002) Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Lab Anim* 36:243-270.
- Pickering G, Jourdan D, Eschalir A, Dubray C (2002) Impact of age, gender and cognitive functioning on pain perception. *Gerontology* 48:112-118.
- Porreca F, Lai J, Bian D, Wegert S, Ossipov MH, Eglen RM, Kassotakis L, Novakovic S, Rabert DK, Sangameswaran L, Hunter JC (1999) A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaV/SNS2, in rat models of chronic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7640-7644 Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 7696:10548.
- Racine M, Tousignant-Laflamme Y, Kloda LA, Dion D, Dupuis G, Choinire M (2011) A systematic literature review of 10 years of research on sex/gender and pain perception- part 1: are there really differences between women and men? *Pain* 153:602-618.

Robinson I, Meert TF (2005) Stability of neuropathic pain symptoms in partial sciatic nerve ligation in rats is affected by suture material. *Neurosci Lett* 373:125-129.

Sone K, Yamamoto-Sawamura T, Kuwahara S, Nishijima K, Ohno T, Aoyama H, Tanaka S (2007) Changes of estrous cycles with aging in female F344/n rats. *Exp Anim* 56:139-148.

Taguchi T, Matsuda T, Mizumura K (2007) Change with age in muscular mechanical hyperalgesia after lengthening contraction in rats. *Neurosci Res* 57:331-338.

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

Legends for figures**Figure 1. Withdrawal thresholds after mechanical stimulus in L5 spinal nerve ligation model.**

Withdrawal thresholds were higher in aged female rats on baseline, POD7 and POD21 compared to OVx young females with E2 replacement. Aged female rats presented lower withdrawal thresholds on POD7 compared to OVx young females without E2 replacement. OVx young females with E2 replacement presented lower withdrawal thresholds than OVx young females without E2 replacement on POD7, 14, 21 and 28. Each group contained 8 to 10 animals. Data presented as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, for comparisons between OVx young females with E2 replacement and OVx young females without E2 replacement, ** $p < 0.05$ for comparisons between aged female rats and OVx young females without E2 replacement. # $p < 0.05$ for comparisons between aged female rats and OVx young females with E2 replacement.

Figure 2. Difference in weight during the period of observation. Weight gain in female rats without E2 replacement was greater than in rats with E2 replacement. Weight loss in aged male rats was more intense than in aged female rats. Data presented as mean $\pm$ SEM.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

#

Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

***Highlights (for review)**

We sought to determine how aging and female gonadal hormones affect mechanical hyperalgesia using a neuropathic pain model. We explored the impacts of ovarian removal and estradiol replacement on nociception on young female, we added the aging variable. Aging and female sex are understudied in pain. Estradiol replacement increased nociception in young female and mechanical hyperalgesia did not differ with aging in neuropathic pain.

Author declaration template
[Click here to download high resolution image](#)

AUTHOR DECLARATION TEMPLATE

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

We confirm that we have given due consideration to the protection of intellectual property associated with this work and that there are no impediments to publication, including the timing of publication, with respect to intellectual property. In so doing we confirm that we have followed the regulations of our institutions concerning intellectual property.

We understand that the Corresponding Author is the sole contact for the Editorial process (including Editorial Manager and direct communications with the office). She is responsible for communicating with the other authors about progress, submissions of revisions and final approval of proofs. We confirm that we have provided a current, correct email address which is accessible by the Corresponding Author and which has been configured to accept email from ccpalmeira@gmail.com or ccpalmeira@usp.br.

Signed by all authors as follows:

Date – June, 9th 2014

Cláudia Carneiro de Araújo Palmeira
Gabriel Magalhães Nunes Guimarães
Carolina Bullara de Andrade
Irimar de Paula Posso
Hazem Adel Ashmawi