



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**Monografia de Final de Curso**

**Letícia Wada Okoti**

**Papel da testosterona no efeito antinociceptivo induzido  
pelo bloqueio de adrenoceptores beta na Articulação  
Temporomandibular de ratos**

**UNICAMP**

PIRACICABA

-2010-



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



**Letícia Wada Okoti**

**Papel dos hormônios sexuais no efeito  
antinociceptivo induzido pelo bloqueio de  
adrenoceptores beta na Articulação  
Temporomandibular de ratos**

Monografia apresentada ao Curso  
de Odontologia da Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba –  
UNICAMP para obtenção do Diploma  
de Cirurgiã-Dentista.

Orientadora: Nádia Cristina Fávaro Moreira  
Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli

PIRACICABA

-2010-

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª. / 8099

Ok5p

Okoti, Letícia Wada.

Papel da testosterona no efeito antinociceptivo induzido pelo bloqueio de adrenoceptores beta na articulação temporomandibular de ratos / Letícia Wada Okoti. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

44f. : il.

Orientadores: Nádía Cristina Fávaro Moreira, Cláudia Herrera Tambeli.

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fisiologia. 2. Nociceptores. I. Fávaro-Moreira, Nádía Cristina. II. Tambeli, Cláudia Herrera. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(eras/fop)

## **Dedicatória**

Aos meus pais Claudio Sueo Okoti e Rosa Wada Okoti, e aos meus irmãos Leandro Wada Okoti e Leonardo Wada Okoti, pelo carinho, atenção, compreensão e apoio.

## **Agradecimentos**

À Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida.

À minha família, em especial à minha mãe Rosa Wada Okoti, que esteve sempre presente e disposta a me auxiliar nos momentos em que eu mais precisei.

Aos meus amigos, pelo convívio, apoio e principalmente pela amizade.

À Renata Furini, por ter sido companheira não só na realização deste trabalho, mas também durante todo o curso.

À Nádia Cristina Fávaro Moreira, pela disposição, paciência e dedicação com que orientou este trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli pelo incentivo que levou à execução deste trabalho.

Aos queridos funcionários Carlos Alberto Feliciano e Eliete Riguetto por me ajudarem sempre com boa vontade e disposição;

À todas as pessoas que participaram e contribuíram para realização de nosso trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor, Jacks Jorge Junior, e especialmente ao Departamento de Ciências Fisiológicas, por me proporcionar um importante rumo ao crescimento científico e profissional.

## **Sumário**

<b>I. Resumo</b>	<b>vii</b>
<b>II. Introdução</b>	<b>01</b>
<b>III. Justificativa</b>	<b>05</b>
<b>IV. Materiais e Métodos</b>	<b>06</b>
<b>V. Resultados</b>	<b>10</b>
<b>VI. Discussão</b>	<b>12</b>
<b>VII. Figuras e legendas</b>	<b>17</b>
<b>VIII. Conclusões</b>	<b>22</b>
<b>IX. Referências Bibliográficas</b>	<b>23</b>
<b>X. Anexo</b>	<b>29</b>

## Resumo

As disfunções temporomandibulares (DTM) são condições dolorosas que envolvem a articulação temporomandibular (ATM) e os músculos mastigatórios, apresentam maior prevalência, severidade e duração no sexo feminino e são comumente associadas à inflamação. Apesar das drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs) serem freqüentemente utilizadas no controle de dores inflamatórias, muitos pacientes podem apresentar intolerância ao tratamento prolongado e nem todos os pacientes com dor inflamatória na ATM respondem aos efeitos de tais medicamentos. Sabe-se que a dor inflamatória possui um componente simpático que pode predominar em casos com menor sensibilidade aos AINEs. Nesse contexto, dados obtidos recentemente em nosso laboratório demonstraram que machos são menos sensíveis aos efeitos antinociceptivos dos antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos do tipo 1, 2 e 3 que fêmeas. Assim, com o objetivo de avaliar o papel do hormônio masculino testosterona sobre o efeito antinociceptivo induzido por antagonistas de receptores adrenérgicos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , formalina foi co-administrada com antagonistas seletivos para receptores  $\beta_1$  (Atenolol),  $\beta_2$  (ICI 118 551) ou  $\beta_3$  (SR59230A) na ATM de ratos machos gonadectomizados com ou sem reposição do hormônio gonadal testosterona. A co-administração de antagonistas de receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido por formalina tanto em machos gonadectomizados quanto em machos gonadectomizados com reposição testosterona, confirmando a participação desses adrenoceptores na nocicepção da ATM. No entanto, os animais gonadectomizados com reposição hormonal apresentaram comportamento nociceptivo similar àquele induzido por formalina quando a mesma foi co-administrada com as menores concentrações dos antagonistas de adrenoceptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . Assim, estes dados sugerem que o hormônio sexual

masculino testosterona reduz a sensibilidade ao efeito antinociceptivo dos antagonistas de adrenoceptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  necessitando assim de uma maior concentração dos mesmos para que seus efeitos ocorram. Consideramos que a proposta do estudo é de grande relevância, pois o entendimento sobre os mecanismos através dos quais os hormônios sexuais modulam o efeito analgésico de drogas poderá contribuir com o tratamento da dor associada à disfunção temporomandibular levando em consideração não apenas o sexo, mas o status hormonal do paciente.

**Palavras-chave:** Articulação Temporomandibular, nocicepção, adrenoceptores, beta-bloqueador, antiinflamatório não-esteroidal.



## **Abstract**

Temporomandibular disorders (TMD) are pain conditions that affect the temporomandibular joint (TMJ) and masticatory muscles. These conditions present higher prevalence, severity and duration in females and appear to be associated with inflammation. Although non-steroidal anti-inflammatory drugs have been frequently used in the control of inflammatory pains, many patients may be intolerant to the prolonged treatment and some of them may not respond to the effect of these medications. It is already known that temporomandibular joint receives rich sympathetic innervations that may predominate in cases less sensitive to the non-steroidal anti-inflammatory drugs. In this context, data recently obtained in our laboratory showed that males are less sensitive to the antinociceptive effects of  $\beta$ -adrenergic antagonists 1, 2 and 3 than females. Thus, in order to evaluate the role of male hormone testosterone on the antinociceptive effect induced by adrenoceptors antagonists  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$ , formalin was co-administered with selective antagonists for the  $\beta_1$  adrenoceptors (Atenolol),  $\beta_2$  adrenoceptors (ICI 118.551) or  $\beta_3$  adrenoceptors (SR59230A) in the TMJ of gonadectomized rats with or without testosterone replacement. The co-administration of  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$  adrenoceptors antagonists significantly reduced the nociceptive behavior induced by formalin in both gonadectomized males and gonadectomized males with testosterone replacement, confirming the involvement of adrenoceptors in the TMJ nociception. However, gonadectomized animals with hormonal replacement presented nociceptive behavior induced by formalin similar to that when it was co-administered with low concentrations of  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  or  $\beta_3$  adrenoceptors antagonists. Thus, these data suggest that the male sex hormone testosterone reduces the sensitivity to the antinociceptive effect of  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  or  $\beta_3$  adrenoceptors antagonists,

requiring a higher concentration of them to obtain their effects. The proposed study is of great importance because the understanding of the mechanisms by which sex hormones modulate the analgesic effect of drugs. This may contribute to the treatment of pain associated with temporomandibular disorders considering not only gender, but patient's hormonal status.

**Keywords:** Temporomandibular joint, nociception, adrenoceptors, beta-blocker, non steroidal anti-inflammatory drugs.

## **Introdução**

As disfunções temporomandibulares (DTMs) são condições dolorosas que envolvem a articulação temporomandibular (ATM) e os músculos mastigatórios, e afetam mais de 12% da população (Carlsson, 1999; Dworkin *et al.*, 1990; Von Korff *et al.*, 1988), com maior prevalência, severidade e duração no sexo feminino (Riley and Gilbert, 2001). Essas condições resultam principalmente de trauma agudo, desarranjo interno ou artrites, e são comumente associadas à inflamação aguda ou crônica (Alstergren and Kopp, 2000; Suzuki *et al.*, 2003).

As condições inflamatórias da ATM promovem a sensibilização de nociceptores periféricos desta região (Alstergren and Kopp, 2000; Kopp, 2001; Nordahl *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2005; Raja *et al.*, 1988) e de neurônios nociceptivos centrais do complexo sensorio-nuclear trigeminal do tronco encefálico (Dubner and Ren, 2004; Iwata *et al.*, 1999; Sessle, 2000). Tanto a sensibilização periférica como a central são caracterizadas por aumento da excitabilidade da membrana neuronal causada por mediadores inflamatórios liberados no local da lesão (Alstergren and Kopp, 2000; Kopp, 2001; Suzuki *et al.*, 2003) e por neuropeptídeos e amino-ácidos excitatórios liberados no complexo sensorio-nuclear trigeminal do tronco encefálico, respectivamente (Bakke *et al.*, 1998; Bereiter and Benetti, 1996; Cairns *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 1996). Essa sensibilização neuronal é denominada de hiperalgesia. Alguns dos mediadores inflamatórios liberados no local da lesão que contribuem para isso, incluindo as prostaglandinas E2, estão presentes em alta concentração no fluido sinovial de pacientes que apresentam dor na ATM Kopp, 2001. Drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs) são frequentemente utilizadas no controle de dores inflamatórias (Dionne, 1997; List *et al.*, 2003; Ta and Dionne, 2004). A ação analgésica dessas drogas resulta do bloqueio da síntese das prostaglandinas, prevenindo assim a sensibilização

periférica dos nociceptores (Ferreira, 1972; Ferreira, 2002). No entanto, muitos pacientes podem apresentar intolerância ao tratamento prolongado com AINEs e nem todos os pacientes com dor inflamatória na ATM respondem aos efeitos de tais medicamentos (Ta and Dionne, 2004).

Sabe-se que a dor inflamatória possui um componente simpático (Levine *et al.*, 1986; Nakamura and Ferreira, 1987) que pode predominar em casos com menor sensibilidade aos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs).

Dados publicados recentemente (Nackley *et al.*, 2007), demonstram que a inibição da enzima catecol-o-metil-transferase (COMT), que metaboliza as catecolaminas, induz hiperalgesia mecânica e térmica na pata de ratos semelhante à induzida pela administração do agente inflamatório carragenina. Esse efeito induzido pela inibição da COMT foi bloqueado pela administração conjunta de antagonista de receptor adrenérgico  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , mas não de  $\beta_1$ . Esses dados, juntamente com dados previamente publicados (Khasar *et al.*, 1999a; Khasar *et al.*, 1999b; Aley *et al.*, 2001) indicam o envolvimento do adrenoceptor  $\beta_2$  em estados hiperalgésicos e demonstram pela primeira vez a participação dos receptores  $\beta_3$  na hiperalgesia.

Há alguns anos nosso laboratório tem se dedicado ao estudo do envolvimento dos  $\beta$ -adrenoceptores na hiperalgesia e na dor instalada da ATM. Por exemplo, demonstramos que as aminas simpatomiméticas são liberadas no local da lesão articular onde contribuem com o desenvolvimento de hiperalgesia na ATM de ratos através da ativação de adrenoceptores  $\beta_2$  localizados nessa região, mas não de adrenoceptores  $\beta_1$  (Rodrigues *et al.*, 2006). Isto se baseia no fato de a depleção dos estoques intracelulares de norepinefrina ou o bloqueio dos adrenoceptores  $\beta_2$  articulares previamente ao desenvolvimento do processo inflamatório atenuar a hiperalgesia da ATM. Em outro

trabalho demonstramos que durante a inflamação na ATM de ratos a ativação de adrenoceptores  $\beta_2$ , mas não  $\beta_1$ , localizados na região da ATM, induz a sensibilização necessária para ocorrência de dor pelo fator de crescimento neural (Pelegri-da-Silva *et al.*, 2008). Com relação à dor já instalada da ATM, induzida pela administração de formalina na ATM, dados obtidos recentemente e que ainda serão publicados (Fávaro-Moreira *et al.*) indicam que o bloqueio de ambos os adrenoceptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , além do adrenoceptor  $\beta_3$  reduz significativamente a resposta nociceptiva induzida pela administração de formalina na ATM de ratos e ratas. Essa foi a primeira demonstração da participação desses adrenoceptores na dor instalada articular.

Interessantemente, neste mesmo estudo as fêmeas foram mais responsivas ao efeito antinociceptivo dos antagonistas seletivos dos adrenoceptores  $\beta_1$  (Atenolol),  $\beta_2$  (ICI 118.551) e  $\beta_3$  (SR59230A), do que os machos. Esses dados reforçam a idéia de que, apesar do sexo feminino apresentar uma maior sensibilidade dolorosa (LeResche, 1997; Martinez-Gomez *et al.*, 1994), ele parece ser mais sensível aos efeitos analgésicos (Gordon *et al.*, 1995; Gear *et al.*, 1996a; Gear *et al.*, 1996b; Clemente *et al.*, 2004; Clemente-Napimoga *et al.*, 2009; Affaitati, *et al.*, 2010).

De fato, o sexo masculino parece apresentar uma menor sensibilidade à estimulação nociceptiva experimental (Clemente *et al.*, 2004) e uma menor prevalência da dor da ATM (LeResche *et al.*, 1997; Warren and Fried, 2001 Fischer *et al.*, 2007), provavelmente relacionados a um efeito protetor da testosterona com relação ao risco de desenvolvimento da dor na ATM (Fischer *et al.*, 2007). Além deste efeito protetor, a administração exógena desse hormônio em machos gonadectomizados reduz a nocicepção já instalada. Dados preliminares de nosso laboratório sugerem que esse efeito antinociceptivo é mediado pela ativação do sistema opióide endógeno,

possivelmente ao nível do núcleo do trato espinhal trigeminal (Fischer et. al., 2005b). Talvez estes mesmos mecanismos, ainda pouco esclarecidos, mediando os efeitos da testosterona sobre a sensibilidade dolorosa também estejam relacionados à menor sensibilidade aos efeitos antinociceptivos (ou analgésicos) dos antagonistas de receptores beta-adrenérgicos.

## **Justificativa**

Este projeto faz parte de uma das linhas de pesquisa do laboratório de Dor Orofacial da FOP-UNICAMP e dá continuidade aos estudos sobre a participação do componente simpático na dor da ATM entre os sexos.

O estudo proposto poderá contribuir com o tratamento da dor associada à disfunção temporomandibular, principalmente nos casos de pacientes que não respondem bem ao tratamento com antiinflamatórios não esteroidais. O conhecimento a influência dos hormônios sexuais no efeito antinociceptivo de drogas beta bloqueadoras poderá contribuir para um maior índice de sucesso no tratamento das condições dolorosas articulares, através do estabelecimento de um tratamento diferenciado que leve em consideração o status hormonal do paciente.

## **Materiais e métodos**

### Animais

Para realização deste trabalho foram utilizados ratos e Wistar pesando entre 150 a 250 g, provenientes do CEMIB e mantidos no Biotério da FOP - UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (5 por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12h) com alimentação e água *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo número 2014-1) e estão de acordo com as diretrizes determinadas pelo Comitê de Ética da Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), em animais conscientes (Zimmermann, 1983). Em particular, a duração dos experimentos foi a menor possível (45 minutos) e o número de animais usados foi mantido ao mínimo necessário (aproximadamente 6 por grupo).

### Drogas

- Formalina – 1,5%/15µL (Clemente *et al.*, 2004), solução de formaldeído a 37% diluída em NaCl 0,9%.
- Antagonista de receptores adrenérgicos  $\beta_1$  Atenolol ((RS)-4-[2-hydroxy-3-[(1-methylethyl) amino] ropoxy] benzeneacetamide): 6 µg (Vandenput *et al.*, 2002), 18µg, 54µg e 162µg/15µL diluída em NaCl 0,9%.
- Antagonista seletivo de receptores adrenérgicos  $\beta_2$  ICI 118.551 hydrochloride ((±)-1-[2,3-(dihydro-7-methyl-1H-inden-4-y)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol



hydrochloride): 0,1µg (Vandenput *et al.*, 2002), 0,3µg e 0,9µg/15µL diluída em NaCl 0,9%.

- Antagonista de receptores adrenérgicos  $\beta_3$  SR59230A hydrochloride 1-(2-Ethylphenoxy)-3-[[[(1S)-1,2,3,4-tetrahydro-1naphth alenyl]amino]-(2S)-2-propanol hydrochloride, 0,5µg (Nackley *et al.*, 2007), 1,5µg e 4,5µg/15µL dissolvido em DMSO e diluído em NaCl 0,9%.

Todas as drogas foram adquiridas da Sigma–Aldrich, com exceção do antagonista de receptores  $\beta_3$  SR59230A que foi adquirido da Tocris.

#### Administração de drogas na região da ATM

Os animais foram brevemente anestesiados por inalação de Isoflurano. A seguir, uma agulha calibre 30, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton, por um tubo de polietileno P50, foi inserida na porção inferior da borda póstero-inferior do arco zigomático, sendo avançada em direção anterior até contactar a região póstero-lateral do côndilo (Roveroni *et al.*, 2001). O volume de injeção foi de 15µl por droga.

#### Teste comportamental

As sessões de teste foram realizadas durante a fase clara entre 9h e 17h em sala silenciosa, com temperatura ambiente mantida a 25°C. Durante o teste os animais não tiveram acesso à água ou à comida. Para minimizar o estresse durante as sessões experimentais, os animais foram previamente manipulados pelo pesquisador por um período de 7 dias. Para a realização das análises comportamentais uma caixa de observação medindo 30x30x30 cm com base e 3 laterais espelhadas e frente de vidro foi

utilizada. Cada animal foi inicialmente colocado e mantido na caixa por 10 minutos para habituar-se ao ambiente de experimentação e minimizar o estresse.

Imediatamente após a injeção periarticular o animal já consciente foi recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 minutos, divididos em 9 blocos de 5 minutos. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células (Roveroni *et al.*, 2001). Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1 segundo de duração, a intensidade da resposta nociceptiva será quantificada somando-se esse comportamento ao ato de coçar a região injetada, como previamente padronizado (Roveroni *et al.*, 2001).

#### Confirmação do local de aplicação da formalina:

Após o término de cada análise comportamental foi feita a confirmação visual do local da administração da formalina (pos-mortem). Para isso, após indução anestésica através da administração intraperitoneal de uma mistura de uretano e  $\alpha$ -cloralose (100mg/kg e 50mg/kg, respectivamente) (Hu, 1990), o corante azul de Evans (1%; 5mg/Kg) foi injetado, intracardiacamente. Após dez minutos, o animal foi submetido à perfusão cardíaca com soro fisiológico. Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas, o local da injeção foi identificado visualmente, de acordo com a aparência do corante extravasado (Haas *et al.*, 1992).

### Gonadectomia

A gonadectomia foi realizada em animais com 21 dias de idade (Green *et al.*, 1999 Green *et al.*, 1999). Para isso, os animais foram anestesiados através da administração intramuscular de ketamina (55mg/Kg) e xylazina (5.5 mg/Kg).

Orquidectomia – Foi realizada uma única incisão de 1cm na pele escrotal do animal. A cavidade peritoneal foi pressionada para que os testículos fossem expostos. Realizou-se então uma ligadura logo abaixo dos testículos com fio de sutura e estes serão excisionados. Os tecidos foram reposicionados e suturados (Waynforth and Flecknell, 1992).

### Tratamento de Reposição Hormonal

Após a castração, os animais tiveram 21 dias de recuperação para então iniciar o tratamento de reposição hormonal

Conforme padronizado em nosso laboratório a reposição hormonal de testosterona foi compatível com os níveis fisiológicos de testosterona de um animal intacto. Para isto, a testosterona foi administrada s.c. na dose de 200µg/100g por 3 dias sendo o experimento realizado 14 horas após a última injeção.

## Resultados

*Efeito dos antagonistas de receptores beta1, 2 e 3 na nocicepção induzida por formalina na ATM de machos gonadectomizados.*

Com o intuito de verificar o efeito dos antagonistas de adrenoceptores  $\beta_1$  Atenolol (1A),  $\beta_2$  ICI 118.551 (1B) e  $\beta_3$  SR59230A (1C) sobre a nocicepção da ATM de ratos machos gonadectomizados cada um dos três antagonistas foi co-administrado com o agente inflamatório Formalina 1,5% na ATM. Todos os antagonistas adrenérgicos testados (mesmo nas suas menores doses, Atenolol (6 $\mu$ g), ICI 118.551 (0,1 $\mu$ g) e SR59230A (1,5 $\mu$ g)) reduziram significativamente a nocicepção induzida por formalina em machos gonadectomizados de forma dose dependente ( $p < 0,05$ , teste Tukey).

A maior concentração desses antagonistas não afetou a nocicepção induzida por formalina quando administrados na ATM contralateral (Fig.,  $p > 0,05$ , teste t), confirmando a ação periférica e local dessas drogas. Co-administração da maior concentração de cada antagonista com NaCl 0,9% não afetou a resposta comportamental pois a resposta foi similar àquela induzida pela administração na ATM de NaCl 0,9% com o veículo (Fig. 1A, 1B e 1C,  $p > 0,05$ , teste t).

*Efeito dos antagonistas de receptores beta1, 2 e 3 na nocicepção induzida por formalina na ATM de machos gonadectomizados com reposição hormonal de testosterona.*

Com o intuito de verificar o efeito dos antagonistas de adrenoceptores  $\beta_1$  Atenolol (2A),  $\beta_2$  ICI 118.551 (2B) e  $\beta_3$  SR59230A (2C) sobre a nocicepção da ATM de ratos machos gonadectomizados com reposição hormonal de testosterona cada um dos três antagonistas foi co-administrado com o agente inflamatório Formalina 1,5% na

ATM. Todos os antagonistas adrenérgicos testados reduziram significativamente a nocicepção induzida por formalina em machos gonadectomizados com reposição de testosterona de forma dose dependente ( $p < 0,05$ , teste Tukey, Fig. 4, 5 e 6). No entanto, a administração dos antagonistas em suas menores concentrações, Atenolol ( $6\mu\text{g}$ ), ICI 118.551 ( $0,1\mu\text{g}$ ) e SR59230A ( $1,5\mu\text{g}$ ), não provocaram uma redução significativa do comportamento nociceptivo quando comparados às respostas da administração de formalina. Estes resultados sugerem que a maior concentração plasmática de testosterona diminui em machos a sensibilidade ao efeito antinociceptivo das antagonistas adrenérgicos.

A maior concentração desses antagonistas não afetou a nocicepção induzida por formalina quando administrados na ATM contralateral (Fig. 2A, 2B e 2C,  $p > 0,05$ , teste t), confirmando a ação periférica e local dessas drogas. Co-administração da maior concentração de cada antagonista com NaCl 0,9% não afetou a resposta comportamental pois a resposta foi similar àquela induzida pela administração na ATM de NaCl 0,9% com o veículo (Fig. 4, 5 e 6,  $p > 0,05$ , teste t).

## Discussão

Neste estudo pudemos confirmar a participação de adrenoceptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  na nocicepção induzida por formalina na ATM de ratos gonadectomizados com ou sem reposição hormonal de testosterona. Estes dados estão de acordo com outros dados do nosso laboratório ainda não publicados (Fávaro-Moreira et al.) mostrando a participação desses adrenoceptores em machos intactos e em fêmeas intactas na fase diestro e na fase proestro do ciclo estral.

Embora o RNAm de adrenoceptores beta não tenha sido detectado no Gânglio da Raiz Dorsal (Nicholson *et al.*, 2005), RNAm desses adrenoceptores, em especial adrenoceptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , foram encontrados no Gânglio Trigeminal como demonstrado em dados ainda não publicados de nosso laboratório (Fávaro-Moreira et al.), mostrando então que a ativação dos adrenoceptores na nocicepção ocorre também através de mecanismos periféricos (Bondok, 1988; Peng, 1993; Nicholson *et al.*, 2005; Han et al, 2007).

Os resultados encontrados são consistentes com a densa inervação simpática da ATM por fibras vindas de células do gânglio cervical superior (Widenfalk and Wiberg, 1990; Yoshino *et al.*, 1998; Kido *et al.*, 2001) de onde provavelmente as catecolaminas são liberadas. Este componente simpático da inflamação da ATM pode estar predominando em alguns pacientes que apresentam dor na ATM e talvez explique porque alguns desses pacientes não respondem ao tratamento analgésico com AINES.

Ainda neste estudo demonstramos que em animais gonadectomizados submetidos à reposição hormonal de testosterona há necessidade de uma concentração maior dos antagonistas para que ocorra redução significativa do comportamento nociceptivo induzido por formalina, sugerindo que o hormônio sexual masculino testosterona diminui a sensibilidade aos efeitos antinociceptivos dos antagonistas beta

adrenérgicos. Estes resultados estão de acordo com dados preliminares do nosso laboratório demonstrando que em ratos machos intactos, assim como os animais submetidos à reposição hormonal de níveis fisiológicos de testosterona, a menor concentração dos antagonistas de adrenoceptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  não causam redução significativa do comportamento nociceptivo induzido pela formalina.

Sabe-se que, apesar do sexo feminino apresentar uma maior sensibilidade dolorosa (LeResche, 1997; Martinez-Gomez *et al.*, 1994), ele parece ser mais sensível aos efeitos analgésicos e colaterais decorrentes da administração de medicamentos analgésicos (Gordon *et al.*, 1995; Gear *et al.*, 1996a; Gear *et al.*, 1996b; Clemente *et al.*, 2004; Clemente-Napimoga *et al.*, 2009, Affaitati, *et al.*, 2010). Por exemplo, tem sido demonstrado que a administração sistêmica de drogas colinérgicas (Chiari *et al.*, 1999; Lhomme *et al.*, 1999), canabinóides (Tseng and Craft, 2001) ou nicotínicas (Craft and Milholland, 1998) é mais eficaz na redução da resposta nociceptiva induzida experimentalmente em fêmeas. Resultados semelhantes têm sido observados após o uso sistêmico de opióides. Em animais experimentais, os agonistas dos receptores opióides  $\mu$  induzem um efeito antinociceptivo significativamente maior em fêmeas quando comparadas com machos (Binder *et al.*, 2000; Tershner *et al.*, 2000). Similarmente, em humanos, a administração sistêmica de morfina (Larijani *et al.*, 2004), ou de agonistas seletivos para os receptores opióides  $\mu$  (Gear *et al.*, 1996a; Gear *et al.*, 1996b) ou  $\kappa$  (Gordon *et al.*, 1995), tem proporcionado uma maior analgesia pós-operatória no sexo feminino.

Assim, podemos inferir que o sexo masculino apresenta uma menor sensibilidade dolorosa e menor sensibilidade aos efeitos analgésicos. A diminuição da sensibilidade dolorosa no sexo masculino tem sido atribuída a um mecanismo protetor, em que a testosterona reduz o risco de desenvolvimento de dor na ATM em machos de

forma sexo-específica (Fischer *et al.*, 2007). A sexo-especificidade do efeito protetor da testosterona sugere que esse efeito pode não depender só da ação da testosterona durante a vida adulta, ou seja, pode depender também de sua ação durante um período crítico do desenvolvimento, quando a diferenciação sexual do sistema nervoso ocorre. De fato, a ação da testosterona durante os primeiros dias de vida medeia a diferenciação sexual do sistema nervoso masculino induzindo mudanças morfológicas permanentes que irão se refletir durante a vida adulta (Kawata, 1995). Dessa forma, é possível que o efeito protetor da testosterona seja determinado durante o desenvolvimento do organismo masculino, sendo apenas mantido pelos níveis fisiológicos de testosterona na vida adulta.

Além do efeito protetor da testosterona no desenvolvimento de dor na ATM, a administração exógena desse hormônio em machos gonadectomizados reduz a nocicepção já instalada, ou seja, induzida por uma dose maior de formalina (1,5%). Dados sugerem que esse efeito antinociceptivo é mediado pela ativação do sistema opióide endógeno, possivelmente ao nível do núcleo do trato espinhal trigeminal (Fischer *et. al.*, 2005b).

Devido à controversa literatura relacionando dimorfismo sexual e sensibilidade aos efeitos analgésicos, estudos ainda são necessários para melhor esclarecer os mecanismos que medeiam a ação da testosterona neste aspecto. A modulação pela testosterona em ratos machos da nocicepção e da antinocicepção por meio de opióides tem sido bastante descrita, mas a direção e a magnitude desta modulação ainda parecem inconsistentes entre os estudos. Alguns estudos reportam que a gonadectomia aumenta o limiar nociceptivo (Nayebi and Ahmadiani, 1999; Pajot *et. al.*, 2003) enquanto outros estudos reportam que não há variação no limiar nociceptivo depois da gonadectomia (Liu and Gintz, 2000; Craft *et al.*, 2004; Kepler *et al.*, 1989, 1991; Ali *et al.*, 1995;



Krzanowska et al., 2002; Pajot et al., 2003; Stoffel et al., 2003). Ainda outros estudos demonstram que a orquidectomia diminui o limiar nociceptivo, enquanto a reposição hormonal com testosterona aumenta o limiar nociceptivo quando comparado àquele em machos gonadectomizados (Forman et. al., 1989; Pednekar and Mulgaonker, 1995; Frye and Seliga, 2001). Com relação à modulação da testosterona sobre a antinocicepção em resposta à drogas opióides, uma recente revisão citou seis estudos em que animais machos intactos e/ou animais machos gonadectomizados com reposição de testosterona são mais sensíveis à ação antinociceptiva de opióides que os animais gonadectomizados sem reposição hormonal, três estudos demonstrando o oposto, e seis estudos relatando nenhuma diferença entre animais intactos e gonadectomizados no efeito antinociceptivo das drogas opióides (Craft *et al.*, 2004). Com relação à morfina, embora tenha ocorrido um rápido e modesto aumento na potência antinociceptiva desta droga, não houve mudança efetiva no limiar de excitabilidade ou no efeito antinociceptivo entre animais gonadectomizados com ou sem reposição hormonal (Summer et. al., 2006). A inconsistência na literatura sobre a modulação da testosterona sobre a antinocicepção pode ser devido à procedimentos que diferem significativamente em termos de intervalo entre a gonadectomia e reposição de testosterona, a duração do período de reposição hormonal antes dos testes e entre as concentrações de testosterona utilizadas (Summer et. al., 2006).

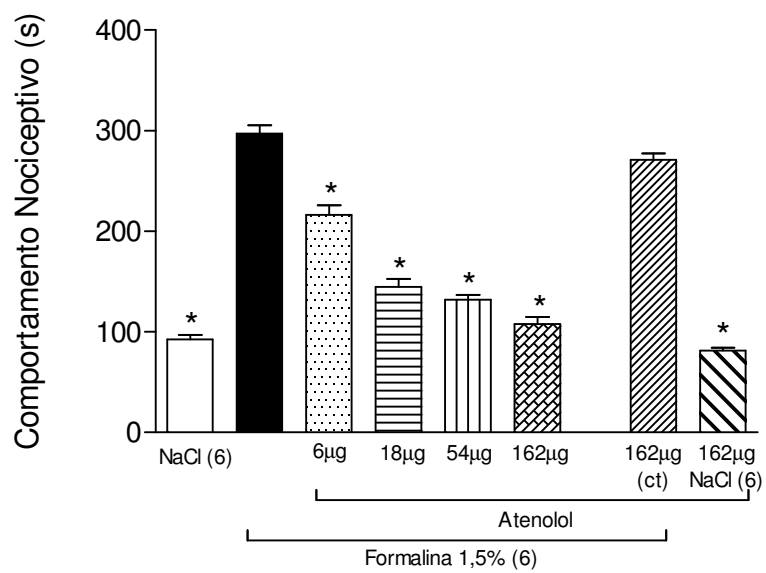
Clinicamente os  $\beta$ -bloqueadores já são vastamente utilizados no tratamento da enxaqueca. A enxaqueca e a dor da ATM apresentam algumas características em comum (O'Brien *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1994; Rasmussen, 1995; Dworkin *et al.*, 1990; LeResche, 1997; Stewart *et al.*, 1992) o que sugere que talvez os beta-bloqueadores possam ser utilizados também com sucesso no tratamento da dor na ATM. A utilização de beta bloqueadores no tratamento dessas condições é um alvo em

potencial, uma vez que a ATM possui rica inervação simpática (Widenfalk and Wiberg, 1990; Yoshino *et al.*, 1998; Kido *et al.*, 2001), e a modulação da dor por esta via iria contribuir para o tratamento de pacientes que apresentam dor inflamatória nessa região e que não respondem bem ao uso dos AINEs (Ta and Dionne, 2004).

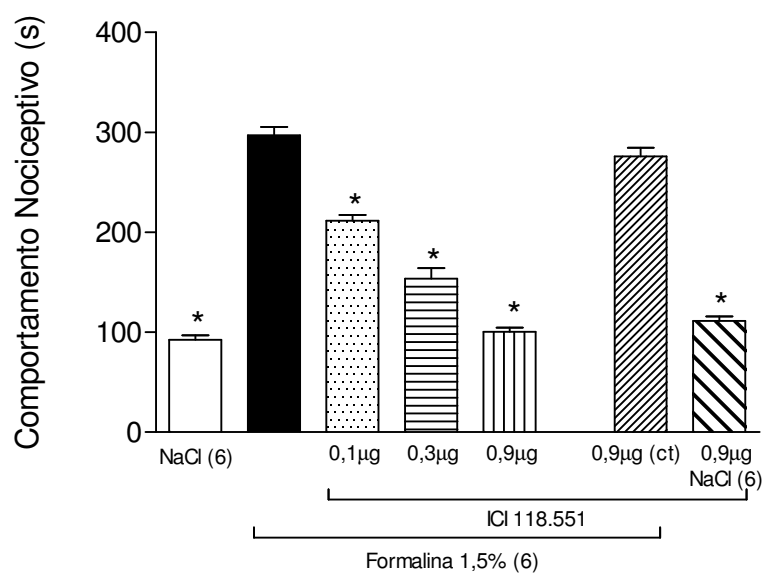
## Figuras e Legendas

### Figura 1

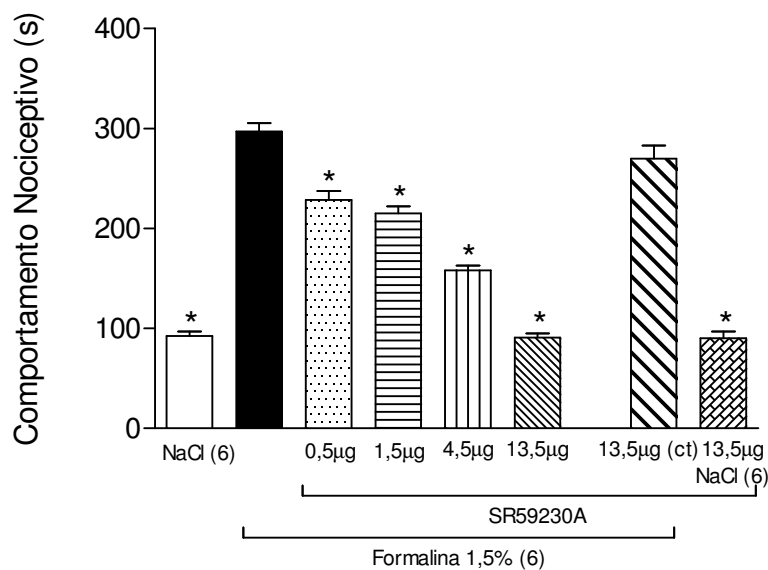
A



B



C

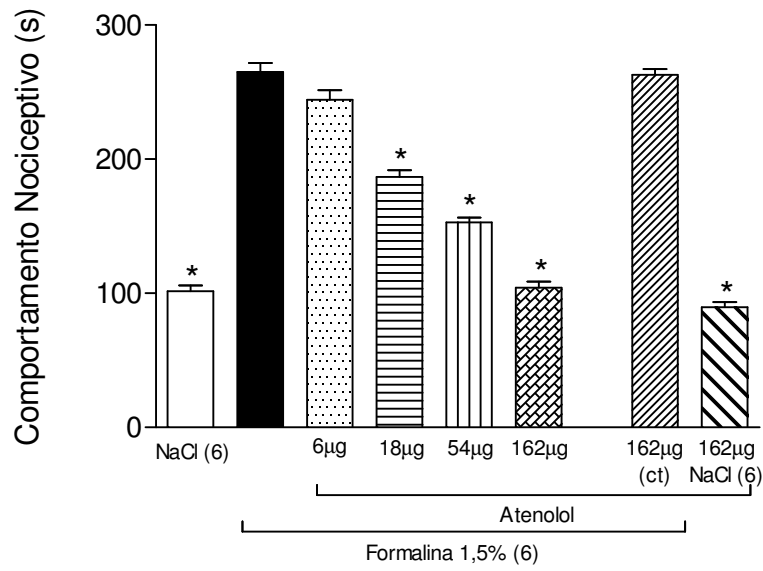


*Fig.1 – Efeito da administração local de antagonistas de adrenoceptores  $\beta_1$  Atenolol,  $\beta_2$  ICI 118.551 ou  $\beta_3$  SR59230A no comportamento nociceptivo induzido pela formalina em machos gonadectomizados.*

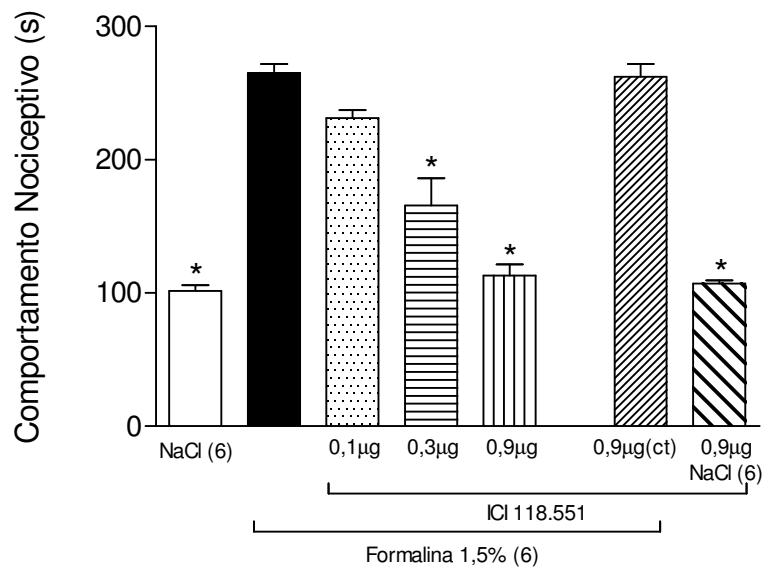
Co-administração de Atenolol (A), ICI 118.551 (B) ou SR59230A (C) com formalina 1,5% reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela formalina em machos gonadectomizados. O símbolo “\*” indica uma resposta significativamente menor que a induzida pela formalina em machos gonadectomizados ( $p < 0.05$ , ANOVA pós-teste de Tukey). Co-administração da maior concentração dos antagonistas Atenolol (162µg, Fig. A), ICI 118.551 (0,9µg, Fig. B) e SR59230A (13,5µg, Fig. C) com NaCl não apresentou efeito por si só ( $p > 0.05$ , teste t). Administração de Atenolol (162µg), ICI 118.551 (0,9µg) e SR59230A (13,5µg) na ATM contralateral (ct) não afetou o comportamento nociceptivo induzido por formalina ( $p > 0.05$ , teste t).

**Figura 2**

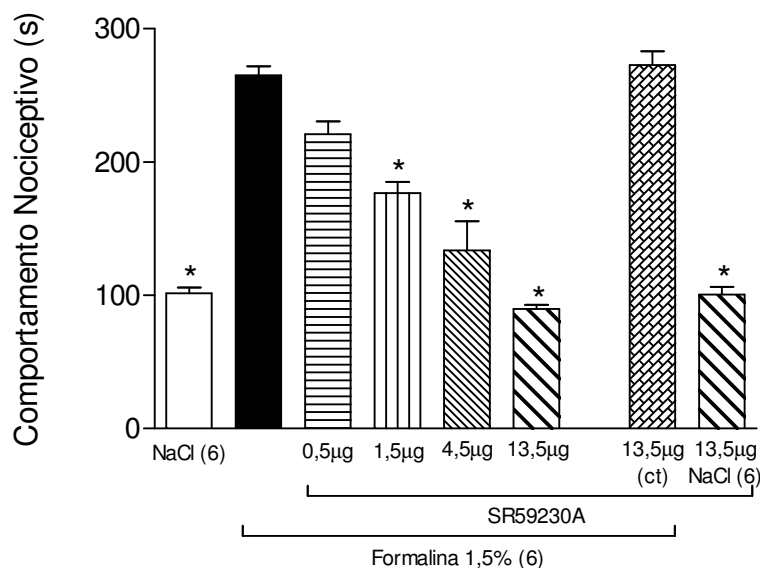
**A**



**B**



C



*Fig.2 – Efeito da administração local de antagonistas de adrenoceptores  $\beta_1$  Atenolol,  $\beta_2$  ICI 118.551 ou  $\beta_3$  SR59230A no comportamento nociceptivo induzido pela formalina em machos gonadectomizados submetidos à reposição hormonal com testosterona.*

Co-administração de Atenolol (A), ICI 118.551 (B) ou SR59230A (C) com formalina 1,5% reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido pela formalina em machos gonadectomizados submetidos à reposição hormonal com testosterona. No entanto, em machos gonadectomizados submetidos à reposição hormonal a administração das menores concentrações dos antagonistas Atenolol (6µg), ICI 118.551 (0,1µg) ou SR59230A (0,5µg) não apresentaram uma diminuição significativa no comportamento nociceptivo induzido pela formalina como ocorreu em machos gonadectomizados sem reposição hormonal de testosterona, sugerindo que o hormônio sexual masculino reduz a sensibilidade à antinocicepção induzida pelos antagonistas

beta adrenérgicos. O símbolo “\*” indica uma resposta significativamente menor que a induzida pela formalina em machos gonadectomizados ( $p < 0.05$ , ANOVA pós-teste de Tukey). Co-administração da maior concentração dos antagonistas Atenolol (162 $\mu$ g, Fig. A), ICI 118.551 (0,9 $\mu$ g, Fig. B) e SR59230A (13,5 $\mu$ g, Fig. C) com NaCl não apresentou efeito por si só ( $p > 0.05$ , teste t). Administração de Atenolol (162 $\mu$ g), ICI 118.551 (0,9 $\mu$ g) e SR59230A (13,5 $\mu$ g) na ATM contralateral (ct) não afetou o comportamento nociceptivo induzido por formalina ( $p > 0.05$ , teste t).

## **Conclusões**

O presente trabalho demonstrou que adrenoceptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  presentes na região da Articulação Temporomandibular participam da nocicepção da ATM de ratos machos gonadectomizados submetidos ou não à reposição hormonal com testosterona. Estes dados sugerem que os beta-bloqueadores, em especial aqueles seletivos para adrenoceptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ , podem ser uma alternativa interessante no tratamento de pacientes com dor da ATM que apresentam intolerância ao tratamento prolongado com antiinflamatórios não esteroidais ou que simplesmente não respondem aos seus efeitos. Ainda, animais submetidos à reposição hormonal, com níveis fisiológicos de testosterona circulante, apresentaram menor sensibilidade aos efeitos antinociceptivos dos antagonistas beta adrenérgicos, sugerindo que medicamentos beta-bloqueadores no sexo masculino talvez devam ser utilizados em concentrações maiores para que seus efeitos analgésicos sejam alcançados.



## Referências bibliográficas

- Affaitati G., Ceccarelli I., Fiorenzani P., Rossi C., Pace M.C., Passavanti M.B., Aurilio C., Sorda G., Danielli B., Giamberardino M.A., Aloisi A.M. Sex differences in the analgesic effects of ICI 182,780 and Flutamide on ureteral calculosis in rats. *Horm Behav.* Oct 1 2010. [Epub ahead of print].
- Aley, K. O., Martin, A., McMahon, T., Mok, J., Levine, J. D., Messing, R. O. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci*;21(17):6933-6939. 2001.
- Alstergren, P., Kopp, S. Prostaglandin E2 in temporomandibular joint synovial fluid and its relation to pain and inflammatory disorders. *J Oral Maxillofac Surg*;58(2):180-186; discussion 186-188. 2000.
- Bakke, M., Hu, J. W., Sessle, B. J. Involvement of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor mechanisms in jaw muscle activity reflexly evoked by inflammatory irritant application to the rat temporomandibular joint. *Pain*;75(2-3):219-227. 1998.
- Bereiter, D. A., Benetti, A. P. Excitatory amino release within spinal trigeminal nucleus after mustard oil injection into the temporomandibular joint region of the rat. *Pain*;67(2-3):451-459. 1996.
- Binder, W., Carmody, J., Walker, J. Effect of gender on anti-inflammatory and analgesic actions of two kappa-opioids. *J Pharmacol Exp Ther*;292(1):303-309. 2000.
- Cairns, B. E., Sessle, B. J., Hu, J. W. Temporomandibular-evoked jaw muscle reflex: role of brain stem NMDA and non-NMDA receptors. *Neuroreport*;12(9):1875-1878. 2001.
- Carlsson, G. E. Epidemiology and treatment need for temporomandibular disorders. *J Orofac Pain*;13(4):232-237. 1999.
- Chiari, A., Tobin, J. R., Pan, H. L., Hood, D. D., Eisenach, J. C. Sex differences in cholinergic analgesia I: a supplemental nicotinic mechanism in normal females. *Anesthesiology*;91(5):1447-1454. 1999.
- Clemente-Napimoga, J. T., Pellegrini-da-Silva, A., Ferreira, V. H., Napimoga, M. H., Parada, C. A., Tambeli, C. H. Gonadal hormones decrease temporomandibular joint kappa-mediated antinociception through a down-

- regulation in the expression of kappa opioid receptors in the trigeminal ganglia. *Eur J Pharmacol*;617(1-3):41-47. 2009.
- Clemente, J. T., Parada, C. A., Veiga, M. C., Gear, R. W., Tambeli, C. H. Sexual dimorphism in the antinociception mediated by kappa opioid receptors in the rat temporomandibular joint. *Neurosci Lett*;372(3):250-255. 2004.
- Craft, R. M., Milholland, R. B. Sex differences in cocaine- and nicotine-induced antinociception in the rat. *Brain Res*;809(1):137-140. 1998.
- Craft, R. M., Mogil, J. S., Aloisi, A. M. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *Eur J Pain*;8(5):397-411. 2004.
- Dionne, R. A. Pharmacologic treatments for temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*;83(1):134-142. 1997.
- Dubner, R., Ren, K. Brainstem mechanisms of persistent pain following injury. *J Orofac Pain*;18(4):299-305. 2004.
- Dworkin, S. F., Huggins, K. H., LeResche, L., Von Korff, M., Howard, J., Truelove, E., Sommers, E. Epidemiology of signs and symptoms in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. *J Am Dent Assoc*;120(3):273-281. 1990.
- Ferreira, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol*;240(102):200-203. 1972.
- Ferreira, S. H. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. *Int J Clin Pract Suppl*;(128):2-10. 2002.
- Fischer, L., Clemente, J. T., Tambeli, C. H. The protective role of testosterone in the development of temporomandibular joint pain. *J Pain*;8(5):437-442. 2007.
- Gear, R. W., Gordon, N. C., Heller, P. H., Paul, S., Miaskowski, C., Levine, J. D. Gender difference in analgesic response to the kappa-opioid pentazocine. *Neurosci Lett*;205(3):207-209. 1996a.
- Gear, R. W., Miaskowski, C., Gordon, N. C., Paul, S. M., Heller, P. H., Levine, J. D. Kappa-opioids produce significantly greater analgesia in women than in men. *Nat Med*;2(11):1248-1250. 1996b.
- Gordon, N. C., Gear, R. W., Heller, P. H., Paul, S., Miaskowski, C., Levine, J. D. Enhancement of morphine analgesia by the GABAB agonist baclofen. *Neuroscience*;69(2):345-349. 1995.

- Green, P. G., Dahlqvist, S. R., Isenberg, W. M., Strausbaugh, H. J., Miao, F. J., Levine, J. D. Sex steroid regulation of the inflammatory response: sympathoadrenal dependence in the female rat. *J Neurosci*;19(10):4082-4089. 1999.
- Haas, D. A., Nakanishi, O., MacMillan, R. E., Jordan, R. C., Hu, J. W. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. *Arch Oral Biol*;37(5):417-422. 1992.
- Hu, J. W. Response properties of nociceptive and non-nociceptive neurons in the rat's trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) related to cutaneous and deep craniofacial afferent stimulation and modulation by diffuse noxious inhibitory controls. *Pain*;41(3):331-345. 1990.
- Iwata, K., Tashiro, A., Tsuboi, Y., Imai, T., Sumino, R., Morimoto, T., Dubner, R., Ren, K. Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol*;82(3):1244-1253. 1999.
- Kawata, M. Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Res*;24(1):1-46. 1995.
- Khasar, S. G., Lin, Y. H., Martin, A., Dadgar, J., McMahan, T., Wang, D., Hundle, B., Aley, K. O., Isenberg, W., McCarter, G., Green, P. G., Hodge, C. W., Levine, J. D., Messing, R. O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron*;24(1):253-260. 1999a.
- Khasar, S. G., McCarter, G., Levine, J. D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J Neurophysiol*;81(3):1104-1112. 1999b.
- Kido, M. A., Zhang, J. Q., Muroya, H., Yamaza, T., Terada, Y., Tanaka, T. Topography and distribution of sympathetic nerve fibers in the rat temporomandibular joint: immunocytochemistry and ultrastructure. *Anat Embryol (Berl)*;203(5):357-366. 2001.
- Kopp, S. Neuroendocrine, immune, and local responses related to temporomandibular disorders. *J Orofac Pain*;15(1):9-28. 2001.
- Larijani, G. E., Goldberg, M. E., Gratz, I., 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*;24(12):1675-1680. 2004.
- LeResche, L. Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. *Crit Rev Oral Biol Med*;8(3):291-305. 1997.
- Levine, J. D., Taiwo, Y. O., Collins, S. D., Tam, J. K. Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. *Nature*;323(6084):158-160. 1986.
- Lhomme, J., Constant, J. F., Demeunynck, M. Abasic DNA structure, reactivity, and recognition. *Biopolymers*;52(2):65-83. 1999.
- List, T., Axelsson, S., Leijon, G. Pharmacologic interventions in the treatment of temporomandibular disorders, atypical facial pain, and burning mouth syndrome. A qualitative systematic review. *J Orofac Pain*;17(4):301-310. 2003.
- Martinez-Gomez, M., Cruz, Y., Salas, M., Hudson, R., Pacheco, P. Assessing pain threshold in the rat: changes with estrus and time of day. *Physiol Behav*;55(4):651-657. 1994.
- Nackley, A. G., Tan, K. S., Fecho, K., Flood, P., Diatchenko, L., Maixner, W. Catechol-O-methyltransferase inhibition increases pain sensitivity through activation of both beta2- and beta3-adrenergic receptors. *Pain*;128(3):199-208. 2007.
- Nakamura, M., Ferreira, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol*;135(2):145-153. 1987.
- Nicholson, L. J., Philippe, M., Paine, A. J., Mann, D. A., Dolphin, C. T. RNA interference mediated in human primary cells via recombinant baculoviral vectors. *Mol Ther*;11(4):638-644. 2005.
- Nordahl, S., Alstergren, P., Kopp, S. Tumor necrosis factor-alpha in synovial fluid and plasma from patients with chronic connective tissue disease and its relation to temporomandibular joint pain. *J Oral Maxillofac Surg*;58(5):525-530. 2000.
- O'Brien, B., Goeree, R., Streiner, D. Prevalence of migraine headache in Canada: a population-based survey. *Int J Epidemiol*;23(5):1020-1026. 1994.

- Oliveira, M. C., Parada, C. A., Veiga, M. C., Rodrigues, L. R., Barros, S. P., Tambeli, C. H. Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. *Eur J Pain*;9(1):87-93. 2005.
- Pelegrini-da-Silva, A., Oliveira, M. C., Parada, C. A., Tambeli, C. H. Nerve growth factor acts with the beta2-adrenoceptor to induce spontaneous nociceptive behavior during temporomandibular joint inflammatory hyperalgesia. *Life Sci*;83(23-24):780-785. 2008.
- Raja, S. N., Meyer, R. A., Campbell, J. N. Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology*;68(4):571-590. 1988.
- Rasmussen, B. K. Epidemiology of headache. *Cephalalgia*;15(1):45-68. 1995.
- Riley, J. L., 3rd, Gilbert, G. H. Orofacial pain symptoms: an interaction between age and sex. *Pain*;90(3):245-256. 2001.
- Rodrigues, L. L., Oliveira, M. C., Pelegrini-da-Silva, A., de Arruda Veiga, M. C., Parada, C. A., Tambeli, C. H. Peripheral sympathetic component of the temporomandibular joint inflammatory pain in rats. *J Pain*;7(12):929-936. 2006.
- 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*;94(2):185-191. 2001.
- Sessle, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med*;11(1):57-91. 2000.
- Stewart, W. F., Lipton, R. B., Celentano, D. D., Reed, M. L. Prevalence of migraine headache in the United States. Relation to age, income, race, and other sociodemographic factors. *JAMA*;267(1):64-69. 1992.
- Stewart, W. F., Shechter, A., Rasmussen, B. K. Migraine prevalence. A review of population-based studies. *Neurology*;44(6 Suppl 4):S17-23. 1994.
- Suzuki, T., Segami, N., Nishimura, M., Sato, J., Nojima, T. Bradykinin expression in synovial tissues and synovial fluids obtained from patients with internal derangement of the temporomandibular joint. *Cranio*;21(4):265-270. 2003.
- Ta, L. E., Dionne, R. A. Treatment of painful temporomandibular joints with a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized placebo-controlled comparison of celecoxib to naproxen. *Pain*;111(1-2):13-21. 2004.

- Tershner, S. A., Mitchell, J. M., Fields, H. L. Brainstem pain modulating circuitry is sexually dimorphic with respect to mu and kappa opioid receptor function. *Pain*;85(1-2):153-159. 2000.**
- Tseng, A. H., Craft, R. M. Sex differences in antinociceptive and motoric effects of cannabinoids. *Eur J Pharmacol*;430(1):41-47. 2001.**
- Vandenput, L., Boonen, S., Van Herck, E., Swinnen, J. V., Bouillon, R., Vanderschueren, D. Evidence from the aged orchidectomized male rat model that 17beta-estradiol is a more effective bone-sparing and anabolic agent than 5alpha-dihydrotestosterone. *J Bone Miner Res*;17(11):2080-2086. 2002.**
- Von Korff, M., Dworkin, S. F., Le Resche, L., Kruger, A. An epidemiologic comparison of pain complaints. *Pain*;32(2):173-183. 1988.**
- Warren, M. P., Fried, J. L. Temporomandibular disorders and hormones in women. *Cells, tissues, organs*;169(3):187-192. 2001.**
- Waynforth, H., Flecknell, P. Experimental and surgical technique in the rat. London: Academic, 1992.**
- Widenfalk, B., Wiberg, M. Origin of sympathetic and sensory innervation of the temporo-mandibular joint. A retrograde axonal tracing study in the rat. *Neurosci Lett*;109(1-2):30-35. 1990.**
- Yoshino, K., Kawagishi, S., Amano, N. Morphological characteristics of primary sensory and post-synaptic sympathetic neurones supplying the temporomandibular joint in the cat. *Arch Oral Biol*;43(9):679-686. 1998.**
- Yu, X. M., Sessle, B. J., Haas, D. A., Izzo, A., Vernon, H., Hu, J. W. Involvement of NMDA receptor mechanisms in jaw electromyographic activity and plasma extravasation induced by inflammatory irritant application to temporomandibular joint region of rats. *Pain*;68(1):169-178. 1996.**
- Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*;16(2):109-110. 1983.**

- De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

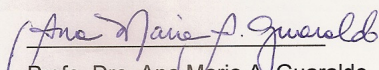
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2014-1, sobre "Papel dos adrenoceptores beta na nocicepção induzida por formalina na ATM de ratos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Claudia Herrera Tambeli / Nádía Cristina Fávoro Moreira, 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 27 de novembro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2014-1, entitled "Role of beta adrenoceptores in the nociception induced by formalin in rats' TMJ", 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 November 27, 2009.

Campinas, 27 de novembro de 2009.

  
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](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>