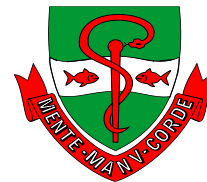




FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CRISTINA GOMES DE MACEDO

**Mecanismos opióides centrais envolvidos no efeito protetor da
testosterona no desenvolvimento da dor da ATM em ratos.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção de Título de Mestre em
Odontologia, Área de Fisiologia Oral.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia H. Tambeli

**Este exemplar corresponde à
versão final da dissertação
defendida pela aluna, e orientada
pela Profa. Dra. Claudia Herrera Tambeli**

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

M151m Macedo, Cristina Gomes de.
Mecanismos opióides centrais envolvidos no efeito protetor da testosterona no desenvolvimento da dor da ATM em ratos / Cristina Gomes de Macedo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Claudia Herrera Tambeli.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Receptores opióides. 2. Dor. I. Tambeli, Claudia Herrera, 1969- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Central mu- kappa opioid receptor cooperativity mediates the protective effect of testosterone on temporomandibular joint nociception development in rats

Palavras-chave em Inglês:

Receptors, opioid

Pain

Área de concentração: Fisiologia Oral

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Claudia Herrera Tambeli [Orientador]

Luciane Lacerda Franco Rocha Rodrigues

Gilson César Nobre Franco

Data da defesa: 27-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata CRISTINA GOMES DE MACEDO aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Cláudia", written over a horizontal line.

Profa. Dra. CLÁUDIA HERRERA TAMBELI

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Luciane Lacerda Franco Rocha Rodrigues", written over a horizontal line.

Profa. Dra. LUCIANE LACERDA FRANCO ROCHA RODRIGUES

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Gilson César Nobre Franco", written over a horizontal line.

Prof. Dr. GILSON CÉSAR NOBRE FRANCO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz e Eugênia, pelo amor incondicional;

Aos meus filhos Luiz Felipe, Alexandre e Henrique, a existência de vocês é o verdadeiro significado de minha vida;

Ao meu grande amor, Antonio.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora Profa. Dra.,

Claudia Herrera Tambeli, pelo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência, muito obrigada;

A minha amiga,

Nádia Cristina Fávaro, pelos conselhos, disposição e por tudo que me ensinou com tanta paciência, muito obrigada;

A Profa. Dra.,

Dagmar de Paula Queluz, pelas oportunidades, incentivo, carinho e dedicação, muito obrigada;

A Profa. Dra.,

Juliana Trindade Clemente Napimoga, pelo acolhimento, pelos ensinamentos ministrados com tanta competência, muito obrigada;

Aos funcionários e amigos,

Carlos Alberto A. Feliciano, Eliete Righetto e Maria Eliza dos Santos, sem vocês teria sido muito difícil e em algumas horas impossível, muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Prof. Dr. Jacks Jorge Junior (Diretor);

Especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela oportunidade;

Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga, pelas orientações e conselhos;

Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes, por tudo que nos ensinou e pelo apoio nos momentos difíceis;

A todos os meus amigos e amigas da pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, que sempre estiveram presentes nos bons e maus momentos com carinho e dedicação;

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, pelas aulas ministradas e pelo exemplo de dedicação à pesquisa;

Aos funcionários da biblioteca pela competência com que conduzem seus trabalhos;

A todos os professores associados e ou convidados da Faculdade de Odontologia de Piracicaba que compartilharam seus conhecimentos;

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP, que direta ou indiretamente colaboraram com o meu aprendizado;

E a todos que porventura não citei nominalmente aqui e que colaboraram na execução desta dissertação expresse o meu profundo agradecimento.

EPÍGRAFE

“Seu trabalho vai ocupar uma grande parte da sua vida, e a única maneira de estar verdadeiramente satisfeito é fazendo aquilo que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um ótimo trabalho é fazendo o que você ama fazer.”

Steve Jobs

RESUMO

Disfunções temporomandibulares são condições dolorosas que envolvem a articulação temporomandibular e os músculos mastigatórios com maior prevalência, severidade e duração no sexo feminino. Recentemente foi demonstrado que a testosterona apresenta um efeito protetor ao diminuir o risco de ratos desenvolverem dor na Articulação Temporomandibular (ATM), o que explica pelo menos em parte, a menor prevalência de dor no sexo masculino. No entanto, o mecanismo através do qual a testosterona induz o efeito protetor em machos não é conhecido. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar se o efeito protetor da testosterona é mediado pela ativação do sistema opióide endógeno no sistema nervoso central e quais os subtipos de receptores opióides estão envolvidos nesse efeito protetor sobre o desenvolvimento de dor na ATM em ratos. Para o procedimento experimental foram usados ratos machos Wistar (230-300 g), intactos, gonadectomizados (Gx) e sham gonadectomizados (sham Gx) e a injeção de formalina 0,5% na ATM foi usada como estímulo nociceptivo. Para testar o envolvimento de um mecanismo neural central dependente da ativação do sistema opióide, os animais receberam injeção de naloxona, antagonista não seletivo de receptores opióides, CTOP, Naltrindole e Nor-BNI, antagonistas opióides seletivos para os subtipos de receptores opióides mu (μ), delta (δ) e capa (κ), respectivamente na região do núcleo sensorial trigeminal, antes do teste da formalina na ATM. A administração da Naloxona (15 μ g) antagonista não seletivo ou a combinação dos antagonistas de receptor μ opióide CTOP (30 μ g/10 μ l) mais o de receptor κ opióide Nor- BNI (90 μ g/10 μ l) aumentou significativamente a nocicepção induzida pela formalina 0,5% na ATM em ratos sham Gx, mas não em ratos Gx (31.09%, n = 6 e 26,9%,

n = 6; respectivamente) A resposta de ratos intactos a estes tratamentos foi semelhante à de ratos sham Gx. Em contraste, a administração de cada antagonista de receptores opióides sozinhos ou a combinação de CTOP (30µg/10µl) mais o antagonista do receptor delta opióide Naltrindole (90µg/10µl) ou de Nor-BNI (90µg/10µl) mais Naltrindole (90µg/10µl) não afetou a nocicepção induzida pela formalina 0,5% em ratos Gx, intactos e sham Gx. Estes resultados sugerem que o efeito protetor da testosterona no desenvolvimento da dor na ATM depende da liberação de opióides endógenos e a subsequente ativação dos receptores opióides mu e kappa no sistema nervoso central. Conclui-se que a ativação individual dos subtipos de receptores é insuficiente enquanto que a co-ativação dos receptores opióides mu e kappa é necessária para mediar o efeito protetor da testosterona.

Palavras-chave: Testosterona; Receptores opióides; Articulação Temporomandibular; Formalina; Nocicepção; Dor.

ABSTRACT

Temporomandibular Joints (TMJ) dysfunctions are painful conditions involving the masticatory muscles and temporomandibular joint with higher prevalence, severity and duration in females. Recently it was shown that testosterone has a protective effect by reducing the risk of rat develop pain in TMJ, which explains at least in part, the lower prevalence of pain in males. However, the mechanism through which the testosterone induces protective effect in males is not known. Thus, the aim of this study was to investigate whether the protective effect of testosterone is mediated by activation of endogenous opioid system in the central nervous system and what subtypes of opioid receptors are involved in this protective effect on the development of TMJ pain in rats. For the experimental procedure Intact, gonadectomized and sham Wistar (230-300g) male rats were used and all experimental procedures were approved by the Ethics Committee in Animal Research at the UNICAMP. The TMJ injection of 0.5% formalin was used as a nociceptive stimulus. The nociceptive behavior was quantified for 45 minutes and used as a quantitative nociceptive behavior measure that was defined as the cumulative total number of seconds that the animal spent rubbing the orofacial region asymmetrically with the ipsilateral fore or hind paw plus the number of head flinches counted during the observation period. Administration of the opioid receptor antagonist naloxone 15 mg or the combination of the mu-opioid receptor antagonists CTOP (30µg/10µl) plus the kappa-opioid receptor antagonist nor-binaltorphimine (90µg/10µl), significantly increased TMJ 0.5% formalin-induced nociception in sham (31.09%, n=6 and 26.9%, n=6; respectively) but not in gonadectomized rats. The response of intact rats to these treatments was similar

to that of sham rats. In contrast, the administration of each opioid receptor antagonist alone or the combination of CTOP (30µg/10µl) plus the delta-opioid receptor antagonist Naltrindole (90µg/10µl) or of Nor-binaltorphimine (90µg/10µl) plus Naltrindole (90µg/10µl) did not affect TMJ 0.5% formalin-induced nociception in intact, sham and gonadectomized rats. These findings suggest that the protective effect of testosterone on TMJ pain development depends on the release of endogenous opioids and on the subsequent activation of mu and kappa opioid receptors in the central nervous system. The conclusion is that the selective activation of individual receptor subtypes is insufficient while the co-activation of μ and κ opioid receptors is necessary to mediate the protective effect of testosterone.

Key words: Testosterone; Opioid receptors; Temporomandibular Joint; Formalin; Nociception; Pain

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO1: Central μ/κ -opioid receptor cooperativity mediates the protective effect of testosterone on temporomandibular joint nociception development in rats.	10
CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS.	33
ANEXOS	38

INTRODUÇÃO

A Disfunção Temporomandibular (DTM) constitui em uma condição na qual há uma desarmonia no sistema estomatognático, podendo ocorrer envolvimento e prejuízo nos músculos mastigatórios, na ATM propriamente dita, ou em ambos (Okeson, 1997; Quinto, 2000; Vazquez-Delgado *et al.*, 2004; Leeuw, 2010). A etiologia da DTM é considerada complexa e multifatorial por envolver fatores de origem anatômica, oclusal, muscular e psicológica. É caracterizada pela presença de sinais e sintomas como ruídos articulares, redução da amplitude ou alteração dos movimentos mandibulares, limitações funcionais, dores na musculatura mastigatória, na região pré-auricular e/ou na própria articulação (Garcia *et al.*, 2000; Ash *et al.*, 2001; Ozan *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2007). Na região orofacial, correspondem à condição de dor crônica de maior prevalência, e parecem ser até duas vezes mais comuns em mulheres que em homens (Lund *et al.*, 2001; Leeuw, 2010) e esses dados sugerem que os hormônios sexuais atuam modulando a dor na ATM.

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. A sensação dolorosa tem papel fisiológico e funciona como um sinal de alerta para percepção de algo que está ameaçando a integridade física. Uma vez instalada a injúria pode se introduzir o conceito de dor patológica que, segundo sua origem, pode ser classificada como nociceptiva (somática ou visceral) ou neuropática. A dor pode também ser classificada segundo determinação temporal em dor aguda ou crônica. (Rocha *et al.*, 2007).

O componente sensorial da dor corresponde a nocicepção e consiste de três fases, transdução, transmissão e modulação. Transdução é a transformação do estímulo nociceptivo, captado por terminações nervosas periféricas que o transformam em sinais elétricos. Transmissão é a propagação dos impulsos elétricos através de fibras sensoriais de dois tipos A δ e C polimodais. Modulação refere-se à alteração do estímulo no corno dorsal da medula espinhal, por meio de vias opioidérgicas, serotoninérgicas e noradrenérgicas. A combinação destas três fases de percepção, ou nocicepção, estimula o sistema nervoso central à consciência da dor (Sessle, 2000; Lund *et al.*, 2001).

O estímulo nociceptivo é transformado em potencial de ação no receptor de dor no nervo periférico sensitivo e propagado ao sistema nervoso central para, então, ocorrer sua integração cortical e identificação como dor. Os receptores específicos para dor estão localizados nas terminações de fibras nervosas A- δ e C. Quando ativados, esses receptores sofrem alterações em sua membrana, com abertura de canais de sódio e rápida entrada de sódio, despolarizando a membrana celular e deflagrando o estímulo e sua propagação. Nesse processo, os nociceptores são sensibilizados por substâncias químicas tidas como algioênicas, tais como: prostaglandinas (PGE₂), serotonina, acetilcolina, adenosina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrienos, substância P, fator de ativação plaquetário, radicais ácidos, íons potássio, tromboxane, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF α), fator de crescimento do nervo (NGF) e monofosfato cíclico de adenosina (AMPC). Esses estímulos são conduzidos através de fibras nervosas (fibras A- δ e C) até o corno dorsal da medula espinal, onde realizam sinapses com interneurônios medulares, podendo ser modulados por peptídeos opióides. Da medula espinal, os estímulos dolorosos percorrem os tratos espinotalâmicos e espinorreticulares, alcançando estruturas nervosas

centrais (formação reticular, tálamo, sistema límbico, córtex cerebral), onde são modulados novamente via receptores opióides (Andrade, 2000).

A interpretação do estímulo doloroso é individual e sofre influência dos padrões culturais, do medo e ansiedade e das experiências dolorosas prévias. A partir dessa percepção da dor pelo SNC, são obtidas as respostas motoras, autonômicas e comportamentais. (Thurmon *et al*, 1999; Teixeira, 2001; Ferreira, 2002; Tranquilli, 2004; Klaumann *et al.*, 2008).

A modulação central da dor é mediada pelos sistemas analgésicos endógenos descendentes (opióide, serotoninérgico e noradrenérgico) que modulam a nocicepção ao longo da via nociceptiva ascendente (Harlan *et al.*, 2002; Yoshimura *et al.*, 2006). Essas vias descendentes controlam a transmissão de impulsos dolorosos (relacionados com a sensação de dor) no corno posterior da medula espinal. A sinapse entre aferentes primários e neurônios no interior do complexo trigeminal do tronco encefálico representa outro importante local para modulação da dor. Os terminais centrais das fibras nociceptivas C também possuem receptores opióides que, uma vez estimulados, suprimem a produção de neuromoduladores algôgenicos e de neurotransmissores. Os opióides estão envolvidos tanto em componentes ascendentes quanto descendentes da modulação da dor (Stamford, 1995).

Receptores de peptídeos opióides estão distribuídos por todo o SNC, incluindo o hipocampo; uma das áreas cerebrais de grande importância nos processos de memória, resposta ao estresse e recompensa. Os peptídeos opióides são os neurotransmissores e neuromoduladores naturais da dor constituindo o sistema de controle endógeno da dor (Volpato, 2008). Os peptídeos opióides endógenos consistem de três grupos principais:

encefalinas, beta-endorfinas e dinorfinas. Ambos os opióides endógenos e exógenos produzem analgesia através da ligação a receptores opióides específicos que bloqueiam a liberação de neurotransmissores excitatórios. Os receptores opióides pertencem a uma superfamília de receptores acoplados à proteína G e são observados em áreas correlacionadas com a percepção da dor (lâminas I, II e V), a modulação do comportamento afetivo (amígdala, hipocampo, *locus coeruleus* e córtex) e a regulação do sistema nervoso autônomo e funções neurodegenerativas (bulbo e hipotálamo) (Harlan *et al*, 2002).

Os opióides endógenos podem ser liberados após estímulos dolorosos, agindo em vários receptores opióides mu (μ), delta (δ) e kappa (κ) de modo a suprimir as respostas nociceptivas na periferia, na medula espinhal e no cérebro. Um dos efeitos dos opióides é inibir a liberação de neurotransmissores excitatórios locais (Schaible, 2006). A ativação dos receptores opióides apresenta inúmeras conseqüências: inibição da atividade da adenilciclase levando a uma redução da concentração intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), a abertura dos canais de K⁺, causando a hiperpolarização do neurônio nociresponsivo, com conseqüente redução da excitabilidade e o bloqueio da abertura dos canais de Ca⁺⁺ voltagem – dependentes, inibindo a liberação do glutamato e da substância P pelos terminais aferentes primários. Estes mecanismos explicam o bloqueio opióide da liberação de neurotransmissores e na transmissão da dor em várias vias neuronais (Andersen *et al*, 2004; Becker *et al*, 2004). O sistema de modulação opióide não é exclusivamente central, apresenta componentes periféricos. Foram encontrados receptores opióides nos macrófagos, mastócitos, nos gânglios trigeminais e espinhais, e nas fibras sensitivas que inervam nociceptores (Binder, 2001).

Durante a última década, várias pesquisas têm demonstrado diferenças sexuais na percepção e modulação da dor, bem como na resposta à ativação do sistema opióide e seus efeitos analgésicos. Há evidências que as mulheres têm menor limiar que os homens para alguns estímulos álgicos embora pareçam ser mais sensíveis aos efeitos analgésicos e colaterais decorrentes da administração sistêmica de medicamentos analgésicos (Gordon *et al.*, 1995; Gear *et al.*, 1996a; Gear *et al.*, 1996b; Larijani *et al.*, 2004, Craft & Ulibarri, 2009). As diferenças entre homens e mulheres, quanto ao metabolismo, estrutura física, e variações hormonais podem influenciar os mecanismos biológicos da transmissão dolorosa, da sensibilidade dolorosa, e da percepção à dor (Unruh, 1996).

Demonstrou-se, também, que as concentrações regionais dos receptores opióides *mu* no cérebro diferem em homens e mulheres e também podem ser regulados pela idade e pelos esteróides gonadais circulantes (Zubieta *et al.*, 2002). Sabe-se que os hormônios gonadais e o controle endógeno da dor estão relacionados. Os receptores para os neuropeptídios opióides e hormônios esteróides gonadais estão localizados em neurônios no sistema nervoso central e periférico e podem modular uns aos outros (Wiesenfeld-Hallin, 2005).

Os hormônios esteróides gonadais são produzidos pelos ovários e os testículos (gônadas). Os principais produtos dos testículos são os androgênios especificamente a testosterona e a diidrotestosterona, enquanto os ovários produzem dois tipos de hormônios: os estrógenos e progesterona. Os androgênios também são produzidos pelo córtex adrenal e são liberados em resposta ao hormônio adrenocorticotrófico. A testosterona é precursora do estradiol e, portanto, os ovários também sintetizam testosterona e os testículos também

produzem alguns estrógenos, já que o estradiol é um metabólito da testosterona (Kohn, 2006).

No organismo masculino, a testosterona é o esteróide sexual endógeno mais abundante, e é considerado o hormônio testicular fundamental. Na mulher, estes hormônios também são produzidos, entretanto em menores quantidades, pelas glândulas supra-renais. No homem, as células testiculares secretoras de testosterona são denominadas células intersticiais de Leydig e são estimuladas pelo hormônio luteinizante (LH) hipofisário (Marques *et al.*, 2003).

Os hormônios gonadais promovem a diferenciação sexual. Esta diferenciação sexual do sistema nervoso pode ser dividida em duas fases: organizacional e ativacional dos hormônios sexuais. A primeira é caracterizada como período crítico, que ocorre logo após o nascimento, onde circuitos neurais específicos de cada sexo são consolidados, a testosterona circulante durante os primeiros dias de vida medeia a diferenciação sexual do sistema nervoso, induzindo mudanças morfológicas permanentes que irão se refletir durante a vida adulta. A segunda é quando o indivíduo, na fase adulta, requer os hormônios sexuais para ativar os circuitos e proporcionar o desencadeamento dos aspectos fisiológicos da função reprodutiva e produzir ações temporárias e reversíveis, desencadeando uma dada resposta somente na presença do hormônio apropriado (Borzan & Fuchs, 2006; Sakuma, 2009).

O efeito protetor da testosterona sobre o sistema nociceptivo em machos foi apoiado por alguns estudos clínicos, demonstrando que baixos níveis de testosterona podem contribuir para o desenvolvimento e a manutenção de algumas condições de dor (Morales *et al.*, 1994; Stoffel *et al.*, 2005) e ratos submetidos a estímulos nociceptivos

repetitivos, a testosterona induz adaptação progressiva com diminuição das respostas nociceptivas (Aloisi *et al.*, 2003).

Foi demonstrado que a injeção de formalina em uma concentração de 0,5%, que é insuficiente para nocicepção, induziu um comportamento nociceptivo em ratos machos gonadectomizados e fêmeas intactas, mas não em ratos machos intactos sugerindo que a testosterona possui um efeito protetor em machos, diminuindo seu risco de desenvolver dor na ATM (Fischer *et al.*, 2007). Esses resultados sugerem que o efeito protetor observado nos machos intactos é devido à testosterona e apesar deste hormônio estar presente em ambos os sexos, a sexo-especificidade do seu efeito protetor no sexo masculino não é surpreendente, uma vez que os níveis de testosterona circulante nas fêmeas são normalmente cerca de 10% daqueles observados em machos (Evans, 2004).

O modelo de dor da formalina (nociceptiva e inflamatória) é amplamente utilizado no estudo das diferenças sexuais na percepção de dor (Palmeira *et al.*, 2011). Em um estudo de reposição hormonal realizado em ratos fêmeas e machos gonadectomizados para observar os efeitos dos hormônios sexuais nas fases excitatória e inibidora das respostas nociceptivas induzidas pela formalina, observou-se que a testosterona tinha efeito hipoálgico nas fases I e II do teste de formalina e que os hormônios femininos atuavam apenas na interfásica: os resultados levaram a acreditar que a testosterona desempenha papel protetor na percepção de dor (Gaumond *et al.*, 2005).

Posteriormente em novo estudo de Fischer *et al.* (2009) foi demonstrado que o efeito antinociceptivo da testosterona suprafisiológica é mediado pela ativação do sistema opióide endógeno, possivelmente na região do núcleo do trato espinhal trigeminal, uma vez que foi possível inibir o efeito antinociceptivo da testosterona por meio da injeção

subaracnóide de naloxona (antagonista de receptores opióides) em ratos machos intactos. Portanto neste contexto o efeito protetor da testosterona no **desenvolvimento** da dor na ATM em ratos poderia ser mediado pelo sistema opióide na região do núcleo espinal trigeminal, mais especificamente no subnúcleo caudal, que é o correspondente trigeminal do corno dorsal da medula espinal.

O complexo trigeminal do tronco cerebral pode ser subdividido em núcleo sensorial principal e núcleo do trato espinal. Este último é constituído por três subnúcleos: oral, interpolar e caudal (Sessle, 1996). O subnúcleo caudal é o subnúcleo que está localizado na porção mais inferior do núcleo do trato espinhal, estendendo-se até o corno dorsal da medula espinhal cervical, fundindo-se com a mesma. É a principal estação de transmissão da informação nociceptiva proveniente da região orofacial. Os neurônios nociceptivos do subnúcleo caudal apresentam uma extensa convergência de fibras nervosas aferentes, sendo estas provenientes da pele e da mucosa (tecidos superficiais), e da ATM, músculos mastigatórios, língua e da dura-máter (Lund *et al.*, 2001).

O mecanismo envolvido no efeito protetor da testosterona de ratos machos ainda não está totalmente esclarecido e o estudo da influência da testosterona, principal hormônio masculino, sobre os mecanismos nociceptivos contribuiria para o entendimento dos mecanismos responsáveis pela menor prevalência e severidade da maioria das condições dolorosas crônicas no sexo masculino.

Dentro deste contexto o objetivo deste estudo se o efeito protetor da testosterona no desenvolvimento da dor na ATM é mediado pelo sistema opióide. Para responder a essa pergunta, nós usamos uma abordagem farmacológica para avaliar a capacidade dos antagonistas dos receptores opióides em bloquear o efeito protetor da

testosterona endógena, esses antagonistas foram administrados no espaço subaracnóide da região do complexo sensorial trigeminal, em ratos machos intactos, sham gonadectomizados (sham GX), gonadectomizados (GX) e em ratos gonadectomizados (GX) com reposição de testosterona. Para avaliar o desenvolvimento da nocicepção, usamos a resposta comportamental induzida pela injeção de formalina 0,5% na ATM. O objetivo deste trabalho foi investigar quais os subtipos de receptores opióides (receptores delta, mu e capá) ao nível do subnúcleo caudal, que é o correspondente trigeminal do corno dorsal da medula espinhal, medeiam o efeito protetor da testosterona sobre o desenvolvimento de dor na ATM em ratos.

O presente estudo está apresentado em formato alternativo, conforme deliberação da Comissão Central de Pós-Graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) nº 001/98.

CAPÍTULO

Central μ/κ -opioid receptor cooperativity mediates the protective effect of testosterone on temporomandibular joint nociception development in rats.

Macedo, C.G.¹; Fischer, L.³; Fanton, L. E.¹; Tambeli, C. H.²

¹ Department of Physiology, Piracicaba Dental School, University of Campinas–UNICAMP, Campinas, SP, Brazil;

² Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics, Institute of Biology, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil.

³ Department of Physiology, Division of Biological Sciences, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil

Corresponding author:

Claudia Herrera Tambeli, Tel.: +55 19 35216195

E-mail address: tambeli@unicamp.br (C.H. Tambeli).

Original Article

Key words: Testosterone; Opioid receptors; Temporomandibular Joint; Formalin; Nociception; Pain

Abstract

We have previously demonstrated that endogenous testosterone protects males from developing temporomandibular nociception. In this study, we asked whether the

protective effect of testosterone on TMJ nociception development in males is mediated by activation of central opioid mechanisms. To answer this question, we used a pharmacological approach to assess the ability of opioid receptor antagonists administered in the surrounding of the spinal trigeminal nucleus to block the protective effect of testosterone in sham gonadectomized and in testosterone replaced gonadectomized male rats. To assess nociception development, we used the behavioral response induced by a TMJ injection of 0.5% formalin in naïve, sham, gonadectomized and testosterone replaced gonadectomized male rats. We found that the non-selective opioid receptor antagonist, Naloxone (15 µg), or the combination of the mu-opioid receptor antagonist CTOP (Cys²,Tyr³, Orn⁵,Pen⁷amide, 30 µg) and the kappa-opioid receptor antagonist Nor-Binaltorphimine (90 µg) significantly increased 0.5% formalin-induced behavioral response. In contrast, combination of CTOP or Nor-Binaltorphimine and the delta -opioid receptor antagonist Naltrindole (90 µg) or the administration of each selective opioid receptor antagonist alone had no effect. These findings indicate that the co-activation central mu and kappa opioid receptors is necessary for testosterone to protect males from developing TMJ nociception.

Key words: Testosterone; Opioid receptors; Temporomandibular Joint; Formalin; Nociception; Pain

1. Introduction

Temporomandibular Disorder (TMD) is a term generally applied to conditions characterized by pain and/or dysfunction in the temporomandibular joint (TMJ) and masticatory muscles. Its characterization has been difficult because of the large number of

symptoms and signs attributed to this disorder (Cooper and Kleinberg, 2007). TMD is considered to be 1.5-2 times more prevalent in women than in men and 80% of patients treated for this disorder are women (LeResche, 1997; Carlsson and LeResche, 1995). We have previously proposed that the lower prevalence of TMJ pain in males may result, at least in part, from a protective effect of endogenous testosterone on reducing their risk of developing TMJ pain (Fischer *et al.*, 2007). This was evidenced by the findings showing that a low concentration of formalin (0.5%) injected into the rat's TMJ induces a significant nociceptive behavior in gonadectomized (Gx) males and in naive females but not in naive males. However, the mechanisms underlying the protective effect of testosterone on TMJ nociception development remains to be elucidated.

In addition to its protective effect on TMJ nociception development, testosterone, at a supraphysiological dose, decreases TMJ nociception induced by a higher dose (1.5%) of formalin (Fischer *et al.*, 2007) in male rats through the activation of the endogenous opioid system in the trigeminal subnucleus caudalis region (Fischer *et al.*, 2009). Therefore, in the present study we asked whether the protective effect of testosterone on reducing the risk of males developing TMJ nociception is mediated by the opioid system. To answer this question we used a pharmacological approach to assess the ability of opioid receptors antagonists administered in the surrounding of the spinal trigeminal nucleus in blocking the protective effect of endogenous testosterone in sham GX rats and of exogenous testosterone in GX rats. To assess nociception development, we used the behavioral response induced by a TMJ injection of 0.5% formalin in naïve, sham, Gx and Gx with testosterone replacement male rats.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

This study was carried out in male Wistar rats (200 to 300 g), six rats per group, housed (5 per cage) in a temperature-controlled room ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12:12 light cycle, with food and water available *ad libitum*. All animal experimental procedures and protocols were approved by the Committee on Animal Research of the University of Campinas (2102-1/2010) and are in accordance with IASP guidelines for the study of pain in animals (Zimmermann, 1983).

2.2. Drugs

Formalin solution was prepared from commercially available stock formalin (an aqueous solution of 37% formaldehyde) further diluted in 0.9% NaCl to a concentration of 0.5%. Naloxone hydrochloride, non selective opioid receptor antagonist (15 μg , Fischer *et al.*, 2009; Danzebrink *et al.* 1995), CTOP (Cys²,Tyr³, Orn⁵,Pen⁷amide), mu-opioid (μ) receptor antagonist (0.2, 10 and 30 μg , Tambeli *et al.*, 2003), nor-BNI (*nor*-Binaltorphimine dihydrochloride), kappa-opioid (κ) receptor antagonist (15, 45 and 90 μg , Tambeli *et al.*, 2003) and naltrindole hydrochloride, delta-opioid (δ) (receptor antagonist (10, 30 and 90 μg , Tambeli *et al.*, 2003), were dissolved in 0.9% NaCl and injected in the subarachnoid medullary space (Fischer, *et al.*, 2005). The drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3. Gonadectomy

The procedure was performed in 45-day-old male rats through a single scrotal incision, as previously described (Fischer *et al.*, 2008; Gordon & Soliman, 1994). The testicular bundles were ligated and removed and the skin was sutured. The efficacy of

gonadectomy was confirmed by postmortem observation of prostate and seminal vesicles atrophy. These procedures were carried out under anesthesia induced by an intramuscular injection of a mixture of ketamine (55 mg/kg) and xylazine (5.5 mg/kg). Sham-operated rats underwent a surgical procedure similar to that of gonadectomized ones, except that the gonads were not removed.

2.4. Testosterone replacement

Testosterone replacement protocol consisted of three daily subcutaneous injections of testosterone propionate (2mg/Kg) (Liu *et al.*, 2006; Banu *et al.*, 2002). Nociceptive testing was performed at the fourth day. Testosterone (17 β -Hydroxy-3-oxo-4-androstene) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and diluted in propylene glycol. Serum testosterone level was determined by radioimmunoassay using a specific kit (DSL-4100) from Diagnostic System Laboratories, Inc. (Webster, TX, USA).

2.5. Subarachnoid Medullary Injection

The injection of opioid antagonists or vehicle (0.9% NaCl) in the surrounding of trigeminal sensory complex was performed as previously described (Fischer *et al.*, 2005). Ten minutes before the TMJ injection of formalin, rats were briefly anesthetized by inhalation of halothane and were dorsally positioned. A small skin area overlying the high cervical region was shaved with an electric razor. A 30-gauge needle connected to a 50 μ l Hamilton syringe by a polyethylene cannula was first inserted below the occipital bone up to 2 mm and slightly inclined in a cranial direction. The needle was advanced 2 mm more to perforate the atlanto-occipital membrane and reach the medullary subarachnoid space. Total volume injection in all experiments was 10 μ l. All injections were performed at a rate of 1 μ l/s.

2.5. TMJ Injections

The injection of 0.5% formalin or its vehicle (0.9% NaCl) in the TMJ region was performed as previously described (Roveroni *et al.*, 2001). Rats were briefly anesthetized by inhalation of halothane and a 30-gauge needle was introduced into the TMJ at the moment of injection. A cannula consisting of a polyethylene tube was connected to the needle and also to a Hamilton syringe (50 μ l). Total injection volume in all experiments was 30 μ l. Each rat regained consciousness approximately 30 s after discontinuing the anesthetic. At the conclusion of the nociceptive behavioral testing, each rat was anesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of urethane (1 g/kg) and α chloralose (50 mg/kg). The Evans blue dye (30 mg/kg) was injected systemically; 40 min later, the animals were perfused transcardially with saline (NaCl 0.9%). Since this dye binds to plasma protein, the correct site of injection was indicated by the observation that the plasma extravasation induced by the TMJ injection of formalin was restricted to the TMJ region (Roveroni *et al.*, 2001).

2.6. Nociceptive Assay

Nociceptive behavioral testing was performed during the light phase (between 9:00 AM and 5:00 PM) in a quiet room maintained at 23°C (Rosland, 1991). Before the experiments, each animal was manipulated for 7 days to be habituated to the experimental manipulation. On the day of the experiment, each animal was individually placed in a test chamber (30 x 30 x 30 cm mirrored-wood chamber with a glass at the front side) for a 15-minute habituation period to minimize stress. The TMJ injection of formalin was performed as described above and animals were immediately returned to the test chamber for counting behavioral nociceptive responses during a 45-minute observation period. This

response was defined as the cumulative total number of seconds that the animal spent rubbing the orofacial region asymmetrically with the ipsilateral fore or hind paw plus the number of head flinches counted during the observation period, as previously described (Roveroni *et al.*, 2001). From a theoretical perspective, the occurrence of a given behavior is expressed as the proportion of time that the behavior occupies. Since head flinches followed an uniform pattern of 1 second of duration, each flinch was expressed as 1 second (Roveroni *et al.*, 2001). The recording time was divided into 9 blocks of 5 minutes. When the behavioral response induced by formalin is significantly higher than that induced by its vehicle (0.9% NaCl), the behavioral response is characterized as nociceptive, as previously standardized (Roveroni *et al.*, 2001), and when it is not, it is characterized as basal and not nociceptive. Rats did not have access to food or water during the test, and each animal was used once.

2.7. Data Analysis

The behavioral response obtained by summing the flinching and rubbing behaviors recorded during the entire duration of the experiment, was used in statistical analysis. To determine if there were significant differences ($p \leq 0.05$) between the treatment groups, one-way ANOVA was performed. If there was a significant between-subjects main effect of treatment group, post-hoc contrasts, using the Tukey test, were performed to determine the basis of the significant difference.

Data are presented in figures as means $\pm$ SEM. GraphPad Prism5 program was used for statistical analysis.

3. Results

3.1. The protective effect of testosterone on TMJ nociception development

To assess nociception development and to confirm the protective effect of testosterone on TMJ nociception development, we measured the behavioral response induced by a TMJ injection of 0.9% NaCl in naïve and of 0.5% formalin in naïve, sham Gx, Gx and testosterone replaced Gx male rats. As expected, we found that the TMJ injection of 0.5% formalin induced a behavioral response similar to that induced by 0.9% NaCl and a significantly greater behavioral response in Gx than in naïve and sham Gx male rats receiving 0.5% formalin into the TMJ (Figure 1). Testosterone replacement prevented the increase in the behavioral response of Gx male rats confirming the protective effect of testosterone on TMJ nociception development.

The total serum level of testosterone in Gx was significantly lower than that of sham Gx male rats (0.60 ± 0.04 vs. 4.66 ± 0.58 ng/ml in 6 rats, $P < 0.05$). Testosterone replacement in Gx induced a total serum level of testosterone that was significantly different (2.87 ± 0.54 ng/ml) from that Gx male rats ($P > 0.05$). The total serum level of testosterone in testosterone replaced GX males was sufficient to restore the protective effect of testosterone, preventing TMJ nociception development.

3.2. Effect of opioid receptor antagonists

The administration of the non selective opioid receptor antagonist naloxone (15 μ g) into the medullary subarachnoid space of sham Gx and of testosterone replaced Gx males receiving 0.5% formalin into the TMJ induced a behavioral response significantly greater (Figure 2) than that induced by the administration of its vehicle. Thus blockade of

opioid receptors into the medullary subarachnoid space inhibited the protective effect of testosterone indicating that this effect is mediated by endogenous opioids. Importantly, naloxone treatment by itself did not affect the behavioral response of Gx male rats.

To evaluate the contribution of opioid receptor subtypes to the protective effect of testosterone on TMJ nociception development, selective antagonists, except nor-binaltorphimine, were administered into the medullary subarachnoid space alone 10 minutes prior to the TMJ administration of 0.5% formalin; nor-binaltorphimine was administered the day preceding the experiment (see Methods). CTOP (μ -opioid receptor antagonist; 0.2, 10 and 30 μ g; Figure 3A), naltrindole (δ -opioid receptor antagonist; 10, 30 and 90 μ g; Figure 3B and nor-binaltorphimine (κ -opioid receptor antagonist; 15, 45 and 90 μ g; Figure 3C) failed to affect the protective effect of testosterone on TMJ nociception development because each one of them induced a behavioral response similar to that induced by the administration of their vehicle. These findings taken together with the finding that the non selective opioid receptor antagonist naloxone blocked the protective effect of testosterone on TMJ nociception development suggest that co-activation of opioid receptors may be necessary for testosterone to protect males from TMJ nociception development. Therefore, to determine if co-activation of two opioid receptors is sufficient for that, opioid receptor selective antagonists were administered into the medullary subarachnoid space of naïve rats in combination (Figure 4A).

The ability of the combination of CTOP (μ -antagonist, 30 μ g) and nor-binaltorphimine (κ -antagonist; 90 μ g) to block the protective effect of testosterone on TMJ nociception development was indicated by two findings. The first finding showed that the combination of these antagonists significantly increased the behavioral response induced

by the TMJ injection of 0.5% formalin in naïve male rats (Figure 4A). The second finding showed that the combination of these antagonists prevented the reestablishment of the protective effect of testosterone in testosterone replaced Gx males as indicated by the significant increase in the behavioral response after the combination of these antagonists in testosterone replaced Gx males (Figure 4A). In contrast, combination of CTOP or Nor-Binaltorphimine and Naltrindole (δ -antagonist; 90 μ g) or the administration of each selective opioid receptor antagonist alone had no effect (Figure 4A). Taken together, these findings indicate that central μ/κ opioid receptor co-activation is necessary for testosterone to protect males from developing TMJ nociception.

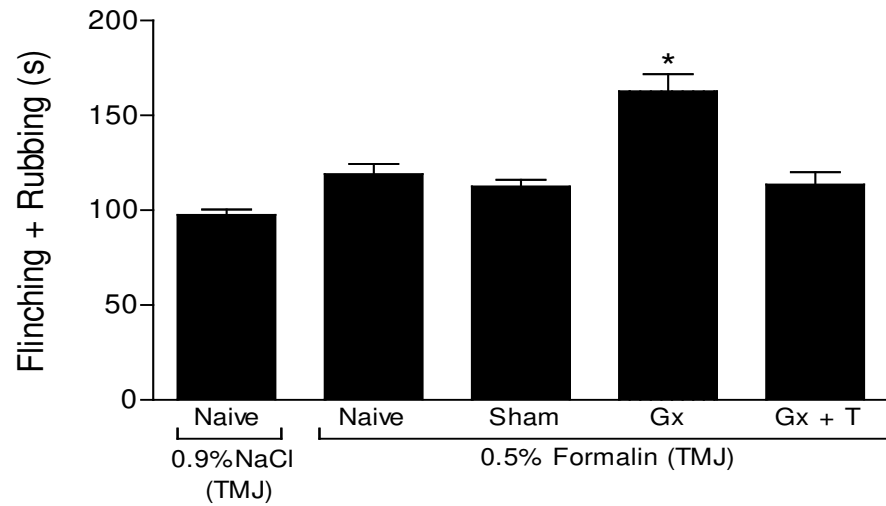


Figure 1. The protective effect of testosterone on TMJ nociception development. The TMJ injection of 0.5% formalin did not induce nociception in naïve, in sham and in testosterone replaced Gx male rats, since it induced a behavioral response similar to that induced by 0.9% NaCl. The TMJ injection of 0.5% formalin induced nociception in Gx males, since it induced a behavioral response significantly greater than that induced by 0.9% NaCl. The symbol ‘*’ indicates a behavioral response significantly greater than that of the other groups ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey Test). In this and in subsequent figures data are expressed as mean $\pm$ EPM of behavioral score (flinching + rubbing), six rats per group. Abbreviations: Gx = gonadectomized; GX+T = gonadectomized receiving testosterone replacement. See methods for additional details regarding data presentation and analysis.

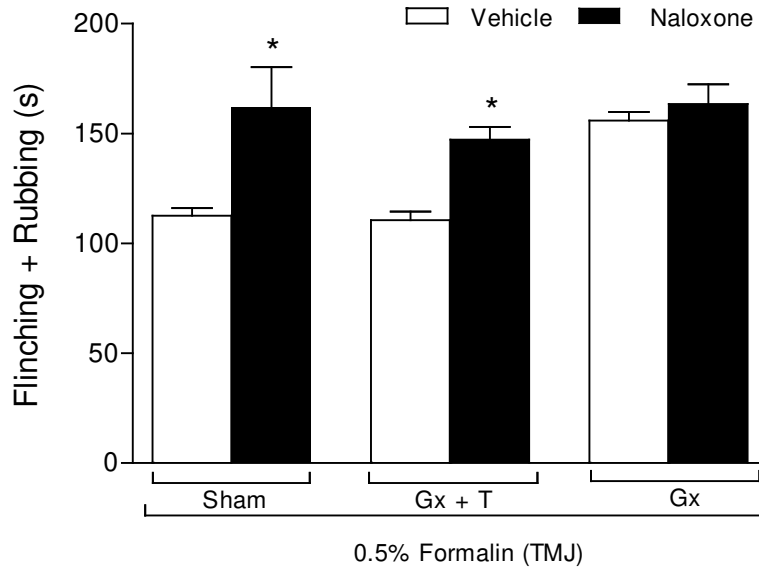


Figure 2. Non-selective blockade of opioid receptors. The subarachnoid injection of naloxone (15 μ g) in the surrounding of trigeminal sensory complex significantly increased the behavioral response induced by 0.5% TMJ formalin in sham and in testosterone replaced Gx (Gx+T) male, but did not affect it in Gx male rats. The symbol ‘*’ indicates a behavioral response significantly greater than that of sham and GX+T male rats receiving a subarachnoid injection vehicle (0.9% NaCl) ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey Test). Abbreviations: Gx = gonadectomized; GX+T = gonadectomized receiving testosterone replacement.

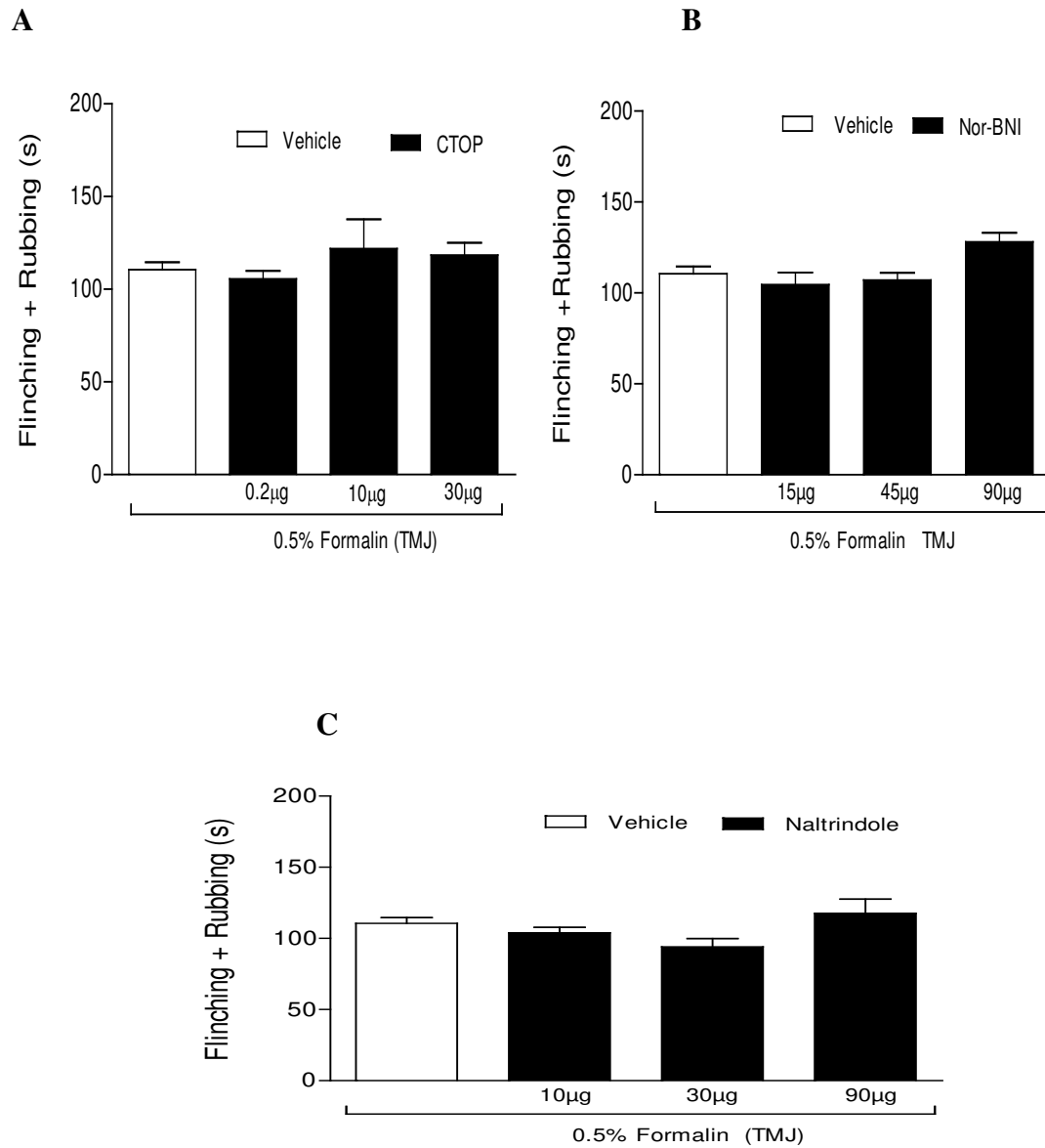


Figure 3. Selective blockade of μ , κ or δ - opioid receptors. The subarachnoid injection of (A) CTOP (μ -opioid receptor antagonist 0.2, 10 and 30 μ g); (B) Nor-Binaltorphimine (κ -opioid receptor antagonist, 15, 45 and 90 μ g) or (C) Naltrindole (δ -opioid receptor antagonist 10, 30 and 90 μ g) in the surrounding of trigeminal sensory complex did not affect 0.5% formalin induced behavioral response ($p > 0.05$, ANOVA, Tukey).

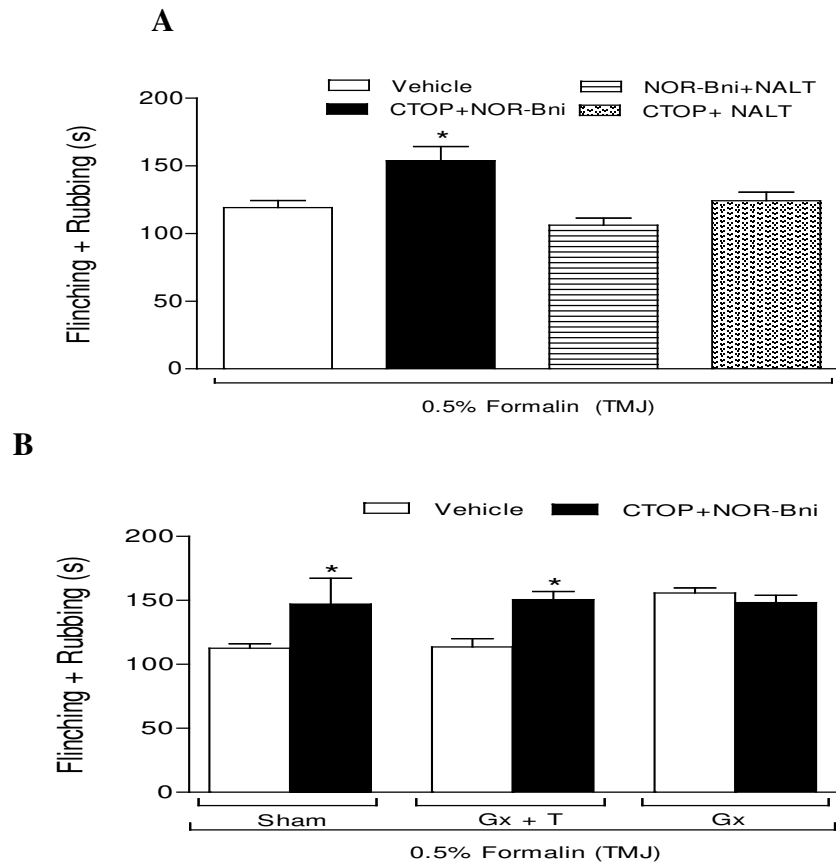


Figure 4. μ/κ -opioid receptor cooperativity. (A) The administration of CTOP (30 μ g) plus Nor-Binaltorphimine (90 μ g), but not that of Naltrindole (90 μ g) plus CTOP or Nor-Binaltorphimine in the surrounding of trigeminal sensory complex significantly increased 0.5% TMJ formalin-induced behavioral response. The symbol ‘*’ indicates a behavioral response significantly greater than that of the other groups ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey test). (B) The subarachnoid injection of CTOP plus Nor-Binaltorphimine in the surrounding of trigeminal sensory complex significantly increased the behavioral response induced by 0.5% TMJ formalin in sham and in testosterone replaced Gx (Gx+T) male, but did not affect it in Gx male rats. The symbol ‘*’ indicates a behavioral response significantly greater than that of sham and GX+T male rats receiving a subarachnoid injection vehicle (0.9% NaCl) ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey Test). Abbreviations: Gx = gonadectomized; GX+T = gonadectomized receiving testosterone replacement.

4. Discussion

This study confirms our previous findings that testosterone decreases the risk of males developing TMJ pain (Fischer *et al.*, 2007) and shows that it does so by an opioid mechanism mediated by the co-activation of μ and κ -opioid receptors in the surrounding of trigeminal sensory nuclei.

The confirmation that testosterone protects males from developing TMJ nociception is that the TMJ injection of formalin at a concentration (0.5%) that did not induce TMJ nociception in naïve and in sham Gx males, induced in gonadectomized males; an effect that was blocked by testosterone replacement in Gx male rats. The protective effect of testosterone in male's nociceptive system has also been supported by some clinical studies demonstrating that its deficit can contribute to the development and maintenance of some pain conditions (Morales, 1994). One evidence that the protective effect of testosterone on TMJ nociception development is mediated by a central opioid mechanism is that blockade of opioid receptors by the administration of the non selective opioid receptor antagonist naloxone into the medullary subarachnoid space blocked the protective effect of testosterone on TMJ nociception development in sham Gx and in testosterone replaced Gx males. In fact, blockade of opioid receptors in the surrounding of trigeminal sensory nuclei of these rats induced a nociceptive response similar to that of Gx male rats suggesting that testosterone induces endogenous opioid release in this region. Although it is well known that testosterone interacts with the opioid system in different brain areas (Pluchino *et al.*, 2009) this is the first demonstration that this interaction can decrease the risk of pain development.

The interaction of testosterone with the opioid system to protect males from developing TMJ nociception, requires the co-activation of μ and κ -opioid receptors in the surrounding of trigeminal sensory nuclei. This is because the administration of the combination of selective antagonists for either μ - or κ -opioid receptors into the medullary subarachnoid space, blocked the protective effect of testosterone on TMJ nociception development in sham Gx and in testosterone replaced Gx males, while the administration of the combination of μ or κ and δ -opioid receptor antagonist or the administration of each selective opioid receptor antagonist alone had no effect. These findings are another evidence that the protective effect of testosterone on TMJ nociception development is mediated by a central opioid mechanism. Importantly, neither the non selective opioid antagonist naloxone nor the combination of selective antagonists for either μ - or κ -opioid receptors into the medullary subarachnoid space affected the behavioral response of Gx male rats by themselves indicating that their effect occurs only in the presence of testosterone.

Although the mechanism underlying the testosterone requirement for μ - and κ -opioid receptor co-activation to protect males from developing TMJ nociception is unknown, a μ/κ receptor heterodimerization was recently demonstrated by estrogen- induced antinociception in the spinal cord (Liu *et al.*, 2011). However, whether testosterone can do the same to protect males from developing TMJ pain remains to be investigated. Alternatively, μ and κ -opioid receptors may be located in different neurons of the same pathway involved in the protective effect of testosterone and activation of each one of them may be essential to activate this pathway. Testosterone could activate the opioid system either by raising opioid peptides release or opioid receptor expression. In both

cases, blockade of opioid receptors would block the protective effect of testosterone, as demonstrated.

Consistent with the idea that testosterone could activate the opioid system by raising opioid peptides release, it has been previously demonstrated that androgenic steroids increase the expression of beta-endorphin levels in the ventral tegmental area in the male rat brain (Johansson *et al.*, 1997), and that orchidectomy reduces opioid concentration in some brain regions while testosterone replacement in the orchidectomized rats significantly increase beta-endorphin levels in some brain regions as well as in the plasma (Pluchino *et al.*, 2009). However, it is not known whether testosterone affects opioid receptor expression.

In this study, opioid antagonists were injected in the surrounding of the trigeminal sensory complex, which includes the spinal trigeminal nucleus also known as medullary dorsal horn. The spinal trigeminal nucleus receives the majority of the sensory afferents of the orofacial region and has an important role in modulating the nociceptive information that ascends to higher brain levels (Sokolov *et al.*, 2011; Borsani *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2002; Amandusson *et al.*, 1996). Therefore, the protective effect of testosterone may be modulated by a neuronal circuit located at this region which is consistent with evidence that androgen (Hamson *et al.*, 2004) and opioid receptors (Atweh and Kuhar, 1977) are detected in the spinal trigeminal nucleus. However, because the antagonists injected into the subarachnoid space could diffuse through the cerebrospinal fluid to neighboring regions, the involvement of other regions cannot be excluded.

Although ligand binding studies have demonstrated a substantial reduction in the number of binding sites for opioid receptors in rats treated neonatally with capsaicin (Besse *et al.*, 1990) suggesting that a large number of these receptors are presynaptic,

immunohistochemical studies using antisera raised against the cloned receptor subtypes suggest that μ - and κ -receptors are targeted more at post-synaptic sites (Arvidsson *et al.*, 1995a; 1995b)

In summary, this study reports that a central opioid mechanism mediated by co-activation of μ and κ -opioid receptors is activated by testosterone to protect males from developing TMJ nociception. Thus, understanding sex hormones pain development modulation mechanisms could potentially shed light on strategies for preventing chronic pain development as well as increase understanding of the neural basis of pain development.

Acknowledgments

We thank Carlos Alberto Feliciano for technical assistance. This work was supported in part by a master fellowship to C.G.M. from CNPq, Brazil.

5. References

Amandusson, A., Hermanson, O., & Blomqvist, A. Colocalization of oestrogen receptor immunoreactivity and preproenkephalin mRNA expression to neurons in the superficial laminae of the spinal and medullary dorsal horn of rats. *European Journal of Neuroscience*, 1996; 8, 2440–2445.

Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, Elde R. Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci*. 1995b; 15(5 Pt 1): 3328-41.

Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Vulchanova L, Lee JH, Nakano AH, Lin X, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, et al. The kappa-opioid receptor is primarily

postsynaptic: combined immunohistochemical localization of the receptor and endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995a; 92(11): 5062-6.

Atweh SF, Kuhar MJ. Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Spinal cord and lower medulla. *Brain Res*. 1977; 124(1): 53-67.

Banu SK, Govindarajulu P, Aruldas MM. Testosterone and estradiol up-regulate androgen and estrogen receptors in immature and adult rat thyroid glands in vivo. *Steroids*. 2002 Dec; 67(13-14):1007-14.

Besse D, Lombard MC, Zajac JM, Roques BP, Besson JM. Pre- and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res*. 1990; 521(1-2):15-22.

Borsani E, Albertini R, Labanca M, Lonati C, Rezzani R, Rodella LF. Peripheral purinergic receptor modulation influences the trigeminal ganglia nitroxidergic system in an experimental murine model of inflammatory orofacial pain. *J Neurosci Res*. 2010 Sep; 88(12): 2715-26.

Carlsson, G., LeResche, L. Epidemiology of temporomandibular disorders. In Sessle, B. J., Bryant, P., & Dionne, R. Progress in pain research and management. IASP Press, Seattle. 1995; 211–226.

Cooper BC, Kleinberg. Examination of a large patient population for the presence of symptoms and signs of temporomandibular disorders. *Cranio*. 2007 Apr; 25(2):114-26.

Danzebrink RM, Green SA, Gebhart GF. Spinal mu and delta, but not kappa, opioid-receptor agonists attenuate responses to noxious colorectal distension in the rat. *Pain*. 1995; 63(1): 39-47.

Fischer L, Arthuri MT, Torres-Chávez KE, Tambeli CH. Contribution of endogenous opioids to gonadal hormones-induced temporomandibular joint antinociception. *Behav Neurosci*. 2009; 123: 1129-1140.

Fischer L, Clemente JT, Tambeli CH: The protective role of testosterone in the development of temporomandibular joint pain. *J Pain*. 2007; 8(5): 437-42.

Fischer, L., Parada, C. A., & Tambeli, C. H. A novel method for subarachnoid drug delivery in the medullary region of rats. *Journal of Neuroscience Methods*. 2005; 148, 108–112.

Fischer, L., Torres-Chavez, K. E., Clemente-Napimoga, J. T., Jorge, D.Arsati, F., de Arruda Veiga, M. C., & Tambeli, C. H. The influence of sex and ovarian hormones on temporomandibular joint nociception in rats. *Journal of Pain*. 2008; 9, 630–638.

Gordon, F. T., & Soliman, M. R. Diurnal variation in the acute effects of estradiol and progesterone on beta-endorphin and metenkephalin levels in specific brain regions of ovariectomized rats. *Pharmacology*, 1994; 49: 192–198.

Hamson D. K., Jones B. A. and Watson N. V. Distribution of androgen receptor immunoreactivity in the brainstem of male rats. *Neuroscience* 2004; 127: 797-803.

Johansson P, Ray A, Zhou Q, Huang W, Karlsson K, Nyberg F. Anabolic androgenic steroids increase beta-endorphin levels in the ventral tegmental area in the male rat brain. *Neurosci Res*. 1997; 27(2): 185-189.

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

Liu J, Tsang S, Wong TM. Testosterone is required for delayed cardioprotection and enhanced heat shock protein 70 expression induced by preconditioning. *Endocrinology*. 2006 Oct; 147(10): 4569-77.

Liu NJ, Chakrabarti S, Schnell S, Wessendorf M, Gintzler AR. Estrogen and μ/κ -Opioid Heterodimerization *J. Neurosci.*, August 17, 2011; 31(33): 11836–11845.

Morales AJ, Nolan JJ, Nelson JC, Yen SS. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 78(6): 1360-1367.

Pluchino N, Ninni F, Casarosa E, Giannini A, Merlini S, Cubeddu A, Luisi M, Cela V, Genazzani AR. Sex differences in brain and plasma beta-endorphin content following testosterone, dihydrotestosterone and estradiol administration to gonadectomized rats. *Neuroendocrinology*. 2009; 89(4): 411-23.

Rosland JH: The formalin test in mice: The influence of ambient temperature. *Pain*, 1991; 45: 211-216.

Roveroni, R. C., Parada, C. A., Cecilia, M., Veiga, F. A., & Tambeli, C. H. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: The TMJ formalin test. *Pain*, 2001; 94, 185–191.

Sokolov AY, Lyubashina OA, Pantelev SS. Spinal trigeminal neurons demonstrate an increase in responses to dural electrical stimulation in the orofacial formalin test. *J Headache Pain*. 2011 Nov 25. [Epub ahead of print]

Tambeli CH, Quang P, Levine JD, Gear RW. Contribution of spinal inhibitory receptors in heterosegmental antinociception induced by noxious stimulation. *Eur J Neurosci*. 2003; 18(11): 2999-300.

Wang XM, Zhang ZJ, Bains R, Mokha SS. Effect of antisense knock-down of alpha(2a)- and alpha(2c)-adrenoceptors on the antinociceptive action of clonidine on trigeminal nociception in the rat. *Pain*. 2002 Jul; 98(1-2): 27-35.

Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 1983; 16, 109–110.

CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que o efeito protetor da testosterona no desenvolvimento da dor da ATM em ratos é mediado pela ativação de receptores opióides centrais mais especificamente a co-ativação dos receptores μ e κ opióides. O entendimento dos mecanismos responsáveis pela menor prevalência e severidade das condições dolorosas no sexo masculino é de suma importância para prevenir o desenvolvimento de dor crônica, bem como aumentar a compreensão da base neural do desenvolvimento de dor.

REFERÊNCIAS

- Aloisi AM. Gonadal hormones and sex differences in pain reactivity. Clin J Pain. 2003; 19(3):168-174.
- Andersen, G.; Sjogren, P.; Hansen, S. H.; Jensen N. H.; Christrup, L. Pharmacological consequences of long-term morphine treatment in patients with cancer and chronic non-malignant pain. European Journal of Pain. 2004; 8 (3): 263-271.
- Andrade MP. Dor pós-operatória: Conceitos Básicos de Fisiopatologia e Tratamento. Rev. Dor. 2000; 2(2): 07-14.
- Ash, M. M.; Ramfjord, S. P.; Schmioseroer, J. Oclusao. 2001; 2. ed. São Paulo: Santos.
- Becker, J.; Schmidt ,P.; Musshoff, F; Fitzenreiter, M.; Madea, B. MOR 1 receptor expression in human brains of drug-related fatalities-a realtime PCR quantification. Forensic Science International, Lausanne. 2004; 140 (1): 13-20.
- Binder W, Machelska H, Mousa S, Schmitt T, Riviere PJ, Junien JL *et al.* Analgesic and antiinflammatory effects of two novel kappa-opioid peptides. *Anesthesiology*. 2001; 94(6): 1034-44.
- Borzan J, Fuchs PN. Organizational and activational effects of testosterone on carrageenan-induced inflammatory pain and morphine analgesia. Neuroscience 2006; 143(3): 885-93.
- Craft R.M, Ulibarri C. Sexual Differentiation of Rat Reproductive Versus Opioid Antinociceptive Systems. Gender medicine. 2009; 6, theme issue.
- Evans NA. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. Am J Sports Med. 2004; 32(2): 534-542.

Ferreira, S H. Entre a compreensão e a confusão: alodínia e hiperalgesia. Dor on line (www.dol.inf.br/HTML), 2002.

Fischer L, Arthuri MT, Torres-Chávez KE, Tambeli CH. Contribution of endogenous opioids to gonadal hormones-induced temporomandibular joint antinociception. *Behav Neurosci*. 2009; 123: 1129-1140.

Fischer L., Clemente J. and Tambeli C. The protective role of testosterone in the development of temporomandibular joint pain. *J Pain*. 2007; 8: 437-42.

Garcia AR, Madeira MC, Paiva G, Olivieri KA. Joint vibration analysis in patients with articular inflammation. *Cranio*. 2000; 18(4): 272-9.

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; 1052:105-111.

Gear, R.W.; Gordon, N.C.; Heller, P.H.; Paul, S.; Miaskowski, C. and Levine, J.D.: Gender difference in analgesic response to the kappa-opioid pentazocine. *Neurosci Lett*. 1996a; 205 (3): 07-9.

Gear, R.W.; Miaskowski, C.; Gordon, N.C.; Paul, S.M.; Heller, P.H. and Levine, J.D. Kappa-opioids produce significantly greater analgesia in women than in men. *Nat Med*. 1996b; 2 (11): 1248-50.

Gordon, N.C.; Gear, R.W.; Heller, P.H.; Paul, S.; Miaskowski, C. and Levine, J.D. Enhancement of morphine analgesia by the GABAB agonist baclofen. *Neuroscience*. 1995; 69 (2): 345-9.

Harlan, E.S.; Elizabeth, A.L. Comparison of the peripheral and central effects of the opioid agonists loperamide and morphine in the formalin test in rats. *Neuropharmacology*. 2002; 4 (2): 253–261.

Klaumann, P. R. et al. Patofisiologia da dor. *Archives of Veterinary Science*, 2008; 13 (1): 1-12.

Kohn F.M., Testosterone and body functions. *Aging Male*. 2006; 9(4): 183-188.

Larijani, G.E.; Goldberg, M.E.; Gratz, I. and Warshal, D.P.: Analgesic and hemodynamic effects of a single 7.5-mg intravenous dose of morphine in patients with moderate-to-severe postoperative pain. *Pharmacotherapy*. 2004; 24 (12): 1675-80.

Leeuw Rd. Dor Orofacial: guia de avaliação, diagnóstico e tratamento. 2010; Quarta ed. São Paulo: Quintessence Editora LTDA.

Lund JP, Lavigne GL, Dubner R, Sessle BJ: Orofacial Pain: from basic science to clinical management. 2001; 1^a edição, Quintessence Books, Carol Stream.

Marques, M.A.S.; Pereira, H.M.G.; Aquino Neto, F.R. Controle da dopagem de anabolizantes: o perfil esteroidal e suas regulações. *Rev. Bras. Med. Esporte*, São Paulo. 2003; 9 (1): 1-10.

Morales AJ, Nolan JJ, Nelson JC, Yen SS. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 78(6): 1360-1367.

Okeson JP. Current terminology and diagnostic classification schemes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997; 83(1): 61-4.

Ozan, F.; Polat, S.; Kara, I.; Kucuk, D.; Polat, H. B. Prevalence study of signs and symptoms of temporomandibular disorders in a Turkish population. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2007; 8 (4): 35-42.

Palmeira, Ashmawi, Oliveira Junior e col. Opioides, sexo e gênero. *Rev Dor*. São Paulo. 2011 abr-jun; 12(2): 182-7.

Quinto, C.A. Classificação e tratamento das disfunções temporomandibulares: qual o papel do fonoaudiólogo no tratamento dessas disfunções? *Rev CEFAC* 2000; 2(2): 15-22.

Rocha, Kraychete, Lemonica et al. Pain: Current aspects on peripheral and central sensitization. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2007; 57 (1).

Sakuma Y. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*. 2009; 21(4): 410-4.

Schaible H. G. Pathophysiology of pain. *Orthopade*. 2006; 36 (1): 8-16.

Sessle BJ. Mechanism of trigeminal and occipital pain. *Pain Rev*. 1996; 3: 91-116.

Sessle B.J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11(1): 57-91.

Silveira, A. M.; Feltrin, P. P.; Zanetti, R. V.; Mautoni, M. C. Prevalence of patients harboring temporomandibular disorders in an otorhinolaryngology department. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2007; 73 (4): 528-532.

Stamford, J.A. Descending control of pain. British Journal of Anaesthesia. 1995; 75: 217-227.

Teixeira, M.J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. JBA, Curitiba. 2001; 1 (4): 329-334.

Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ. In Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ, eds. Essentials of small animal anesthesia and analgesia. 1aed. San Francisco: Wiley-Blackwell, 1999: 433-43.

Tranquilli, W. J. Fisiologia da dor aguda. In: Greene, S. A. Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor. Porto Alegre: Artmed. 2004; 399-402.

Unruh AM. Gender variations in clinical pain experience. Pain. 1996; 65: 123-167.

Vazquez-Delgado E, Schmidt JE, Carlson CR, DeLeeuw R, Okeson JP. Psychological and sleep quality differences between chronic daily headache and temporomandibular disorders patients. Cephalalgia. 2004; 24(6): 446-54.

Volpato AMJ. Contribuição do sistema opióide na melhora dos transtornos de ansiedade pelo exercício físico. Revista de pesquisa e extensão em saúde. 2008; 4 (1).

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

Yoshimura, M.; Furue, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. Journal of Pharmacological Sciences. 2006; 101: 107-117.

Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA et al. - mu-opioid receptor-mediated antinociceptive responses differ in men and women. J Neurosci, 2002; 22: 5100-5107.



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

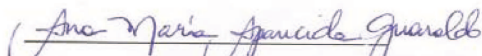
CERTIFICADO

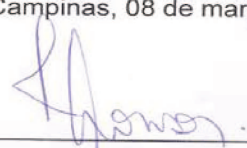
Certificamos que o Protocolo nº 2102-1, sobre "Estudo dos subtipos de receptores opioides envolvidos no efeito protetor da testosterona sobre o desenvolvimento da dor da ATM em ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Claudia Herrera Tambeli / Cristina Gomes de Macedo Maganin, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 08 de março de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2102-1, entitled "Study of the subtypes of opioides receptors involved in the protective effect of testosterone on TMJ pain development in rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 8, 2010.

Campinas, 08 de março de 2010.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>