



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e  
Terapêutica

INFLUÊNCIA DO ESTROGÊNIO NAS DISFUNÇÕES  
TEMPOROMANDIBULARES EM RATAS OVARIECTOMIZADAS

Giovana Paola Heck Kroeff

Porto Alegre  
2023

**INFLUÊNCIA DO ESTROGÊNIO NAS DISFUNÇÕES  
TEMPOROMANDIBULARES EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iraci Lucena Torres  
Coorientador: Prof. Dr. Dirson Stein

Porto Alegre

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Kroeff, Giovana  
Influência do Estrogênio nas Disfunções  
Temporomandibulares em Ratas Ovariectomizadas /  
Giovana Kroeff. -- 2023.  
62 f.  
Orientadora: Iraci Lucena da Silva Torres.

Coorientadora: Dirson Stein.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre,  
BR-RS, 2023.

1. Estrogênio. 2. Ovariectomia. 3. Disfunção  
Temporomandibular. 4. CFA. 5. Ratas. I. Lucena da  
Silva Torres, Iraci, orient. II. Stein, Dirson,  
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### INFLUÊNCIA DO ESTROGÊNIO NAS DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES EM RATAS OVARIECTOMIZADAS

[subtítulo do trabalho]

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica pelo programa de pós-graduação em ciências biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iraci Lucena Torres

Coorientador: Prof. Dr. Dirson Stein

**Aprovada em:** Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane da Rosa

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Alexandre Quevedo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Seitenfus

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirna Leal

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é dedicado àquele que é meu companheiro, me amparou em cada dia, Cristiano, amor da minha vida. Obrigada pelo amor incondicional e carinho em todos os momentos e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus filhos que são para mim, o meu maior tesouro e o meu maior incentivo a cada dia. Por eles, e para eles todos os desafios e obstáculos são superados. Na certeza, de que a busca pelo conhecimento é sempre o melhor caminho, e que sou instrumento de amor e motivação. Antônia, João Fernando e Natália, amo vocês.

Ao meu pai, João Batista, meu parceiro de consultório, pelo exemplo de vida, dedicação aos pacientes e pela sede incessante na busca do conhecimento e à minha mãe, Teresinha, por me passar os valores familiares, os valores fundamentais da vida.

Ao meu irmão, João Felipe porque só ele sabe a falta que me faz em estar morando tão longe.

Agradeço ao professor Fabrício Finamor, que despertou em mim o desejo de estudar mais e aprender através da pesquisa.

Agradeço à minha orientadora, a Prof.<sup>a</sup> Dra. Iraci Lucena Torres por me ensinar os valores fundamentais da ciência, por me incentivar a concretizar o meu sonho de realizar um mestrado. Agradeço por desempenhar sua tarefa de mestre com satisfação e competência acreditando em meu potencial. Obrigada por me ensinar tudo o que ensinou!!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Dirson Stein por sua contribuição fundamental à minha formação e pelo incentivo nas horas difíceis e sua disponibilidade em ajudar sempre. Seu entusiasmo pela ciência é contagiante, nos faz querer ir sempre além.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: investigações pré-clínicas, agradeço pelo empenho na condução dos protocolos experimentais, pela amizade e companheirismo. Às alunas da iniciação científica Hemilly, Thaís, Khetrui, Alanis, Vivi aos colegas de mestrado Tenille, Iala, Maielli, Mateus e meu querido doutorando Josimar, sem ajuda e o empenho de vocês não conseguiria realizar este projeto.

À Unidade de Experimentação Animal do HCPA, Marta e sua excelência na direção, às veterinárias Daniela e Tuanny na paciência, auxílio nos procedimentos, respeito e zelo para com os animais, e aos funcionários – Inácio, Rosa, Sônia – pela dedicação com os projetos de pesquisa e com os pesquisadores.

A agência de fomento FIPE-HCPA, pelo apoio financeiro e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul viabilizando pesquisas de qualidade na ciência brasileira.

A alegria torna o homem sociável, a dor individualiza-o.

Christian Hebbel (poeta alemão)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. DOR CRÔNICA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. DORES OROFACIAIS NÃO ODONTOGÊNICAS .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3. ESTROGÊNIO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. ESTROGÊNIO E DTM .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5. BIOMARCADORES E DTM.....</b>	<b>18</b>
<b>2.6. MODELO ANIMAL DE DOR INFLAMATÓRIA OROFACIAL.....</b>	<b>19</b>
<b>2.7. CICLO ESTRAL .....</b>	<b>20</b>
<b>3. HIPÓTESES .....</b>	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>24</b>
<b>5. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>25</b>
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esfregaço vaginal .....	21
Figura 2 – Ciclo estral de ratas .....	22

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
DTM	Disfunção Temporomandibular
AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
ATM	Articulação Temporomandibular
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo ( <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> )
NGF	Fator de crescimento neural ( <i>Nerve growth factor</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa ( <i>Tumor necrosis factor alpha</i> )
CFA	Adjuvante Completo de Freund ( <i>Complete Freund's Adjuvant</i> )
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9
MMP13	Metaloproteinase de matriz 13
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
iNOS	Óxido nítrico sintase
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
UPL	Unidade de Pesquisa Laboratorial
UEA	Unidade de Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Comissão Nacional de Controle de Experimentação Animal
HE	Hematoxilina-eosina
ER $\alpha$	Receptor de estrogênio alfa
ER $\beta$	Receptor de estrogênio beta
REPG	Receptor de estrogênio acoplado à proteína G
OVX	Ovariectomia
FS	Teste do Nado Forçado (do inglês, <i>Forced Swim</i> )
HP	Hot Plate Test

## RESUMO

**Introdução:** Mulheres sofrem mais com dores crônicas do que homens, sendo a percepção, tolerância e limiares diferentes entre os sexos. As causas desse dimorfismo sexual podem estar relacionadas às variações hormonais do estrogênio, que ainda tem um papel controverso na modulação da dor. **Objetivo:** Avaliar a relação entre o modelo de dor inflamatória orofacial com os níveis de estrogênio resultante da ovariectomia e os efeitos da reposição de estrogênio em ratas ovariectomizadas. **Material e Métodos:** 80 ratas Wistar adultas foram inicialmente divididas em 2 grupos: (1) Sham Ovariectomia; (2) Ovariectomia (OVX). Sete dias após a cirurgia para retirada dos ovários, as ratas foram submetidas a uma infiltração unilateral de Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou salina na Articulação Temporomandibular (ATM) direita, sendo divididas em ratas sham ovariectomizadas ou ovariectomizadas com infiltrações de salina ou CFA na ATM. O tratamento consistiu na reposição hormonal (21 dias) de  $17\beta$ -estradiol (28  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ ) por via oral ou placebo. A alodinia mecânica na região da ATM foi avaliada pelo teste de von Frey (VF) eletrônico nos tempos basal, 14<sup>o</sup>, 17<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dia após a OVX. Os animais foram avaliados quanto a hiperalgesia térmica pelo teste da Placa Quente (HP) no 30<sup>o</sup> dia após a OVX, e quanto ao comportamento do tipo-depressivo pelo teste do Nado Forçado (FST) no 31<sup>o</sup> dia após a OVX. Após a eutanásia, análises neuroquímicas do marcador pró-inflamatório (TNF- $\alpha$ ) e do fator de crescimento (BDNF) foram realizadas pelo teste de ELISA em amostras do tronco encefálico e hipocampo. Além disso, os níveis de estrogênio foram avaliados por ensaio imuno quimioluminescente em amostras de soro. Os dados foram analisados utilizando o modelo de Equação de Estimativa Generalizada (GEE) com correção de Bonferroni para avaliar simultaneamente os parâmetros ao longo do tempo, e pelo teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn e testes de Qui-quadrado, considerando  $P < 0,05$  como significativo. Este projeto foi aprovado pela CEUA - HCPA (n<sup>o</sup> 2021-0632). **Resultados:** Animais que receberam infiltrações intra-articulares de CFA apresentaram maior resposta nociceptiva no teste de VF nos dias 14, 17 e 21 ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos na latência do teste HP ( $p = 0,735$ ), nem na latência para imobilidade e tempo total de nado do teste FST ( $p = 0,800$ ;  $p = 0,998$ , respectivamente). Não houve diferença

significativa entre os grupos nos níveis de BDNF no hipocampo ( $p=0,232$ ) e no tronco encefálico ( $p=0,054$ ), nem nos níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo ( $p=0,081$ ). No entanto os níveis de TNF- $\alpha$  no tronco encefálico apresentaram diferença significativa entre os grupos ( $p=0,043$ ;). **Conclusão:** O modelo animal utilizado foi efetivo em induzir dor orofacial, sendo uma opção pré-clínica na busca de novas intervenções terapêuticas. A reposição hormonal foi efetiva no restabelecimento de níveis séricos de estrogênio, porém, contrariando a hipótese inicial, nas condições experimentais utilizadas, a falta do estrogênio não alterou o limiar nociceptivo de ratas ovariectomizadas.

**Palavras-chave:** Dor orofacial, Disfunção Temporomandibular, Ovariectomia, Estrogênio, Ratas Wistar.

## ABSTRACT

**Introduction:** Women suffer more from chronic pain than men, with perception, tolerance and thresholds being different between genders. The causes of this sexual dimorphism may be related to hormonal variations in estrogen, which still has a controversial role in modulating pain. **Objective:** To evaluate the relationship between the orofacial inflammatory pain model and estrogen levels resulting from ovariectomy, and the effects of estrogen replacement in ovariectomized rats. **Material and Methods:** 80 adult female Wistar rats were initially divided into 2 groups: (1) Sham Ovariectomy; (2) Ovariectomy (OVX). Seven days after surgery to remove the ovaries, the rats were subjected to a unilateral infiltration of Complete Freund's Adjuvant (CFA) or saline in the right Temporomandibular Joint (TMJ), being divided into sham ovariectomized rats or ovariectomized rats with saline or CFA infiltrations into the TMJ. Treatment consisted of oral hormonal replacement (21 days) of  $17\beta$ -estradiol (28  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) or placebo. Mechanical hyperalgesia in the TMJ region was assessed using the electronic von Frey test (VF) at baseline, 14<sup>th</sup>, 17<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 30<sup>th</sup> day after OVX. The animals were evaluated for thermal hyperalgesia using the Hot Plate (HP) test on the 30th day after OVX, and for depressive-like behavior using the Forced Swim Test (FST) on the 31st day following OVX. After euthanasia, neurochemical analysis of the pro-inflammatory marker (TNF- $\alpha$ ) and growth factor (BDNF) were performed using the ELISA test in brainstem and hippocampus samples. Furthermore, estrogen levels were assessed by immunochemiluminescent assay in serum samples. The data were analyzed using the Generalized Estimating Equation (GEE) model with Bonferroni correction to simultaneously assess the parameters over time, and the Kruskal-Wallis with Dunn *post hoc* test and Chi-square tests, considering  $P < 0.05$  as significant. This project was approved by CEUA - HCPA (#2021-0632). **Results:** Animals that received intra-articular CFA infiltrations showed higher nociceptive response in the VF test on days 14, 17 and 21 ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference between the groups in the latency of the HP test ( $p = 0.735$ ), nor in the latency for immobility and total swimming time of the FST test ( $p = 0.800$ ;  $p = 0.998$ , respectively). There was no significant difference between the groups in BDNF levels in the hippocampus ( $p = 0.232$ ) and brainstem ( $p = 0.054$ ) and in TNF- $\alpha$  levels in the

hippocampus ( $p=0.081$ ). However, the levels of TNF- $\alpha$  in the brainstem showed a significant difference between groups ( $p=0.043$ ). **Conclusion:** The animal model employed in this study was effective in inducing orofacial pain, being a preclinical option in the search for new therapeutic interventions. Hormone replacement was effective in restoring serum estrogen levels, however, in contrast to the initial hypothesis, under these experimental conditions, the lack of estrogen did not change the nociceptive threshold in ovariectomized rats.

**Keywords:** Orofacial pain, Temporomandibular Disorder, Ovariectomy, Estrogen, Female Wistar Rats.

## **1. INTRODUÇÃO**

Os dados epidemiológicos mostram que as mulheres são mais afetadas pela dor, com índices mais proeminentes que se iniciam logo após a puberdade, permanecem durante seu período reprodutivo e tendem a diminuir após a menopausa, podendo retornar com a utilização de reposição hormonal com estrogênio. Pesquisas clínicas e experimentais comprovam essa discrepância na percepção de dor entre os sexos, porém com resultados divergentes e muitas vezes contraditórios. O mecanismo pelo qual isto ocorre é complexo e não é completamente compreendido. O estrogênio, como principal hormônio feminino, tem recebido atenção nas pesquisas envolvendo dor. Há uma correlação entre os níveis de estrogênio e a sensibilidade à dor, sugerindo que hiperalgesia e alodinia são mais proeminentes em mulheres que em homens, assim como um sistema endógeno inibitório de dor deficiente. Inúmeros estudos buscam esclarecer e justificar este fenômeno, dentre os quais o mecanismo de ação dos hormônios esteroidais, mais especificamente o estrogênio, que parece influenciar esta diferenciação sexual de maneiras ainda não completamente esclarecidas. O estrogênio é capaz de modular a função de vários sistemas, como nervoso, imune, cardiovascular e esquelético, e dependendo de qual sistema está envolvido e do tipo de dor, pode ter efeitos pró ou antinociceptivo. Esta pesquisa avaliou a relação entre o modelo de dor inflamatória orofacial com os níveis de estrogênio resultantes da ovariectomia e os efeitos da reposição de estrogênio em ratas ovariectomizadas. A compreensão dos mecanismos pelos quais o estrogênio contribui ou atenua a dor, poderá indicar um tratamento preventivo e curativo de maior efetividade.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. DOR CRÔNICA**

A Associação Internacional para Estudo da Dor (do inglês, IASP) define a dor como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada a uma lesão tecidual real ou potencial” (Raja et al., 2020). A dor fisiológica é um reflexo protetor do organismo, para evitar dano ou injúria, e pode ser classificada segundo a determinação temporal como aguda ou

crônica. Enquanto a dor aguda ocorre como sinal de alerta de lesão, a dor crônica ou persistente pode durar meses ou anos e pode não estar associada a lesão tecidual (Schaible, 2007). A dor crônica é uma queixa comum nos pacientes que buscam atendimento médico, sendo coadjuvante na perda da qualidade de vida e na produtividade dos pacientes. Assim como sua associação com transtornos psiquiátricos como a depressão e a ansiedade (Chang, 2020). As dores agudas são consideradas fisiológicas, como um sinal de alerta e muito importante para a sobrevivência, têm duração limitada, cessando com a resolução do processo nócico. Já a dor crônica é definida por aquela sofrida por mais de 3 meses ou após a cura da causa. Não é uma dor protetora como as demais, mas mal adaptativa, resultante do funcionamento anormal do sistema nervoso. Algumas vezes não consegue um nexo causal, deixa de ser um sintoma de algum distúrbio para se tornar um estado de doença do sistema nervoso. Várias condições podem ocasioná-la, entre elas as disfunções temporomandibulares (DTMs), sendo em grande parte a consequência de sinais sensoriais amplificados no sistema nervoso central (Woolf, 2010; Marquez, 2011).

Pacientes com dores crônicas podem apresentar quadros mais intensos de dor relatada, reduzindo a estabilidade psicológica, a produtividade e a qualidade de vida, podendo estar relacionada à mortalidade prematura (Raja et al., 2020; Smith et al., 2014). As dores crônicas são de difícil manejo farmacológico, sendo, muitas vezes, refratárias às terapias convencionais como os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e opioides (Paller et al., 2009).

## 2.2. DORES OROFACIAIS NÃO ODONTOGÊNICAS

Entre as dores crônicas estão as disfunções temporomandibulares (DTMs) como principais causas de dores orofaciais não odontogênicas (Hilgenberg et al., 2010). As quais abrangem um grande número de sintomas clínicos envolvendo a articulação temporomandibular (ATM), os músculos mastigatórios e as estruturas associadas (Ferneini, 2021). Além dos sintomas clínicos, a presença de DTM tem sido relacionada a transtornos de sono, sintomas de estresse, de ansiedade e depressivos, influenciando sua vida emocional, social e consequentemente levando à perda na qualidade de vida (Oliveira et al., 2015). A etiopatogenia das DTMs não

é bem compreendida, sendo de origem multifatorial, incluindo fatores biopsicossociais, neuromusculares, bioquímicos e biológicos com inúmeros fatores predisponentes e desencadeantes, o que resulta em tratamentos multidisciplinares para o seu adequado manejo e controle (Swiri et al., 2020; Wang et al., 2008).

Cabe salientar que as DTMs são mais prevalentes em mulheres, com maior prevalência no período reprodutivo (Warren e Fried, 2001; Vilanova et al., 2015). A dor nas DTMs pode variar durante o ciclo menstrual, se mantendo mais elevada nas fases lútea e menstrual quando comparada à ovulação (Vilanova et al., 2015). E o uso de estrogênio está associado ao aumento de DTM em mulheres em idade reprodutiva em uso de contraceptivos orais e em mulheres pós-menopáusicas em suplementação hormonal (LeResche, 1997; Vilanova et al., 2015). Interessantemente, a dor nas DTMs pode desaparecer durante a menopausa, mas retorna em algumas mulheres com a reposição do estrogênio (Ferreira, 2018; Wise et al., 2000).

A percepção da dor também é modulada pelo sistema imunológico que está sob o controle dos hormônios gonadais, e difere entre homens e mulheres: mulheres percebem mais a dor provavelmente pelos altos índices de estrogênio e progesterona e baixa testosterona (Moggil, 2009). As DTMs são de difícil tratamento e refratárias às terapias farmacológicas tradicionais, necessitando frequentemente de estratégias alternativas de terapia. A compreensão dos mecanismos que envolvem o estrogênio em sua etiologia é de fundamental importância para auxiliar os profissionais envolvidos no tratamento destes pacientes. Inúmeros estudos buscam esclarecer e justificar este fenômeno, dentre os quais o mecanismo de ação dos hormônios esteroidais, mais especificamente o estrogênio (Wang et al., 2008; Paller et al., 2009; LeResche et al., 1997).

### 2.3. ESTROGÊNIO

O estrogênio é um hormônio gonadal, que pertence à família dos hormônios esteroidais, dentre os principais, estão o estradiol, estrona, estriol e etestrol. O estradiol é o mais potente e abundante nos anos reprodutivos, sendo o mais utilizado para estudos *in vitro* e *in vivo* (Cui et al., 2013; Robinson et al., 2020). É responsável pelas características femininas nas mulheres durante a puberdade quando se inicia

sua produção. Apresenta seu pico de atuação durante a idade reprodutiva e declínio no período de menopausa, com variações durante o ciclo menstrual, na gravidez, no uso de contraceptivos orais e com o uso de reposição hormonal (Motta., 2012; Guyton e Hall., 2021). Os efeitos biológicos do estrogênio estão baseados em seus efeitos genômicos, os quais são modulados através de seus receptores nucleares, alfa ( $ER\alpha$ ) e beta ( $ER\beta$ ), presentes nas estruturas das ATMs (disco articular, membrana sinovial e côndilo) ou não genômicos, que envolvem os receptores de membrana celular acoplados com a proteína G (Halbe et al., 2005; Prossnitz et al., 2008; Yamada et al., 2003). O estrogênio participa da modulação de diversos sistemas, como o sistema nervoso central e periférico, imunológico, esquelético e cardiovascular, podendo atuar de maneira pró ou antinociceptiva (Wang et al, 2008).

O estrogênio regula positivamente a expressão da caderina 11, glicoproteína envolvida na adesão celular epitelial, de maneira dependente da dose e do tempo nos sinoviócitos primários, responsável também pela indução e ativação do infiltrado com padrão pró inflamatório tipo M1 na sinóvia da ATM; induz produção e atuação de MMP9 e MMP13 (metaloproteinases de matriz, um grupo de enzimas proteolíticas zinco-dependentes responsáveis pela degradação da matriz extracelular e membranas basais) na fibrocartilagem da ATM, induz a produção das citocinas pró inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ), interleucina 1 beta ( $IL-1\beta$ ) e interleucina 6 ( $IL-6$ ); potencializa a ação da Ciclo-oxigenase-2 ( $COX-2$ ) e do óxido nítrico sintase (iNOS), uma isoenzima que possui papel importante na cascata da inflamação; e regula positivamente a vida do Fator de Transcrição NFkapa B ( $NF-Kb$ ) e sua via, fator de transcrição envolvido na expressão de genes ligados à resposta inflamatória (Kou et al., 2014; Kou et al., 2015; Park et al., 2019; Traub e Ji, 2013; Jedynak et al., 2021; Xue et al., 2017; Yazici et al., 2021).

#### 2.4. ESTROGÊNIO E DTM

É importante ressaltar que a deficiência nos níveis de estrogênio decorrentes da menopausa, cirúrgica ou fisiológica, e os efeitos da estrogênio terapia sob as DTMs ainda são contraditórios e com resultados divergentes. Segundo Patil et al, 2005 há um aumento dos níveis séricos de estrogênio e progesterona com aumento do grau de gravidade da DTM sugerindo a influência desses hormônios como fatores

etiológicos da DTM. Corroborando outros estudos que afirmam que a DTM afeta predominantemente mulheres em idade fértil, sugerindo que níveis mais elevados de estrogênio potencializam a doença (LeResche et al., 1997; Macfarlane et al., 2002). Já outros autores mostraram que a prevalência de DTM atinge o pico entre 45 e 64 anos de idade e depois diminui gradualmente (Lovgren et al., 2016; Maixner et al., 2016). Como a transição da menopausa e a subsequente queda nos níveis de estrogênio ocorrem entre os 45 e os 55 anos de idade, esses resultados sugerem que baixos níveis de estrogênio podem potencializar certos tipos de DTM. Quando avaliado o padrão de distribuição etária nas DTMs observa-se que a degeneração da ATM aumenta em mulheres com mais de 50 anos; enquanto os distúrbios do disco diminuem na mesma faixa etária e atingem o pico em mulheres em idade fértil (Guarda-Nardini et al., 2012). Tomados em conjunto, os estudos sugerem que o estrogênio pode ter um efeito bifásico na DTM, com níveis elevados e/ou flutuantes promovendo certos tipos de DTM e com níveis baixos potencializando outros tipos de DTM.

Além da modulação sistêmica, o estrogênio atua diretamente nas ATMs e em suas estruturas associadas, tendo um papel fundamental no mecanismo pelo qual se estabelecem as DTMs (Wang et al., 2008). Parece haver uma correlação entre os níveis de estrogênio e a sensibilidade à dor, corroborando a hipótese de que a hiperalgesia e alodinia são mais proeminentes em mulheres, assim como podem apresentar o sistema de controle inibitório de dor menos atuante ou ausente (Racine et al., 2012; Berger et al., 2015; Carbone e Handa, 2013). No estudo de Ye et al. (2018), os autores demonstraram que a reposição de estrogênio em ratas ovariectomizadas em estágios iniciais da DTM reverte a absorção anormal do tecido ósseo subcondral por meio da inibição dos osteoclastos, mas por outro lado agrava a degradação condilar pela deterioração da matriz extracelular e da apoptose dos condrocitos. Abdrabuh et al., 2020 demonstrou uma degradação da cartilagem do disco articular na deficiência de estrogênio e um aumento na proliferação dos condrocitos na sua reposição. Um estudo pré-clínico demonstrou que ratas ovariectomizadas desenvolveram osteoartrite pós-menopausa, sugerindo que níveis reduzidos de estrogênio induzem perda óssea subcondral e aceleraram a degeneração da cartilagem articular (Xu, 2019). Neste mesmo estudo também foi demonstrado que a reposição de estrogênio preveniu a perda óssea, medida pelo

índice de densidade óssea em articulações do joelho. A reposição de estrogênio em mulheres na menopausa diminui os sintomas de desconforto oral e melhora na citologia oral em 56% das mulheres sintomáticas (Forabosco,1992). Por outro lado, a utilização de um antagonista do estrogênio, tamoxifeno, induziu alívio da dor para 72% dos indivíduos com mastalgia cíclica e 54% destes pacientes ficaram assintomáticos por até 12 meses após a interrupção do tratamento, sugerindo que menores níveis de estrogênio podem induzir analgesia (Kontostolis et al,1997). Estes dados sugerem que o nível de estrogênio está intimamente relacionado ao processo nociceptivo e ao equilíbrio dinâmico da remodelação óssea.

## 2.5. BIOMARCADORES E DTM

A busca de biomarcadores tem como objetivo quantificar e avaliar como um processo biológico normal, patogênico ou resposta biológica a uma intervenção terapêutica. Sabe-se hoje que as DTMs são de origem multifatorial e de difícil diagnóstico sendo ainda necessárias pesquisas para definir um perfil de biomarcadores em pacientes com DTMs. O reconhecimento da relação da DTM com os seus marcadores bioquímicos ou inflamatórios permitirá um melhor diagnóstico e tratamento da doença (Swiri et al., 2020).

O estrogênio atua na modulação de neurotrofinas como o Fator Neurotrófico Derivado do encéfalo (do inglês, BDNF) e Fator de Crescimento Neural (do inglês, NGF), e de citocinas pró e anti-inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês, TNF- $\alpha$ ) e IL-10, respectivamente (Kou et al., 2015).

Em relação aos biomarcadores inflamatórios, as citocinas são polipeptídeos mediadores da inflamação, que atuam como um complexo imunobiológico contendo citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-1, IL-6 e o TNF, e mediadores anti-inflamatórios como IL-4 e IL-10 (Feghali e Wright, 1997). Altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias são associadas com sintomas de DTM e contribuem para a degradação da cartilagem e osso articular liberando proteinases e outras moléculas inflamatórias (Campos et al., 2006). A IL-8 está presente na inflamação severa e indica a presença de atividade quimiotática e contribui para a infiltração de neutrófilos no fluido sinovial (Nishimura et al., 2002). O TNF tem um papel

fundamental nas DTMs como uma das primeiras citocinas estimulando a produção em cascata de outros mediadores inflamatórios (Wojdasiewicz et al., 2014).

Por outro lado, a neurotrofina BDNF está envolvida em síndromes dolorosas, atuando como regulador sináptico neuronal e na neuroplasticidade periférica e central (Merighi et al. 2008, Binder and Scharfman 2004). Em indivíduos saudáveis foi demonstrado efeito do BDNF dependendo do sexo, onde mulheres com maiores níveis de BDNF apresentaram maiores limiares de dor e o inverso foi observado em homens, podendo, inclusive variar ao longo do ciclo estral, o que se correlaciona com seus efeitos na excitabilidade neural (Scharfman *et al.* , 2003, Stefane et al., 2012). Já Allen and McCarson 2005 demonstraram que a expressão do gene BDNF em certas estruturas cerebrais é inibida pela dor inflamatória, no entanto, o estrogênio pode aumentar a sensibilização do sistema nervoso central associada ao processamento sensorial. Como as alterações na expressão do gene BDNF nos centros cerebrais superiores podem ser relevantes para as alterações cognitivas que ocorrem na depressão recorrente, esses resultados podem fornecer informações sobre a coincidência de dor crônica e depressão.

## 2.6. MODELO ANIMAL DE DOR INFLAMATÓRIA OROFACIAL

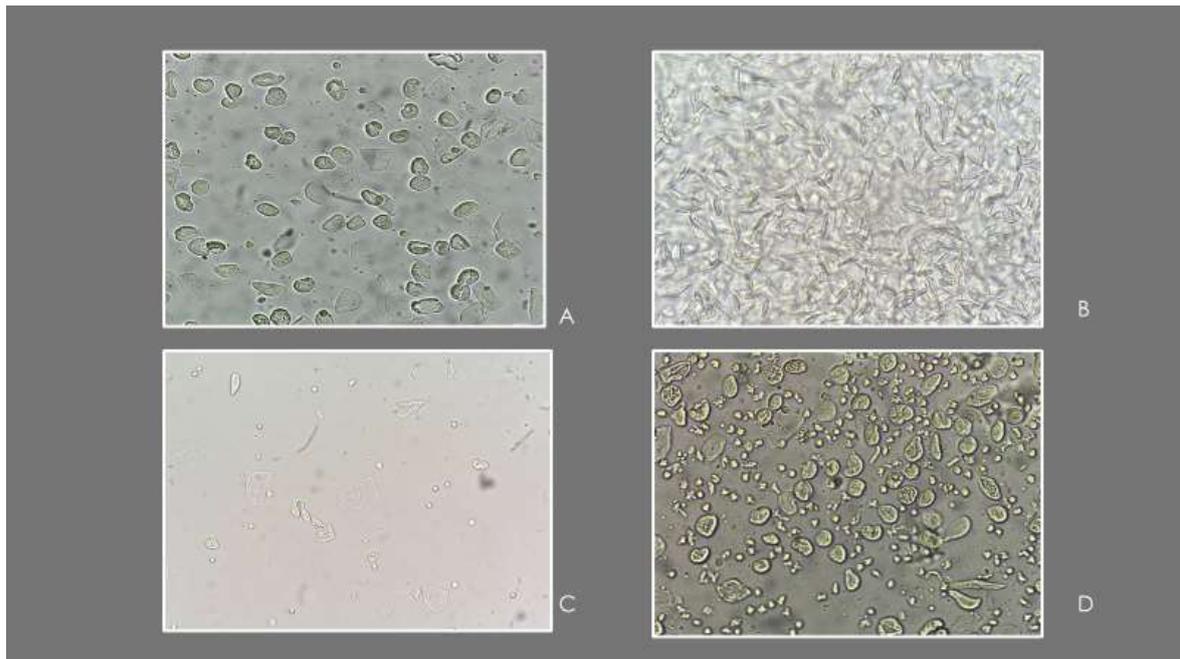
O uso de animais em pesquisas biológicas é necessário, promovendo o avanço dos conhecimentos na área da medicina humana e veterinária. Os animais são seres sencientes e que possuem sensibilidade similar à humana no que se refere à dor, memória, angústia e instinto de sobrevivência. Os animais utilizados como modelos experimentais são seres vivos que possuem as mesmas características biológicas dos outros animais de sua espécie, com a diferença de estarem sendo privados de sua liberdade em favor da Ciência (Raymundo, 2000).

A pesquisa científica básica utiliza-se de modelos animais de laboratório na busca de uma melhor compreensão da dor e suas comorbidades. Os modelos animais são correlatos aos fenômenos encontrados na clínica e os estudos experimentais são, na maioria, realizados em roedores (ratos e camundongos). Em pesquisa básica, os termos dor e analgesia são substituídos por nocicepção e antinocicepção (Medeiros et al., 2020).

Adjuvante Completo de Freund (CFA) é um bom modelo para o estudo de hiperalgesia mecânica e alodinia, produz dor persistente e hiperalgesia mecânica, promovendo uma resposta inflamatória bifásica: inicial (inflamação aguda) e tardia (inflamação crônica) (Philippe et al., 1997), liberando mediadores pró-inflamatórios (PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-1) que induzem às sinovites, reabsorção óssea e eventual degeneração, responsáveis pela sensibilização neural, resultando em dor articular (Mulley et al., 2016).

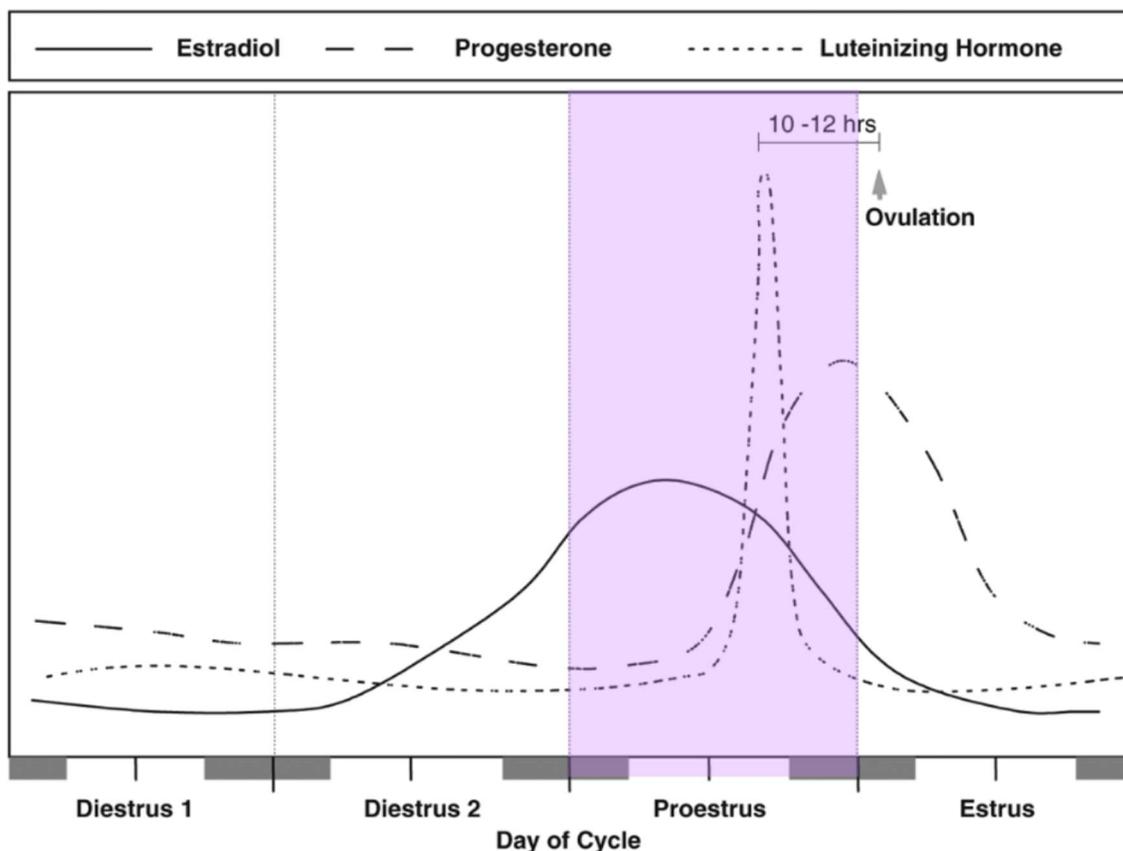
## 2.7. CICLO ESTRAL

O ciclo estral das ratas tem duração média de quatro a cinco dias e é caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metaestro (diestro I ou precoce) e diestro (diestro II ou tardio). Estas fases podem ser identificadas pela coleta da secreção vaginal e análise no microscópio eletrônico pelo tipo de células presentes no esfregaço vaginal. Na fase proestro estão mais frequentes as células epiteliais grandes, redondas e nucleadas, dura aproximadamente 1 dia. Segue na fase estro com células cornificadas (ou queratinizadas), anucleadas e irregulares, com duração de 1 dia (ciclo de 4 dias) a dois dias (ciclo de 5 dias). Após segue a fase metaestro, um período de transição com a presença de leucócitos, células epiteliais e células cornificadas; na fase diestro há a predominância de leucócitos, células pequenas e redondas quando retorna novamente à fase proestro (Figura 1) (Goldmann et al., 2007; Marcondes, 2002 e Butcher et al., 1974).



**Figura 1** - Esfregaço vaginal. Sob microscópio padrão em aumento de 40x. A. Proestro (maior frequência de células epiteliais grandes, redondas e nucleadas); B. Estro (células cornificadas ou queratinizadas, anucleadas e irregulares); C. Metaestro (um período de transição com a presença de leucócitos, células epiteliais e células cornificadas); D. Diestro (predominância de leucócitos, células pequenas e redondas). *Fonte: próprio autor.*

O aumento do nível de estradiol que inicia no segundo dia do diestro e atinge o pico por volta do meio-dia no proestro, diminuindo ao nível basal ao final da tarde (Fig.2). Essas concentrações crescentes agem para regular positivamente os mecanismos hipotalâmicos do cérebro que amplificam a liberação pulsátil do hormônio liberador de gonadotropina nos vasos portais que descem para a hipófise anterior. Esse aumento do estradiol também sensibiliza a hipófise, e é essa combinação de efeitos no hipotálamo e na hipófise que desencadeia o aumento ovulatório do hormônio luteinizante. O pico, por sua vez, desencadeia os estágios finais da maturação folicular oocitária e ovariana que precedem a ruptura ovulatória do folículo, um evento que no rato segue o pico por 10 a 12 horas (Goldmann, 2007).



**Figura 2** - Ciclo estral de ratos. Figura adaptada de Goldmann et al., 2007 apresentando o padrão esquemático do ciclo estral de 4 dias no rato representando as concentrações séricas de estradiol e progesterona conforme elas se relacionam com o tempo para o aumento do hormônio luteinizante (LH). Os blocos sombreados na base da figura indicam a parte escura de um fotoperíodo claro:escuro de 14:10 horas. Enfatizando o período proestro com maior concentração de estradiol.

A ovariectomia é um procedimento cirúrgico de retirada bilateral dos ovários, o procedimento promove a privação dos hormônios ovarianos como progesterona e estrógenos, sendo amplamente utilizado como modelo experimental de menopausa em pesquisas científicas (Ferretti et al., 2014; Hoegh-Andersen et al., 2004; Babinski, 2012).

### 3. HIPÓTESES

*H0:* A variação nos níveis de estrogênio produzida pela ovariectomia e pela terapia de reposição hormonal não é capaz de alterar a percepção dolorosa em ratas submetidas a um modelo experimental de dor orofacial inflamatória crônica, e induzir alterações nos níveis de um biomarcador pró-inflamatório e de uma neurotrofina em estruturas do sistema nervoso central.

*H1:* A variação nos níveis de estrogênio produzida pela ovariectomia e pela terapia de reposição hormonal é capaz de alterar a percepção dolorosa em ratas submetidas a um modelo experimental de dor orofacial inflamatória crônica, e induzir alterações nos níveis de um biomarcador pró-inflamatório e de uma neurotrofina em estruturas do sistema nervoso central.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da reposição diária de estrogênio na modulação da dor em ratas ovariectomizadas e submetidas a um modelo de dor orofacial.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a relação entre o modelo de dor inflamatória orofacial com os níveis de estrogênio resultante da ovariectomia e os efeitos da reposição de estrogênio em ratas ovariectomizadas, por meio dos seguintes parâmetros:

- Alodinia mecânica e hiperalgesia térmica através dos testes von Frey eletrônico facial e Placa Quente, respectivamente;
- Níveis de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) em tronco encefálico e hipocampo;
- Níveis de fator de crescimento (BDNF) em tronco encefálico e hipocampo;
- Níveis de estrogênio em amostras de soro.

## **5. ARTIGO CIENTÍFICO**

Título: Hormone replacement therapy did not alleviate temporomandibular joint inflammatory pain in ovariectomized rats

Este artigo está configurado conforme as normas da revista Odontology (Electronic ISSN: 1618-1255; Print ISSN: 1618-1247). Fator de Impacto 2022: 2.50.

## **6. CONCLUSÕES GERAIS**

Apesar das inconsistências, o crescente corpo de literatura sobre as diferenças sexuais na dor e na analgesia oferece vislumbres de um futuro no qual os médicos podem expandir as ferramentas de diagnóstico e adaptar os tratamentos para refletir as diferenças individuais. Embora os padrões nos dados ainda estejam surgindo, o estado atual da pesquisa nos permite sugerir várias direções de pesquisa que podem levar a mudanças nas abordagens clínicas do tratamento da dor. A experiência da dor é afetada por múltiplas variáveis, incluindo variáveis psicossociais, genética, sexo e tipo de analgesia. Explorar as questões de pesquisa conforme discutido acima nos permitirá entender melhor os múltiplos fatores que influenciam a experiência de dor de um paciente e nos permitirá desenvolver opções de tratamento mais direcionadas.

## 7. REFERÊNCIAS

Abdrabuh A, Baljon K, Alyami Y. Impact of estrogen therapy on temporomandibular joints of rats: histological and hormone analytical study. Saudi Dental Journal. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2020.07.006>

Allen AL, and McCarson KE. Estrogen increases nociception-evoked brain-derived neurotrophic factor gene expression in the female rat. Neuroendocrinology 81.3 (2005): 193- 199.

Anseloni VCZ, Weng H-R, Terayama R, Letizia D, Davis BJ, Ren K, Dubner R, Ennis M. Age-dependency of analgesia elicited by intraoral sucrose in acute and persistent pain models. Pain 97(1):p 93-103, May 2002. | DOI: 10.1016/S0304-3959(02)00010-6

Babinski MA. Anatomia dos ovários: considerações clínico-patológicas. Acta Scientiae Medica, v. 5, n. 2, p.43-52, 2012. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. Neuroscience.2012; 211,39- 50.

Bas DB, Su J, Wigerbladl G, Svensson CI. Pain in rheumatoid arthritis: models and mechanisms of pain. 2016; Cell 139,267-284.

Berger M, Szalewzki L, Bakalczuk M, Bakalczuk G, Bakalczuk S, Szkutnik J. Association between estrogen levels and temporomandibular disorders: A systematic literature review. Prz Menopauzely. 2015;14(4):260-70.

Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. Growth Factors. 2004 Sep;22(3):123-31. doi: 10.1080/08977190410001723308. PMID: 15518235; PMCID: PMC2504526.

Butcher RL, Collins WE, Fugo NW. Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 $\beta$  Throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat, Endocrinology. 1974; 94 (6): 1704–1708, <https://doi.org/10.1210/endo-94-6-1704>

Campos MIG, Campos PSF, Line SRP. Inflammatory cytokines activity in temporomandibular joint disorders: A review of literature. Braz. J. Oral Sci. 2006, 5, 1054– 1062.

Cao Y, Xie QF, Li K, Light AR, Fu KY. Experimental occlusal interference induces long-term masticatory muscle hyperalgesia in rats. PAIN. 2009 Aug 1;144(3):287-93.

Carbone DL, Handa RJ. Sex and stress hormone influences on the expression and activity of brain-derived neurotrophic factor. Neuroscience. 2013 Jun 3;239:295-303. 59

Chang MC. Tratamentos conservadores frequentemente usados para pacientes com dor crônica na prática clínica: uma revisão da literatura. *Cureus*. 2020; 12 (8): e9934. Publicado em 22 de agosto de 2020. Doi: 10.7759 / cureus.9934

Cui J, Shen Y, Li R. Síntese de estrogênio e vias de sinalização durante o envelhecimento: Da periferia ao cérebro. *Tendências Mol. Med.* 2013 , 19 , 197–209.

Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci.* 1997, 2, d12–d26. Ferneini EM. Temporomandibular joint disorders (TMD). *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2021 Oct 1;79(10):2171-2.

Ferreira FV. Sistema modulador descendente da dor, neuroplasticidade e fatores associados em mulheres na pré e pós menopausa. 2008. 150 f. Tese de doutorado UFRGS. Porto Alegre.

Ferretti M, Cavani F, Manni P, Carnevale G, Bertoni L, Zavatti M, Palumbo C. Ferutinin dose-dependent effects on uterus and mammary gland in ovariectomized rats. *Histology and Histopathology*. 2014; v. 29, n. 8, p. 1027-1037.

Figueroba S, Franco G, Omar N, Groppo M, Groppo F. Dependence of cytokine levels on the sex of experimental animals: study on the effects of estrogen in the temporomandibular joint synovial tissues. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(11)

Forabosco A, Criscuolo M, Cucos G, e outros. Eficácia da terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa com desconforto oral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73(5):570–4

Goldmann JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth defects Res*. 2007 Apr;80(2):84–97

Guarda-Nardini L, et al. Age-related differences in temporomandibular disorder diagnoses. *Cranio*. 2012;30(2):103–9.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 14. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2021.

Halbe HW. Conceitos e aspectos bioquímicos dos estrógenos. *Revista Clínica e Terapêutica [internet]*. 2005 (31): 68-76.

Hilgenberg PB, Cunha CO, Mendonça L M, Conti PCR. Dor orofacial odontogênica e a importância do diagnóstico diferencial. *Relato de caso. Rev Dor* 2010;11(2):169-172.

Hoegh-Andresen P, Tankó LB, Andersen TL, Lundberg C V, Mo JA, Heegaard A, Delaissé, J, Christgau S. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Research & Therapy*, v. 6, n. 2, p.169-180, 2004. 60

Jedynak B, Jaworska-Zaremba M, Grzechocińska B, Chmurska M, Janicka J, KostrzewaJanicka J. TMD in females with menstrual disorders. *International journal of environmental research and public health*. 2021 Jul 7;18(14):7263.

Kontostolis E, Stefanidis K, Navrozoglou EU, Iolis D. Comparação de tamoxifeno com danazol para tratamento de mastalgia cíclica. *Gynecol Endocrinol* 1997;11(6):393–7.

Kou XX, Li CS, He DQ, Hao T, Meng Z., et al. Estradiol Promotes M1-Like Macrophage Activation through Cadherin-11 to Aggravate Temporomandibular Joint Inflammation in Rats. *J Immunol*. 2015;194(6):2810-8.

Kou X X, et al. Estradiol-potentiated cadherin-11 in synovial membrane involves in temporomandibular joint inflammation in rats. *Journal of Steroid Biochemistry and MolecularBiology*, v. 143, p. 444–450, 2014.

Kuba T, Quinonas-Jenab VO. Papel dos hormônios gonadais femininos nas diferenças sexuais comportamentais na dor persistente e crônica: estudos clínicos versus préclínicos. *Brain Res Bull* 2005;66(3):179–88.

LeResche L, Saunders K, Von Korff MR, Barlow W, Dworkin SF. Use of exogenous hormones and risk of temporomandibular disorder pain. *Pain*. 1997 Jan 1;69(1-2):153-60.

LeResche L Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(3):291–305

Lovgren A, et al. Temporomandibular pain and jaw dysfunction at different ages covering the lifespan—a population based study. *Eur J Pain* . 2016; 20 ( 4 ):532–40.

Macfarlane TV, et al. Oro-facial pain in the community: prevalence and associated impact. *Commun Dent Oral Epidemiol*. 2002;30(1):52–60.

Maixner W, et al. Overlapping chronic pain conditions: implications for diagnosis and classification.. *J Pain* . 2016; 17 ( 9 Suplemento ):T93–107.

Marcondes, FK, Bianchi, FJ, Tanno AP. Determinação das fases do ciclo estral em ratas: considerações úteis. *Braz. J. Biol.* 2002; 62 (4a ): 609-614.

Marquez JO. A dor e os seus aspectos multidimensionais. *Ciência e Cultura*. 2011 Apr;63(2):28-32.

Medeiros P, Medeiros AC, Martins RCP, Negrini-Ferrari SE, Silva JA, Silva JA, Coimbra NC, Freitas RL. Modelos neuropsicobiológicos para estudo da dor e das emoções. *Psicol. Pesq. Juiz de Fora*. 2020; 14(3). p.66-82. DOI: 10.34019/1982-1247.2020.v14.30596

Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, Bardoni R. BDNF as a pain modulator, *Progress in Neurobiology*, Volume 85, Issue 3, 2008, Pages 297-317, ISSN 0301- 0082, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.04.004>.

Moggil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev. Neurosci*. 10,283- 294. 2010 61

Motta ACF, Rocha MJA, Tba Jr. *Hormônios Sistêmicos e as Estruturas Bucomaxilofaciais*. Ribeirão Preto; 2012. 128p.

Muley MM, Krustev E, McDougall JJ. Preclinical assessment of inflammatory pain. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2016 Feb;22(2):88-101.

Nishimura M, Segami N, Kaneyama K, Suzuki T, Miyamaru, M. Proinflammatory cytokines and arthroscopic findings of patients with internal derangement and osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2002, 40, 68–71.

Oliveira LK, Almeida G, Lelis ER, Tavares M, Fernandes Neto AJ. Temporomandibular disorder and anxiety, quality of sleep, and quality of life in nursing professionals. *Baz. Oral Res*. 2015, 29, 1-7.

Paller CJ, Campbell CM, Edwards RR, Dobs AS. Sex-based differences in pain perception and treatment. *Pain medicine*. 2009 Mar 1;10(2):289-99.

Park Y et al. Estrogen Selectively Enhances TMJ Disc but Not Knee Meniscus Matrix Loss. *Journal of Dental Research*, v. 98, n. 13, p. 1532–1538, 1 dez.2019.

Patil S et al. Role of female reproductive hormones estrogen and progesterone in temporomandibular disorder in female patients. *Journal of Oral Research and Review*, v. 7, n. 2, p.41, 2015.

Phillippe L et al. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am J Physiol*. v. 273, n. 4, p. 1550–6, outubro 1997.

Prossnitz ER. Opera TI, Sklar LA, Arteburn JB. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 Apr; 109(3-5): 350-3.

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

Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe F, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song X, Stenes B, Sullivan MD, Tutelman P, Ushida T, Vader K. The Revised International Association for the study of pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises, *PAIN*. v. 161, p. 1976-1982, 2020.

Raymundo MM. Os deveres dos Pesquisadores para com os animais de Experimentação: uma proposta de auto-regulamentação [dissertação]. Porto Alegre: Programa de pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul,2000.

Robinson JL, Johnson PM, Kister K, Yin MT, Chen J, Wadhwa S. Estrogen signaling impacts temporomandibular joint and periodontal disease pathology. *Odontology*. 2020 62 Apr;108(2):153-165. doi: 10.1007/s10266-019-00439-1. Epub 2019 Jul 3. PMID: 31270648; PMCID: PMC7192637.

Schaible HG. Pathophysiology of pain. *Orthopade*. 2007. Jan,36 (1):8,10-2,14-16  
Scharfman HE et al. Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 2003;23:11641–11652. [PubMed: 14684866]

Silva Moreira SF, Nunes EA, Kuo J, Macedo IC, Muchale A, Oliveira C, Scarabelot VL, Marques Filho PR, Medeiros LF, Caumo W, Torres IL. Hypoestrogenism alters mood: Ketamine reverses depressive-like behavior induced by ovariectomy in rats. *Pharmacological Reports*. 2016 Feb 1;68(1):109-15.

Smith D, Wilkie R, Uthman O, Jordan JL, McBeth J. Chronic pain and mortality: a systematic review. *PLoS One*. 2014 Jun 5;9(6):e99048. doi: 10.1371/journal.pone.0099048. PMID: 24901358; PMCID: PMC4047043

Stefani LC, Torres ILS, Souza ICC, Rozisky PP, Fregni F, Caumo W. BDNF as an effect modifier for gender effects on pain thresholds in healthy subjects, *Neuroscience Letters*, Volume 514, Issue 1,2012,Pages 62-66,ISSN 0304-3940, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.02.057>.

Strom JO, Theodorsson A, Theodorsson E. Hormesis and female sex hormones. *Pharmaceuticals*. 2011 May 16;4(5):726-40.

Zwiri A, Al-Hatamleh MA, W. Ahmad WM, Ahmed Asif J, Khoo SP, Husein A, Ab-Ghani Z, Kassim NK. Biomarkers for temporomandibular disorders: current status and future directions. *Diagnostics*. 2020 May 15;10(5):303.

Traub RJ, Ji Y. Sex differences and hormonal modulation of deep tissue pain. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2013 Oct 1;34(4):350-66.

Vilanova LSR, Gonçalves, TMSV, Meireles L, Garcia RCMR. Hormonal Fluctuations Intensify Temporomandibular Disorder Pain Without Impairing Masticatory Function. *The International Journal of Prosthodontics*. 2015; 28(1): 72–74.

Wang J, Chao Y, Wan Q, Zhu Z. The possible role of estrogen in the incidence of temporomandibular disorders. *Med Hypotheses*. 2008; 71:564-567. Warren MP, Fried JL. Temporomandibular disorders and hormones in women. *CellsTissue Organ*. 2001;1;169(3):187–92.

Wise EA, Riley JL, Robinson ME. Clinical pain perception and hormone replacement therapy in postmenopausal women experiencing orofacial pain. *Clin J Pain*. 2000;16(2):121-6. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and antiinflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014; 561459. 74 63

Woolf CJ. What is this thing called pain?. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Nov 1;120(11):3742-4.

Xu X, Li X, Liang Y, Ou Y, Huang J, Xiong J, Duan L, Wang D. Estrogen Modulates Cartilage and Subchondral Bone Remodeling in an Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Osteoarthritis. *Med Sci Monit*. 2019 Apr 29;25:3146-3153. doi: 10.12659/MSM.916254. PMID: 31031401; PMCID: PMC6503753

Xue XT, Kou XX, Li CS, Bi RY, Meng Z, Wang XD, Zhou YH, Gan YH. Progesterone attenuates temporomandibular joint inflammation through inhibition of NF-κB pathway in ovariectomized rats. *Scientific reports*. 2017 Nov 10;7(1):15334.7.

Yamada K, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Kohno S, Amizuka N, Iwanaga T, Maeda T. Expression of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in the rat temporomandibular joint. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists*. 2003 Oct;274(2):934-41.

Yazici H, Taskin MI, Guney G, Hismiogullari AA, Arslan E, Tulaci KG. The novel relationship between polycystic ovary syndrome and temporomandibular joint disorders. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*. 2021 Dec 1;122(6):544-8.

Ye T, Sun D, Mu T, Chu Y, Miao H, Zhang M, Yang H, Liu Q, Lu L, Xing X, Yu S. Differential effects of high-physiological oestrogen on the degeneration of mandibular condylar cartilage and subchondral bone. *Bone*. 2018 Jun 1;111:9-22.

## 8. ANEXO

### ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO PELA CEUA - HCPA



#### HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

##### Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

##### Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 2021/0632

**Título:** INFLUÊNCIA DO ESTROGÊNIO NAS DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES EM RATAS OVARIETOMIZADAS

**Pesquisador Responsável:** IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

**Equipe de Pesquisa:**

DIRSON JOAO STEIN

GIOVANA PAOLA HECK KROEFF

**Data de Aprovação:** 20/06/2022

**Data de Término:** 31/12/2023

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade	Data Reunião	Documento
RATO HETEROGÊNICO	F/90 Dia(s)	100	10/05/2022	Projeto

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.



Assinado digitalmente por:  
PATRICIA ASHTON PROLLA  
DIRETORIA DE PESQUISA  
22/06/2022 09:24:36

entorno: /cpa/estudo/pesquisa/publico/atividade/pos-graduacao/conferencia/Arquivo\_xhtml?ca  
de=ny<202792