

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

Renata Correa Martins

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-HIPERALGÉSICO DA  
ACUPUNTURA NO TESTE DE FORMALINA EM RATOS  
MACHOS E FÊMEAS**

Dissertação submetida ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Graciela Terenzi

Florianópolis

2011



Renata Correa Martins

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-HIPERALGÉSICO DA  
ACUPUNTURA NO TESTE DE FORMALINA EM RATOS  
MACHOS E FÊMEAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciências Fisiológicas” e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2011.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cilene Lino de Oliveira  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Graciela Terenzi  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. José Marino Neto  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Li Shih Min  
Universidade Federal de Santa Catarina



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradecer a Deus por me dar saúde e condições de avançar e por me auxiliar nos momentos difíceis.

À professora Dra. Mariana Graciela Terenzi pela orientação, pelo apoio, pelo auxílio, pela compreensão, pela paciência e pelo exemplo de professora dedicada.

Ao professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos pela cooperação no empréstimo dos materiais, de grande importância para realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Li Shih Min e à professora Dra. Janetti Nogueira de Francischi pela leitura de meu projeto em sua fase inicial e colaboração com críticas construtivas.

Aos professores do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas e da Pós-Graduação em Neurociência pelos ensinamentos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos professores Dra. Lêda Menescal de Oliveira, Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, Dr. José Marino Neto e Dr. Li Shih Min por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

Aos amigos que me acolheram e me ensinaram os primeiros passos do trabalho em laboratório, além de me auxiliarem na elaboração de idéias e realização de experimentos: Diana, Francisco, Leidiane, Morgana, Larissa, Daniel e Ari.

Aos amigos que me ajudaram na realização dos experimentos, Rodrigo, Juliana, Camila e Melissa.

Aos amigos Larissa, Lucas, Ana Cláudia, Ana Paula, Cristiane, Daniela pelos momentos de descontração e de amizade.

Aos amigos do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Martina, Anderson, Sidarta e Samira pela cooperação e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia pelo auxílio logístico, Carlos, Vilma e Nivaldo.

E finalmente, agradeço a minha família. A minha mãe, Sonia Maria Correa Martins, ao meu pai, Lauro Martins Filho e aos meus irmãos (Gustavo, Marcela e Carla) pelo apoio no dia-a-dia e pelo carinho. Ao meu namorado, Leonardo Boell Pimentel, pelo companheirismo e pelo incentivo na elaboração deste trabalho.



## RESUMO

Os mecanismos fisiológicos da analgesia produzida pela acupuntura foram extensamente explorados nas últimas décadas e evidências mostram o envolvimento de opióides endógenos e seus receptores neste efeito analgésico. Em paralelo, estudos apontam dimorfismo sexual na sensibilidade a estímulos dolorosos e na resposta analgésica aos opióides. O objetivo deste estudo foi investigar se os efeitos antinociceptivos e anti-hiperalgésicos da acupuntura são sensíveis às diferenças sexuais. Foram utilizados 275 ratos Wistar adultos, fêmeas (200-250g) e machos (300-350g). Hiperalgisia e inflamação foram induzidos por 0,05ml de solução de 1,0% de formaldeído em salina (0,9%) (solução de formalina), injetada (sc) na superfície plantar da pata posterior direita. Para controle da solução de formalina, grupos de animais foram injetados (sc) somente com salina. Depois de injetados com salina ou formalina, os grupos de animais aguardavam por 10 min e eram submetidos aos seguintes procedimentos: contenção (controle) ou contenção + acupuntura no ponto análogo ST36 ou contenção + acupuntura no ponto sham. A acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 ou no ponto sham foi realizada por 20 min e os animais permaneciam livres para se mover na caixa de observação. Os comportamentos nociceptivos induzidos pela solução de formalina foram avaliados, subseqüentemente, por 30 min e utilizados para o cálculo do índice de dor. O limiar de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico (filamentos de Von Frey) e a latência de retirada da pata em resposta a estímulo térmico (calor radiante) foram determinados 90 min após a injeção de formalina ou salina. Não houve diferença no índice de dor entre ratos machos e fêmeas controles, injetados com formalina. O limiar basal de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico foi menor em ratos fêmeas em estro quando comparados aos ratos machos e fêmeas em diestro e proestro, já a latência basal de retirada da pata foi maior em ratos machos quando comparados às fêmeas em qualquer fase do ciclo estral. No entanto, ratos machos e fêmeas controles não apresentaram diferença no limiar de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico e na latência de retirada da pata em resposta a estímulo térmico quando avaliados 90 min após injeção de formalina. A acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 não produziu efeito antinociceptivo no teste da formalina, porém produziu um aumento no limiar de retirada da pata em resposta a estímulo

mecânico em ratos fêmeas em diestro e em estro e um aumento na latência de retirada da pata em resposta a estímulo térmico, somente em ratos machos, ambos avaliados 90 min pós-formalina. Este efeito não foi observado nos grupos submetidos à acupuntura manual no ponto sham, demonstrando ser específico à acupuntura manual no ponto análogo ao ST36. Estes resultados sugerem que os hormônios gonadais podem estar envolvidos na nocicepção e no aumento de limiares nocifensivos provocados pela acupuntura no ponto análogo ao ST36, porém estes efeitos parecem ser dependentes do teste nociceptivo utilizado.

**Palavras-chave:** Acupuntura, antinocicepção, anti-hiperalgesia, ciclo estral.

## ABSTRACT

The physiological mechanisms of acupuncture analgesia have been widely investigated in recent decades and evidence has shown the involvement of endogenous opioids and their receptors in acupuncture analgesia. In parallel, studies have shown sexual dimorphism in painful stimuli sensitivity and in opioid analgesia effectiveness. The aim of this study was to investigate whether the antinociceptive and anti-hyperalgesic effects of acupuncture are sensitive to sex differences. We used 275 Wistar adult rats, female (200-250g) and male (300-350g). Hyperalgesia and inflammation were induced by 0.05 ml of 1.0% formaldehyde in saline (0.9%) (formalin solution) injected (sc) into the plantar surface of the hind paw. As a control, groups of animals were injected (sc) only with saline. Ten min after the saline or formalin injection, the animals were subjected to the following procedures: restraint (control) or restraint + acupuncture at point analogous to ST36 or restraint + acupuncture at a non-acupoint (sham). Manual acupuncture was performed for 20 min and the animals remained free to move in the observation box. The nociceptive behaviors induced by formalin solution were evaluated for 30 min and used to calculate the pain score. The paw withdrawal threshold in response to mechanical stimuli (von Frey filaments) and the paw withdrawal latency in response to thermal stimuli (radiant heat) were determined 90 min after the formalin or saline injections. There was no difference between control male and female rats, injected with formalin solution, in the pain score. The baseline paw withdrawal threshold in response to mechanical stimuli was lower in female rats in estrus when compared to female rats in proestrus and in diestrus and male rats; and the baseline paw withdrawal latency in response to thermal stimuli was higher in male rats when compared to female rats in any phase of the estrous cycle. However, there was no difference between control male and female rats in the paw withdrawal threshold in response to mechanical stimuli and in the paw withdrawal latency in response to thermal stimuli measured 90 min after formalin injection. The manual acupuncture at the point analogous to the ST36 did not produce antinociceptive effect in the formalin test, but it produced an increase in the paw withdrawal threshold in response to mechanical stimuli in female rats in diestrus and in estrus, and increased the paw withdrawal latency in response to thermal stimuli, only in male rats, measured 90 min post-formalin. This

effect was not observed in groups exposed to manual acupuncture at the sham point, demonstrating a specific effect of acupuncture at the point analogous to the ST36. These results suggest that gonadal hormones may be involved in nociception and the increase of the nocifensive thresholds produced by acupuncture at the point analogous to the ST36, but these effects seem to be dependent on the nociceptive test used.

**Keywords:** Acupuncture, antinociception, anti-hyperalgesia, estrous cycle.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Quantidade de animais (n) utilizados nos grupos experimentais no teste de formalina e no teste de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico.....50
- Tabela 2.** Quantidade de animais (n) utilizados nos grupos experimentais no teste de retirada da pata em resposta a estímulo térmico.....50
- Tabela 3.** Resultados da ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores para o Índice de Dor.....52
- Tabela 4.** Resultados da ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores para os intervalos do Índice de Dor.....56
- Tabela 5.** Resultados da ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores para a variável comportamento três.....59
- Tabela 6.** Resultados da ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores para a variável limiar (g) de retirada da pata, obtida 90 min após injeção de formalina.....62
- Tabela 7.** Resultados da ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores para a variável latência (s) de retirada da pata, obtida 90 min após injeção de formalina.....67



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Padrão dos hormônios estradiol, progesterona e LH em humanos (A) e ratos (B) durante o ciclo reprodutivo.....27
- Figura 2.** Ponto análogo ao ST36.....46
- Figura 3.** Protocolo Experimental.....49
- Figura 4. Representação do índice de dor analisado por 30 min (de 30 a 60 min após injeção de salina ou formalina), correspondente a fase II do teste de formalina.** Ratos Wistar machos (M) e fêmeas em diestro (D), estro (E) e proestro (P) foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F), submetidos aos procedimentos de contenção somente (C) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (A) e avaliados quanto aos comportamentos nociceptivos por 30 min. **A)** O gráfico linear indica o índice de dor, calculado a cada minuto, ao longo do tempo, de todos os grupos experimentais. **B)** Histograma representando a média dos índices de dor calculados minuto a minuto, durante o período de 30 minutos. \*  $p < 0,001$  em relação aos grupos controles injetados com salina sc (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).....53
- Figura 5. Efeito do sexo e ciclo estral no índice de dor entre os animais controles injetados com formalina e somente contidos.** Ratos Wistar machos (M) e fêmeas em diestro (D), estro (E) e proestro (P) foram injetados com formalina (F), submetidos somente ao procedimento de contenção (C) e analisados no período de 30 a 60 minutos após injeção de formalina quanto aos comportamentos induzidos pelo agente nociceptivo (ANOVA de uma via).....55
- Figura 6. Efeito da acupuntura no ponto análogo ao ST36 no índice de dor, analisado por 30 min (de 30 a 60 min após injeção de salina ou formalina), correspondente a fase II do teste de formalina.** Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro, foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F), submetidos aos procedimentos de contenção (C) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (A) e avaliados quanto aos comportamentos

nociceptivos por 30 min (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).....55

**Figura 7. Índice de dor analisado em três intervalos: de 31 a 40 min, de 41 a 50 min e de 51 a 60 min.** Ratos Wistar machos (M) e fêmeas em diestro (D), estro (E) e proestro (P), foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F), submetidos aos procedimentos de contenção somente (C) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (A) e avaliados quanto aos comportamentos nociceptivos por 30 min. \*  $p < 0,001$  em relação aos grupos controles injetados sc com salina (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).....58

**Figura 8. Soma do tempo (s) em que animais lamberam, morderam e sacudiram a pata durante o intervalo de 1800 s (de 30 a 60 min após injeção de formalina), correspondente a fase II do teste de formalina.** Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F), submetidos aos procedimentos de contenção somente (C) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (A) e avaliados quanto aos comportamentos nociceptivos por 30 min. \*  $p < 0,001$  em relação aos grupos controles injetados com salina (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).....60

**Figura 9. Limiar basal (g) de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico dos grupos de ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro.** Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro foram submetidos ao teste de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico com filamentos de Von Frey. \*  $p < 0,05$  em relação aos grupos de ratos machos e fêmeas em diestro e proestro (ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan).....61

**Figura 10. Limiar (g) de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico, obtido 90 min após injeção sc de salina ou formalina na pata posterior direita.** Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro, foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F), submetidos aos procedimentos de contenção somente (Contenção) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (Acupuntura ST36) e avaliados no teste de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico com filamentos de Von Frey, 90 min após injeção sc

de salina ou formalina. #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle de ratos fêmeas em diestro injetados com salina e somente contidos. \*  $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  em relação aos grupos controles de ratos fêmeas em diestro e estro injetados com formalina e somente contidos, respectivamente (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).....63

**Figura 11. Efeito da acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 e no ponto Sham no limiar (g) de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico, obtido 90 min após injeção sc de formalina na pata posterior direita.** Ratos Wistar fêmeas em diestro e estro foram injetados sc com formalina, submetidos ao procedimentos de contenção somente (Contenção) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (Acupuntura ST36) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto Sham (Acupuntura Sham) e avaliados no teste de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico com filamentos de Von Frey, 90 min após injeção sc de formalina. \*  $p < 0,05$  em relação aos grupos controles de ratos fêmeas em diestro e estro injetados com formalina e somente contidos e aos grupos de ratos fêmeas em diestro e estro injetados com formalina e tratados com acupuntura no ponto Sham (ANOVA de uma via seguida por teste post-hoc de Duncan).....65

**Figura 12. Latência basal (s) de retirada da pata em resposta a estímulo térmico de calor radiante em grupos de ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro.** Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro foram submetidos ao teste de retirada da pata em resposta a estímulo térmico com calor radiante. \*  $p < 0,05$  em relação aos grupos de fêmeas em diestro, estro e proestro (ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan).....66

**Figura 13. Variação da latência (s) de retirada da pata em resposta a estímulo térmico de calor radiante (média das latências basais - média das latências obtidas 90 min após injeção sc de salina ou formalina).** Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F) na pata posterior direita, submetidos aos procedimentos de contenção somente (Contenção) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (Acupuntura ST36) e avaliados no teste de retirada da pata em resposta a estímulo térmico com calor radiante, 90 min após injeção sc de salina ou formalina. #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle de ratos machos injetados com salina e somente contidos. \*  $p < 0,05$  em

relação ao grupo controle de ratos machos injetados com formalina e somente contidos (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).....68

**Figura 14. Efeito da acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 e no ponto Sham na variação da latência (s) de retirada da pata em resposta a estímulo térmico de calor radiante (média das latências basais - média das latências obtidas 90 min após injeção sc de formalina).** Ratos Wistar machos foram injetados sc com formalina na pata posterior direita, submetidos aos procedimentos de contenção somente (Contenção) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (Acupuntura ST36) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto Sham (Acupuntura Sham) e avaliados no teste de retirada da pata em resposta a estímulo térmico com calor radiante, 90 min após injeção sc de formalina. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle de ratos machos injetados com formalina e somente contidos (ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan).....69

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>19</b> |
| 1.1 DOR E NOCICEPÇÃO .....  | 19        |
| 1.2 MODELOS ANIMAIS DE DOR.....   | 22        |
| 1.3 DIFERENÇAS SEXUAIS EM NOCICEPÇÃO E DOR .....  | 26        |
| 1.4 SISTEMAS DE ANALGESIA E ANTINOCICEPÇÃO ENDÓGENOS .....                                | 31        |
| <b>1.4.1 Diferenças Sexuais nos Sistemas de Analgesia e Antinocicepção Endógenos.....</b> | <b>34</b> |
| 1.5 ANALGESIA OPIÓIDE E DIFERENÇAS SEXUAIS .....  | 35        |
| 1.6 ACUPUNTURA E PONTO ST36 .....   | 37        |
| 1.7 JUSTIFICATIVA.....  | 41        |
| 1.8 OBJETIVOS .....   | 42        |
| <b>1.8.1 Objetivo Geral.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>1.8.2 Objetivos Específicos.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>   | <b>43</b> |
| 2.1 ANIMAIS.....  | 43        |
| 2.2 ESFREGAÇO VAGINAL .....   | 43        |
| 2.3 TESTE DE FORMALINA.....   | 44        |
| 2.4 ACUPUNTURA .....  | 45        |
| 2.5 TESTE DE RETIRADA DA PATA EM RESPOSTA A ESTÍMULO MECÂNICO .....                       | 46        |
| 2.6 TESTE DE RETIRADA DA PATA EM RESPOSTA A ESTÍMULO TÉRMICO.....                         | 48        |
| 2.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....  | 48        |
| 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 50        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3 RESULTADOS .....</b>  | <b>52</b> |
| 3.1 RESPOSTA COMPORTAMENTAL AO TESTE DE FORMALINA: EFEITO DO SEXO OU CICLO ESTRAL E DA ACUPUNTURA MANUAL NO PONTO ANÁLOGO AO ST36 .....  | 52        |
| 3.2 TESTE DE RETIRADA DA PATA EM RESPOSTA A ESTÍMULO MECÂNICO COM FILAMENTOS DE VON FREY: EFEITO DO SEXO OU CICLO ESTRAL E DA ACUPUNTURA MANUAL NO PONTO ANÁLOGO AO ST36 ..... | 60        |
| 3.3 TESTE DE RETIRADA DA PATA EM RESPOSTA A ESTÍMULO DE CALOR RADIANTE: EFEITO DO SEXO OU CICLO ESTRAL E DA ACUPUNTURA MANUAL NO PONTO ANÁLOGO AO ST36 .....                   | 66        |
| <b>4 DISCUSSÃO.....</b>  | <b>70</b> |
| 4.1 RESPOSTA COMPORTAMENTAL AO TESTE DE FORMALINA: INFLUÊNCIA DO SEXO E DO CICLO ESTRAL .....  | 70        |
| 4.2 EFEITO DA ACUPUNTURA MANUAL NO PONTO ANÁLOGO AO ST36 NA RESPOSTA COMPORTAMENTAL AO TESTE DE FORMALINA.....   | 72        |
| 4.3 EFEITO DO SEXO OU CICLO ESTRAL NA RESPOSTA BASAL AOS TESTES DE RETIRADA DA PATA COM ESTÍMULOS MECÂNICO E TÉRMICO.....  | 74        |
| 4.4 EFEITO DO SEXO OU CICLO ESTRAL NA RESPOSTA AOS TESTES DE RETIRADA DA PATA COM ESTÍMULOS MECÂNICO E TÉRMICO .....   | 75        |
| 4.5 EFEITO DA ACUPUNTURA MANUAL NO PONTO ANÁLOGO AO ST36 NA RESPOSTA AOS TESTES DE RETIRADA DA PATA COM ESTÍMULOS MECÂNICO E TÉRMICO.....                                      | 77        |
| <b>5 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>83</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>84</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

Na reunião realizada em Kyoto, em 2007, a Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP) revisou os conceitos de termos relacionados à dor. O conceito de dor, criado em 1994, foi mantido como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano presente ou potencial ao tecido ou descrita em termos de tal dano”. O termo nocicepção, apesar de ser utilizado há muito tempo, ainda não havia sido integrado na Terminologia Básica de Dor da IASP. Na discussão realizada em Kyoto definiu-se nocicepção como “os processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo” (LOESER; TREEDE, 2008).

Nocicepção e dor não devem ser confundidos, pois são eventos que podem ocorrer independentemente. Como exemplo, após anestesia local do nervo mandibular para procedimentos odontológicos, existe nocicepção periférica, mas não há dor, enquanto que no paciente com dor talâmica, há dor sem existir nocicepção periférica. Além disso, dor é um fenômeno subjetivo, enquanto que nocicepção é o objeto de fisiologia sensorial. Muitas pessoas referem dor na ausência de dano tecidual ou qualquer causa patofisiológica, e isto acontece por razões psicológicas. A definição de dor citada acima evita atrelar dor ao estímulo, portanto, a atividade induzida no nociceptor e a ativação de vias nociceptivas por estímulos nocivos não são consideradas dor, que é sempre um estado psicológico, apesar de que, com frequência, dor está associada a uma causa física aparente. Houve, também, a inclusão do termo dor nociceptiva: “dor que surge da ativação de nociceptores” (LOESER; TREEDE, 2008).

Estímulo nocivo foi definido pela IASP como “um evento presente ou potencialmente causador de dano aos tecidos” e o estímulo nociceptivo foi considerado como “um evento presente ou potencialmente causador de dano aos tecidos que é traduzido e decodificado por nociceptores”. Apesar de um dano tecidual presente ou potencial ser o denominador comum de estímulos que podem causar dor, existem alguns tipos de danos teciduais que não são detectados por qualquer receptor sensorial, e, portanto não causam dor (LOESER; TREEDE, 2008).

Um estímulo nociceptivo causa dano tecidual, ativando um grupo discreto de órgãos sensoriais periféricos chamados nociceptores. Esses órgãos são as terminações de fibras nervosas de pequeno diâmetro que são não-mielinizadas (fibras C) ou pouco mielinizadas (fibras A $\delta$ ). Os nociceptores podem ser ativados por várias formas de energia que são geradas por estímulos mecânicos, eletromagnéticos, elétricos, térmicos e químicos (COUTAUX et al, 2005). Estas fibras nervosas nociceptivas (C e A $\delta$ ) alcançam e circundam a lâmina mais externa do corno dorsal, onde penetram perpendicularmente e terminam nas lâminas superficiais (I ou II) ou se estendem para as lâminas mais profundas (V, VI, VII e X). Estudos eletrofisiológicos do corno dorsal identificaram três tipos de neurônios que recebem sinapses de fibras aferentes sensoriais primárias: neurônios nociceptivos específicos, neurônios nociceptivos não-específicos (também conhecido como neurônio de faixa dinâmica ampla, sigla conhecida como WDR, do inglês “*Wide dynamic range neurons*”) e neurônios não-nociceptivos específicos (que não possuem nenhum papel na integração de informação nociceptiva). Os axônios dos neurônios nociceptivos do corno dorsal constituem o trato espinhal ascendente que projeta a informação para vários níveis supra-espinhais. Estas projeções supra-espinhais atingem, a grosso modo, quatro regiões: tálamo ventro-pósterolateral (VPL), principalmente; sítios de projeção no bulbo (núcleo gigantocelular, núcleo cuneiforme) e mesencéfalo (substância cinzenta periaquedutal), que transmitem as informações nociceptivas oriundas do trato espinoreticulotalâmico para a tálamo medial; hipotálamo (projeções diretas e indiretas) e complexo amigdalóide. O segmento terminal das vias espinhais envolvidas na integração dos estímulos nociceptivos conectam-se com neurônios localizados em duas partes do tálamo (VPL e medial). Os neurônios no tálamo ventro-pósterolateral projetam seus axônios para a área somatossensorial S1 e S2 do córtex parietal, onde as características do sinal nociceptivo são decifradas, levando à gênese da percepção da dor (qualidade, intensidade, localização e duração). Os neurônios no tálamo medial projetam seus axônios ao córtex frontal, córtex insular e córtex cingular anterior que geram as respostas emocionais mais complexas à dor (CALVINO; GRILO, 2006).

Considerando a fisiologia do sistema nociceptivo, que é um componente do conjunto de sistemas de controle responsáveis pela homeostase, a dor constitui um sistema de alarme que ajuda na proteção do organismo que possibilita detectar, localizar e até mesmo identificar o tecido ou órgão lesado (MILLAN, 1999; LE BARS et al, 2001).

Apesar de a dor fisiológica (ou dor nociceptiva) ter uma função de proteção importante, ela pode assumir um caráter de doença, em estados patológicos como na inflamação, neuropatia, câncer, infecções virais, quimioterapia e diabetes. Este caráter é manifestado como hiperalgesia ou alodínia (HADDAD, 2007; KUNER, 2010). A Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP) alterou o conceito de alodínia e hiperalgesia na reunião realizada em Kyoto. Alodínia é definida como “dor em resposta a um estímulo não-nociceptivo” e hiperalgesia como “sensibilidade dolorosa aumentada”. Assim, o termo alodínia só deveria ser utilizado quando o estímulo testado não é normalmente capaz de ativar nociceptores. Quando não há certeza se o estímulo pode ou não ativar nociceptores, o termo hiperalgesia é preferido. Na hiperalgesia pode ocorrer tanto uma diminuição de limiar quanto um aumento na resposta supra-limiar. Em muitos casos pode ser difícil saber quando um estímulo é capaz de ativar nociceptores. Portanto, é necessário ter um termo “guarda-chuva” que serve para todos os tipos de sensibilidade dolorosa aumentada. Alodínia é então um caso especial de hiperalgesia (LOESER; TREEDE, 2008).

Sandküler (2009) refere que hiperalgesia e alodínia são sintomas de doenças e podem ser adaptações úteis para uma melhor proteção aos tecidos vulneráveis, mas podem também emergir como a própria doença. Quando há uma injúria e conseqüente aumento da vulnerabilidade dos tecidos ocorre uma adaptação do sistema nociceptivo, através da diminuição do limiar nocifensivo e da facilitação de respostas nocifensivas, portanto, proteção tecidual adequada é garantida. Porém, esta sensibilidade aumentada à dor pode persistir após o desaparecimento de sua causa inicial, então esta dor não será mais considerada como um sintoma, mas como doença. Este fenômeno ocorre por modificações do processamento de sinal no sistema nervoso. Pode ocorrer a sensibilização de nociceptores, fibras C e A $\delta$ , que é restrita a área de injúria, raramente ultrapassa, em duração, a causa primária de dor e, portanto, podem ser considerados como adaptativas. Em contraste, alterações centrais no processamento da informação nociceptiva podem durar dias, meses ou anos e podem se espalhar para sítios distantes da causa primária de dor. Assim, mecanismos centrais podem ser uma das causas de cronicidade ou amplificação de dor em pacientes.

Hiperalgesia e alodínia são ainda classificadas de acordo com o tipo de estímulo que acarreta a sensação de dor. Estímulo térmico (calor

e frio) ou mecânico (pinçar, pressão) são os mais freqüentemente utilizados (SANDKÜHLER, 2009).

As etiologias de dor mais comumente descritas são: nociceptiva, inflamatória, neuropática e idiopática (dor crônica sem estar relacionada necessariamente com causas inflamatórias ou danos em nervos). Estes tipos de dores tendem a ser diferentes em seu curso temporal, dores nociceptivas e inflamatórias são, usualmente, de curta duração (agudas), enquanto as dores neuropáticas e idiopáticas cursam, freqüentemente, por anos ou até indefinidamente (crônicas) (MOGIL, 2009).

## 1.2 MODELOS ANIMAIS DE DOR

A ausência de comunicação verbal é sem dúvida um obstáculo para a avaliação de dor em animais. Sinais de dor provocada em animais incluem a retirada da pata ou cauda em resposta a um estímulo, vocalização, locomoção reduzida ou agitação (SANDKÜHLER, 2009). Haddad (2006) refere que sinais nociceptivos podem ser correlacionados com reação motora (reflexo principalmente), que possibilitam a proteção do tecido. Além disso, Le Bars et al (2001) referem que reações de dor incluem reações neurovegetativas, como aumento do tônus simpático (ex. taquicardia, hipertensão arterial, hiperpnéia, midríase).

Existem vários modelos de nocicepção em animais. Muitos estímulos são capazes de provocar uma resposta nociceptiva. Estes estímulos podem ser agudos e classificados em elétricos, térmicos, mecânicos ou químicos (LE BARS et al, 2001; MOGIL, 2009).

A aplicação de estímulo elétrico tem vantagens por ser quantificável, reprodutível, não-invasivo. Entretanto, tem uma desvantagem, de não ser um estímulo natural, como os estímulos encontrados por um animal em seu ambiente normal. Além disso, estímulos elétricos ativam todas as fibras periféricas de uma forma não discriminada, incluindo fibras de grande diâmetro que não estão diretamente relacionadas à nocicepção, assim como fibras A $\delta$  e C, que medeiam sensações de frio e calor assim como sensações nociceptivas. As respostas produzidas por estímulos elétricos podem variar de acordo com a intensidade do estímulo: de reflexos espinhais, complexas vocalizações até comportamentos bem organizados, como escape e agressão (LE BARS et al, 2001).

Quanto aos estímulos térmicos estes podem ser de calor ou de frio. Os testes que envolvem estímulos térmicos são sempre aplicados na

pele. O estímulo de calor radiante estimula nociceptores e termorreceptores. A fonte de calor radiante pode estar localizada distante do alvo a ser estimulado (lâmpada) ou pode estar em contato direto com a pele. Geralmente são aplicadas na cauda ou pata do animal (LE BARS et al, 2001).

Os testes que utilizam a estimulação de calor radiante na pata possuem a vantagem de não estimular um órgão envolvido na termorregulação de ratos e camundongos, a cauda (LE BARS et al, 2001). Neste contexto, o teste criado por Hargreaves et al (1988) visava quantificar a nociceção térmica em um modelo animal de hiperalgesia induzida por um agente inflamatório, assim, utilizaram um estímulo de calor radiante para analisar a hiperalgesia resultante de inflamação produzida pela injeção de carragenina (solução com extrato de alga marinha) na pata. O teste possui a vantagem de ser realizado em um animal que não precisa ser contido e permanece livre para se movimentar.

Os estímulos mecânicos podem ser aplicados de forma progressiva ou de forma rápida e grosseira. As respostas obtidas são classificadas de acordo com a intensidade e/ou duração do estímulo, podendo ir de reflexos a vocalizações ou até mesmo comportamentos motores complexos. O estímulo é cessado assim que a resposta é obtida. São geralmente aplicados na pata ou cauda. As reações de retirada da pata ou cauda são reflexos espinhais, enquanto reações como agressão ou vocalização envolvem estruturas supraespinhais (LE BARS et al, 2001).

O teste realizado com os filamentos de Von Frey foi primeiramente realizado por Handwerker e Brune em 1987 e consiste na estimulação de um ponto da pele com filamentos até que eles se dobrem, mantendo uma pressão constante. O uso de filamentos com uma variedade de diâmetros crescentes permite determinar o limiar de resposta evocada pelo animal (reflexo de flexão). Os filamentos de Von Frey ativam mecanorreceptores de baixo limiar, assim como nociceptores. O estímulo mecânico provocado pelos filamentos de Von Frey também possui a vantagem de ser realizado em um animal que não precisa ser contido, ou seja, permanece com os membros livres para se mover no ambiente de análise (CHAPLAN et al, 1994, LE BARS et al, 2001).

Segundo Le Bars et al (2001) a estimulação química envolve a administração de agentes algogênicos e é diferente das outras formas de estimulação por ser progressiva, de longa duração e ter um caráter

inescapável. Estes modelos experimentais são os que mais se aproximam da natureza da dor clínica. São mensurados através da análise de comportamentos, em função do tempo e em resposta a um estímulo supra-limiar inescapável. Segundo Mogil (2009) o teste de formalina se inclui nesta forma de estimulação e é considerado um modelo de dor aguda e tônica. A solução de formalina consiste em uma solução de formaldeído em salina. O teste de formalina produz duas fases de comportamentos de dor (fase I e II), separados por um período quiescente (interfase).

A fase I, com duração de 5 minutos aproximadamente, é resultante de ativação direta de nociceptores devido ao estímulo periférico de fibras aferentes do tipo C e A $\delta$  (PUIG; SORKIN,1995). McNamara e colaboradores (2007) demonstraram que a formalina ativa diretamente canais TRPA1, um potente canal de cálcio potencial receptor transiente. A ocorrência de uma fase quiescente, sem manifestação comportamental, a interfase, é independente da concentração de formalina utilizada e é resultante de ativa inibição (HENRY et al, 1999).

A fase II é caracterizada por reações inflamatórias e sensibilização central (TJOLSEN et al, 1992). A sensibilização central representa um aumento na função de neurônios e circuitos nas vias nociceptivas, assim como uma redução de inibição e é uma manifestação de neuroplasticidade extraordinária do sistema nervoso somatossensorial em resposta a atividade, inflamação ou injúria nervosa (LATREMOLIER; WOOLF, 2009).

Mc Call et al (1996) demonstraram haver ativação de fibras aferentes C durante todo o teste de formalina, de forma bifásica, com padrão análogo aos comportamentos induzidos pela formalina durante as fases I e II. O estudo de Ikeda et al (2006) mostra haver potencialização de longa prazo (LTP, sigla derivada do termo em inglês “Long Term Potentiation”, é um aumento na eficácia sináptica que ultrapassa a duração do estímulo condicionante), de início lento, registrado por potenciais evocados pela fibra C na superfície do corno dorsal da medula espinhal de ratos adultos anestesiados, após injeção subcutânea de solução de formalina 5%.

Para alguns autores, a intensa ativação de estímulos nociceptivos produzidos na fase I é necessária para sensibilização do corno dorsal e expressão de comportamentos nociceptivos na fase II do teste de formalina, uma vez que, bloqueio seletivo de atividade aferente na fase I levou a redução do comportamento nociceptivo na fase II (O’CONNOR;

ABRAM, 1994; FU et al, 2000). Entretanto, para outros autores, a ativação contínua de fibras aferentes primárias na fase II da formalina é necessária para a expressão dos comportamentos induzidos pelo agente nocivo nesta fase (TAYLOR et al 1997, PUIG; SORKIN,1995; ABBADIE et al 1997). Cadet e Woda (1998) sugerem que esta ativação contínua de fibras nociceptivas durante a fase II poderia manter a sensibilização central.

A contribuição da estimulação de neurônios nociceptivos no desenvolvimento e manutenção dos comportamentos nociceptivos observados na fase II é sustentado pela observação de que o estímulo da formalina provoca liberação de neuromoduladores inflamatórios como aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato) e substância P na medula espinhal, que contribuem para sensibilização central (MALMBERG, YAKSH, 1992, 1995).

Capone e Aloisi (2004) referem-se ao teste de formalina como um modelo animal importante para o estudo de dor aguda de longa duração. Diferentes espécies de animais podem ser utilizados, porém ratos e camundongos são os mais comuns. A solução de formalina pode ser injetada em diferentes regiões do corpo, por via subcutânea ou intramuscular. No estanto, a pata é o local mais comum, a injeção pode ser realizada na região plantar ou ventral. Às vezes, as duas patas são injetadas simultaneamente. Porém, para análise dos comportamentos induzidos pela formalina, a melhor escolha é uma injeção na região plantar da pata posterior direita, por vários motivos: as patas dianteiras são utilizadas para comportamento de limpeza; é mais fácil injetar solução de formalina no tecido cutâneo macio da região plantar da pata e a locomoção do animal não se modifica pela presença de fluido irritante neste sítio.

Os principais comportamentos induzidos pela solução de formalina são o ato de lambem a pata, flexão tônica e flexão fásica da pata injetada. Todas as respostas aparecem imediatamente após aplicação e desaparecem em uma ou duas horas, dependendo da concentração utilizada, porém, o inchaço produzido pela inflamação pode durar por vários dias (CAPONE; ALOISI, 2004). Mathies e Franklin (1992) mostraram que após descerebração de ratos os comportamentos nociceptivos induzidos pela formalina se mantinham, sugerindo que estes comportamentos são organizados em estruturas não-corticais. O estudo de Wheeler-Aceto e Cowam (1990) mostrou que os comportamentos induzidos pela formalina podem ser processados tanto espinhalmente quanto supraespinhalmente. Os autores observaram que,

após transecção espinhal de ratos, o comportamento de lambar a pata foi totalmente abolido, sugerindo que este comportamento é processado supraespinhalmente, já o comportamento de flexão fásica da pata foi totalmente abolido durante a fase II do teste de formalina e parcialmente abolido durante a fase I, assim, foi sugerido que o comportamento de flexão fásica na fase I é processado tanto espinhalmente quanto supraespinhalmente e na fase II é processado exclusivamente supraespinhalmente.

### 1.3 DIFERENÇAS SEXUAIS EM NOCICEPÇÃO E DOR

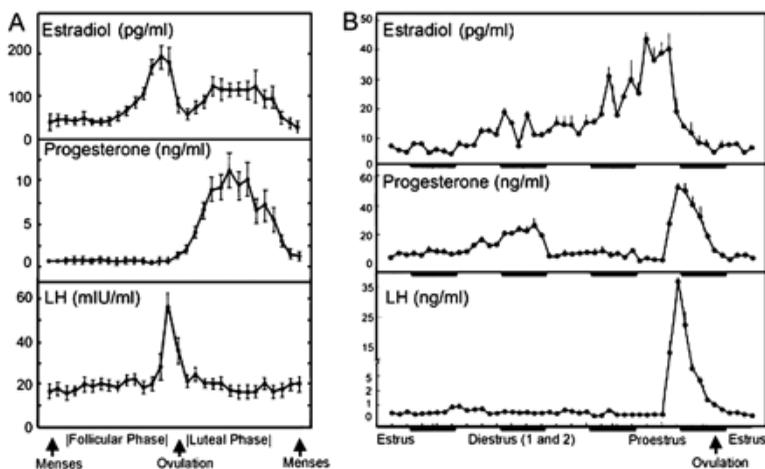
Muitos estudos epidemiológicos mostram que as mulheres possuem um risco substancialmente maior para muitas condições dolorosas clínicas (KUBA; QUINONES-JENAB, 2005; FILLINGIM et al, 2009). A prevalência de certas doenças, como enxaqueca (LYNGBERG et al, 2004), artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico (OLIVER; SILMAN, 2009) fibromialgia, osteoartrite (LAWRENCE et al, 2008) e distúrbios na articulação têmporo-mandibular (ATM) (JOHANSSON et al, 2003) é maior em mulheres.

Experimentos mostram que mulheres apresentam menor limiar e baixa tolerância à dor quando comparadas aos homens ao serem testados com várias modalidades de estímulos como calor (SARLANI et al, 2003), pressão (CHESTERTON, et al, 2003) e irritantes químicos, como a capsaicina, um componente pungente da pimenta, conhecida por ativar fibras C, não-mielinizadas (FROT et al, 2004).

Muitos fatores são atribuídos às diferenças sexuais em dor, desde fatores genéticos e hormonais até fatores sócio-culturais e ambientais (FILLINGIN; NESS, 2000; CRAFT, 2004). Muitos estudos e revisões tentam explicar este dimorfismo sexual através de investigações sobre a influência dos hormônios gonadais, que são hormônios esteróides produzidos pelos ovários e testículos (CRAFT, 2004). Como no ciclo menstrual em mulheres, os hormônios ovarianos de ratos fêmeas sofrem flutuações durante o ciclo estral (figura 1).

O ciclo estral de ratos fêmeas tem duração de 4 a 5 dias e é dividido em quatro fases: diestro I (ou metaestro), diestro II, proestro e estro. Os hormônios  $17\beta$ -estradiol e progesterona são os hormônios mais amplamente secretados pelos ovários. Durante o ciclo estral, estes hormônios atuam no cérebro para estimular os eventos hormonais que culminam em ovulação e comportamentos sexuais. Durante o diestro I

(duração de 6 a 8 horas) e diestro II (duração de 55 a 57 horas), as concentrações de  $17\beta$ -estradiol aumentam gradualmente e as concentrações de progesterona continuam baixas, análoga à fase folicular em humanos. O aumento dramático do hormônio  $17\beta$ -estradiol estimula liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que induz um pico do hormônio luteinizante (LH), que leva à ovulação. Associado a isto, há um aumento de progesterona que antecede a ovulação e contribui para este processo, esta fase corresponde ao proestro (duração de 12 a 14 horas); e a fase estro (duração de 25 a 27 horas) é o período de receptividade sexual e o dia efetivo da ovulação. No início desta fase, estradiol e progesterona ainda estão elevados, porém, ocorre o decréscimo das concentrações hormonais (BECKER et al, 2005) (figura 1).



**Figura 1.** Padrão dos hormônios estradiol, progesterona e LH em humanos (A) e ratos (B) durante o ciclo reprodutivo (adaptado de BECKER et al, 2005).

Analisando dor durante o ciclo menstrual, estudos mostram que mulheres na fase lútea referem maiores taxas de enxaqueca (MARTIN; LIPTON, 2008), distúrbios na articulação têmporo-mandibular (LERESCHE et al, 2003) e dor lombossacra (HELLSTROM; ANDERBERG, 2003). Em contraste, durante a fase folicular, demonstraram aumento de limiar de dor para estímulos de pressão, frio, calor e isquemia muscular quando comparada a outras fases do ciclo,

com exceção aos estímulos elétricos (FILLINGIN; NESS, 2000; RILEY III, 1998).

Experimentos utilizando animais também mostram diferenças sexuais e influência do ciclo estral na resposta a estímulos nocivos, porém existe uma variedade de resultados. Nos modelos de nocicepção agudos que utilizam estímulos elétricos as fêmeas se mostram mais sensíveis (VINCLER et al, 2001; MOGIL et al, 2000). Entretanto, nos modelos que utilizam estímulos mecânicos e térmicos, os resultados são menos consistentes. No estudo de Kayser et al (1996), utilizando estímulo mecânico (pressão) na cauda e pata, fêmeas demonstraram maiores limiares à pressão na cauda quando comparadas aos machos e limiares semelhantes à pressão na pata. Limiares de ratos fêmeas em proestro e estro foram menores do que os de fêmeas em metaestro e diestro para estimulação na cauda e pata. No estudo de Barrett et al (2002) o limiar de pressão aplicada na pata foi maior em ratos machos quando comparados às fêmeas. Já no estudo de Tseng e Craft (2001) não houve diferença no limiar mecânico (pressão) na pata e na latência de retirada da cauda em resposta a estímulo térmico (calor) entre machos e fêmeas.

Em modelos de dor persistente, como o teste de formalina, estudos mostram maior resposta nociceptiva em ratos fêmeas do que machos nas fases I, interfase e fase II do teste de formalina a 2% e 10% (ALOISI et al, 1994; GAUMOND et al, 2002). No entanto, as flutuações fisiológicas dos hormônios femininos ao longo do ciclo estral não parecem afetar a sensibilidade a dor no teste de formalina. Vincler et al (2001) não encontraram diferença significativa na duração do ato de lamber e morder a pata e do número médio de sacudidas durante as fases I e II entre ratos fêmeas em estro, proestro, diestro e metaestro.

Resultados semelhantes são encontrados em outros modelos de dor persistente e inflamatória, nos quais fêmeas demonstram maior sensibilidade, porém, demonstram, também, variação da sensibilidade durante o ciclo estral. Bradshaw et al (2000) no modelo inflamatório por administração da solução de Adjuvante Completo de Freund, CFA (solução com *Mycobacterium tuberculosis*) na pata, os ratos fêmeas em proestro exibiam aumento significativo da hiperalgesia térmica quando comparados aos ratos machos, aos ratos fêmeas ovariectomizadas e aos ratos fêmeas em outras fases do ciclo estral. Cook e Nickeson (2005) mostraram no modelo de poliartrite por CFA (injetado na base da cauda), que ratos fêmeas desenvolveram inflamação e hiperalgesia mecânica mais rápido e em maior intensidade do que ratos machos. Além disso,

entre os ratos fêmeas com artrite, os limiares de hiperalgesia mecânica foram menores durante o estro e proestro. Barret et al (2003) mostraram que ratos fêmeas apresentaram maior hiperalgesia térmica induzida pela capsaicina (componente ativo da pimenta), injetada na cauda, do que os machos em todas as doses testadas. Tall e Crip (2004) utilizando o modelo de nocicepção por inflamação por administração de carragenina (extrato de algas marinhas) na pata também demonstraram que ratos fêmeas tiveram maior hiperalgesia térmica quando comparadas aos machos. Porém, neste caso, as fêmeas em proestro foram menos sensíveis (possuíam maior latência de retirada da pata) do que as fêmeas em diestro e estro.

A realização de gonadectomia ocasiona o desaparecimento de diferenças sexuais vistas em animais intactos, onde ratos fêmeas ovariectomizadas se comportam igual aos ratos machos castrados, em vários modelos nociceptivos, como no teste da formalina e nos teste de hiperalgesia térmica e mecânica em modelos de inflamação por carragenina e de lesão nervosa por constrição crônica (GAUMOND et al, 2002; TALL, CRISP, 2004, TALL et al, 2001; LA-CROIX-FRALISH et al, 2005), sugere-se, então, que os hormônios gonadais sejam, em parte, responsáveis pelas diferenças sexuais nas respostas nociceptivas.

Entretanto, o papel preciso dos hormônios gonadais masculinos e femininos na nocicepção não são bem entendidos (CRAFT et al, 2004). Estas diferenças sexuais em nocicepção parecem ser efeitos tanto organizacionais (durante o desenvolvimento) quanto ativacionais (na fase adulta) dos hormônios esteróides gonadais (CRAFT, 2007; GREENSPAN et al, 2007). O mecanismo organizacional é um mecanismo associado ao desenvolvimento, no qual esteróides atuam durante períodos críticos (neonatal) para mediar o dimorfismo sexualmente permanente da morfologia cerebral que caracterizam o comportamento e a fisiologia na fase adulta. Já o mecanismo ativacional é mediado através de efeitos agudos dos hormônios gonadais no sistema nervoso já completamente desenvolvido e é responsável pela manutenção dos comportamentos sexuais e outros comportamentos em machos e fêmeas na fase adulta (LACROIX-FRALISH et al, 2005).

A testosterona parece ter um papel protetivo, pois a gonadectomia em ratos machos adultos produz aumento das respostas nociceptivas evocadas pela formalina (ALOISI; CECCARELLI, 2000). Gaumond et al (2005) observaram que a reposição com testosterona (implantes

subcutâneos de 15mg/pílula) tem um efeito hipalgésico nas fases I e II da formalina.

Estudos mostram que exposição recente (neonatal) à testosterona parece ser necessária para o desenvolvimento do fenótipo masculino em adultos (menor sensibilidade a estímulos nocivos), demonstrado no estudo de Borzan e Fuchs (2006), no modelo de inflamação por carragenina, no qual os ratos machos gonadectomizados na fase neonatal tiveram menores latências de retirada da pata em resposta a estímulo de calor quando comparados aos ratos sham gonadectomizados na fase adulta. LaCroix-Fralish et al (2005) utilizando um modelo de dor lombossaca associado com radiculopatia mostraram que a administração de testosterona em fêmeas neonatais aboliu o aumento de hiperalgesia térmica e mecânica observada em ratos fêmeas adultas quando comparadas aos machos adultos. Em contraste, no estudo de Hagiwara et al (2007), a administração neonatal de testosterona em ratos fêmeas, com dose suficiente para os ratos fêmeas não manifestarem as características femininas (em relação ao sistema reprodutivo), não resultou no fenótipo masculino observado na fase adulta no teste de formalina.

Após ovariectomia, fêmeas apresentam repostas diminuídas em relação aos animais intactos, sugerindo um efeito hipalgésico dos hormônios femininos (KEPLER, 1989; BARRETT et al, 2003). Gaumond et al (2005) não verificou alteração dos comportamentos nociceptivos (índice de dor) no teste de formalina entre ratos fêmeas intactas e ovariectomizadas. Entretanto, a ovariectomia diminuiu o índice de dor na interfase da formalina. Os autores sugerem que os hormônios femininos teriam um papel importante nos sistemas inibitórios de dor, uma vez que a interfase está relacionada a uma inibição ativa da nocicepção e não à diminuição de aferências nociceptivas. Assim, a prevalência de dor em mulheres poderia estar relacionada à deficiência nos sistemas inibitórios de dor e não ao aumento da atividade nociceptiva.

O papel dos hormônios gonadais femininos através de procedimentos de reposição também trazem resultados diversos e são dependentes das doses e das vias de administração dos hormônios, dos modelos nociceptivos utilizados e das respostas avaliadas. Todas estas variáveis tornam difíceis possíveis comparações (KUBA-QUINONES, JENAB, 2005).

Em modelos nociceptivos agudos, estudos mostram que a reposição com estradiol, administrado subcutaneamente (injeção diária

ou implantes) em ratos fêmeas ovariectomizadas aumentou a latência de retirada da pata no teste da placa quente (CRAFT ET AL, 2008; STOFELL, 2003, GORDON; SOLIMAN, 1998). Porém, a mesma forma de reposição de estradiol não alterou (CRAFT et al, 2008) ou aumentou (GORDON e SOLIMAN, 1998) a latência de retirada da cauda em resposta ao calor (água quente). Já a administração de progesterona, injetada subcutaneamente, aumentou (GORDON; SOLIMAN, 1998) ou não alterou (STOFELL, 2003) a latência de retirada da pata no teste da placa quente em ratas ovariectomizadas.

Em modelos de nociceção persistente, como o da formalina, também produzem resultados variados. Aloisi e Ceccareli (2000) mostraram que injeção intracerebroventricular de estradiol em ratos machos intactos provocou o aumento da duração do ato de lambear a pata na fase II do teste de formalina 5%. Porém, estudos com reposição de estradiol por via subcutânea (injeção diária ou implantes) encontraram redução no comportamento nociceptivo induzido pelo agente nociceptivo na fase II da formalina 2%, 5% e 5%, respectivamente (GAUMOND et al, 2005; MANINNO et al, 2007; KUBA et al, 2006). Entretanto, quando administrados em conjunto, estradiol e progesterona, por via subcutânea, não houve alteração dos comportamentos nociceptivos observados em ratos fêmeas ovariectomizadas na fase II do teste de formalina nos estudos de Gaumond et al (2005) e Kuba et al (2005). Além disso, Dexheimer (2003) mostrou que reposição de estradiol (injeção) subcutaneamente não alterou o comportamento nociceptivo induzido pela formalina 2%, porém, quando administrada em conjunto com a progesterona provocou aumento dos comportamentos nociceptivos avaliados.

A administração de progesterona subcutaneamente atenuou respostas nociceptivas nos modelo inflamatório por administração de CFA (REN et al, 2000). Porém, no modelo da formalina, doses de progesterona administradas, também, subcutaneamente (injeção diária ou implantes) não mostraram efeito no comportamento nociceptivo em nenhuma fase da formalina (GAUMOND et al, 2005; MANINNO et al, 2007; DEXHEIMER et al, 2002).

#### 1.4 SISTEMAS DE ANALGESIA E ANTINOCICEPÇÃO ENDÓGENOS

O processamento da dor no Sistema Nervoso Central (SNC) não consiste de mera reprodução consciente das sensações dolorosas periféricas que o alcançam. O SNC possui muitas estratégias para modificar as informações que recebe. A seleção é o principal mecanismo que gera uma sensação dolorosa e, portanto, por mecanismos modulatórios, o SNC pode modificar a eficácia dos “inputs” nociceptivos. Assim, a percepção da dor é um processo ativo (VILLANUEVA, 2009).

Segundo Calvino e Grilo (2006), a modulação da dor é mediada por controles originados de estruturas espinhais e supra-espinhais. Os autores dividiram o controle da dor em quatro categorias: influências dos segmentos espinhais, influências inibitórias descendentes do tronco cerebral, influências descendentes facilitatórias e Sistemas Inibitórios Difusos de Dor (DNICs).

Melzack e Wall (1965) analisaram os efeitos das influências dos segmentos espinhais na modulação da transmissão dos sinais nociceptivos e criaram a Teoria da Comporta. Neste modelo existe o balanço de dois tipos de influências exercidas nos neurônios nociceptivos não-específicos espinhais, cujos axônios constituem o trato espinorreticular e espinotalâmico ascendentes (chamados de neurônios T, pois são considerados de células gatilho, do inglês, “trigger cells”). Influências inibitórias chegam por neurônios periféricos por fibras não-nociceptivas ( $A\alpha$  e  $A\beta$ ) e por neurônios supra-espinhais. Grosseiramente, de acordo com a teoria da comporta, a ativação das fibras  $A\alpha$  e  $A\beta$  inibe respostas do neurônio T ao estímulo nociceptivo por um mecanismo envolvendo ativação de interneurônios inibitórios localizados na lâmina II. Estes interneurônios inibitórios são ativados por fibras não-nociceptivas e podem ser inibidos por fibras nociceptivas. Portanto, a ativação das fibras não-nociceptivas fecha o portão e bloqueia a transmissão do sinal nociceptivo para estrutura supra-espinhais (levando a analgesia), enquanto ativação de fibras nociceptivas, pela inibição de interneurônios inibitórios pode abrir o portão, facilitando a transmissão do sinal nociceptivo para estruturas supra-espinhais (levando à dor). Esta regulação espinhal é influenciada por estruturas supra-espinhais descendentes.

A modulação endógena da dor, através de vias descendentes, pode inibir ou facilitar a transmissão da informação nociva (MOONT et al, 2010; VAN WIJK; VELDHUIJZEN, 2010). Heinricher et al (2009) referem que algumas influências descendentes são tonicamente ativas, porém o equilíbrio entre a inibição e facilitação é dinâmico e pode ser

alterado em diferentes estados comportamentais, emocionais e patológicos. Estudos mostram que o estresse intenso e o medo estão associados à hipoalgesia (diminuição da resposta a estímulos nocivos) que reflete um deslocamento em direção à inibição. Já inflamação, lesão nervosa, doença e a administração de opióides estão associados com hiperalgesia (uma maior responsividade aos estímulos nocivos) que em parte, reflete um deslocamento em direção à facilitação. O autor refere que existem muitas evidências que sugerem que facilitação da nocicepção espinhal por vias descendentes é o principal contribuinte para a sensibilização central e no desenvolvimento da hiperalgesia secundária, indicando que o equilíbrio se desloca à favor da facilitação na transição da dor aguda para dor crônica.

Controles descendentes saem de uma série de regiões supra-espinhais, porém o sistema melhor estudado é o sistema PAG-RVM (Substância Cinzenta Periaquedutal - Bulbo Ventro Medial Rostral). A PAG se liga ao hipotálamo e às estruturas límbicas do prosencéfalo, incluindo a amígdala, e também recebe impulsos espino-mesencefálicos diretos. A PAG projeta-se para o RVM, que por sua vez envia projeções ao corno dorsal, região importante na função nociceptiva (HEINRICHER et al, 2009).

Um dos mecanismos inibitórios descendentes que modulam o processamento da dor ao nível da medula espinhal é chamado de Sistema Inibitório Difuso de Dor (DNIC), no qual a atividade de neurônios que sinalizam dor no corno dorsal da medula espinhal e no núcleo trigeminal é atenuada em resposta a um estímulo nocivo aplicado em uma área afastada do corpo (MOONT et al, 2010; POPESCU et al, 2010; VAN WIJK; VELDHUIJZEN, 2010). Estes neurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal são os neurônios multireceptivos de faixa dinâmica ampla (WDR, neurônios nociceptivos não-específicos), localizam-se, principalmente, na lâmina V do corno dorsal e podem ser ativados tanto por estímulos nocivos ou inócuos. Portanto, estes neurônios são importantes sítios de convergência para influências tanto excitatórias quanto inibitórias que saem de vários tipos de tecido, desse modo, fornecendo níveis de “atividade somestésica básica”. Isto resulta em um contínuo suplemento de sinais para os centros nervosos superiores e pode ser difícil extrair um significado desta “atividade somestésica básica”. Sugere-se que o DNIC poderia funcionar como um filtro, que ajuda a extrair sinais nociceptivos dos demais sinais através da inibição da “atividade somestésica básica” de toda a população de neurônios nociceptivos não-específicos. O processo de dor seria o

resultado do contraste entre atividade e o relativo silêncio de todos os outros neurônios nociceptivos não-específicos ativados pelo estímulo inicial. Os efeitos do DNIC não são observados em animais ou pacientes com a medula espinhal seccionada, já que estes efeitos não parecem estar confinados à medula espinhal, mas também parecem envolver regiões supraespinhais (CALVINO; GRILO, 2006; VAN WIJK; VELDHUIJZEN, 2010). O subnúcleo reticular dorsal (SDR) localizado no bulbo caudal parece estar envolvido no DNIC, funciona como uma estação de transmissão do DNIC. O SDR é principalmente ativado por estímulos nociceptivos que saem de qualquer parte do corpo e tem conexões recíprocas com o corno dorsal da medula espinhal (VAN WIJK; VELDHUIJZEN, 2010; VILLANUEVA, 2010).

Calvino e Grilo (2006) referem que o mecanismo de DNIC também pode explicar o efeito analgésico da hiperestimulação ou eletroacupuntura. A efetividade dessas técnicas parece aumentar com o aumento da intensidade do estímulo, sendo maior com uma estimulação próxima ao limiar de dor.

Analgesia induzida por estresse pode contar com, pelo menos alguns dos efeitos do DNIC, pois o estímulo doloroso pode ativar respostas de estresse (VAN WIJK; VELDHUIJZEN, 2010). Analgesia induzida por estresse é uma supressão da resposta de dor que ocorre durante ou após a exposição a estímulos estressantes e dolorosos. A analgesia induzida por estresse pode ser vista como um componente da resposta de luta ou fuga. A presença de uma lesão dolorosa poderia não possibilitar a sobrevivência de um organismo se este estivesse ameaçado. O mecanismo pelo qual ocorre analgesia induzida por estresse seria pela ativação de vias inibitórias descendentes de dor. Muitos neurotransmissores e neuropeptídeos parecem estar envolvidos na analgesia induzida por dor, especialmente, opióides endógenos, monoaminas, canabinóides, ácido aminobutírico e glutamato (BUTLER; FINN, 2009).

#### **1.4.1 Diferenças Sexuais nos Sistemas de Analgesia e Antinocicepção Endógenos**

Diferenças sexuais nos Sistemas Inibitórios Difusos de Dor (DNIC) poderiam particularmente explicar porque condições de dor crônica afetam predominantemente mulheres. Maior sensibilidade à dor em mulheres poderia ser causada por um DNIC menos eficiente,

resultando em menor efetividade na inibição da dor. Na revisão, o autor cita que muitos estudos demonstraram maior efetividade dos efeitos do DNIC em homens. Entretanto, outros estudos não mostraram diferença nos efeitos de DNIC, enquanto nenhum estudo encontrou um efeito maior de DNIC em mulheres (VAN WIJK; VELDHUIJZEN, 2010).

Estudos mostram diferenças relacionadas ao sexo na expressão da analgesia induzida por estresse. Machos tendem a exibir maior analgesia induzida por estresse do que fêmeas (BUTLER; FINN, 2009).

## 1.5 ANALGESIA OPIÓIDE E DIFERENÇAS SEXUAIS

Opióides exógenos são as drogas mais potentes para tratamento de dor aguda e severa, mas a sua utilização é prejudicada pelos efeitos colaterais proporcionados como depressão respiratória, náuseas, turvação da consciência, constipação, vício e tolerância (NIESTERS et al, 2010; STEIN et al, 2009).

Foram identificados três tipos de receptores opióides  $\mu$  (mu),  $\delta$  (delta) e  $\kappa$  (kappa). Todos estes três tipos de receptores medeiam inibição de dor e são encontrados por todo sistema nervoso: no sistema nervoso sensorial somático e visceral, projeções e interneurônios da medula espinhal, mesencéfalo e córtex (STEIN et al, 2003). Recentemente, descobriu-se que neurônios sensoriais periféricos expressam receptores opióides e peptídeos opióides, e a função desses neurônios pode ser modulada por opióides endógenos derivados de células do sistema imunológico ou por uso de drogas opióides. Este cenário tem evoluído a partir de estudos sobre mecanismos da dor inflamatória e sua inibição (STEIN et al, 2009).

Médicos envolvidos no tratamento de dor aguda encontram diferenças entre indivíduos tanto nos efeitos analgésicos terapêuticos quanto nos seus efeitos colaterais indesejáveis. Estudos em roedores mostram que a variabilidade nas respostas aos opióides é relacionada com uma variedade de fatores incluindo a genética, o modelo de nocicepção, a idade e o sexo dos animais e o tipo de opióides utilizados. A contribuição das diferenças sexuais na eficácia dos opióides está sendo apreciada em estudos humanos. Porém, as diferenças sexuais na analgesia opióide em humanos continuam pobremente compreendido (NIESTERS et al, 2010).

Em estudos antigos de Gear e colaboradores (Gear et al, 1996a, 1996b e 1999) observaram que drogas agonistas parciais

(agonista-antagonista), com ação, principalmente, em receptores k-opioides (pentazocina, nalbufine e butofarnol) produzem maior analgesia após extração do terceiro molar (dente siso) em mulheres do que em homens. Porém, Fillingim et al (2004), mostraram que a pentazocina (0,5 mg/kg) produziu analgesia de similar magnitude em homens e mulheres em três tipos de estímulos dolorosos (calor, pressão e isquemia).

Niesters et al (2010) realizaram uma revisão sobre o efeito da analgesia produzida por  $\mu$ -opioides e pela combinação de  $\mu$ - e k-opioides da dor aguda ou experimental em humanos e concluíram que existem diferenças sexuais na analgesia produzida pela morfina nos estudos realizados tanto experimentais quanto clínicos, sendo a morfina mais eficiente em mulheres na maioria dos estudos. Dados sobre o tratamento conjunto de  $\mu$ - e k-opioides são menos convincentes e precisam de futuras investigações, alguns estudos clínicos com mulheres tratadas com a combinação de  $\mu$ - e k-opioides tiveram maior analgesia, porém estudos experimentais com a combinação destes opioides não mostraram diferença sexual.

Em relação aos estudos em animais, Dahan et al (2008) referem existir evidências de diferenças sexuais na analgesia produzida por drogas agonistas opioides aos receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e k. Porém, muitas questões devem ser levadas em consideração ao analisar os resultados obtidos como, os opioides utilizados, a via de administração e as doses utilizadas dos opioides e os modelos de dor utilizados.

Muitos estudos mostram sensibilidade aos opioides aumentada em machos quando comparados às fêmeas (FILLINGIM; NESS, 2000). Dahan et al (2008) relatam que a maioria dos estudos com ratos e camundongos mostram que a morfina administrada sistemicamente é mais potente e eficiente em machos do que em fêmeas em uma variedade de modelos nociceptivos. Wang et al (2006) utilizaram ratos machos e fêmeas intactos e observaram a influência de dor persistente (induzida por CFA na pata) na potência dos opioides. Observou-se diferença significativa entre ratos machos e fêmeas no efeito anti-hiperalgésico da morfina em todas as doses testadas. Os ratos machos tiveram um aumento significativo no percentual do efeito possível máximo da morfina quando comparados às fêmeas. Este efeito dimórfico entre os sexos foi mais evidente nas doses altas de morfina. Também, no estudo de Cook e Nickeson (2005), a administração sistêmica de morfina, oxicodona (agonistas opioides com alta afinidade aos receptores opioides  $\mu$ ) e butorfanol (agonistas opioide parcial, com

alta afinidade aos receptores opióides  $\kappa$  e baixa afinidade aos receptores opióides  $\mu$ ) provocou um efeito anti-hiperalgésico mais potentes em machos do que em fêmeas.

Com relação aos estudos em animais envolvendo opióides que se ligam em receptores  $\delta$  e  $\kappa$ , existe uma variedade de resultados. Kavalier e Innes (1987) observaram que a droga U69,593, um agonista  $\kappa$ -opióide produziu maior analgesia em camundongos machos do que em fêmeas, no teste de placa quente. Bartok e Craft (1997) mostraram diferenças sexuais na analgesia por drogas  $\delta$ - e  $\kappa$ -opióides em dois testes nociceptivos (teste de retirada da cauda e teste da placa quente), mas referem que estas diferenças podem ser dependentes do modelo, da dose das drogas utilizadas e do tempo no qual a antinocicepção é avaliada. Neste estudo, o efeito máximo das drogas U69,593 (agonista  $\kappa$ -opióide) e DPDPE (agonista  $\delta$ -opióide) ocorre primeiro em fêmeas do que em machos (em diferentes testes nociceptivos), a bremazocina (agonista  $\kappa$ -opióide) produziu maior analgesia em fêmeas do que em machos no teste de retirada da cauda, enquanto as maiores doses de agonistas  $\delta$ -opióides (DPDPE e deltorfina) testados produziram maior antinocicepção no teste de placa quente em machos do que em fêmeas.

## 1.6 ACUPUNTURA E PONTO ST36

A acupuntura tradicional Chinesa é uma terapia utilizada há mais de 3000 anos e consiste na aplicação de agulhas em regiões específicas do corpo, conhecidas como acupontos. É utilizada para tratamento de uma variedade de condições clínicas como dor, depressão, vícios, ansiedade, acidentes cerebrovasculares e suas seqüelas e distúrbios gastrointestinais (ULETT et al 1998). Os mecanismos de analgesia por acupuntura vêm sendo extensamente explorados desde os anos 70, mas ainda são incompletos (LIN; CHEN, 2008).

Evidências mostram o envolvimento de opióides endógenos e seus receptores no efeito analgésico da acupuntura, este fato se deve à reversão da analgesia pela administração sistêmica de naloxona, um antagonista opióide (HAN, 2004; LIN; CHEN, 2008). No estudo de Emmel (2008), a naloxona (1mg/kg) reverteu o efeito antinociceptivo obtido na acupuntura manual no ponto BL60 no modelo de nocicepção por ácido acético em camundongos.

Porém, estudos referem que este efeito de reversão da analgesia provocada pela naloxona na eletroacupuntura parece ser dependente da

freqüência utilizada (HAN, 2004; LIN; CHEN, 2008). No estudo de Han et al (1986), o efeito da eletroacupuntura de 2Hz foi bloqueado por baixas doses de naloxona (0,5 mg/Kg, dose suficiente para bloquear somente receptor  $\mu$ -opióide e não k-opióide) e a eletroacupuntura de 100Hz foi bloqueada somente por altas doses de naloxona (20mg/Kg), sugerindo então, que a eletroacupuntura de baixa freqüência ativaria receptores  $\mu$ -opióides e a eletroacupuntura de alta freqüência ativaria receptores k-opióides. Posteriormente, Fei et al (1987) mensuraram o conteúdo de meta-enkefalina (agonistas de receptores  $\mu$ - e  $\delta$ -opióides) e dinorfina (agonista puro do receptores k-opióides) no líquido retirado do espaço subaracnoideu após eletroacupuntura de 2, 25 ou 100 Hz e constataram que a eletroacupuntura de 2Hz produziu um aumento na quantidade de meta-enkefalina e eletroacupuntura de 100 Hz produziu em aumento na quantidade de dinorfina. Ainda, Han et al (1999), utilizando anticorpo contra endorfina-1 (agonista puro do receptor  $\mu$ -opióide), confirmaram o resultado descrito acima e indicaram que endorfina-1 está relacionada a analgesia produzida por eletroacupuntura de 2Hz, mas não a analgesia produzida por eletroacupuntura de 100Hz.

Com base em estudos analisados, Han (2004) e Zhao (2008) concluíram que a eletroacupuntura de baixa freqüência estimula liberação de  $\beta$ -endorfinas, enkefalinas e endomorfina, que ativam receptores  $\mu$ - e  $\delta$ -opióides e altas freqüências estimulariam liberação de dinorfina que ativaria receptores k-opióides.

Além do sistema opióide endógeno, estudos estão focados no envolvimento dos sistemas monoaminérgicos na analgesia induzida pela acupuntura. O estudo de Chang et al (2004) mostrou que os receptores 5-HT1A e 5-HT3 medeiam parcialmente o efeito da analgesia por eletroacupuntura, mas que o receptor 5-HT2 está envolvido na resposta nociceptiva, pois o efeito da eletroacupuntura de 100Hz foi potencializado pela administração de antagonista do receptor 5-HT2, enquanto que antagonistas dos receptores 5-HT1A e 5-HT3 bloquearam a analgesia induzida por três freqüências de eletroacupuntura. No estudo de Emmel (2008), a administração de antagonista 5HT1A bloqueou o efeito antinociceptivo da acupuntura manual no ponto BL60 no teste de contorção abdominal, porém, a administração de antagonistas aos receptores 5HT2A/2C e 5HT3 não reverteu o efeito analgésico da acupuntura. O mesmo estudo não encontrou participação do sistema dopaminérgico na antinocicepção induzida pela acupuntura manual no ponto BL60.

Estudos realizados na década de 70 demonstram a participação de vias inibitórias descendentes na analgesia induzida pela acupuntura. Lesões realizadas no funículo lateral dorsal da medula espinal (T2 e T3) de gatos provocaram diminuição ou abolição da analgesia induzida pela eletroacupuntura no ponto ST36 (ZHAO, 2008). Em estudo mais recente, Li et al (2007) mostraram que eletroacupuntura no ponto GB30 inibiu significativamente a expressão de Fos nas lâminas I e II da medula espinal (onde terminam os aferentes nociceptivos primários) de ratos sham-operados, mas não em ratos com lesão do funículo lateral. O estudo de Lao et al (2004) também demonstrou que eletroacupuntura (10Hz e 100Hz) no ponto GB30 produziu anti-hiperalgesia e diminuiu a expressão de Fos nas lâminas I e II da medula espinal e aumentou a expressão de Fos nas lâminas III e IV, onde fibras mielinizadas de grande calibre (A $\alpha$  e A $\beta$ ) terminam. Os autores acreditam que a eletroacupuntura inibe e ativa populações distintas de neurônios na medula espinal.

Muitas regiões cerebrais parecem estar envolvidas na modulação da analgesia induzida por acupuntura (ZHAO, 2008). De Medeiros et al (2003) observaram aumento da expressão de Fos na substância cinzenta periaquedutal em animais tratados com eletroacupuntura no ponto ST36. Takeshige et al (1991) mostraram que lesões na área pré-óptica e no núcleo arqueado medial aboliram a analgesia induzida pela acupuntura. Em humanos, Hui et al (2005), utilizando a técnica de neuroimagem funcional mostraram que a acupuntura pode modular a atividade de muitas estruturas corticais e subcorticais, como o tálamo, o hipotálamo, o córtex cingulado anterior (parte do sistema límbico), a substância cinzenta periaquedutal, o núcleo da rafe e o cerebelo.

Le Bars e Willer (2002) sugerem a participação dos Sistemas Inibitórios Difusos de Dor (DNICs) na analgesia produzida pela acupuntura e eletroacupuntura. Em um estudo desenvolvido por Bing et al (1990) a acupuntura manual na pata posterior direita de ratos, aplicada em um acuponto (ST36 ou “Zusanli”) e em um não-acuponto (próximo ao ST36) provocaram analgesia e inibição de neurônios multirreceptivos de faixa dinâmica ampla, efeito também observado na aplicação de um estímulo nocivo (água quente 48°C) na pata contralateral.

Pesquisas mostram que a acupuntura tem um efeito anti-inflamatório e na regulação do sistema imune (YIM et al, 2007). Tracey (2002) refere que o reflexo inflamatório e vias colinérgicas anti-inflamatórias podem estar envolvidos na analgesia obtida pela acupuntura. Segundo o autor, os produtos da inflamação em tecidos

periféricos (citocinas liberadas por ativação de células imunes inatas) podem ativar sinais aferentes, que fazem sinapse com o Núcleo do Trato Solitário (NTS). A subsequente ativação da atividade eferente do nervo Vago inibe a síntese de citocinas através da via colinérgica anti-inflamatória (o reflexo inflamatório). Informações também podem ser transmitidas para o hipotálamo e para o complexo vagal dorsal e estimulam a liberação de ACTH e consequente liberação de glicocorticóides, ativando a via anti-inflamatória humoral. Assim, sinais aferentes somáticos produzidos pela terapia com acupuntura poderiam ser transmitidos para níveis supra-espinais para indução de sinais anti-inflamatórios reflexivos através de mecanismos neurais ou humorais.

Os pontos de acupuntura (acupontos) foram empiricamente determinados através da prática clínica. A determinação dos pontos foi baseada em relatos clínicos, se observou que ao estimulá-los produziam-se sensações como, entorpecimento, peso ou choque, chamadas por acupunturistas chineses de *De Qi*. Perceberam, também, que estas sensações irradiavam para regiões distantes do corpo e seguiam um trajeto comum. Assim, segundo a teoria chinesa, os acupontos estão ligados por uma rede de meridianos que percorrem longitudinalmente o corpo. Segundo acupunturistas, esta sensação *De Qi* é essencial para os efeitos da terapia por acupuntura (SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA, 2001; LANGEVIN; YANDOW, 2002).

Apesar de intenso esforço para entender a anatomia e fisiologia dos pontos de acupuntura e meridianos, a definição e caracterização destas estruturas ainda não estão bem elucidadas (LANGEVIN; YANDOW, 2002). Entretanto, alguns estudos analisaram as propriedades fisiológicas dos pontos da acupuntura e mostraram que a maioria dos pontos utilizados era pontos motores ou áreas próximas ao trajeto de nervos principais (ULETT et al, 1998). Segundo Li et al (2004), acupontos são complexos excitáveis de pele/músculo e nervos que possuem alta densidade de terminações nervosas. Colbelt et al (2009) identificaram propriedades elétricas de acupontos, como baixa resistência.

Segundo Yim et al (2007) o ponto ST36 (Estômago 36) determinado em humanos, chamado de “Zusanli” faz parte do meridiano do estômago e segundo a medicina oriental, o meridiano do baço e estômago governam os quatro membros, assim, ele é utilizado, freqüentemente, para tratamento de disfunções que acometem os quatro membros. Também é utilizado para aumento e regulação da imunidade.

Estudos demonstram analgesia por eletroacupuntura em um ponto análogo ao ST36 em diversos modelos de nocicepção. Chang et al (2004) utilizando solução de formalina 1% e eletroacupuntura em três frequências diferentes 2, 10 e 100Hz, observaram que houve diminuição do tempo em que o animal lambe a pata nas fases inicial e final do teste de formalina pela pré-estimulação com eletroacupuntura no ponto análogo ao ST36 nas frequências de 2, 10 e 100Hz. Em outro estudo, Huang et al (2004) utilizaram a eletroacupuntura (100Hz, pontos análogos ao ST36 e BP6) em um modelo de nocicepção inflamatória induzida por CFA e obtiveram como resultado a diminuição da hiperalgisia mecânica (Von Frey), porém nenhum resultado significativo foi demonstrado para hiperalgisia térmica (placa quente). A diminuição da hiperalgisia mecânica foi revertida por uma dose alta de naloxona (20mg/kg). Em outro estudo, com eletroacupuntura (100Hz) nos pontos análogos aos ST36 e BP6, Huang et al, (2008) mostraram efeito antinociceptivo (aumento da latência em teste de estímulo radiante na cauda) em ratos normais e tratados com CFA, sendo o efeito antinociceptivo maior em ratos tratados com CFA do que em ratos normais. Este efeito foi bloqueado somente por altas doses de naloxona (20mg/kg), indicando que peptídeos opióides endógenos, especialmente a dinorfina, poderiam estar presentes.

## 1.7 JUSTIFICATIVA

A acupuntura tradicional Chinesa é uma terapia utilizada há mais de 3000 anos e é extremamente reconhecida pelo seu efeito no alívio de dores (ULETT et al, 1998). Como referido, nas últimas décadas cresceu o interesse pelo estudo da acupuntura e seus mecanismos de ação, que são, ainda, incompletos (LIN; CHEN, 2008). Desta forma, evidências mostram o envolvimento de opióides endógenos e seus receptores na analgesia produzida pela acupuntura (HAN, 2004). Em paralelo, estudos demonstram dimorfismo sexual na analgesia opióide, tanto em humanos quanto em animais (FILLINGIM; NESS, 2000, DAHAN et al, 2008; NIESTER et al, 2010). Assim, foi proposto que, talvez, o efeito da acupuntura mostre dimorfismo sexual. Além disso, não há estudos que investiguem a possível influência do sexo ou do ciclo estral no efeito antinociceptivo e anti-hiperalgésico da acupuntura.

## 1.8 OBJETIVOS

### 1.8.1 Objetivo Geral

Investigar se o efeito antinociceptivo e anti-hiperalgésico da acupuntura no ponto análogo ao ST36 é sensível às diferenças sexuais.

### 1.8.2 Objetivos Específicos

- Verificar a influência do sexo e do ciclo estral no comportamento nociceptivo ao teste da formalina e aos testes de retirada da pata em resposta a estímulos térmicos e mecânicos.
- Verificar o efeito antinociceptivo da acupuntura no ponto análogo ao ST36 no teste de formalina.
- Verificar os efeitos anti-hiperalgésicos mecânicos da acupuntura no ponto análogo ao ST36.
- Verificar os efeitos anti-hiperalgésicos térmicos da acupuntura no ponto análogo ao ST36.
- Verificar a influência do ciclo estral no efeito antinociceptivo e anti-hiperalgésico da acupuntura no ponto análogo ao ST36.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 275 ratos adultos (80 a 100 dias) da espécie *Rattus norvegicus*, do tipo Wistar, fêmeas com peso de 250-300g e machos com peso de 300-350g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos em um biotério setorial, em grupo de cinco ou seis por caixa, com livre acesso à água e à ração. A temperatura do biotério foi controlada ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e a iluminação mantida em ciclo claro/escuro de 12 horas cada, o período escuro iniciando-se às 19 horas.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética de Uso dos Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA-UFSC). Este projeto foi cadastrado sob nº de protocolo PP00372/CEUA e 23080.030009/2009-44/UFSC.

### 2.2 ESFREGAÇO VAGINAL

As ratas foram firmemente contidas pelo dorso e totalmente imobilizadas com uma toalha por cima do seu corpo. O fluido vaginal foi coletado através da introdução da ponta de um conta-gotas na abertura vaginal, este preenchido com uma quantidade adequada de solução salina. A solução foi introduzida e aspirada de volta para o conta-gotas por três vezes e após, colocada em uma lâmina de microscópio limpa, isenta de gordura. A análise foi feita no microscópio óptico com aumento médio (10X). A identificação das fases do ciclo estral foi realizada com base na proporção das células analisadas (NELSON, 1995, MARCONDES, et al, 2002). As fases do ciclo estral foram identificadas seguindo o seguinte critério, descrito por Nelson (1995):

a) Proestro: o esfregaço apresenta grande número de células epiteliais nucleadas, algumas células epiteliais corneificadas (sem núcleo) e ausência total de leucócitos.

b) Estro: corneificação vaginal completa, ou seja, o esfregaço apresenta células epiteliais corneificadas (sem núcleo) e ausência total de leucócitos.

c) Diestro I (Metaestro): as células epiteliais corneificadas apresentam-se em número reduzido, aparecem leucócitos e poucas células epiteliais nucleadas.

d) Diestro II: leucócitos em abundância e algumas células epiteliais nucleadas.

A verificação das fases do ciclo estral foi acompanhada por 8 a 15 dias precedentes ao dia do experimento para evitar erro na determinação do ciclo e identificar ciclos irregulares. Segundo Marcondes et al (2002), a duração do ciclo estral para a maioria (60 a 70%) das ratas analisadas foi de 4 a 5 dias, entretanto, algumas ratas apresentaram ciclos regulares mais longos ou até ciclos irregulares, permanecendo em uma fase do ciclo estral por um período maior do que 4 a 5 dias.

Foram utilizados ratos fêmeas de todas as fase do ciclo estral, porém, os animais nas fases diestro I e diestro II foram agrupados e formaram o grupo chamado diestro.

### 2.3 TESTE DE FORMALINA

No dia do teste o animal foi transferido para uma caixa de acrílico (20 x 20 x 20 cm) dividida em três compartimentos iguais, colocada em cima de uma plataforma perfurada, que estava situada sobre um suporte de madeira com altura de 30 cm da mesa de análise. O animal foi mantido por um período mínimo de 30 minutos para ambientação, antes do início do experimento. Em seguida, o animal foi contido e injetado subcutaneamente (sc), na pata posterior direita, com 0,05ml de solução de 1,0% de formaldeído em salina (0,9%) (solução de formalina) e imediatamente devolvido à caixa para observação e registro de suas reações à injeção do agente nociceptivo através de um programa de computador, PainTestLab desenvolvido pela UNICAMP em 2005. Foi registrada somente a fase II do teste de formalina, de 30 a 60 minutos após injeção de formalina. Para controle da injeção de solução de formalina foram realizados grupos com injeção de salina subcutânea na pata posterior direita.

O teste de formalina foi descrito por Dubuisson e Dennis em 1977 como um modelo animal de nocicepção, sendo considerado um método conveniente para produzir e quantificar dor em ratos. A intensidade da dor é inferida por categorias de comportamentos, que foram convertidas em valores numéricos (escores de 0 a 3):

0 (zero): as duas patas estão apoiadas no chão, o peso é distribuído igualmente entre as duas patas, inclusive durante a locomoção.

1 (um): o animal apóia a ponta dos dígitos da pata injetada no chão da caixa.

2 (dois): o animal eleva a pata e a mantém flexionada junto do corpo, sem apoiá-la no chão,

3 (três): o animal lambe, morde e agita pata injetada.

Coderre et al (1993) avaliaram os pesos descritos por Debuissou e Denis (1977), validando o método como adequado para medir a intensidade de dor. Assim, de acordo com os escores propostos por Dubuisson e Denis (1977) e validados por Coderre et al (1993), o índice de dor (ID) foi calculado através de uma medida ponderada considerando-se o tempo gasto em cada um dos comportamentos induzidos pelo agente nociceptivo. A análise dos índices de dor foi realizada ao final de cada minuto, calculados através da fórmula abaixo, assim, se obteve 30 valores de índices de dor, demonstrados através de um gráfico linear.

$$ID = \frac{0 \times t(s) + 1 \times t(s) + 2 \times t(s) + 3 \times t(s)}{60s}$$

Outra forma de análise foi realizada através da soma do tempo em que o animal lambeu, mordeu e agitou a pata (comportamento 3) durante os 30 minutos de análise.

## 2.4 ACUPUNTURA

Devido ao fato que a determinação dos pontos mapeados em humanos foi de maneira empírica, a transição destes para os animais se tornou uma tarefa difícil. Apesar de a acupuntura ser utilizada na prática veterinária, os pontos determinados em animais podem ser considerados apenas análogos aos pontos mapeados em humanos. Portanto, foi

realizada acupuntura manual em um ponto análogo ao ponto ST36 determinado em humanos na acupuntura tradicional chinesa.

A acupuntura manual foi realizada por 20 minutos após 10 minutos da injeção subcutânea da solução de formalina ou salina. Foram utilizadas agulhas de aço inoxidável de tamanho 0,18 mm x 8 mm para acupuntura e um aplicador de agulhas, onde foi mantida uma profundidade de 5 mm. Os animais foram brevemente contidos para o posicionamento da agulha sendo mantidos soltos nas caixas de observação durante o período total de agulhamento.

O ponto análogo ao ST36, determinado em ratos, localiza-se entre a tíbia e fíbula, a uma distância aproximada de 5 mm lateral ao tubérculo anterior da tíbia, no músculo tibial anterior de acordo com figura 2 (MEDEIROS et al, 2003, HUANG et al, 2004).



**Figura 2.** Ponto análogo ao ST36 (figura adaptada de YIM et al, 2008)

Para controle da acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 foi realizada a acupuntura manual em um não-acuponto localizado 5 mm lateral à linha média da superfície posterior da pata traseira direita, de acordo com Medeiros et al (2003).

## 2.5 TESTE DE RETIRADA DA PATA EM RESPOSTA A ESTÍMULO MECÂNICO

Para realização do teste de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico os animais foram mantidos nas caixas acrílicas transparentes, sobre a plataforma metálica perfurada (célula de 0,5 x 0,5 cm) utilizada no teste de formalina. Os animais se movimentavam livremente dentro da caixa de observação. Foram utilizados filamentos de Von Frey, onde

o animal foi submetido a uma pressão mecânica na pata injetada. O teste com filamentos de Von Frey foi realizado 90 minutos após a injeção de formalina ou salina.

O teste de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico foi realizado com base no descrito por Chaplan et al (1994), com algumas modificações, como, espessuras de filamentos distintas. Foram utilizados oito filamentos, aplicados na região plantar da pata posterior direita de forma crescente ou decrescente de espessura. As espessuras dos filamentos utilizadas foram: 3,61 (0,4g), 3,84 (0,6g), 4,08 (1g), 4,31 (2g) 4,56 (4g), 4,93 (8g) e 5,18 (15g), 5,46 (26g).

Os filamentos de Von Frey foram aplicados de forma perpendicular à superfície plantar da pata direita (injetada) com força suficiente para curvâ-los e o estímulo permaneceu por 8s. Foi dado um intervalo de 5 min, permitindo recuperação entre um teste e outro. Uma resposta positiva foi considerada quando a pata testada foi retirada. O teste foi iniciado com o filamento de 2,0g e progredido de maneira crescente ou decrescente conforme a resposta apresentada. Na ausência de resposta de retirada, um estímulo mais forte foi aplicado, já na presença de resposta de retirada da pata, o próximo estímulo aplicado foi mais fraco.

O padrão de resultados positivos e negativos foi tabulado como: X = retirada e O = não retirada.

Para cálculo do limiar foram obtidas seis respostas. Porém as seis respostas não começam a ser contadas até que haja uma alteração em seu padrão (retirada, não retirada, ou vice-versa), compreendido como um cruzamento de respostas, sendo que as duas primeiras respostas são as próprias ocorridas neste cruzamento. As próximas quatro respostas somam-se às duas e completam as seis respostas necessárias. Também podem acontecer cinco respostas consecutivas negativas (atingindo o escore máximo) ou quatro respostas positivas (atingindo o escore mínimo).

O padrão de respostas positivas e negativas foi tabulado e 50%g limiar de resposta foi calculado pela fórmula:

$$50\%g \text{ limiar} = (10 X_f + \kappa\delta) / 10.000, \text{ onde,}$$

$X_f$  = valor (em unidade de log) do Von Frey final utilizado;

$K$  = valor (retirado de Chaplan et al, 1994) dos padrões positivos e negativos;

$\delta$  = diferença média (em unidade de log) entre estímulos.

## 2.6 TESTE DE RETIRADA DA PATA EM RESPOSTA A ESTÍMULO TÉRMICO

O teste de retirada da pata em resposta a estímulo térmico foi realizado de acordo com o proposto por Hargreaves et al (1988), assim, foi testada a latência de retirada da pata a um estímulo nocivo de calor radiante, utilizando-se o aparelho Plantar Test (Ugo Basile 50W, 50/60Hz) com intensidade de 70 I.R. (infravermelho). O aparato experimental constituía de um suporte com a base de acrílico transparente. Acima deste suporte foi acoplada uma caixa acrílica transparente (20 x 20 x 20 cm), dividida em três compartimentos, onde os animais foram colocados e abaixo deste suporte ficava localizada a fonte de calor radiante. Os animais ficavam livres para se movimentar.

O teste de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante foi realizado 90 minutos após a injeção de salina ou formalina. Foram realizados três estímulos de calor radiante nas patas ipsilaterais e contralaterais à aplicação de salina ou formalina. O tempo de intervalo entre os estímulos na mesma pata foi de 5 min. A resposta de latência de retirada da pata da superfície foi observada e o tempo de corte utilizado para evitar lesão tecidual foi de 20s.

A latência de retirada da pata, antes da aplicação de formalina/salina (basal) foi calculada pela combinação das médias da latência dos três estímulos para cada pata traseira. Após intervenção (formalina/salina), a latência de retirada da pata foi determinada pela diferença das médias das latências dos três estímulos apresentados das medidas basais e das medidas realizadas após intervenção, formalina ou salina (média medida basal – média medida pós-intervenção).

## 2.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

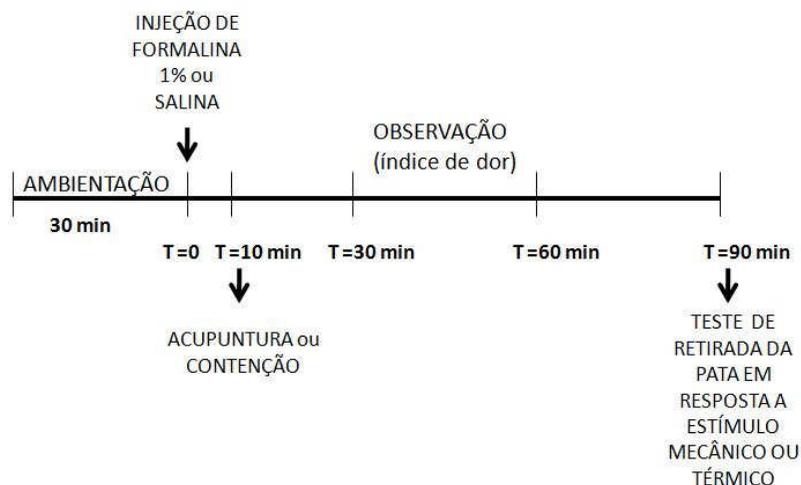
As fêmeas foram divididas em grupos de acordo com a fase do ciclo estral (diestro, proestro e estro). A lavagem vaginal e verificação do ciclo ocorreram no período da manhã entre 09:00 e 11:00 horas.

Pela manhã também foram realizadas as medidas basais de limiar e latência de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico e térmico, respectivamente.

Os experimentos foram realizados no período da tarde entre 13:00 e 18:00. Os animais foram colocados nos aparatos experimentais

específicos para cada teste nociceptivo (mecânico e térmico) e ambientados por 30 min. Em seguida, recebiam injeção de solução de salina ou formalina (1% de formaldeído), após 10 min foi realizada somente contenção ou contenção e agulhamento por 20 min, seguido de observação comportamental por 30 min.

Após 90 min da injeção de salina ou formalina, os animais foram submetidos aos testes de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico e térmico. Foram utilizados grupos distintos para cada teste, assim cada teste foi realizado em apenas um animal (figura 3).



**Figura 3.** Protocolo Experimental

O controle da solução de formalina foi realizado através da avaliação das medidas basais e também com outros grupos de animais, nos quais foi injetada salina por via subcutânea. Para avaliar o efeito da acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 foi realizado o controle do procedimento de contenção, uma vez que este procedimento pode produzir analgesia por estresse. Além disso, nos grupos experimentais em que a acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 provocou resultado significativo em relação ao grupo controle não agulhado, um controle foi realizado através da introdução de uma agulha em um ponto sham (não-acuponto).

O número (n) de animais utilizados em cada grupo experimental nos testes nociceptivos utilizados são demonstrados na tabela 1 e 2.

**Tabela 1. Quantidade de animais (n) utilizados nos grupos experimentais no teste de formalina e no teste de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico.**

| Injeção   | Intervenção     | Sexo    |       |          |        |
|-----------|-----------------|---------|-------|----------|--------|
|           |                 | Diestro | Estro | Proestro | Macho  |
| Salina    | Contenção       | n = 7   | n = 8 | n = 8    | n = 8  |
|           | Acupuntura ST36 | n = 8   | n = 8 | n = 8    | n = 7  |
| Formalina | Contenção       | n = 8   | n = 8 | n = 7    | n = 12 |
|           | Acupuntura ST36 | n = 8   | n = 8 | n = 7    | n = 11 |
|           | Acupuntura Sham | n = 7   | n = 7 | n = 6    | -      |

**Tabela 2. Quantidade de animais (n) utilizados nos grupos experimentais no teste de retirada da pata em resposta a estímulo térmico.**

| Injeção   | Intervenção     | Sexo    |       |          |       |
|-----------|-----------------|---------|-------|----------|-------|
|           |                 | Diestro | Estro | Proestro | Macho |
| Salina    | Contenção       | n = 8   | n = 6 | n = 6    | n = 7 |
|           | Acupuntura ST36 | n = 8   | n = 6 | n = 6    | n = 6 |
| Formalina | Contenção       | n = 10  | n = 7 | n = 7    | n = 7 |
|           | Acupuntura ST36 | n = 11  | n = 7 | n = 6    | n = 8 |
|           | Acupuntura Sham | -       | -     | -        | n = 8 |

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados em uma câmara de CO<sub>2</sub>.

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados por média e erro padrão. Para a análise do índice de dor, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de três vias com 30 medidas repetidas, levando em consideração os seguintes fatores: sexo ou fase do ciclo estral (estro, diestro, proestro e

machos) intervenção (salina ou formalina), tratamento (acupuntura ou contenção). Após, o índice de dor, que era formado por 30 variáveis dependentes no gráfico linear foi dividido em três intervalos (intervalo 1: de 31 a 40 min, intervalo 2: de 41 a 50 min e intervalo 3: de 51 a 60 min) e uma nova análise de variância (ANOVA) de três vias, agora com 10 medidas repetidas, foi realizada para cada intervalo, levando em consideração os mesmos fatores citados acima. Para a análise do comportamento três, do limiar de retirada da pata em reposta a estímulo mecânico e da latência de retirada da pata em reposta a estímulo térmico, também foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de três vias, considerando os fatores citados acima. Para a análise do limiar basal de retirada da pata em reposta a estímulo mecânico e da latência basal de retirada da pata em reposta a estímulo térmico foi utilizada ANOVA de uma via. Além disso, também foi utilizada ANOVA de uma via para verificar o efeito da acupuntura no ponto sham nos grupos injetados com formalina. Quando pertinente, após análise com a ANOVA seguiu-se uma análise post-hoc com o teste de Duncan. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos. Toda a análise estatística foi realizada com o programa STATISTICA 8.0.

### 3 RESULTADOS

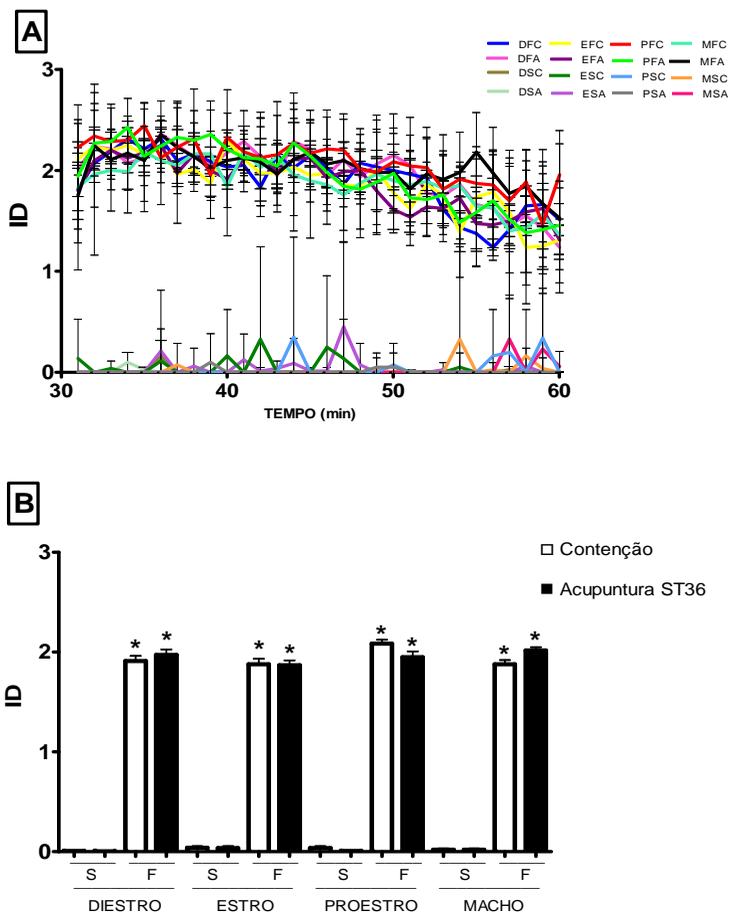
#### 3.1 RESPOSTA COMPORTAMENTAL AO TESTE DE FORMALINA: EFEITO DO SEXO OU CICLO ESTRAL E DA ACUPUNTURA MANUAL NO PONTO ANÁLOGO AO ST36

A tabela 3 apresenta os resultados da ANOVA de três vias com 30 medidas repetidas para o índice de dor. A análise mostrou efeito somente para o fator intervenção (formalina ou salina) no índice de dor, ou seja, a injeção sc de formalina na pata posterior direita provocou aumento significativo do índice de dor em todos os ratos fêmeas e machos comparados com a injeção sc de salina, demonstrado na figura 4.

**Tabela 3. Resultados da ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores para o Índice de Dor.**

| <b>Fatores e Interações</b>                     | <b>Índice de Dor</b>           |
|---|--------------------------------|
| Sexo ou Ciclo estral                            | $F(3,115) = 1,18, P = 0,32$    |
| Intervenção                                     | $F(1,115) = 6488, P < 0,001^*$ |
| Tratamento                                      | $F(1,115) = 0,007, P = 0,93$   |
| Sexo ou Ciclo estral X Intervenção              | $F(3,115) = 1,88, P = 0,14$    |
| Sexo ou Ciclo estral X Tratamento               | $F(3,115) = 1,83, P = 0,15$    |
| Intervenção X Tratamento                        | $F(1,115) = 0,21, P = 0,65$    |
| Sexo ou Ciclo estral X Intervenção X Tratamento | $F(3,115) = 1,21, P = 0,31$    |

Ratos Wistar machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (diestro, estro e proestro) foram submetidos às intervenções com injeção sc de salina ou formalina na pata posterior direita e aos procedimentos de contenção somente ou contenção e acupuntura no ponto análogo ao ST36.



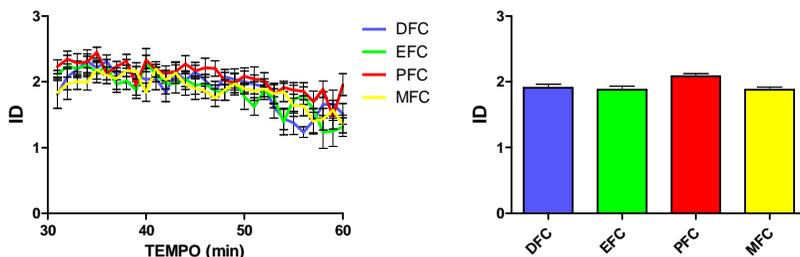
**Figura 4. Representação do índice de dor analisado por 30 min (de 30 a 60 min após injeção de salina ou formalina), correspondente a fase II do teste de formalina.** Ratos Wistar machos (M) e fêmeas em diestro (D), estro (E) e proestro (P) foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F), submetidos aos procedimentos de contenção somente (C) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (A) e avaliados quanto aos comportamentos nociceptivos por 30 min. **A)** O gráfico linear indica o índice de dor, calculado a cada minuto, ao longo do tempo, de todos os grupos experimentais. **B)** Histograma representando a média dos índices de dor calculados minuto a minuto, durante o período de 30 minutos. \*  $p < 0,001$  em relação aos grupos controles injetados com salina sc (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).

A análise post-hoc com o teste de Duncan mostrou haver diferença significativa no índice de dor entre todos os grupos injetados com salina e todos os grupos injetados com formalina (figura 4A e 4B). A análise não revelou diferença estatística no índice de dor entre os grupos de ratos machos e fêmeas injetados com salina e não-tratados (somente contidos), demonstrando nenhum efeito do sexo ou ciclo estral no índice de dor entre os animais controles injetados com salina (figura 4A e 4B).

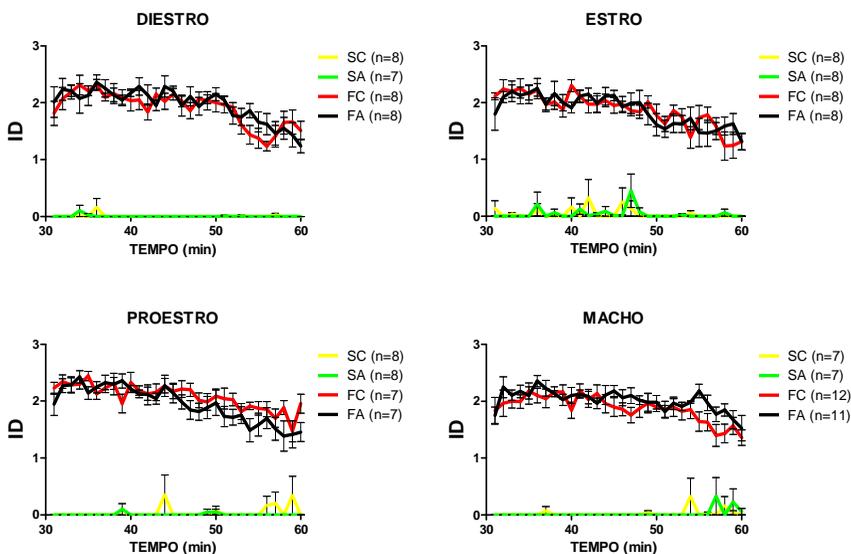
Nos grupos de ratos injetados com salina, a acupuntura não mostrou efeito no índice de dor, pois não houve diferença significativa entre os grupos de ratos machos e fêmeas injetados com salina e não-tratados (somente contidos) e os grupos de ratos machos e fêmeas injetados com salina, contidos e tratados com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (figura 4B e 6).

Com relação aos grupos de ratos machos e fêmeas injetados com solução de formalina e somente contidos, a análise post-hoc com o teste de Duncan mostrou diferença significativa entre o grupo de ratos fêmeas em proestro quando comparado com os grupos de ratos fêmeas em diestro, estro e o grupo ratos de machos ( $p < 0,05$ ) (dado não demonstrado). Porém, devido ao fato que a comparação entre 16 grupos pode induzir ao erro, como, falsos positivos, para verificarmos o efeito do sexo e/ou ciclo estral entre os animais controles injetados com formalina e somente contidos, foi realizada uma nova ANOVA de uma via com medidas repetidas entre os grupos. A análise não revelou diferença significativa entre os grupos de ratos machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral, injetados sc com formalina e somente contidos ( $F_{(3,31)} = 1,99$ ,  $p = 0,14$ ) (figura 5).

Analisando os grupos de ratos machos e fêmeas injetados com solução de formalina, a análise post-hoc com o teste de Duncan não revelou diferença significativa entre o grupo de ratos não-tratados (somente contidos) e o grupo de ratos contidos e tratados com acupuntura no ponto análogo ao ST36, ou seja, a acupuntura não provocou um efeito antinociceptivo no índice de dor nos animais injetados com solução de formalina (figura 6).



**Figura 5. Efeito do sexo e ciclo estral no índice de dor entre os animais controles injetados com formalina e somente contidos.** Ratos Wistar machos (M) e fêmeas em diestro (D), estro (E) e proestro (P) foram injetados com formalina (F), submetidos somente ao procedimento de contenção (C) e analisados no período de 30 a 60 minutos após injeção de formalina quanto aos comportamentos induzidos pelo agente nociceptivo (ANOVA de uma via).



**Figura 6. Efeito da acupuntura no ponto análogo ao ST36 no índice de dor, analisado por 30 min (de 30 a 60 min após injeção de salina ou formalina), correspondente a fase II do teste de formalina.** Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro, foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F), submetidos aos procedimentos de contenção (C) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (A) e avaliados quanto aos comportamentos nociceptivos por 30 min (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).

A tabela 4 apresenta os resultados da ANOVA de três vias com 10 medidas repetidas para cada um dos três intervalos do índice de dor (intervalo 1: de 31 a 40 min, intervalo 2: de 41 a 50 min e intervalo 3: de 51 a 60 min). Da mesma forma, a análise dos intervalos, em separado, mostra somente o efeito da intervenção, formalina ou salina, nos índices de dor.

**Tabela 4. Resultados da ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores para os intervalos do Índice de Dor.**

| <b>Fatores e Interações</b>                     | <b>Intervalo I<br/>(31 a 40 min)</b> | <b>Intervalo II<br/>(41 a 50 min)</b> | <b>Intervalo III<br/>(51 a 60 min)</b> |
|---|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Sexo ou Ciclo estral                            | F(3,115) = 1,94<br>P = 0,13          | F(3,115) = 0,39<br>P = 0,76           | F(3,115) = 1,86<br>P = 0,14            |
| Intervenção                                     | F(1,115) = 6329<br>P < 0,001*        | F(1,115) = 3822<br>P < 0,001*         | F(1,115) = 1366<br>P < 0,001*          |
| Tratamento                                      | F(1,115) = 0,009<br>P = 0,85         | F(1,115) = 0,08<br>P = 0,79           | F(1,115) = 0,04<br>P = 0,85            |
| Sexo ou Ciclo estral X Intervenção              | F(3,115) = 2,44<br>P = 0,07          | F(3,115) = 1,50<br>P = 0,22           | F(3,115) = 0,65<br>P = 0,59            |
| Sexo ou Ciclo estral X Tratamento               | F(3,115) = 0,43<br>P = 0,73          | F(3,115) = 0,80<br>P = 0,50           | F(3,115) = 1,87<br>P = 0,14            |
| Intervenção X Tratamento                        | F(1,115) = 0,13<br>P = 0,72          | F(1,115) = 0,24<br>P = 0,63           | F(1,115) = 0,03<br>P = 0,87            |
| Sexo ou Ciclo estral X Intervenção X Tratamento | F(3,115) = 0,37<br>P = 0,77          | F(3,115) = 0,46<br>P = 0,71           | F(3,115) = 1,00<br>P = 0,39            |

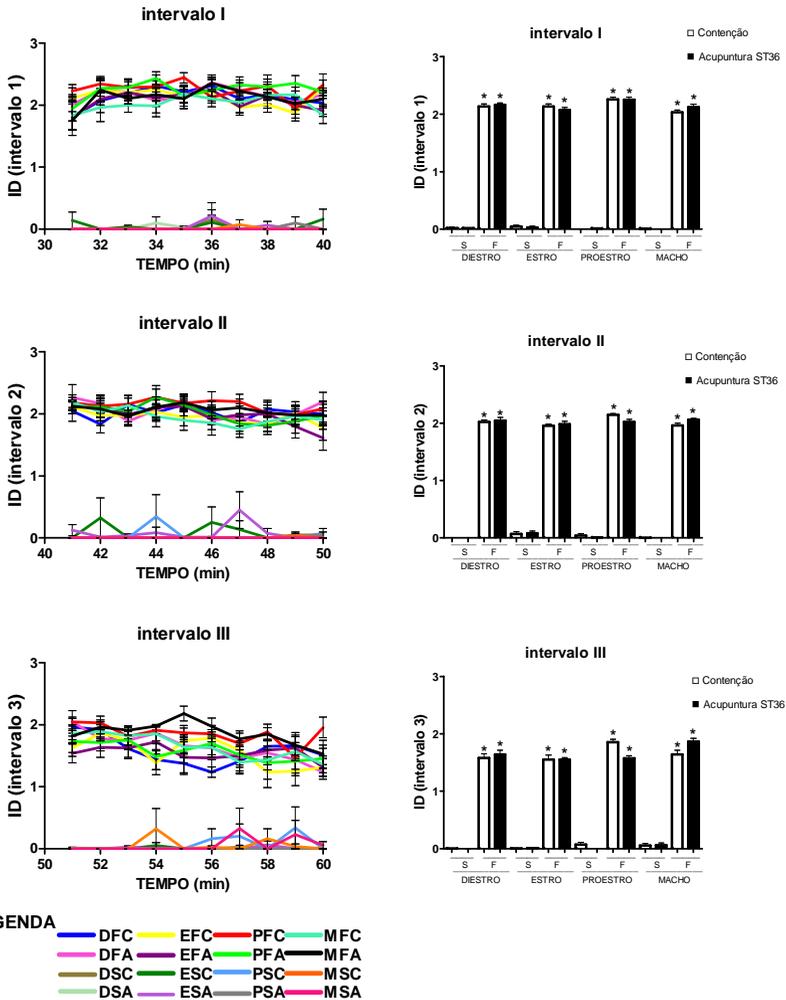
Ratos Wistar machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (diestro, estro e proestro) foram submetidos às intervenções com injeção sc de salina ou formalina na pata posterior direita e aos procedimentos de contenção somente ou contenção e acupuntura no ponto análogo ao ST36.

A análise post-hoc com o teste de Duncan mostrou haver diferença significativa entre todos os grupos injetados com salina e

todos os grupos injetados com formalina nos três intervalos analisados: de 31 a 40 min, de 41 a 50 min e de 51 a 60 min. A análise não revelou diferença estatística entre os grupos de ratos machos e fêmeas injetados com salina e não-tratados (somente contidos) nos três intervalos. Nos grupos de ratos injetados com salina, a acupuntura não mostrou efeito, pois não houve diferença significativa entre os grupos de ratos machos e fêmeas injetados com salina, tratados e não-tratados com acupuntura no ponto análogo ao ST36 em nenhum dos três intervalos analisados (figura 7).

Com relação aos grupos de ratos machos e fêmeas injetados com solução de formalina e somente contidos, a análise post-hoc com o teste de Duncan mostrou diferença significativa entre o grupo de ratos fêmeas em proestro em relação ao grupo de ratos machos, no intervalo 1 ( $p < 0,05$ ) e em relação aos grupos de fêmeas em estro e diestro, no intervalo 3 ( $p < 0,05$ ) (dado não demonstrado). Da mesma forma que o índice de dor analisado por inteiro, devido a análise de 16 grupos induzir ao erro, falsos positivos, foi realizada uma análise ANOVA de uma via com medidas repetidas, entre os grupos de animais fêmeas e machos injetados com formalina e somente contidos, para os intervalos 1, 2 e 3. A ANOVA não mostrou diferença significativa entre os grupos analisados no intervalo 1 ( $F_{(3,31)} = 1,72$ ,  $p = 0,18$ ), intervalo 2 ( $F_{(3,31)} = 0,99$ ,  $p = 0,41$ ) ou intervalo 3 ( $F_{(3,31)} = 1,09$ ,  $p = 0,37$ ).

Analisando os grupos de ratos machos e fêmeas injetados com solução de formalina, a análise post-hoc com o teste de Duncan mostrou diferença significativa entre os grupos de ratos fêmeas em proestro não-tratados e tratados com acupuntura no ponto análogo ao ST36 somente no intervalo 3 ( $p = 0,05$ ) (dado não demonstrado). Pela mesma razão citada acima, realizou-se uma análise com ANOVA de uma via com medidas repetidas para o intervalo 3 entre o grupo de ratos fêmeas em proestro injetados com formalina e somente contidos e o grupo de ratos fêmeas em proestro injetados com formalina, contidos e tratados com acupuntura no ponto ST36. A análise com ANOVA não revelou diferença significativa entre os grupos analisados ( $F_{(1,12)} = 2,29$ ,  $p = 0,16$ ).



**Figura 7. Índice de dor analisado em três intervalos: de 31 a 40 min, de 41 a 50 min e de 51 a 60 min.** Ratos Wistar machos (M) e fêmeas em diestro (D), estro (E) e proestro (P), foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F), submetidos aos procedimentos de contenção somente (C) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (A) e avaliados quanto aos comportamentos nociceptivos por 30 min. \*  $p < 0,001$  em relação aos grupos controles injetados sc com salina (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).

Foi realizada, em separado, a análise do tempo em que os animais passaram lambendo, mordendo ou sacudindo a pata (comportamento três), que representa o maior comportamento de nocicepção no teste de formalina.

A tabela 5 apresenta os resultados da ANOVA de três vias para os fatores sexo ou ciclo estral, intervenção e tratamento. Como pode ser observado, na tabela 5, a ANOVA revelou efeito significativo para a variável comportamento três somente em relação ao fator intervenção (salina ou formalina).

**Tabela 5. Resultados da ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores para a variável comportamento três.**

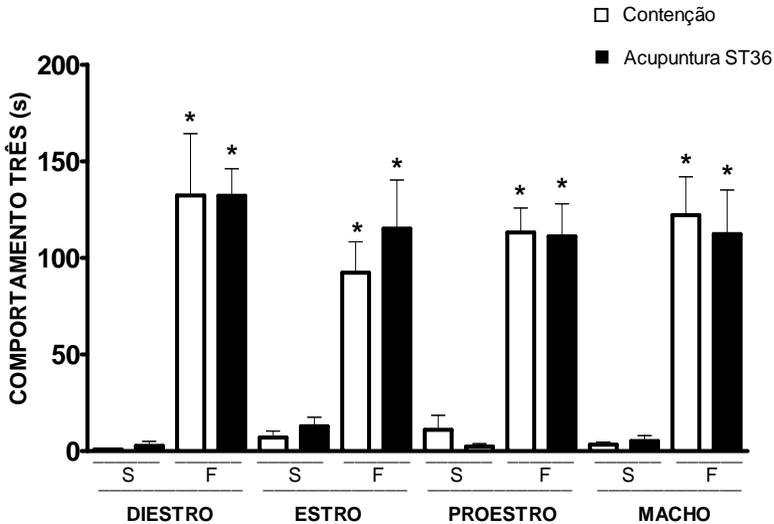
| <b>Fatores e Interações</b>                     | <b>Comportamento três</b>        |
|---|----------------------------------|
| Sexo ou Ciclo estral                            | $F(3,115) = 0,26, P = 0,85$      |
| Intervenção                                     | $F(1,115) = 179,53, P < 0,001^*$ |
| Tratamento                                      | $F(1,115) = 0,32, P = 0,86$      |
| Sexo ou Ciclo estral X Intervenção              | $F(3,115) = 0,85, P = 0,47$      |
| Sexo ou Ciclo estral X Tratamento               | $F(3,115) = 0,29, P = 0,83$      |
| Intervenção X Tratamento                        | $F(1,115) = 0,02, P = 0,88$      |
| Sexo ou Ciclo estral X Intervenção X Tratamento | $F(3,115) = 0,15, P = 0,93$      |

Ratos Wistar machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (diestro, estro e proestro) foram submetidos às intervenções com injeção sc de salina ou formalina na pata posterior direita e aos procedimentos de contenção somente ou contenção e acupuntura no ponto análogo ao ST36.

A análise post-hoc com o teste de Duncan mostrou aumento significativo do tempo em que os animais lambeiram, morderam ou sacudiram a pata posterior direita, injetados sc com formalina quando comparados aos animais injetados sc com salina (figura 8).

Não houve diferença significativa no tempo em que os animais lambeiram, morderam e sacudiram a pata entre os grupos de machos e fêmeas tratados com salina e somente contidos. Ao analisar os grupos de ratos machos e fêmeas injetados com salina e tratados ou não-tratados com acupuntura no ponto análogo ao ST36, também não se observou diferença significativa (figura 8).

Nos grupos de animais injetados com solução de formalina, não houve diferença entre os grupos não-tratados com acupuntura ou entre os grupos tratados e não-tratados com acupuntura (figura 8).



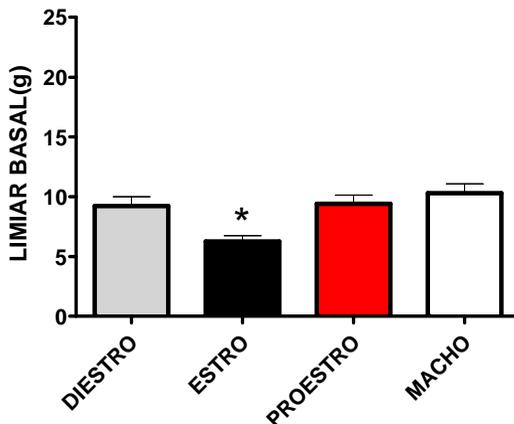
**Figura 8.** Soma do tempo (s) em que animais lamberam, morderam e sacudiram a pata durante o intervalo de 1800 s (de 30 a 60 min após injeção de formalina), correspondente a fase II do teste de formalina. Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F), submetidos aos procedimentos de contenção somente (C) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (A) e avaliados quanto aos comportamentos nociceptivos por 30 min. \*  $p < 0,001$  em relação aos grupos controles injetados com salina (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).

### 3.2 TESTE DE RETIRADA DA PATA EM RESPOSTA A ESTÍMULO MECÂNICO COM FILAMENTOS DE VON FREY: EFEITO DO SEXO OU CICLO ESTRAL E DA ACUPUNTURA MANUAL NO PONTO ANÁLOGO AO ST36

Os mesmos animais avaliados quanto ao índice de dor foram submetidos ao teste de retirada da pata em resposta a um estímulo mecânico, 90 minutos após injeção de formalina.

A ANOVA de uma via demonstrou haver efeito do sexo ou ciclo estral entre as médias do limiar basal (g) de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico ( $F_{(3,127)} = 6,27$ ,  $p < 0,05$ ). A análise com o teste post-hoc de Duncan, o grupo de ratos fêmeas em estro apresentou um

limiar de retirada da pata reduzido quando comparado aos grupos de ratos fêmeas em diestro e proestro e ao grupo de ratos machos ( $p < 0,05$ ) (figura 9).



**Figura 9.** Limiar basal (g) de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico dos grupos de ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro. Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro foram submetidos ao teste de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico com filamentos de Von Frey. \*  $p < 0,05$  em relação aos grupos de ratos machos e fêmeas em diestro e proestro (ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan).

A tabela 6 demonstra o resultado da ANOVA de três vias para a variável limiar (g) de retirada da pata em resposta ao teste com estímulo mecânico (filamentos de Von Frey), realizado 90 minutos após injeção de formalina. A análise mostra efeito do fator tratamento e das interações entre intervenção e tratamento e entre sexo ou ciclo estral, intervenção e tratamento.

**Tabela 6. Resultados da ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores para a variável limiar (g) de retirada da pata, obtida 90 min após injeção de formalina.**

| <b>Fatores e Interações</b>                     | <b>Limiar (g) de retirada da pata (90 min pós-formalina)</b> |
|---|--|
| Sexo ou Ciclo estral                            | $F(3,115) = 2,06, P = 0,11$                                  |
| Intervenção                                     | $F(1,115) = 3,61, P = 0,06$                                  |
| Tratamento                                      | $F(1,115) = 13,98, P < 0,001^*$                              |
| Sexo ou Ciclo estral X Intervenção              | $F(3,115) = 0,60, P = 0,62$                                  |
| Sexo ou Ciclo estral X Tratamento               | $F(3,115) = 0,96, P = 0,42$                                  |
| Intervenção X Tratamento                        | $F(1,115) = 4,80, P < 0,05^*$                                |
| Sexo ou Ciclo estral X Intervenção X Tratamento | $F(3,115) = 3,35, P < 0,05^*$                                |

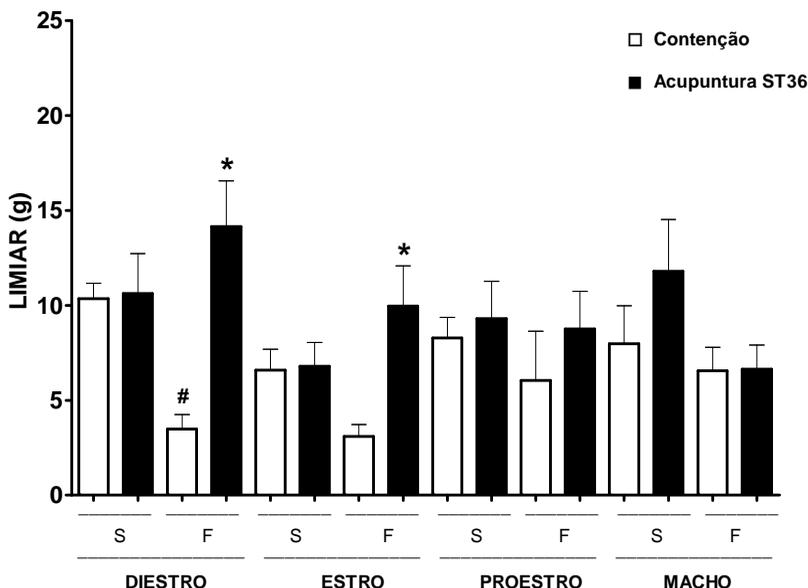
Ratos Wistar machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (diestro, estro e proestro) foram submetidos às intervenções com injeção sc de salina ou formalina na pata posterior direita e aos procedimentos de contenção somente ou contenção e acupuntura no ponto análogo ao ST36.

A análise post-hoc com o teste de Duncan mostrou que não houve diferença estatística no limiar (g) de retirada da pata em resposta a um estímulo mecânico entre os grupos de ratos machos e fêmeas em diestro, estro e proestro, injetados com salina e não-tratados, somente contidos. Ainda, analisando os grupos de animais injetados com salina, o tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 não provocou alteração estatística do limiar (g) de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico, comparados aos grupos controles não-tratados (figura 10).

A análise do teste de Duncan revelou um limiar de retirada da pata significativamente reduzido no grupo de ratos fêmeas em diestro injetados com formalina e não-tratados quando comparado ao grupo de ratos fêmeas em diestro injetados com salina e não-tratados, ou seja, a solução de formalina foi capaz de reduzir significativamente o limiar mecânico de retirada da pata somente no grupo de ratos fêmeas em diestro (hiperalgesia mecânica) ( $p < 0,05$ ) (figura 10).

Não houve diferença significativa entre as médias dos limiares de retirada da pata dos grupos de machos e fêmeas em diestro, estro e proestro injetados com solução de formalina e não-tratados, somente contidos (figura 10).

A acupuntura manual no ponto análogo ao ST36, nos animais injetados com solução de formalina, provocou aumento significativo no limiar (g) de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico em ratos fêmeas em diestro e estro comparados aos respectivos grupos controles (somente contidos) ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) (figura 10).



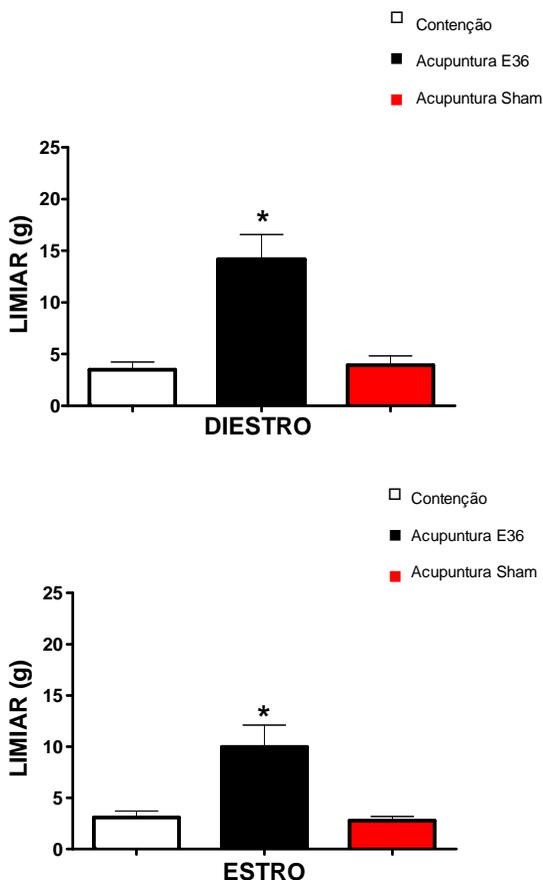
**Figura 10. Limiar (g) de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico, obtido 90 min após injeção sc de salina ou formalina na pata posterior direita.** Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro, foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F), submetidos aos procedimentos de contensão somente (Contensão) ou contensão + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (Acupuntura ST36) e avaliados no teste de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico com filamentos de Von Frey, 90 min após injeção sc de salina ou formalina. #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle de ratos fêmeas em diestro injetados com salina e somente contidos. \*  $p < 0,001$  e  $p < 0,05$  em relação aos grupos controles de ratos fêmeas em diestro e estro injetados com formalina e somente contidos, respectivamente (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).

Foi realizada a análise da acupuntura em um ponto sham em grupos de ratos fêmeas em diestro e estro, pois a acupuntura no ponto

análogo ao ST36 nos revelou efeito significativo quando comparados aos animais controles. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo entre os grupos de animais em diestro, injetados com formalina e submetidos aos procedimentos de contenção somente, contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 e contenção + tratamento com acupuntura no ponto sham ( $F(2,20) = 14,46$ ,  $p < 0,001$ ). A análise post-hoc com o teste de Duncan mostrou que o grupo de ratos fêmeas em diestro injetados com formalina e tratados com acupuntura no ponto análogo ao ST36 teve um limiar de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico elevado quando comparado aos grupos de ratos fêmeas em diestro injetados com formalina e submetidos à contenção somente ou à contenção + tratamento com acupuntura no ponto sham ( $p < 0,001$ ) (figura 11).

A mesma análise foi realizada entre os ratos fêmeas em estro injetados com formalina e submetidos aos procedimentos de contenção somente, contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 e contenção + tratamento com acupuntura no ponto sham. A ANOVA de uma via entre estes grupos revelou diferença estatística ( $F(2,20) = 9,30$ ,  $p < 0,05$ ). A análise post-hoc com o teste de Duncan mostrou que o grupo de ratos fêmeas em estro injetados com formalina e tratados com acupuntura no ponto análogo ao ST36 teve um limiar de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico elevado quando comparado ao grupo de ratos fêmeas em estro injetados com formalina e somente contidos e ao grupo de ratos fêmeas em estro injetados com formalina, contidos e tratados com acupuntura no ponto sham ( $p < 0,05$ ). Isto demonstra um efeito ponto-específico da acupuntura no ponto análogo ao ST36 no aumento de limiar de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico nos ratos fêmeas em diestro e estro (figura 11).

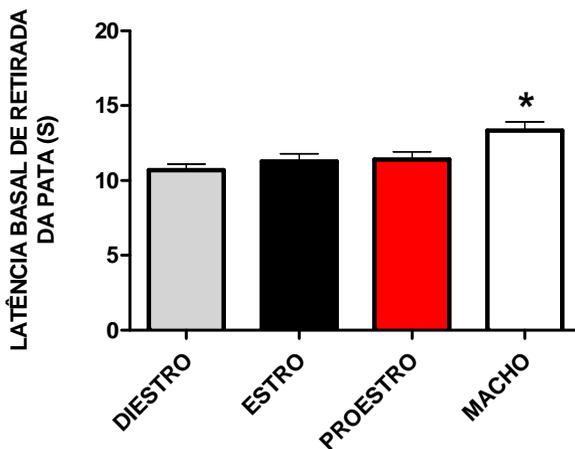
Apesar de não haver diferença estatística entre o grupo de ratos fêmeas em proestro injetados com formalina e somente contidos (controle) e o grupo de ratos fêmeas em proestro injetados com formalina e tratados com acupuntura no ponto análogo ao ST36, um grupo de ratos fêmeas em proestro e tratados com acupuntura em um ponto sham foi avaliado 90 minutos após receberem injeção de formalina. A ANOVA de uma via entre estes três grupos não revelou diferença estatística ( $F(2, 17) = 2,51$ ,  $p = 0,11$ ) (dado não representado).



**Figura 11. Efeito da acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 e no ponto Sham no limiar (g) de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico, obtido 90 min após injeção sc de formalina na pata posterior direita.** Ratos Wistar fêmeas em diestro e estro foram injetados sc com formalina, submetidos ao procedimentos de contenção somente (Contenção) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (Acupuntura ST36) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto Sham (Acupuntura Sham) e avaliados no teste de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico com filamentos de Von Frey, 90 min após injeção sc de formalina. \*  $p < 0,05$  em relação aos grupos controles de ratos fêmeas em diestro e estro injetados com formalina e somente contidos e aos grupos de ratos fêmeas em diestro e estro injetados com formalina e tratados com acupuntura no ponto Sham (ANOVA de uma via seguida por teste post-hoc de Duncan).

### 3.3 TESTE DE RETIRADA DA PATA EM RESPOSTA A ESTÍMULO DE CALOR RADIANTE: EFEITO DO SEXO OU CICLO ESTRAL E DA ACUPUNTURA MANUAL NO PONTO ANÁLOGO AO ST36

A ANOVA de uma via revelou efeito do sexo ou ciclo estral entre as médias das medidas da latência basal (s) de retirada da pata em resposta a estímulo térmico ( $F(3,112) = 5,27, p < 0,05$ ). Na análise com o teste post-hoc de Duncan, o grupo de ratos machos apresentou maior latência (s) de retirada da pata quando comparado aos grupos de ratos fêmeas em diestro, estro e proestro ( $p < 0,05$ ) (figura 12).



**Figura 12.** Latência basal (s) de retirada da pata em resposta a estímulo térmico de calor radiante em grupos de ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro. Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro foram submetidos ao teste de retirada da pata em resposta a estímulo térmico com calor radiante. \*  $p < 0,05$  em relação aos grupos de fêmeas em diestro, estro e proestro (ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan).

Em virtude da variação entre as médias das medidas basais verificadas nos grupos experimentais, a avaliação do tratamento se baseou na diferença entre as médias da latência de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante, obtidas antes de qualquer intervenção (medida basal) e após intervenção (injeção de formalina ou salina) das patas posteriores direitas.

A tabela 7 mostra o resultado da ANOVA de três vias para os fatores sexo ou ciclo estral, intervenção e tratamento para a variável latência de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante, avaliada 90 minutos após injeção de formalina. A análise não mostrou algum efeito com relação a estes fatores e interações.

**Tabela 7. Resultados da ANOVA de três vias indicando os efeitos principais e interações entre fatores para a variável latência (s) de retirada da pata, obtida 90 min após injeção de formalina.**

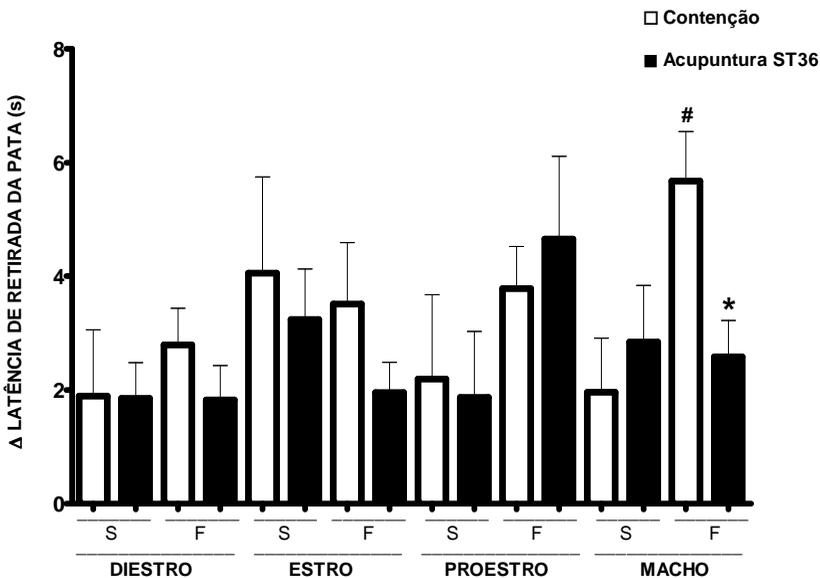
| <b>Fatores e Interações</b>                     | <b>Latência (s) de retirada da pata<br/>(90 min pós-formalina)</b> |
|---|--|
| Sexo ou Ciclo estral                            | $F(3,100) = 1,54, P = 0,21$  |
| Intervenção                                     | $F(1,100) = 3,12, P = 0,08$  |
| Tratamento                                      | $F(1,100) = 1,67 P = 0,20$   |
| Sexo ou Ciclo estral X Intervenção              | $F(3,100) = 1,91, P = 0,13$  |
| Sexo ou Ciclo estral X Tratamento               | $F(3,100) = 0,44, P = 0,72$  |
| Intervenção X Tratamento                        | $F(1,100) = 1,31, P = 0,26$  |
| Sexo ou Ciclo estral X Intervenção X Tratamento | $F(3,100) = 1,15, P = 0,33$  |

Ratos Wistar machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (diestro, estro e proestro) foram submetidos às intervenções com injeção sc de salina ou formalina na pata posterior direita e aos procedimentos de contenção somente ou contenção e acupuntura no ponto análogo ao ST36.

A análise post-hoc com o teste de Duncan não mostrou diferença estatística entre os grupos de ratos machos e fêmeas injetados com salina e somente contidos, na variação da latência de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante. Entre os grupos de animais injetados com salina, a acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 não provocou aumento da latência de retirada da pata em resposta ao estímulo de calor radiante (figura 13).

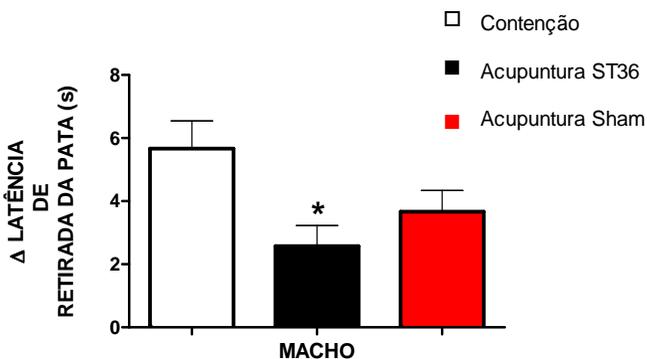
Através da análise post-hoc de Duncan, comparando os grupos de animais contidos e injetados com salina ou formalina, a formalina provocou aumento significativo na variação da latência de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante no grupo de ratos machos injetados com formalina e somente contidos quando comparado ao grupo de ratos machos injetados com salina e somente contidos, ou seja, a formalina provocou um efeito hiperalgésico térmico nos ratos machos, avaliados 90 minutos após injeção de formalina ( $p < 0,05$ ) (figura 13).

Entre os grupos de machos e fêmeas injetados com formalina e somente contidos, não houve alteração da variação da latência de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante. Analisando os grupos injetados com formalina, a acupuntura mostrou efeito de aumento de latência de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante, somente em ratos machos, representado pela diminuição da diferença entre as médias basais e as medidas obtidas 90 minutos após injeção de solução de formalina da pata posterior direita ( $p < 0,05$ ) (figura 13).



**Figura 13. Variação da latência (s) de retirada da pata em resposta a estímulo térmico de calor radiante (média das latências basais - média das latências obtidas 90 min após injeção sc de salina ou formalina).** Ratos Wistar machos e fêmeas em diestro, estro e proestro foram injetados sc com salina (S) ou formalina (F) na pata posterior direita, submetidos aos procedimentos de contenção somente (Contenção) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (Acupuntura ST36) e avaliados no teste de retirada da pata em resposta a estímulo térmico com calor radiante, 90 min após injeção sc de salina ou formalina. #  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle de ratos machos injetados com salina e somente contidos. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle de ratos machos injetados com formalina e somente contidos (ANOVA de três vias seguida de teste post-hoc de Duncan).

Devido ao efeito da acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 na latência de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante, um grupo de ratos injetados com formalina e tratados com acupuntura no ponto sham foi testado. A análise com ANOVA de uma via mostrou haver diferença entre os grupos de ratos machos injetados com formalina e submetidos aos procedimentos de contenção, contenção + acupuntura no ponto análogo ao ST36 e contenção + acupuntura no ponto sham ( $F(2,20) = 4,56, p < 0,05$ ). A análise post-hoc com teste de Duncan revelou que a diferença ocorre somente entre o grupo submetido à contenção e o grupo submetido à contenção + acupuntura no ponto análogo ao ST36 ( $p < 0,05$ ). Apesar de haver uma diminuição da variação da latência de retirada da pata no grupo de ratos machos submetidos aos procedimentos de contenção + acupuntura no ponto sham, quando comparado ao grupo controle, esta não foi significativa, demonstrando assim, um efeito específico do ponto análogo ao ST36 no aumento da latência de retirada da pata em resposta a estímulo térmico, 90 minutos após injeção sc de formalina na pata posterior direita (figura 14).



**Figura 14. Efeito da acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 e no ponto Sham na variação da latência (s) de retirada da pata em resposta a estímulo térmico de calor radiante (média das latências basais - média das latências obtidas 90 min após injeção sc de formalina).** Ratos Wistar machos foram injetados sc com formalina na pata posterior direita, submetidos aos procedimentos de contenção somente (Contenção) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36 (Acupuntura ST36) ou contenção + tratamento com acupuntura no ponto Sham (Acupuntura Sham) e avaliados no teste de retirada da pata em resposta a estímulo térmico com calor radiante, 90 min após injeção sc de formalina. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle de ratos machos injetados com formalina e somente contidos (ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Duncan).

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 RESPOSTA COMPORTAMENTAL AO TESTE DE FORMALINA: INFLUÊNCIA DO SEXO E DO CICLO ESTRAL

No presente estudo, a injeção sc de formalina 1% na pata posterior direita de ratos provocou comportamentos nociceptivos característicos na fase II do teste de formalina. Um desafio no estudo da dor é tentar quantificar os comportamentos nociceptivos induzidos pelo agente nociceptivo. O índice de dor calculado com base no descrito por Coderre et al (1993) consiste na média ponderada dos comportamentos descritos por Dubuisson e Dennis (1977). Coderre et al (1993) consideraram um método bem-definido, com escalas objetivas e que permite quantificar a intensidade da nocicepção em animais. Outros autores como Sufka et al (1998) consideram que a segunda fase do teste de formalina é melhor caracterizada pela soma do tempo em que o animal lambe e morde a pata (comportamento 3).

Os dados obtidos no trabalho mostram que o ciclo estral e o sexo não tiveram efeito na nocicepção causada pela formalina 1% no índice de dor, calculado com base nos escores descritos por Dubuisson e Dennis (1977) e validados por Coderre et al (1993), pois não houve diferença entre os índices de dor dos grupos de ratos machos e fêmeas em proestro, diestro e estro, injetados com solução de formalina 1% e somente contidos. Utilizando a mesma forma de análise do índice de dor, Batista (2004) não obteve efeito do ciclo estral na nocicepção causada pela solução de formalina 2,5% na fase I ou II, entre ratos fêmeas no diestro, metaestro, proestro e estro. Entretanto, Gaumond et al (2002) encontraram diferença significativa entre ratos machos e fêmeas no teste de formalina 2% nas fases I e II e na interfase, onde as fêmeas apresentaram índice de dor superior aos machos em todas as fases. Porém, neste experimento não houve distinção de fases do ciclo estral e, portanto possível influência deste no comportamento nociceptivo não foi detectada.

Quando analisado, em separado, o comportamento 3, maior comportamento de dor observado no teste de formalina, a análise também não mostra diferença sexual entre machos e fêmeas. Da mesma forma, a análise não revela influência do ciclo estral entre fêmeas em diestro, estro e proestro. Este achado vai ao encontro de Vincler et al

(2001) onde os comportamentos nociceptivos, correspondentes ao comportamento 3 (morder, lamben e sacudir a pata) induzidos por injeção de formalina 1% na pata posterior direita não diferiram entre fêmeas de diferentes fases do ciclo estral (estro, diestro, metaestro e proestro) nas duas fases da formalina.

Muitos fatores são sugeridos como responsáveis pelas diferenças sexuais na nocicepção, encontrada em vários modelos de dor. Um destes fatores são os hormônios gonadais. Porém, o papel preciso dos hormônios gonadais masculinos e femininos na nocicepção não são bem entendidos (CRAFT et al, 2004). Na tentativa de compreender o papel dos hormônios gonadais, animais machos e fêmeas intactos e gonadectomizados são utilizados, porém, no caso das fêmeas, há uma preocupação em estudar os comportamentos nociceptivos durante as flutuações hormonais do ciclo estral. O metaestro ou diestro I é caracterizado por níveis baixos de estrógeno e progesterona está um pouco elevada em função do corpo lúteo, o diestro II é caracterizado por níveis baixos de progesterona e níveis ascendentes de estradiol, o proestro é caracterizado pelo pico do hormônio estradiol e pelo aumento da concentração de progesterona, e o estro é caracterizado por níveis decrescentes de estradiol e progesterona, altos no início da fase (BECKER et al, 2005; FILLINGIN; NESS, 2000).

Através de gonadectomia e reposição hormonal, estudos sugerem que a testosterona tem papel protetivo, sendo hipoalérgica em alguns modelos de dor, como o da formalina (GAUMOND et al, 2002; ALOISI; CECCARELLI, 2000), já os hormônios femininos em conjunto desempenham um papel hiperalgésico vistos no modelo da formalina e no modelo da capsaicina (DEXHEIMER, 2002; BARRET et al, 2003).

Fillingin e Ness (2000) referem que em condições de estradiol elevado sozinho ou em combinação com a progesterona as fêmeas possuem uma resposta elevada aos estímulos dolorosos, como observado, em condições fisiológicas como o proestro em ratos fêmeas e a fase lútea, em mulheres. Em alguns modelos de nocicepção, fêmeas em proestro se mostram mais sensíveis do que em outras fases do ciclo, Bradshaw et al (2000) observaram que 24 horas após administração de CFA, os ratos fêmeas em proestro exibiam aumento significativo da hiperalgesia térmica (menor latência de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante) quando comparadas aos ratos machos, aos ratos fêmeas ovariectomizadas e aos ratos fêmeas em outras fases do ciclo. No estudo de Vincler et al (2001) também, os ratos fêmeas em proestro tiveram menor latência de escape e maior amplitude de reflexo

a um estímulo elétrico doloroso. Semelhantemente, em uma meta-análise realizada por Riley III et al (1998) demonstrou que durante a fase lútea, mulheres apresentam limiares de dor a estímulos pressão, frio, calor e isquemia muscular do que durante a fase folicular (baixas taxas hormonais). Entretanto, no presente estudo, as fêmeas em proestro apresentaram um aumento do índice de dor em relação aos machos e às fêmeas em diestro e estro, mas esta diferença não foi significativa.

#### 4.2 EFEITO DA ACUPUNTURA MANUAL NO PONTO ANÁLOGO AO ST36 NA RESPOSTA COMPORTAMENTAL AO TESTE DE FORMALINA

A acupuntura consiste na aplicação de agulhas em pontos específicos, chamados acupontos, situados na pele. Existem duas formas de desenvolver terapia com acupuntura, através de acupuntura manual e eletroacupuntura (ZHAO, 2008). Poucos são os estudos experimentais que utilizam acupuntura manual e muitos a utilizam como um controle da eletroacupuntura. Lin e Chen (2002) referem que muitos estudos utilizam a eletroacupuntura porque esta pode ser padronizada por alguns parâmetros, como frequência e voltagem. Apesar da padronização, muitos especialistas não concordam que a eletroacupuntura possa ser considerada uma substituta para acupuntura manual, muito utilizada na prática clínica. Os autores referem também, que é desconhecido se o efeito da analgesia induzida pela eletroacupuntura ocorre devido à inserção da agulha ou à eletroestimulação.

A acupuntura no ponto análogo ao ST36 realizada durante a interfase na formalina não causou efeito antinociceptivo na fase II (inflamatória) do teste de formalina em machos e fêmeas. Alguns estudos mostraram efeito antinociceptivo da acupuntura no teste de formalina, porém, nestes estudos a acupuntura foi realizada previamente à injeção de formalina. Chang et al (2004) obtiveram resposta antinociceptiva nas fases I e II do teste de formalina 1% em camundongos com a utilização de eletroacupuntura (2, 10 e 100 Hz), assim, houve redução do tempo em que o animal lambia a pata (comportamento 3). A eletroacupuntura no ponto análogo ao ST36 foi realizada por 5 min (animal contido em um tubo) e após 25 minutos era realizado o teste de formalina.

No estudo de Erthal et al (2008) a acupuntura manual no ponto análogo ao ST36 provocou diminuição do tempo de lambida e mordida

nas fase I, neurogênica (0 a 9 min), IIa, inflamatória (10 a 40 min) e IIb inflamatória (41-60 min) do teste de formalina em ratos machos Wistar. A acupuntura manual foi realizada 15 min antes da administração da injeção de formalina e teve duração de 15 min. O estudo de Emmel (2008) a acupuntura manual no ponto BL60, em camundongos, provocou um efeito antinociceptivo (diminuição do tempo em que o animal lambe e morde a pata) nas duas fases do teste de formalina. Neste caso a acupuntura manual foi realizada 30 min antes da administração da injeção de formalina e teve duração de 10 min.

Ambos os estudos acima citados realizaram acupuntura previamente a administração de um agente nocivo. Apesar de muitos estudos utilizarem a prática da acupuntura previamente à instalação de um modelo de nociceção ou dor em seus métodos experimentais, na prática clínica os pacientes procuram atendimento de acupuntura quando já está estabelecido um quadro de dor. Além disso, Sekido et al (2003) demonstraram diferenças no efeito da eletroacupuntura entre animais intactos e com inflamação.

Zhao (2008) refere que após a aplicação da agulha, o limiar de dor aumenta gradualmente, tanto em humano quanto em animais, indicando um lento crescimento da analgesia durante a acupuntura. Além disso, existe um efeito analgésico longo após o término da estimulação da acupuntura. No estudo de Emmel (2008), o efeito antinociceptivo da acupuntura manual no ponto BL60 começou em 5 minutos e durou até 2 horas (analisado no teste de contorção abdominal) com efeito máximo após 30 minutos da realização da acupuntura. O autor ressalta a importância da verificação da duração do efeito antinociceptivo a acupuntura, bem como a identificação temporal do efeito máximo para realização de testes nociceptivos. No presente estudo, os comportamentos induzidos pela formalina foram analisados imediatamente após a realização do tratamento com acupuntura no ponto análogo ao ST36. Nos estudos citados acima que tiveram resposta antinociceptiva, a análise dos comportamentos induzidos pela formalina foi realizada 25, 15 e 30 minutos após o tratamento com acupuntura manual ou eletroacupuntura.

Outro aspecto importante no estudo da acupuntura em animais é determinar o tempo de estimulação. Emmel (2008) demonstrou que a acupuntura manual no ponto BL60 por 5, 10, 20 e 30 minutos provocaram efeito antinociceptivo no teste de contorção abdominal em camundongos. Lao et al (2004) mostraram que 20 minutos de eletroacupuntura no ponto GB30 produziram melhor anti-hiperalgesia

no modelo de CFA em ratos, do que 10 ou 30 min. O presente estudo se baseou neste último para determinação da duração do estímulo.

#### 4.3 EFEITO DO SEXO OU CICLO ESTRAL NA RESPOSTA BASAL AOS TESTES DE RETIRADA DA PATA COM ESTÍMULOS MECÂNICO E TÉRMICO

Com relação à sensibilidade basal ao estímulo mecânico com filamentos de Von Frey, fêmeas em estro apresentaram limiar basal de retirada da pata reduzido em relação aos grupos de ratos machos e fêmeas em diestro e proestro. Da mesma forma, o estudo de Kaiser et al (1996), o limiar de pressão (avaliado quando há resposta de vocalização), foi menor nas fêmeas em proestro e estro quando comparadas às fêmeas em metaestro e diestro, tanto para estímulos aplicados na pata quanto na cauda. Ainda, no estudo de Barrett et al (2002), utilizando ratos de outra linhagem (F344), machos apresentaram maior limiar de pressão na pata do que as fêmeas. Porém o estudo não avaliou a fase do ciclo estral dos ratos fêmeas e no presente estudo os machos tiveram maior limiar somente em comparação com as fêmeas em estro. Porém, alguns estudos como o de Cook e Moore (2006) não observou diferença nos limiares de retirada em resposta a estímulo de pressão entre ratos Lewis machos e fêmeas, obtidos anteriormente a injeção de CFA na pata, ou seja, medidas basais. O estudo de Tseng e Craft (2001) também mostrou que o limiar de pressão na pata de ratos Sprage-Dawley machos e fêmeas são similares.

No presente estudo os ratos machos tiveram uma latência basal de retirada da pata em resposta a estímulo térmico maior do que os ratos fêmeas em diestro, estro e proestro. Semelhante ao presente estudo, Tall e Crisp (2004) e Bradshaw e colaboradores (2000) não demonstraram diferença entre os limiares basais de retirada da pata em resposta a estímulo térmico de calor radiante entre fêmeas em diestro, estro e proestro. Utilizando outro estímulo térmico, Terner et al (2005) também observaram que a fase do ciclo estral não afetou a sensibilidade térmica de ratos fêmeas Wistar no teste de retirada da cauda por estímulo de água quente. Entretanto, Stoeffel et al (2003) mostraram maior latência de retirada da pata no teste da placa quente nas fêmeas em diestro do que nas fêmeas em estro. Contraponto o presente estudo, Bradshaw et al (2004) não encontraram diferença significativa na latência basal de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante entre machos e

fêmeas. Utilizando outra forma de estímulo térmico, Cook e Moore (2004) também não encontraram diferença entre machos e fêmeas nas medidas basais da latência de retirada da pata em resposta a estímulo de água quente.

#### 4.4 EFEITO DO SEXO OU CICLO ESTRAL NA RESPOSTA AOS TESTES DE RETIRADA DA PATA COM ESTÍMULOS MECÂNICO E TÉRMICO

Além da fase I, interfase e fase II observadas no teste de formalina, Fu et al (2001) referem haver uma terceira fase, mais duradoura da ação da formalina. O estudo desenvolvido pelos autores mostrou a ocorrência de hiperalgesia mecânica e térmica 2h após a injeção de solução de formalina 5%, que pode durar até quatro dias. Além disso, a solução de formalina produz aumento da sensibilidade em regiões distantes da área injetada. Fu et al (2000) observaram também, hiperalgesia mecânica na pata contralateral, não-injetada, 2 horas após injeção de formalina 5%. Wiertelak et al (1993) observaram que a solução de formalina injetada na pata causou hiperalgesia térmica na cauda. Os autores referem que os mecanismos de sensibilização central no corno dorsal da medula espinhal, iniciado pela atividade dos nociceptores periféricos parecem contribuir para a hiperalgesia de longa duração e observada em locais distantes após injeção de formalina. Bianchi et al (1997) demonstraram que, após injeção de solução de formalina na cauda, ocorre uma alteração na resposta espontânea e evocada por estimulação térmica na pata com estímulos não-nociceptivo (42°C) e nociceptivo (47°C) de neurônios nociceptivos não-específicos (WDR) do corno dorsal, este achado refere uma sensibilização de neurônios do corno dorsal.

Neste contexto, a análise dos parâmetros de latência de retirada da pata após alguma intervenção (injeção de salina ou formalina) foi prejudicada devido à variedade de valores basais encontrados. Além disso, no projeto inicial, a medida pós-intervenção ipsilateral iria ser comparada à medida contralateral, porém, observou-se diminuição da latência de retirada da pata contralateral e esta análise não foi realizada.

Em relação à sensibilidade mecânica testada 90 minutos após a injeção de solução de formalina 1% em animais não-tratados com acupuntura (somente contidos), observou-se que o agente nociceptivo

induziu sensibilidade em ratos fêmeas em diestro e estro, porém, quando comparadas com os grupos controles de ratos fêmeas injetados com salina, constatou-se hiperalgesia mecânica somente no grupo de ratos fêmeas em diestro. De forma semelhante, Batista (2004) verificou o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica (com filamentos de Von Frey) 90 min após injeção sc de solução de formalina 2,5%, em ratos fêmeas no diestro I e não em fêmeas no diestro II, proestro e estro. Porém, o fato de, no presente estudo, os grupos de fêmeas em diestro I e II serem agrupados, não nos possibilita verificar se algum destes teve maior influência sobre o resultado encontrado. Em relação à sensibilidade térmica, somente os ratos machos apresentaram hiperalgesia térmica observada 90 minutos após injeção de formalina, quando comparados aos ratos machos controles injetados com salina.

Não houve diferença sexual ou influência do ciclo estral em animais injetados com formalina e somente contidos no limiar de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico verificado 90 minutos após injeção de formalina. No modelo de dor por inflamação induzida por administração de CFA na pata, Cook e Moore (2006) também não encontraram diferença entre limiares de pressão na pata de ratos machos e fêmeas, avaliados 11 e 18 dias após administração de CFA.

Entretanto, muitos estudos em diferentes modelos de dor mostraram haver diferença sexual na resposta nociceptiva testada com estímulos mecânicos. LaCroix- Fralish et al (2005) utilizando um modelo de dor lombossacra associado com radiculopatia, mostraram haver maior hiperalgesia mecânica em fêmeas do que em machos Sprage-Dawley. Coyle et al (1996), observaram, no modelo de dor neuropática (ligação parcial do nervo ciático) que as fêmeas intactas (não ovariectomizadas) tiveram menor incidência de desenvolvimento de hiperalgesia mecânica (testada com filamentos de Von Frey) do que as fêmeas ovariectomizadas, sugerindo a participação dos hormônios gonadais no desenvolvimento de hiperalgesia mecânica em ratos fêmeas submetidas a ligação parcial do nervo ciático. No estudo de Batista (2004) as fêmeas em diestro I mostraram maior sensibilidade mecânica do que as fêmeas em proestro e diestro II, testadas 90 min após injeção de formalina 2,5 %.

Analisando a sensibilidade ao estímulo térmico, também não foi verificada diferença sexual ou influência do ciclo estral na latência de retirada da pata em resposta a estímulo térmico verificada 90 minutos após injeção de formalina entre animais não-tratados (somente contidos).

Porém, em outros modelos de dor, foi verificada diferença sexual e/ou influência do ciclo estral na hiperalgesia térmica. No modelo de dor lombossacra associado com radiculopatia, LaCroix-Fralish et al (2005) mostraram haver maior hiperalgesia térmica em fêmeas do que em machos Sprage-Dawley. Já no modelo de inflamação na pata por CFA, Cook e Moore (2006) também mostraram, maiores latências de retirada da pata em machos do que as fêmeas, avaliado no teste da placa quente, 11 e 18 dias após administração de CFA. Utilizando o mesmo modelo, Bradshaw et al (2000) as ratos fêmeas em proestro exibiam aumento significativo da hiperalgesia térmica (24 horas após administração de CFA) quando comparadas aos ratos machos, aos ratos fêmeas ovariectomizadas e aos ratos em outras fases do ciclo.

A divergência de resultados encontrados nos estudos que investigam dimorfismo sexual em dor e nociceção se deve às diferenças metodológicas entre eles. Os modelos nociceptivos podem variar em sua duração (agudos ou crônicos) e envolver uma variedade de estímulos (mecânicos, térmicos, elétricos, químicos), com diferentes intensidades e respostas mensuradas (FILLINGIN; NESS, 2000). Mogil et al (2000) mostraram que diferenças sexuais aos modelos de nociceção agudos são, também, dependentes da linhagem usada, uma vez que, utilizando o estímulo de calor na cauda, ratos fêmeas Long Evans foram mais sensíveis do que machos; ratos machos Sprage Dawley foram mais sensíveis do que fêmeas e não houve diferença sexual entre ratos machos e fêmeas Wistar.

#### 4.5 EFEITO DA ACUPUNTURA MANUAL NO PONTO ANÁLOGO AO ST36 NA RESPOSTA AOS TESTES DE RETIRADA DA PATA COM ESTÍMULOS MECÂNICO E TÉRMICO

No presente estudo observou-se que o limiar de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico nos animais injetados com salina e tratados com acupuntura no ponto análogo ao ST36 não foi diferente estatisticamente do limiar dos animais injetados com salina e não-tratados. Sekido et al (2003) observaram que o efeito da eletroacupuntura difere entre animais intactos e animais com inflamação induzida por carragenina. No grupo de 29 animais intactos somente 15 responderam a eletroacupuntura com aumento de limiar mecânico que atingiu o máximo imediatamente após a eletroacupuntura e retornou ao basal dentro de 20 a 60 min, este efeito foi bloqueado pela

administração de injeção ip de naloxona. Ainda neste estudo, observou-se que nos animais com inflamação, o efeito da eletroacupuntura foi mais longo do que em animais intactos responsivos a eletroacupuntura, durando até 24 horas. A atenuação deste efeito pela administração da naloxona ip foi dose dependente e não foi bloqueado pela mesma dose ou duas vezes o valor da dose administrada em animais intactos responsivos a eletroacupuntura, porém a administração de naloxona localmente intraplantar (ipl) bloqueou completamente de maneira dose-dependente o efeito da eletroacupuntura, o que sugere que não só os receptores opioidérgicos do SNC, mas também periféricos estariam envolvidos na analgesia produzida pela eletroacupuntura em modelos inflamatórios.

Outro aspecto interessante foi o efeito ponto-específico da acupuntura manual no ponto análogo ao ST36, ou seja, estimulação (agulhamento) de um ponto sham (não-acuponto) não provocou efeito de aumento de limiar e/ou latência nos testes nociceptivos. Lao et al (2004) referem que determinar o grupo controle para acupuntura é sempre um desafio. Na maioria dos estudos, o controle é feito com a utilização de um não-acuponto (não mapeado) ou um acuponto não-relevante ao modelo de dor escolhido. Em seu estudo Lao e colaboradores demonstraram que a anti-hiperalgesia produzida pela eletroacupuntura em um modelo de CFA foi específica ao ponto. O ponto utilizado no estudo foi o GB30 e produziu anti-hiperalgesia significativa enquanto outros pontos ou pontos sham não tiveram este efeito. Porém, um ponto sham considerado foi o próprio ponto GB30, no qual a agulha foi inserida sem estimulação de eletroacupuntura. Portanto, a hipótese de que os sistemas inibitórios difusos de dor (DNIC) seriam um dos mecanismos da analgesia produzida pela acupuntura como proposto por Le Bars e Willer (2002) não condiz com o encontrado neste estudo.

A acupuntura manual no ponto análogo ao ST36, realizada durante a interfase, foi capaz de produzir um aumento de limiar de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico em ratos fêmeas em diestro e estro, mas não em fêmeas em proestro e em machos. Além disso, a acupuntura no ponto análogo ao ST36 produziu um efeito de aumento da latência de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante somente em ratos machos. De forma semelhante, o estudo de Huang et al (2004) a eletroacupuntura (100Hz) nos pontos análogos ao ST36 e BP6 provocou uma diminuição da hiperalgesia mecânica em ratos fêmeas no modelo de dor crônica inflamatória por CFA e nenhum

efeito foi observado na hiperalgesia térmica. Entretanto, os autores não fizeram distinção entre as fases do ciclo estral dos ratos fêmeas utilizados e também não as compararam aos ratos machos.

O estudo de Henry et al (1999) mostrou que a interfase da formalina ocorre devido a um processo inibitório ativo, e não por uma falta de excitação das fibras nociceptivas A $\delta$  e C. Gaumond et al (2007) demonstraram que a interfase foi quase completamente abolida pela administração da naloxona em fêmeas e produziu somente um pequeno bloqueio em machos. Os autores concluíram que os opióides exercem um papel fundamental no mecanismo inibitório de dor na interfase do teste de formalina em fêmeas, enquanto um mecanismo não relacionado aos opióides parece ser responsável por essas vias inibitórias em machos. Este bloqueio da interfase em fêmeas também foi observado com a administração da combinação de antagonistas seletivos aos receptores  $\mu$ -,  $\delta$ -, e k-opióides e com a combinação de antagonistas seletivos a receptores de  $\delta$ - e k-opióides somente.

Em virtude das evidências de envolvimento de opióides endógenos e seus receptores no efeito analgésico da acupuntura, pela reversão dos efeitos com a administração de naloxona (EMMEL, 2008; HUANG et al, 2004), a hipótese que postulamos seria que a acupuntura poderia estar potencializando as vias descendentes inibitórias de dor, através da ação de opióides endógenos, durante a interfase do teste de formalina em ratos fêmeas e machos.

Existem evidências de dimorfismo sexual na analgesia provocada por agentes farmacológicos ou em respostas analgésicas endógenas, como na analgesia induzida por estresse (FILLINGIN; NESS, 2000). Apesar de inúmeros resultados contraditórios, muitos estudos demonstram sensibilidade aumentada ao tratamento com opióides em machos intactos quando comparados às fêmeas intactas, principalmente com opióides que se ligam ao receptor  $\mu$  (CICERO et al, 1997; BOYER et al, 1998; TERNER et al, 2002). Estudos com humanos mostram sensibilidade aumentada em mulheres na analgesia com drogas opióides que se ligam aos receptores k (GEAR et al, 1996a, 1996b, 1999), porém resultados não são consistentes quanto a diferenças sexuais na analgesia provocada por opióides de ação em receptores k nos estudos em animais (BARRETT et al, 2002).

Estudos mostram que após gonadectomia, há um aumento na potência da analgesia opióide em fêmeas e diminuição da potência dos opióides em machos, sugerindo um envolvimento dos hormônios esteróides na resposta antinociceptiva aos opióides (CRAFT et al, 2004).

No estudo de Terner et al (2002), após gonadectomia, os machos apresentaram diminuição enquanto as fêmeas aumento da antinocicepção causada por agonistas  $\mu$ -opióides de alta, moderada e baixa eficácia (morfina, buprenorfina e butanorfol, respectivamente).

A administração de estrogênio atenua a sensibilidade aos agonistas opióides em ratos fêmeas ovariectomizadas (STOEFFEL et al, 2003; CRAFT et al, 2004). Craft et al (2008) demonstraram que a flutuação do estradiol é responsável pelas alterações cíclicas na potência nociceptiva à morfina em fêmeas intactas. De fato, a sensibilidade à antinocicepção aos opióides também varia durante as flutuações hormonais do ciclo estral. Semelhante ao presente estudo, Batista (2004) mostrou que a microinjeção de DAGO (agonista opióide  $\mu$ ) na habênula teve efeito de aumento de limiar de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico, verificado 90 min após administração de injeção de formalina, somente em ratos fêmeas em estro, diestro I e diestro II, mas não em proestro. Stoeffell et al (2003) mostraram que a morfina, administrada subcutaneamente, foi mais potente nos ratos fêmeas em diestro do que em estro.

Levando em consideração o dimorfismo sexual nas respostas a nociceptivas e antinociceptivas, Fillingim e Ness (2000) referem que em condições de estradiol elevado sozinho ou em combinação com a progesterona as fêmeas possuem uma resposta elevada aos estímulos dolorosos e uma resposta diminuída na analgesia induzida por opióides. Interessante observar que no presente estudo, os ratos fêmeas em proestro não foram responsivos a acupuntura no ponto análogo ao ST36 nos testes nociceptivos térmico e mecânico.

De acordo com o presente estudo, hormônios gonadais parecem influenciar as respostas nociceptivas e as respostas de aumento de limiares nocifensivos provocados pela acupuntura manual, porém, estes efeitos foram dependentes do teste utilizado. Evidências indicam que diferentes estímulos são servidos, em parte, por vias neuroanatômicas e mediadores neuroquímicos diferentes (BARRETT et al, 2002). Por exemplo, depleção de norepinefrina na medula espinhal atenua os efeitos da morfina em testes mecânicos, mas não térmicos, enquanto a depleção de serotonina na medula espinhal atenua os efeitos da morfina em modelos nociceptivos térmicos, mas não mecânicos (KURASHI et al, 1983, 1985; GIORDANO; BARR, 1988). Assim, a norepinefrina e serotonina espinhal na antinocicepção induzida por opióides em machos e fêmeas poderia ser um fator determinante para os diversos resultados

encontrados na nocicepção e na analgesia opióide em diferentes formas de estímulos nociceptivos.

Os hormônios gonadais interagem com o sistema nociceptivo em muitos níveis, que envolvem o sistema nervoso periférico e central (FILLING; NESS, 2000; ALOISI; BONIFANI, 2006). Dentre os mecanismos periféricos, existe evidência de envolvimento dos hormônios gonadais na sensibilização de aferentes primários através da modulação do neuropeptídeo, fator de crescimento neural (NGF) e seus receptores trKA. Estrogênio e progesterona aumentam a expressão de receptores para o fator de crescimento neural no gânglio da raiz dorsal (LANLUA et al, 2001). Também, durante o proestro (altos níveis hormonais), a expressão de RNAm para trKA está aumentada em neurônios ganglionares da raiz dorsal (SOHRABJI, 1994).

Os hormônios sexuais femininos também modulam níveis de neuromoduladores envolvidos no processamento nociceptivo espinhal, incluindo substância P (DUVAL et al, 1996), aminoácidos como GABA e glutamato e outros neurotransmissores (dopamina, serotonina, norepinefrina) (ALOISI; BONIFANI, 2006).

Existem evidências de que peptídeos opióides podem atuar em níveis espinhais ou supraespinhais e os substratos que medeiam estas duas áreas podem trabalhar independentemente (BONAR; KEST, 2010). LIU et al (2007) administraram morfina via intratecal em ratos e demonstraram que as vias analgésicas opióides espinhais são sexualmente dimórficas, pois a ativação de receptores opióides  $\mu$  ocasionou analgesia em machos, entretanto, é necessária a ativação da combinação dos receptores opióides  $\mu$  e  $\kappa$  para produzir analgesia em fêmeas.

Em nível de sistema nervoso central, estudos em roedores e em humanos mostram que os hormônios gonadais regulam a expressão dos receptores de peptídeos opióides. O tratamento com estrogênio e progesterona, que estimulam o pico de LH (simulando a fase do proestro) dessensibiliza receptores opióides cerebrais, diminuindo a sensibilidade a morfina (BERLUNG et al, 1988) em ratos fêmeas. Além disso, existe evidência de que após o pico de LH pré-ovulatório existe diminuição do tônus opióide e aumento da sensibilidade dolorosa (BERLUNG et al, 1988; RATKA; SIMPKINS, 1990). Também em ratos fêmeas, pesquisa mostra a colocalização de peptídeos opióides endógenos e estrogênio em alguns núcleos hipotalâmicos (MORRELL et al, 1985) assim como, aumento de níveis de RNAm para receptores  $\mu$ -opióides mediado por estrogênio nos núcleos ventro-medial e arqueado

do hipotálamo (QUINONES-JENAB et al, 1997). Porém, um estudo em humanos mostrou a correlação negativa entre estradiol circulante e receptor  $\mu$ -opióide no hipotálamo e amígdala (SMITH et al, 1998).

Estudando a implicação da via inibitória descendente de dor no dimorfismo sexual observados na nocicepção e antinocicepção, Loyd et al (2007) demonstraram que a expressão de fos na substância cinzenta periaquedutal (PAG) induzidas por inflamação foi suprimida por administração sistêmica de morfina em ratos machos, mas não em fêmeas e a morfina ativou preferencialmente a via da substância cinzenta periaquedutal – bulbo ventro medial rostral (PAG-RVM) em machos. Além disso, Loyd et al (2008) demonstraram que machos possuem maior expressão de receptores  $\mu$ -opióides na PAG do que fêmeas. Em outras regiões cerebrais, Cataldo et al (2010) demonstraram que lesões nos núcleos ventro-medial e pré-óptico medial hipotalâmicos produziram aumento da magnitude da analgesia produzida por morfina sistêmica em ratos fêmeas em relação aos ratos fêmeas sham-operadas. Em contraste, ratos machos com mesma lesão não tiveram alteração na magnitude ou potência da analgesia por morfina sistêmica. Isto sugere que diferenças anatômicas nas conexões entre núcleos hipotalâmicos e o tronco cerebral, envolvidos na inibição de dor, poderiam explicar as diferenças sexuais na analgesia opióide.

Interações entre hormônios gonadais e sistemas neuromodulatórios centrais poderiam influenciar tanto a sensibilidade basal devido à diminuição da eficácia dos sistemas inibitórios endógenos de dor quanto às respostas a agentes farmacológicos através de alterações na sensibilidade aos receptores (FILLING; NESS, 2000).

## 5 CONCLUSÕES

- Não houve diferença no comportamento nociceptivo observado no teste de formalina (fase II) entre ratos machos e fêmeas **controles**, quando analisado pelo índice de dor e também quando analisado somente pelo tempo em que os animais lamberam, morderam e sacudiram a pata injetada.
- A **acupuntura** manual no ponto análogo ao ST36 não teve efeito antinociceptivo do teste de formalina (fase II) em ratos machos e fêmeas quando analisado pelo índice de dor e pelo tempo em que os animais lamberam, morderam e sacudiram a pata injetada.
- O limiar basal de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico foi menor em ratos fêmeas em estro quando comparados aos ratos fêmeas em diestro e proestro e aos ratos machos. A latência basal de retirada da pata em resposta a estímulo de calor radiante foi maior em ratos machos quando comparados às fêmeas em qualquer fase do ciclo estral.
- Ratos machos e fêmeas **controles** não apresentaram diferença no limiar de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico e na latência de retirada da pata em resposta a estímulo térmico, observados 90 minutos após injeção de formalina.
- A **acupuntura** manual no ponto análogo ao ST36 provocou um aumento no limiar de retirada da pata em resposta a estímulo mecânico, observado 90 minutos após injeção de formalina, em ratos fêmeas nas fases de diestro e estro, mas não em ratos fêmeas em proestro e machos. Portanto, este efeito de aumento de limiar da acupuntura foi sensível ao ciclo estral.
- A **acupuntura** manual no ponto análogo ao ST36 causou um aumento da latência de retirada da pata em resposta a estímulo térmico, observado 90 minutos após injeção de formalina, somente em ratos machos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBADIE, C.; TAYLOR, B. K.; PETERSON, M. A.; BASBAUM, A. I. Differential contribution of the two phases of the formalin test to the pattern of c-fos expression in the rat spinal cord: studies with remifentanil and lidocaine. **Pain**, v. 69, p. 101-10, 1997.

ALOISI, A. M.; CECCARELLI, I. Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. **Neuroscience**, v. 95, n. 2, p. 559-66, 2000.

ALOISI, A. C.; BONIFAZI, M. Sex hormones, central nervous system and pain. **Hormones and Behaviors**, v. 50, p.1-7, 2006.

BATISTA, P. A. **Influência do ciclo estral sobre o efeito antinocicetivo e antihiperálgico da microinjeção de dago, agonista opióide  $\mu$ , no complexo habenular de ratas**. 2004. 94 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2004.

BARRETT, A. C.; SMITH, E. S.; PICKER, M. J. Sex-related differences in mechanical nociception and antinociception produced by mu- and kappa-opioid receptor agonists in rats. **Eur J Pharmacol**, v.452, n. 2, p. 163-73, 2002.

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

BARTOK, R. E.; CRAFT, R. M. Sex differences in opioid antinociception. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 282, n.2, p. 769-78, 1997.

BECKER, J. B.; ARNOLD, A. P.; BERKLEY, K. J.; BLAUSTEIN, J. D.; ECKEL, L. A.; HAMPSON, E.; HERMAN, J. P.; MARTS, S.; SADEE, W.; STEINER, M.; TAYLOR, J.; YOUNG, E. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior.

**Endocrinology**, v. 146, n.4, p. 1650-73, 2005.

BERGLUND, L. A.; DERENDORF, H.; SIMPKINS, J. W.

Desensitization of brain opiate receptor mechanisms by gonadal steroid treatments that stimulate luteinizing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 122, n. 6, p. 2718-26, 1988.

BIANCHI, M.; PANERAI, A. E. Formalin injection in the tail facilitates hindpaw withdrawal reflexes induced by thermal stimulation in the rat: effect of paracetamol. **Neurosci Lett**, v. 237, n. 2-3, p. 89-92, 1997.

BING, Z.; VILLANUEVA, L.; LE BARS, D. Acupuncture and diffuse noxious inhibitory controls: naloxone reversible depression of activities of trigeminal convergent neurones. **Neuroscience**, v. 37, p. 809-818, 1990.

BING, Z.; VILLANUEVA, L.; LE BARS, D. Acupuncture-evoked responses of subnucleus reticularis dorsalis neurons in the rat medulla. **Neuroscience**, v. 44, p. 693-703, 1991.

BODNAR, R. J.; B. KEST, B. Sex differences in opioid analgesia, hyperalgesia, tolerance and withdrawal: central mechanisms of action and roles of gonadal hormones. **Horm Behav**, v. 581, p. 72-81, 2010.

BORZAN, J.; FUCHS, P. N. Organizational and activational effects of testosterone on carrageenan-induced inflammatory pain and morphine analgesia. **Neuroscience**, v. 143, n. 3, p. 885-93, 2006.

BOYER, J. S.; MORGAN, M. M.; CRAFT, R. M. Microinjection of morphine into the rostral ventromedial medulla produce greater antinociception in male compared to female rats. **Brain Research**, v. 796, p. 315–318, 1998.

BRADSHAW, H.; MILLER, J.; LING, Q.; MALSNEE, K.; RUDA, M. A. Sex differences and phases of the estrous cycle alter the response of spinal cord dynorphin neurons to peripheral inflammations and hyperalgesia. **Pain**, v. 85. p. 93-99, 2000.

BUTLER, R. K.; FINN, D. P. Stress-induced analgesia. **Prog Neurobiol**, v. 88, n. 3, p. 184-202, 2009.

CADET, R.; AIGOUY, L.; WODA, A. Enhanced nociceptive behaviour following conditioning injection of formalin in the perioral area of the rat. **Brain Res**, v. 676, p. 189-95, 1995.

CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine**, v. 73, n. 1, p. 10-6, 2006.

CAPONE, F.; ALOISI, A. M. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. **Ann Ist Super Sanita**, v. 40, n. 2, p. 223-9, 2004.

CATALDO, G.; LOVRIC, J.; CHEN, C. C.; PYTTE, C. L.; BODNAR, R. J. Ventromedial and medial preoptic hypothalamic ibotenic acid lesions potentiate systemic morphine analgesia in female, but not male rats. **Behav Brain Res**, v. 214, n. 2, p. 301-16, 2010.

CHANG, F. C.; TSAI, H.Y.; YU, M. C.; YI, P. L.; LIN, J. G. The Central Serotonergic System Mediates the Analgesic Effect of Electroacupuncture on *Zusanli* (ST36) Acupoints. **J. Biomed. Sci.**, v. 11, p. 179-185, 2004.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, p. 55-63, 1994.

CHESTERTON, L. S.; BARLAS, P.; FOSTER, N. E.; BAXTER, G. D.; WRIGHT, C. C. Gender differences in pressure pain threshold in healthy humans. **Pain**, v. 101, n. 3, p. 259-66, 2003.

CICERO, T. J.; NOCK, B.; MEYER, E. R. Sex-related differences in morphine's antinociceptive activity: relationship to serum and brain morphine concentrations. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 282, n. 2, p. 939-44, 1997.

CODERRE, T. J.; FUNDYTUS, M. E.; MCKENNA, J. E.; DALAL, S.; MELZACK, R. The formalin test: a validation of the weighted-scores method of behavioural pain rating. **Pain**, v. 54, n. 1, p. 43-50, 1993.

COLBERT, A. P.; LARSEN, A.; CHAMBERLIN, S.; DECKER, C.; SCHIFFKE, H. C.; GREGORY, W. L.; THONG, T. A multichannel system for continuous measurements of skin resistance and capacitance at acupuncture points. **J Acupunct Meridian Stud.**, v. 2, n.4, p. 259-68, 2009.

COOK, C. D.; MOORE, K. I. Effects of sex, hindpaw injection site and stimulus modality on nociceptive sensitivity in arthritic rats. **Physiol Behav**, v. 87, n. 3, p. 552-62, 2006.

COOK, C. D.; NICKERSON, M. D. Nociceptive sensitivity and opioid antinociception and antihyperalgesia in Freund's adjuvant arthritic male and female rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 313, p. 449-459, 2005.

COUTAUX, A.; ADAM, F. WILLER, J. C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-71, 2005.

COYLE, D. E., SEHLHORST, C. S.; BEHBEHANI, M. M. Intact female rats are more susceptible to the development of tactile allodynia than ovariectomized female rats following partial sciatic nerve ligation (PSNL). **Neurosci Lett**, v. 203, n.1, p. 37-40, 1996.

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

CRAFT, R. M. Modulation of pain by strogens. **Pain**, v. 132, suppl. 1, p. S3-S12, 2007.

CRAFT, R. M.; ULIBARRI, C.; LEITL, M. D.; SUMNER, J. E. Dose- and time-dependent estradiol modulation of morphine antinociception in adult female rats. **Eur J Pain**, v. 12, n. 4, p. 472-9, 2008.

DAHAN, A.; KEST, B.; WAXMAN, A. R.; SARTON, E. Sex-specific responses to opiates: animal and human studies. **Anesth Analg**, v. 107, n. 1, p. 83-95, 2008.

de MEDEIROS, M. A.; CANTERAS, N. S.; SUCHECKI, D.; MELLO, L. Analgesia and c-Fos expression in the periaqueductal gray induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats. **Brain Res**, v. 973, n.2, p. 196-204, 2003.

DEXHEIMER, J. **Influência dos hormônios gonadais na sensibilidade a dor no teste de formalina em ratos castrados: diferenças sexuais no imiar nociceptivo e na analgesia por opióides**

**µ e k.** 2002. 90 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências)  
Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2002.

DUBUISSON, D.; DENNIS S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p. 161-74, 1977.

DUVAL, P.; LENOIR, V.; MOUSSAOUI, S.; GARRET, C.; KERDELHUE, B. Substance P and neurokinin A variations throughout the rat estrous cycle; comparison with ovariectomized and male rats: I. Plasma, hypothalamus, anterior and posterior pituitary. **J Neurosci Res**, v. 45, n. 5, p. 598-609, 1996.

EMMEL, V. G. **Avaliação do efeito antinociceptivo causado pela estimulação do acuponto BL60 (kulun) em camundongos.** 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2008.

ERTHAL, V.; NOHAMA, P.; SANTOS, A. D. R.; SILVA, M. D. Estudo Experimental da ação antinociceptiva da acupuntura e da radiação Laser no acuponto E36 (Zusanli). In: **CBEB 2008, 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, Salvador, 2008.

FEI, H.; XIE, G. X.; HAN, J. S. Low and high frequency electroacupuncture stimulation release [Met5]enkephalin and dynorphin A in rat spinal cord. **Sci. Bull. China.**, v.32, p.1486-1501.

FILLINGIM, R. B.; NESS, T. J. Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 24, n. 4, p. 485-501, 2000.

FILLINGIM, R. B.; NESS, T. J.; GLOVER, T. L.; CAMPBELL, C. M.; PRICE, D. D.; STAUD, R. Experimental pain models reveal no sex

differences in pentazocine analgesia in humans. **Anesthesiology**, v. 100, p. 1263-70, 2004.

FU, K. Y.; LIGHT, A. R.; MAIXNER, W. Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. **Neuroscience**, v. 101, n. 4, p. 1127–1135, 2000.

FU, K. Y.; LIGHT, A. R.; MAIXNER, W. Long-lasting inflammation and long-term hyperalgesia after subcutaneous formalin injection into the rat hindpaw. **J Pain**, v. 2, n. 1, p. 2-11, 2001.

FROT, M., J. S.; FEINE, J. S.; BUSHNELL, M. C. Sex differences in pain perception and anxiety. A psychophysical study with topical capsaicin. **Pain**, v. 108, n.3, p. 230-6, 2004.

GAUMOND, I.; ARSENAULT, P.; MARCHAND, S. The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. **Brain Res.** v. 958, p. 139-145, 2002.

GAUMOND, I.; ARSENAULT, P.; MARCHAND, S. Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. **Brain Res.**, v. 1052, n.1, p. 105-11, 2005.

GAUMOND, I.; SPOONER, M. F.; MARCHAND, S. Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. **Neuroscience**, v. 146, p. 366-74, 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**, v.205, n.3, p. 207-9, 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**, v. 2, n.11, p. 1248-50, 1996b.

GEAR, R. W.; MIASKOWSKI, C.; GORDON, N. C.; PAUL, S. M.; HELLER, P. H.; LEVINE, J. D. The kappa opioid nalbuphine produces gender- and dose-dependent analgesia and antianalgesia in patients with postoperative pain. **Pain**, v. 83, n.2, p. 339-45, 1999.

GIORDANO, J.; BARR, G. A. Effects of neonatal spinal cord serotonin depletion on opiate-induced analgesia in tests of thermal and mechanical pain. **Brain Res**, v. 469, n. 1-2, p. 121-7, 1988.

GORDON, F. T.; SOLIMAN, M. R. The effects of estradiol and progesterone on pain sensitivity and brain opioid receptors in ovariectomized rats. **Horm Behav**, v. 30, n. 3, p. 244-50, 1998.

GREENSPAN, J. D.; CRAFT, R. M.; LERESCHE, L.; ARENDT-NIELSEN, L.; BERKLEY, K. J.; FILLINGIM, R. B.; GOLD, M. S.; HOLDCROFT, A.; LAUTENBACHER, S.; MAYER, E. A.; MOGIL, J. S.; MURPHY, A. Z.; TRAUB, R. J. Studying sex and gender differences in pain and analgesia: a consensus report. **Pain**, v. 132, Suppl 1, p. S26-45, 2007.

HADDAD, J. J. On the enigma of pain and hyperalgesia: A molecular perspective. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 353, n. 2, p. 217-24, 2007.

HAGIWARA, H.; FUNABASHI, T.; MITSUSHIMA, D.; KIMURA, F. Effects of neonatal testosterone treatment on sex differences in formalin-induced nociceptive behavior in rats. **Neurosci Lett**, v. 412, n. 3, p. 264-7, 2007.

HAN, J. S. Acupuncture and endorphins. **Neurosci Lett.**, v. 361, p. 258-61, 2004.

HAN, J. S.; DING, X. Z.; FAN, S.G. The frequency as the cardinal determinant for electroacupuncture analgesia to be reversed by opioid antagonists. **Acta Physiol. Sin.**, v.38, p. 475-482, 1986.

HAN, Z.; JIANG, Y. H.; WAN, Y.; WANG, Y.; CHANG, J. K.; HAN, J. S. Endomorphin-1 mediates 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture analgesia in the rat. **Neurosci Lett.**, v. 274, n.2, p. 75-8, 1999.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, p. 77-88, 1988.

HEINRICHER, M. M.; TAVARES, I.; LEITH, J. L.; LUMB, B. M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res Rev.** v. 60, n. 1, p. 214-25, 2009.

HELLSTROM, B.; ANDERBERG, U. M. Pain perception across the menstrual cycle phases in women with chronic pain. **Percept Mot Skills**, v. 96, n.1, p. 201-11, 2003.

HENRY, J. L.; YASHPAL, K.; PITCHER, G. M.; CODERRE, T. J. Physiological evidence that the 'interphase' in the formalin test is due to active inhibition. **Pain**, v. 82, n. 1, p. 57-63, 1999.

HUANG, C.; HU, Z. P.; LONG, H.; SHI, Y. S.; HAN, J. S.; WAN, Y. Attenuation of mechanical but not thermal hyperalgesia by electroacupuncture with the involvement of opioids in rat model of chronic inflammatory pain. **Brain Research Bulletin**, v. 63, p. 99-103, 2004.

HUANG, C.; HUANG, Z. Q.; HU, Z. P.; JIANG, S. Z.; LI, H. T.; HAN, J. S.; WAN, Y. Electroacupuncture Effects in a Rat Model of Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammatory Pain: Antinociceptive Effects Enhanced and Tolerance Development Accelerated. **Neurochem. Res.**, v. 33, p. 2107-2111, 2008.

HUI, K.; LIU, J.; MARINA, O.; NAPADOW, V.; HASELGROVE, C.; KWONG, K. K.; KENNEDY, D. N.; MAKRIS, N. The integrated response of the human cerebro-cerebellar and limbic systems to acupuncture stimulation at ST 36 as evidenced by fMRI. **Neuroimage**, v. 27, n. 3, p. 479-96, 2005.

IKEDA, H.; STARK, J.; FISCHER, H.; WAGNER, M.; DRDLA, R.; JAGER, T.; SANDKUHLER, J. Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1659-62, 2006.

JOHANSSON, A.; UNELL, L.; CARLSSON, G. E.; SODERFELDT, B.; HALLING, A. Gender difference in symptoms related to temporomandibular disorders in a population of 50-year-old subjects. **J Orofac Pain**, v. 17, n. 1, p. 29-35, 2003.

KAVALIERS, M.; INNES, D. G. Sex and day-night differences in opiate-induced responses of insular wild deer mice, *Peromyscus maniculatus triangularis*. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 27, n.3, p. 477-82, 1987.

KAYSER, V.; BERKLEY, K. J.; KEITA, H.; GAUTRON, M.; GUILBAUD, G. Estrous and sex variations in vocalization thresholds to hindpaw and tail pressure stimulation in the rat. **Brain Res**, v. 742, p. 352-4, 1996.

KEPLER, K. L.; KEST, B.; KIEFEL, J. M.; COOPER, M. L.; BODNAR, R. J. Roles of gender, gonadectomy and estrous phase in the

analgesic effects of intracerebroventricular morphine in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 34, p. 119-27, 1989.

KUBA, T.; QUINONES-JENAB, V. The role of female gonadal hormones in behavioral sex differences in persistent and chronic pain: clinical versus preclinical studies. **Brain Res Bull**, v. 66, n. 3, p. 179-88, 2005.

KUBA, T.; WU, H. K.; NAZARIAN, A.; FESTA, E. D.; BARR, G. A.; JENAD, S.; INTURRISI, C. E.; QUINONES-JENAB, V. Estradiol and progesterone differentially regulate formalin-induced nociception in ovariectomized female rats. **Hormones and Behavior**, v. 49, p. 441-449, 2006.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nat Med**, v. 16, n. 11, p. 1258-66, 2010.

KURAIISHI, Y., N. HIROTA, N. Antinociceptive effects of intrathecal opioids, noradrenaline and serotonin in rats: mechanical and thermal algic tests. **Brain Res**, v. 326, p. 168-71, 1985.

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

LANGEVIN, H. M.; YANDOW, J. A. Relationship of Acupuncture Points and Meridians to Connective Tissue Planes. **The anatomical record (new anat.)**, v. 269, p. 257-265, 2002.

LANLUA, P.; DECORTI, F.; GANGULA, P. R.; CHUNG, K.; TAGLIALATELA, G.; YALLAMPALLI, C. Female steroid hormones

modulate receptors for nerve growth factor in rat dorsal root ganglia. **Biol Reprod**, v, 64, p. 331-8, 2001.

LAO, L.; ZHANG, R. X.; ZHANG, G.; WANG, X.; BERMAN, B. M.; REN, K. A parametric study of electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats. **Brain Res**, v. 1020, n. 1-2, p. 18-29, 2004.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, 2009.

LAWRENCE, R. C.; FELSON, D. T.; HELMICK, C. G.; ARNOLD, L. M.; CHOI, H.; DEYO, R. A.; GABRIEL, S.; HIRSCH, R.; HOCHBERG, M. C.; HUNTER, G. G.; JORDAN, J. M.; KATZ, J. N.; KREMERS, H. M.; WOLFE, F. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. **Arthritis & Rheumatism**. v. 58, n. 1, p. 26–35, 2008.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev.**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LE BARS, D.; WILLER J-C. Pain modulation triggered by high-intensity stimulation: implication for acupuncture analgesia? **International Congress Series**, v. 1238, p. 11-29, 2002.

LI, A. H.; ZHANG, J. M.; XIE, Y. K. Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/skin-nerve complexes with enriched nerve endings. **Brain Res.**, v. 1012, n.1-2, p. 154-9, 2004, 2004.

LI, A.; WANG, Y.; XIN, J.; LAO, L.; REN, K.; BERMAN, B. M.; ZHANG, R. X. Electroacupuncture suppresses hyperalgesia and spinal

Fos expression by activating the descending inhibitory system. **Brain Res.**, v. 1186, p. 171-9, 2007.

LIN, J. C.; CHEN, W. L. Acupuncture Analgesia: A Review of its Mechanisms of Actions. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 36, n. 4, p. 635-645, 2008.

LIU, N. J.; VON GIZYCKI, H.; GINTZLER, A. R. Sexually dimorphic recruitment of spinal opioid analgesic pathways by the spinal application of morphine. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 322, n. 2, p. 654-60, 2007.

LIUZZI, F. J.; SCOVILLE, S. A.; BUFTON, S. M. Long-term estrogen replacement coordinately decreases trkA and beta-PPT mRNA levels in dorsal root ganglion neurons. **Exp Neurol**, v. 155, n. 2, p. 260-7, 1999.

LERESCHE, L.; MANCL, L.; SHERMAN, J. J.; GANDARA, B.; DWORKIN, S. F. Changes in temporomandibular pain and other symptoms across the menstrual cycle. **Pain**, v. 106, n. 3, p. 253-61, 2003.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, 2008.

LOYD, D. R.; MORGAN, M. M.; MURPHY, A. Z. Morphine preferentially activates the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the male rat: a potential mechanism for sex differences in antinociception. **Neuroscience**, v. 147, n. 2, p. 456-68, 2007.

LOYD, D. R.; WANG, X.; MURPHY, A. Z. Sex differences in mu-opioid receptor expression in the rat midbrain periaqueductal gray are

essential for eliciting sex differences in morphine analgesia. **J. Neurosci.**, v. 28, p.14007-17, 2008.

LYNGBERG, A. C.; RASMUSSEN, B. K.; JØRGENSEN, T.; JENSE, R. Has the prevalence of migraine and tension-type headache changed over a 12-year period? A Danish population survey. **European Journal of Epidemiology**, v. 20. p. 243–249, 2005.

MCCALL, W. D.; TANNER, K. D; LEVINE, J. D. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neurosci Lett**, v. 208, p. 45-8, 1996.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 263, p. 136-46, 1992a

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**, v. 257, n. 5074, p. 1276-9, 1992b.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **J Neurosci**, v. 15, n. 4, p. 2768-76, 1995.

MANNINO, C. A.; SOUTH, S. M.; QUINONES-JENAB, V.; INTURRISI, C. E. Estradiol replacement in ovariectomized rats is antihyperalgesic in the formalin test. **J Pain**, v. 8, n. 4, p. 334-42, 2007.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J., TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.

MARTIN, V. T.; LIPTON, R. B. Epidemiology and biology of menstrual migraine. **Headache**, v. 48, Suppl 3. p. S124-30, 2008.

MATTHIES, B. K.; FRANKLIN, K. B. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. **Pain**, v. 51, n. 2, p. 199-206, 1992.

MEDEIROS, M. A.; CANTERAS, N. S.; SUCHECKI, D.; MELLO, L. E. C-Fos expression induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats submitted to repeated immobilization. **Braz J Med Biol Res.**, v. 36, n. 12, p. 1673-84, 2003.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain Mechanisms: A New Theory. **Science**, v.150, n. 3699, p. 971-9, 1965.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 54, p. 1-164, 1999.

MOGIL, J. S.; CHESLER, E. J.; WILSON, S. G.; JURASKA, J. M.; STERNBERG, W. F. Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, n. 3, p. 375-89, 2000.

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nat Rev Neurosci.**, v. 10, n. 4, p. 283-94, 2009.

MOONT, R., D.; PUD, D.; SPRECHER, E.; SHARVIT, G.; YARNITSKY, D. 'Pain inhibits pain' mechanisms: Is pain modulation simply due to distraction? **Pain**, v. 150, n. 1, p. 113-20, 2010.

MORRELL, J. I.; MCGINTY, F.; PFAFF, D. W. A subset of beta-endorphin- or dynorphin-containing neurons in the medial basal hypothalamus accumulates estradiol. **Neuroendocrinology**, v. 41, n. 5, p. 417-26, 1985.

NELSON, R. J. Female reproductive behavior. In: NELSON, R. J. **An introduction to Behavioral Endocrinology**. Sinauer Associates, Sutherland, p. 231-288, 1995.

NIESTER, M.; DAHAN, A.; KEST, B.; ZACNY, J.; STIJNEN, T.; AARTS, L.; SARTON, E. Do sex differences exist in opioid analgesia? A systematic review and meta-analysis of human experimental and clinical studies. **Pain**, v. 151, p. 61-68, 2010.

O'CONNOR, T.C.; ABRAM, S.E. Halothane enhances suppression of spinal sensitization by intrathecal morphine in the rat formalin test. **Anesthesiology**, v. 81, p. 1277-1283, 1994.

OLIVER, J. E.; SILMAN, A. J. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? **Arthritis Research & Therapy**. v. 11. n. 5. p. 252-261, 2009.

POPESCU, A.; LERESCHE, L.; TRUELOVE, E. L.; DRANGSHOLT, M. T. Gender differences in pain modulation by diffuse noxious inhibitory controls: a systematic review. **Pain**, v. 150, n. 2, p. 309-18, 2010.

PUIG, S.; SORKIN, L. S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, v. 64, n. 2, p. 345-55, 1996.

QUINONES-JENAB, V.; JENAB, S.; OGAWA, S.; INTURRISI, C.; PFAFF, D. W. Estrogen regulation of mu-opioid receptor mRNA in the forebrain of female rats. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 47, p. 134-8, 1997.

RATKA, A.; SIMPKINS, J. W. A modulatory role for luteinizing hormone-releasing hormone in nociceptive responses of female rats. **Endocrinology**, v. 127, n. 2, p. 667-73, 1990.

REN, K.; WEI, F.; DUBNER, R.; MURPHY, A.; HOFFMAN, G. E. Progesterone attenuates persistent inflammatory hyperalgesia in female rats: involvement of spinal NMDA receptor mechanisms. **Brain Res**, v. 865, n. 2, p. 272-7, 2000.

RILEY III, J. L.; ROBINSON, M. E.; WISE, E. A.; PRICE, D. D. A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. **Pain**, v. 81, n.3, p. 225-35, 1999.

SANDKUHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiol Rev**, v. 89, n. 2, p. 707, 2009.

SARLANI, E.; FAROOQ, N.; GREENSPAN, J. D. Gender and laterality differences in thermosensation throughout the perceptible range. **Pain**, v. 106, p. 9-18, 2003.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; BECHARA, G. H. Acupuntura: bases científicas e aplicações. **Rev. Ciência Rural. Santa Maria: Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.6, p.1091-1099, 2001.

SEKIDO, R.; ISHIMARU, K.; SAKITA, M. Differences of electroacupuncture-induced analgesic effect in normal and inflammatory conditions in rats. **Am J Chin Med**, v. 31, n. 6, p. 955-65, 2003.

SMITH, Y. R.; ZUBIETA, J. K.; DEL CARMEN, M. G.; DANNALS, R. F.; RAVERT, H. T.; ZACUR, H. A.; FROST, J. J. Brain opioid receptor measurements by positron emission tomography in normal cycling women: relationship to luteinizing hormone pulsatility and

gonadal steroid hormones. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, n.12, p. 4498-505, 1998.

SOHRABJI, F.; MIRANDA, R. C.; TORAN-ALLERAND, C. D. Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons. **J Neurosci**, v. 14, n. 2, p. 459-71, 1994.

STEIN, C.; SCHAFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nat Med**, v. 9, n.8, p. 1003-8, 2003.

STEIN, C.; CLARK, J. D.; OH, U.; VASKO, M. R.; WILCOX, G. L.; OVERLAND, A. C.; VANDERAH, T. W.; SPENCER, R. H. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 90-113, 2009.

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

SUFKA, K. J.; WATSON, G. S.; NOTHDURFT, R. E.; MOGIL, J. S. Scoring the mouse formalin test: validation study. **Eur J Pain**, v. 2, n. 4, p. 351-358, 1998.

TAKESHIGE, C.; SATO, T.; MERA, T.; HISAMITSU, T.; FANG, J. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. **Brain Res Bull**, v. 29, n.5, p. 617-34, 1992.

TALL, J. M.; CRISP, T. Effects of gender and gonadal hormones on nociceptive responses to intraplantar carrageenan in the rat. **Neurosci Lett**, v. 354, n. 3, p. 239-41, 2004.

TALL, J. M.; STUESSE, S. L.; CRUCE, W. L.; CRISP, T. Gender and the behavioral manifestations of neuropathic pain. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 68, p. 99-104, 2001.

TAYLOR, B. K.; PETERSON, M. A.; BASBAUM, A. I. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J Neurosci**, v. 15, n.11, p. 7575-84, 1995.

TERNER, J. M.; BARRETT, A. C.; GROSSELL, E.; PICKER, M. J. Influence of gonadectomy on the antinociceptive effects of opioids in male and female rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 163, n. 2, p. 183-93, 2002.

TERNER, J. M.; LOMAS, L. M.; PICKER, M. J. Influence of estrous cycle and gonadal hormone depletion on nociception and opioid antinociception in female rats of four strains. **J Pain**, v. 6, n. 6, p. 372-83, 2005.

TJOLSEN, A.; BERGE O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, p. 853-9, 2002.

TSENG, A. H.; CRAFT, R. M. Sex differences in antinociceptive and motoric effects of cannabinoids. **Eur J Pharmacol**, v. 430, p. 41-7, 2001.

ULETT, G. A.; HAN, S.; HAN, J. S. Electroacupuncture: mechanisms and clinical application. **Biol Psychiatry**, v. 44, n. 2, p. 129-38, 1998.

VAN WIJK, G.; VELDHUIJZEN, D. S. Perspective on diffuse noxious inhibitory controls as a model of endogenous pain modulation in clinical pain syndromes. **J Pain**, v. 11, n. 5, p. 408-19, 2009.

VILLANUEVA, L. Diffuse Noxious Inhibitory Control (DNIC) as a tool for exploring dysfunction of endogenous pain modulatory systems. **Pain**, v. 143, n. 3, p. 161-2, 2009.

VINCLER, M.; MAIXNER, W.; VIERCK, C. J.; LIGHT, A. R. Estrous cycle modulation of nociceptive behaviors elicited by electrical stimulation and formalin. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 69, p. 315-324, 2001.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Prog Neurobiol.**, v. 85, n.4, p. 355-75, 2008.

YIM, Y.; LEE, H.; HONG, K.; KIM, Y.; LEE, B.; SON, C.; KIM, J. Electro-acupuncture at acupoint ST 36 reduces inflammation and regulates activity in Collagen-Induced Arthritic Mice. **Ecamm**. v. 4, n. 1, p. 51-57, 2007.

YIM, C. S.; JEONG, H. S.; PARK, H. J.; BAIK, Y.; YOON, M. H.; CHOI, C. B.; KOH, H. G. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Res. Vet. Sci.** v. 84, n. 2, p. 159-65, 2008.

WANG, X.; TRAUB, R. J.; MURPHY A. Z. Persistent pain model reveals sex difference in morphine potency. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 291, p. R300-R306, 2006.

WATSON, G. S.; SUFKA, K. J.; CODERRE, T. J. Optimal scoring strategies and weights for the formalin test in rats. **Pain**, v. 70, n.1, p. 53-8, 1997.

WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. **Psychopharmacology (Berl)**, v.104, p. 35-44, 1991.

WIERTELAK, E. P.; ROEMER, B.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Comparison of the effects of nucleus tractus solitarius and ventral medial medulla lesions on illness-induced and subcutaneous formalin-induced hyperalgesias. **Brain Res**, v. 748, p. 143-50, 1993.