LUCIANA DE BRITTO PEDROSO

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

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profª Drª. Yara Cury

Versão Original

São Paulo
2011

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

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

semelhante a dos machos, efeito que foi revertido pela reposição hormonal. A OVX não interferiu com o efeito antinociceptivo da crotalfina.

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

ABSTRACT

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

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

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

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

1 Introdução

1.1 Crotalfina

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

Figura 1 - Seqüência de aminoácidos da crotalfina

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Dor

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Fármacos Opióides

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6 Conclusão

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

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GUTIERREZ, V. et al. Efeito do veneno de Crotalus durissus terrificus sobre a dor neuropática. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA, 35., 2003,

Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Farmacologia, 2003. p.144.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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