

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DE
DESIDROEPIANDROSTERONA, DESIDROEPIANDROSTERONA
SULFATADA E PROGESTERONA SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO DE
RÃS *RANA CATESBEIANA* ADULTAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RENI VOLMIR DOS SANTOS

PORTO ALEGRE
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA E CRÔNICA DE
DESIDROEPIANDROSTERONA, DESIDROEPIANDROSTERONA
SULFATADA E PROGESTERONA SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO DE
RÃS *RANA CATESBEIANA* ADULTAS**

RENI VOLMIR DOS SANTOS

**ORIENTADORAS: PROF^a. DR^a. WANIA APARECIDA PARTATA
PROF^a. DR^a. MARIA FLÁVIA RIBEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

PORTO ALEGRE

2005

“Meus pais, Waldir e Vanina, pelo amor e orgulho que sinto por vocês, dedico-vos esta dissertação”.

AGRADECIMENTOS

As professoras Wânia Partata e Flávia Ribeiro, pelos ensinamentos, competência, paciência e exemplos em orientação.

Aos meus irmãos, Sílvia e Sérgio, meus cunhados, Mauro e Lizete, e meus sobrinhos, Sérgio, Eduardo e Matheus, pelo apoio e mais uma vez estarem juntos comigo nesta etapa.

A minha turma, Rogério, Zica, Milton, Zinn, Günther, Ju, Tomas, Eduardo, Julinho e Caco, pelos momentos de descontração, amizade e força.

A amiga Daniele Rossato, por estar presente em todos os momentos, incentivando, ajudando, ou simplesmente me ouvindo, agradeço muito.

Aos amigos Paulo Faria e José Rodrigues, que apesar de estarem longe, fizeram-se presente com palavras de apoio.

Aos colegas do laboratório, Renata, Luciano, Melina, Maria, Denise e Gabriela, pela ajuda e por mostrarem que é possível fazer ciência séria de uma forma alegre.

Aos meus alunos e colegas professores pelo incentivo e grande torcida.

Aos professores do ppg em Neurociências pelos ensinamentos.

Aos colegas de mestrado pela companhia e parceria neste período.

Ao senhor Valter Jacob, funcionário do biotério, pela dedicação no cuidado dos animais.

A Ceres Oliveira, pelas aulas de estatística.

Ao amor, pois sem ele a vida não tem sentido.

E a Deus pela vida.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DAS FIGURAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Fisiologia da Transmissão Nociceptiva.....	01
1.2. Neuroesteróides.....	04
1.2.1. Desidroepiandrosterona e Desidroepiandrosterona Sulfatada....	11
1.2.2. Progesterona.....	13
1.3. Anfíbios como Modelos para a Nocicepção.....	15
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Animais: Procedência e Manutenção.....	20
3.2. Administração dos Hormônios DHEA, DHEAS e Progesterona.....	21
3.3. Teste Químico do Ácido Acético.....	21
3.4. Procedimentos Experimentais.....	24
3.5. Análise Estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Considerações Iniciais.....	28
4.2. Tratamento Agudo com DHEA, DHEAS e Progesterona.....	29
4.3. Tratamento Crônico com DHEA, DHEAS e Progesterona.....	31
5. DISCUSSÃO.....	48
5.1. Concentrações Hormonais.....	48
5.2. Administração Aguda e Crônica de DHEA e DHEAS.....	51
5.3. Administração Aguda e Crônica de Progesterona.....	60

6. CONCLUSÕES.....66

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....68

RELAÇÃO DAS FIGURAS

- FIGURA 1: Biossíntese de hormônios neuroesteróides no sistema nervoso central e periférico.....6
- FIGURA 2: Rã *Rana catesbeiana*, adulta, macho, identificada com fita colorida em uma de suas patas dianteiras.....22
- FIGURA 3: Rã *Rana catesbeiana*, adulta, macho, sendo submetida ao teste químico do ácido acético, onde o ácido é colocado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o tempo de retirada da pata medido com um cronômetro.....23
- FIGURA 4: Rã *Rana catesbeiana*, adulta, macho, recebendo injeção subcutânea no saco linfático dorsal.....26
- FIGURA 5: Efeito da administração aguda de DHEA na dose de 1,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento.....35
- FIGURA 6: Efeito da administração aguda de DHEA na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento.....36
- FIGURA 7: Efeito da administração aguda de DHEA na dose de 10,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento.....37

FIGURA 8: Efeito da administração aguda de DHEAS na dose de 1,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento.....38

FIGURA 9: Efeito da administração aguda de DHEAS na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento.....39

FIGURA 10: Efeito da administração aguda de DHEAS na dose de 10,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento.....40

FIGURA 11: Efeito da administração aguda de progesterona na dose de 1,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento.....41

FIGURA 12: Efeito da administração aguda de progesterona na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento.....42

FIGURA 13: Efeito da administração aguda de progesterona na dose de 10,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento.....43

FIGURA 14: Efeito da administração crônica de DHEA na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2 semanas do tratamento.....44

FIGURA 15: Efeito da administração crônica de DHEA na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2 semanas do tratamento, com interrupção da administração do hormônio por 5 dias, e reposição do mesmo por uma semana.....45

FIGURA 16: Efeito da administração crônica de DHEAS na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2 semanas do tratamento.....46

FIGURA 17: Efeito da administração crônica de progesterona na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, antes e após 2 semanas do tratamento.....47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: adrenocorticotrofina

A δ : fibras A delta

Ca⁺²: íon cálcio

DHEA: desidroepiandrosterona

DHEAS: desidroepiandrosterona sulfatada

GABA: ácido gama-aminobutírico

GABA_A: receptor gabaérgico do tipo A

NMDA: N-metil-D-aspartato

P450_{scc}: citocromo P450 de clivagem da cadeia lateral (*side chain cleavage cytochrome P450*)

SNC: sistema nervoso central

σ : receptor sigma

3 β -HSD: 3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase

RESUMO

Em pacientes portadores de fibromialgia, a administração de doses farmacológicas de DHEA ocasionou redução da sensação de dor muscular e fadiga, o que permitiu inferir seu envolvimento na modulação da percepção dolorosa. É sabido que a DHEA pode ser convertida, tanto periféricamente como no SNC, em sua forma sulfatada (DHEAS) por ação de enzimas sulfotransferases, tendo esta papel na modulação da nocicepção. Outro hormônio esteróide com ação sobre a nocicepção é a progesterona, cuja administração resultou em efeitos anestésicos e sedativos.

A maioria destes resultados foram obtidos em mamíferos e humanos. Todavia, um estudo recente demonstrou que o tecido encefálico de rã foi capaz de sintetizar esteróides a partir de colesterol, sendo este processo de biossíntese similar àquele descrito em mamíferos. Deste modo, o presente estudo utilizou a rã *Rana catesbeiana*, adulta, macho, para determinar os efeitos da administração aguda (1,0, 2,0 e 10,0 mg/kg) e crônica (2,0 mg/kg) de DHEA, DHEAS e progesterona sobre o limiar nociceptivo das mesmas. Este limiar foi determinado pela utilização do teste químico do ácido acético, o qual foi realizado 2 horas antes da administração das soluções e após 2, 6 e 24 horas nos estudos de tratamento agudo e 48 horas após o término da última injeção nos estudos crônicos, sendo que nestes as rãs receberam 6 injeções subcutâneas, havendo entre cada administração um intervalo de 72 horas. Foram utilizados 3 grupos: controle, veículos e tratados.

No tratamento agudo, as doses de 1,0 e 2,0 mg/kg de DHEA, DHEAS e progesterona não ocasionaram modificações estatisticamente significativas no limiar nociceptivo das rãs. Já a dose de 10,0 mg/kg de DHEA e DHEAS induziu um acréscimo significativo no limiar nociceptivo destes animais. Esta alteração não foi observada nas rãs tratadas com progesterona nesta dose. Entretanto, a administração crônica de DHEA, DHEAS e progesterona, provocou aumento estatisticamente significativo no limiar nociceptivo das rãs. A interrupção da

administração de DHEA por 05 dias resultou no retorno do limiar nociceptivo a valores semelhantes àqueles obtidos antes das injeções subcutâneas de DHEA. A repetição deste tratamento por mais 07 dias ocasionou um novo aumento no limiar nociceptivo das rãs.

Estes resultados sugerem que o efeito antinociceptivo destes esteróides apareceram precocemente na evolução dos vertebrados, estando ainda presente em humanos. Assim, as rãs, constituem modelos experimentais que poderão contribuir para o esclarecimento dos mecanismos celulares de ação da DHEA, da DHEAS e da progesterona sobre a nocicepção, tema ainda muito especulativo na neurociência.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fisiologia da Transmissão Nociceptiva

Dor é um complexo de sensações desagradáveis, experiências emocionais, respostas neurovegetativas ou autonômicas e psicológicas resultantes de dano tecidual propriamente dito ou da eminência de lesão tecidual. Por este caráter subjetivo, portanto, pode ser somente relacionada aos humanos, os quais podem verbalizá-la. Nocicepção, por sua vez, é o mecanismo pelo o qual estímulos nocivos, de origem térmica, mecânica e/ou química, são transmitidos para o Sistema Nervoso Central (SNC) (BYERS & BONICA, 2001). A lesão nos tecidos constitui um estímulo nocivo, gerando alterações celulares com liberação de substâncias neuroquímicas. Portanto, a dor compreende um conjunto de efeitos ocasionados por mecanismos bioquímicos, fisiológicos e psicológicos, desencadeando atividade em vários centros do sistema nervoso onde ocorrem os processamentos sensorial, motivacional e cognitivo (BYERS & BONICA, 2001).

Está demonstrado que, em mamíferos, o processo da nocicepção inicia com a geração de impulsos elétricos nos terminais axonais de pequenos neurônios sensoriais, os quais são de dois tipos: 1) fibras mielinizadas de pequeno diâmetro, chamadas A delta (A δ) e responsáveis pela dor rápida ou

primária, e 2) fibras do tipo C, que não possuem bainha de mielina e são responsáveis pela dor lenta ou secundária. Estas fibras localizam-se na maioria dos tecidos e são excitadas pela presença de estímulos de origem mecânica, térmica e/ou química nocivos. Nesse processo de excitação, postula-se que em suas membranas existam proteínas receptoras que convertem as diferentes modalidades energéticas em impulsos nervosos, os quais são transmitidos para o SNC (BEAR *et al.*, 2001; KANDEL *et al.*, 2000; BYERS & BONICA, 2001).

A informação nociceptiva destina-se inicialmente ao corno dorsal da medula espinal, quando proveniente da pele, dos músculos e dos órgãos internos localizados no tronco axial e nos membros, e para núcleos do tronco encefálico quando provém da pele e da musculatura da cabeça e do pescoço. Destas regiões saem fibras axonais que se dirigem, em sua maior parte, para o tálamo, principal região responsável pela integração das aferências nociceptivas. Daí a informação sensorial segue para o córtex cerebral onde é novamente processada resultando na percepção dolorosa (MILLAN, 1999; MARTIN, 1996; TERMAN & BONICA, 2001).

Uma questão que sempre é citada quando se estuda a fisiologia da transmissão nociceptiva é qual ou quais são os neurotransmissores que medeiam e/ou modulam esta informação sensorial. Uma grande quantidade de estudos, empregando distintas metodologias, investigou a neurofarmacologia da transmissão nociceptiva, particularmente aquela que envolve os aferentes primários, mostrando que nesse processo ocorre participação tanto de

substâncias químicas com ação excitatória quanto inibitória, as quais podem ser liberadas pelos próprios terminais dos aferentes primários, bem como por neurônios intrínsecos do corno dorsal ou dos núcleos sensoriais do tronco encefálico, e/ou de fibras descendentes provenientes de regiões mais superiores do neuroeixo que chegam até essas áreas neurais (FÜRST, 1999; WALL & MELZACK, 1999; DORAN, 2000). Dentre a diversidade de substâncias químicas envolvidas incluem-se os neurotransmissores clássicos e os neuropeptídeos, sendo que esta lista está em crescente processo de acréscimo de novos nomes. O desafio atual para a neurociência da nocicepção é desvendar a função de cada uma destas diferentes substâncias neste processo sensorial, embora seja evidente até o presente momento que as mesmas estejam contribuindo para o processo da transmissão nociceptiva e/ou para controlar as aferências nociceptivas que aí chegam (KANDEL, *et al.*, 2000; FÜRST, 1999; WALL & MELZACK, 1999; LOESER & BONICA, 2001; WILLIS & WESTLUND, 1997). O equilíbrio entre os processos excitatórios e inibitórios nestas regiões de entrada é a base da teoria das comportas para a transmissão nociceptiva estabelecida por Melzack & Wall, em 1965, e o mecanismo referido como controle inibitório nociceptivo por Le Bars *et al.*, em 1979.

Neste contexto, cabe ser ressaltado o recente interesse recebido pelo hormônio chamado desidroepiandrosterona (DHEA). Este fato surgiu pela demonstração de que o tratamento de pacientes portadores de fibromialgia com doses farmacológicas de DHEA ocasionou redução na sensação de dor muscular e fadiga destes pacientes (MORALES *et al.*, 1995), o que permitiu

inferir o envolvimento desta substância química na modulação da percepção dolorosa (BAULIEU & ROBEL, 1998).

1.2. Neuroesteróides

Esteróides são hormônios que apresentam um núcleo molecular básico derivado das moléculas de colesterol, sendo classificados em glicocorticóides, mineralocorticóides, androgênios, estrogênios e progestogênios. Sua biossíntese é restrita a alguns poucos tecidos (córtex da supra-renal, testículos, ovários e placenta) (DEGROOT & JAMENSON, 2001).

A maioria das reações envolvidas na síntese destes hormônios é catalisada por enzimas do citocromo P450, localizadas nas membranas do retículo endoplasmático e das mitocôndrias. A primeira etapa do processo de síntese hormonal é o transporte do colesterol para as mitocôndrias, o qual é feito por uma enzima transportadora de esteróides. Nas mitocôndrias, o colesterol é convertido em pregnenolona numa reação catalisada pela colesterol desmolase, a qual é um citocromo mitocondrial P450 também conhecida como proteína de clivagem de cadeia lateral ou P450_{sc} (*side chain cleavage cytochrome P450*) (TAKASE *et al.*, 1999). Esta é a etapa limitante da síntese, a qual é controlada por diferentes fatores (STOFFEL-WAGNER, 2001). A pregnenolona formada então se desloca para o retículo endoplasmático liso, onde parte dela é desidrogenada para formar progesterona em uma reação catalisada pela 3-beta-hidroxi-esteróide desidrogenase. Parte da pregnenolona

e parte da progesterona são hidroxiladas no retículo endoplasmático liso por ação da enzima 17-alfa-hidroxilase, outra P450 conhecida como P450_{c17}, resultando nos produtos 17-alfa-hidroxipregnenolona e 17-alfa-hidroxiprogesteron, respectivamente. Parte da 17-hidroxipregnenolona é convertida em 17-alfa-hidroxiprogesteron. O P450_{c17} é também a 17,20-liase, a enzima que catalisa a clivagem da ligação 17,20 para converter a 17-alfa-hidroxipregnenolona e a 17-alfa-hidroxiprogesteron em DHEA e androstenediona. A hidroxilação da progesterona e da 17-alfa-hidroxiprogesteron, que também ocorre no retículo endoplasmático liso, é catalisada pela enzima 21-beta-hidroxilase, um citocromo também conhecido como P450_{c21}. Os produtos finais destas reações, a 11-desoxicorticosterona e o 11-desoxicortisol voltam para as mitocôndrias, onde são 11-hidroxilados pela ação da enzima 11-beta-hidroxilase, conhecida também por P450_{c11}, resultando nos produtos corticosterona e cortisol, respectivamente (Fig. 1). Estes passos ocorrem nas zonas fasciculada e reticular da glândula adrenal. Na gônada masculina, a DHEA formada é convertida em androstenediona pela ação da enzima 17-beta-hidroxi-esteróide-desidrogenase, e a androstenediona, por sua vez, é transformada em testosterona pela ação da enzima 3-beta-hidroxi-esteróide-desidrogenase. Já na gônada feminina ocorre aromatização da androstenediona e da testosterona, resultando na estrona e no 17-beta-estradiol, devido à ação das enzimas 17-beta-hidrogenase e aromatase (GANONG, 1995; AIRES, 1999; MILLER, 2002).

Em humanos, em torno de 99% da DHEA liberada na circulação pela glândula adrenal está na forma sulfatada (DHEAS), havendo, porém, conversão periférica de DHEA em DHEAS e vice-versa após liberação. A meia-vida da DHEA circulante é estimada estar em torno de 15-30 minutos, sendo sua taxa de depuração metabólica de 4 mg/dia. A meia-vida de sua forma sulfatada é maior, sendo de aproximadamente 7-10 horas e sua taxa de depuração em torno de 25 mg/dia (FLYNN *et al.*, 1999; PEÑA, 1997).

É sabido que a concentração sanguínea de DHEA apresenta flutuações que são similares às observadas com o cortisol, o que sugere uma possibilidade de controle da secreção de DHEA pela adrenocorticotrofina (ACTH), muito embora não tenha sido demonstrado mecanismo de controle por “feedback” hipotálamo-hipófise na secreção de DHEA. O hormônio ACTH também parece estimular a síntese de DHEAS, muito embora sua concentração plasmática se mantenha constante ao longo das 24 horas do dia. Sabe-se também que as enzimas que participam da metabolização da DHEA e da DHEAS estão amplamente distribuídas pelo corpo e que humanos e macacos apresentam altas concentrações sanguíneas destes hormônios nos períodos pré-natais, os quais caem consideravelmente ao nascimento, aumentam na puberdade e vão se reduzindo gradualmente com o avanço da idade (PEÑA, 1997).

A progesterona também apresenta uma meia-vida curta, sendo quase toda metabolizada em outros esteróides sem efeito progesterônico alguns minutos após ser secretada. Essencial para a manutenção da gestação, este hormônio é produzido e secretado em grande quantidade pelo corpo amarelo

ou lúteo do ovário (na segunda metade do ciclo ovariano) e pela placenta durante a gravidez. Em quantidades menores, é também sintetizada pelos testículos e supra-renais, onde serve de precursor para a produção de andrógenos e corticosteróides. A concentração plasmática de progesterona varia de 1,13 a 10,40 mg/litro. Sua secreção é regulada pelas gonadotrofinas hipofisárias, que por sua vez, são controladas por fatores hipotalâmicos. No fígado, a progesterona é reduzida a pregnandiol e conjuga-se com ácido glicurônico para ser excretada na urina. Apenas 10% da progesterona original é excretada sob essa forma (WILLIAM & WILSON, 1985; DEGROOT & JAMESON, 2001; GUYTON & HALL, 1996).

Esteróides, que também são sintetizados no sistema nervoso central e periférico, independentemente da atividade esteroidogênica de glândulas periféricas, foram chamados de neuroesteróides (BAULIEU & ROBEL, 1998; ROBEL & BAULIEU, 1994; ROBEL, *et al.*, 1995). Este fato decorreu da demonstração de que esteróides classicamente associados à reprodução nas glândulas endócrinas periféricas ocorriam em concentrações relativamente altas no SNC, mesmo após a realização de adrenalectomia e gonadectomia periféricas (BAULIEU & PAUL, 1996 APUD ZWAIN & YEN, 1999). Outras evidências para a síntese central de esteróides advêm de estudos recentes demonstrando que determinadas regiões do SNC de vertebrados possuem capacidade de formar pregnenolona (MEYER *et al.*, 1999; SCHUMACHER *et al.*, 1996), estando sua concentração encefálica aproximadamente uma ordem de magnitude acima da concentração de DHEA, o que é esperado em uma

relação precursor-produto. Sua concentração também está dez vezes acima daquela observada no plasma (BAULIEU & ROBEL, 1998).

Parece que os principais tipos celulares responsáveis pela síntese de pregnenolona são os astrócitos (MELLON & COMPAGNONE, 1999) e os oligodendrócitos (JUNG-TESTAS *et al.*, 1989). Estas últimas células, em cultura, foram capazes de sintetizar pregnenolona a partir de colesterol marcado com trítio (HU *et al.*, 1987; JUNG-TESTAS *et al.*, 1989). Entretanto, foi demonstrado que neurônios também expressam as enzimas P450_{scc} e P450_{c17} (MELLON & DESCHEPPER, 1993; ZWAN & YEN, 1999), o que sugere que também estas células são capazes de sintetizar pregnenolona e DHEA.

Apesar de estar ainda incompletamente determinados seus locais e rotas de síntese no sistema nervoso, diversos estudos demonstraram o envolvimento dos neuroesteróides no controle de importantes mecanismos neurofisiológicos. A infusão de sulfato de pregnenolona no núcleo “basalis” de rato estimula processos de aprendizagem (McEWEN & SAPOLSKY, 1995), enquanto déficits no desempenho cognitivo de ratos senis foram atribuídos às baixas concentrações hipocâmpais deste composto (VALLÉE *et al.*, 1997). É postulado ainda que os neuroesteróides poderiam participar na regulação da atividade do sistema endócrino (SCHUMACHER *et al.*, 1996), bem como na adaptação de animais frente a novos estímulos ambientais (MAYO *et al.*, 1999; 1993). Além disso, os neuroesteróides também parecem exercer algum papel na regulação da formação e regeneração da bainha de mielina de nervos periféricos (BROCKES *et al.*, 1979; JUNG-TESTAS *et al.*, 1992).

Postula-se que para exercerem suas ações fisiológicas, os neuroesteróides poderiam induzir a síntese de fatores de crescimento ou de outras proteínas específicas após ligação dos mesmos a receptores intracelulares. Poderiam também interagir com receptores próprios localizados na membrana celular, ou ainda agirem em receptores de membrana específicos a outros neurotransmissores, tais como o receptor GABA (ácido gama-aminobutírico) do tipo A (GABA_A), o receptor glutamatérgico do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e o receptor sigma (σ) (WANG, *et al.*, 1996; UCHIDA *et al.*, 2002; LAMBERT *et al.*, 2003; MEUNIER & MAURICE, 2004). Uma hipótese que se faz quanto ao mecanismo de ação dos neuroesteróides é que os mesmos poderiam modular, de forma excitatória ou inibitória, canais iônicos ativados por neurotransmissores, regulando, assim, o balanço entre os processos excitatórios e inibitórios do SNC (SHUMACHER, 1999; WEHLING, 1994; PAUL & PURDY, 1992). Esta hipótese decorreu do fato de que, em concentrações fisiológicas, o sulfato de pregnenolona e a forma sulfatada de DHEA foram capazes de inibir o complexo do receptor GABA_A (MAJEWSKA, 1999; 1996), enquanto metabólitos da progesterona potencializaram a resposta do neurotransmissor GABA (IRWIN, *et al.*, 1994; MAJEWSKA, 1991). A administração de sulfato de pregnenolona provocou redução de corrente iônica e aumento da concentração intracelular de Ca⁺², os quais tinham sido desencadeados pela ativação do receptor NMDA (IRWIN, *et al.*, 1994). Tanto o sulfato de pregnenolona quanto a DHEA e a sua forma sulfatada foram capazes de inibir canais de Ca⁺² dependentes de voltagem em neurônios hipocampais, além de terem potencializado a resposta neuronal glutamatérgica

resultante da ativação do receptor NMDA em medula espinal e neurônios hipocampais (FFRENCH-MULLEN & SPENCE, 1991; IRWIN *et al.*, 1992). Esta modulação da resposta do receptor NMDA parece requerer o envolvimento de receptores σ , uma vez que ligantes seletivos a este receptor também potencializam a atividade neuronal induzida similarmente pela ativação do receptor NMDA (MONNET *et al.*, 1995; 1994).

1.2.1. Desidroepiandrosterona (DHEA) e Desidroepiandrosterona Sulfatada (DHEAS)

Diversos estudos demonstraram a presença de DHEA e de DHEAS no SNC de muitas espécies de vertebrados, sendo abundantes em encéfalos de ratos, coelhos, macacos, cães, humanos (SCHUMACHER, 1999; CORPECHOT *et al.*, 1981; COMPAGNONE *et al.*, 1995) e anfíbios (MENSAH-NYAGAN *et al.*, 2000).

Atualmente existe um grande interesse no conhecimento do papel da DHEA no tecido nervoso, visto que esta substância química, anteriormente apenas considerada como um precursor de hormônios androgênicos e estrogênicos (DEGROOT & JAMESON, 2001; SCHUMACHER *et al.*, 1996; STRAUSS & BARBIERI, 2004), está começando a ser empregada na terapia clínica de diversos distúrbios fisiológicos, recebendo inclusive, o nome de “pílula da juventude” em função do bem estar e disposição relatada pelos pacientes que fizeram tratamento crônico com este hormônio (HIMEL, 2001;

MORALES, *et al.*,1995). Todavia, muitos destes dados não foram obtidos em estudos científicos, constituindo parte das muitas propagandas e anúncios de venda do mesmo. Porém, estudos recentes demonstraram que a DHEA possui efeitos neuroprotetores (CARDOUNEL *et al.*, 1999; KIMONIDES, *et al.*, 1998), rejuvenecedores e poderia ser um possível substituto do estradiol na reposição hormonal feminina (FLYNN *et al.*, 1999). É sabido ainda que em situações de estresse, interrupção do sono, fadiga muscular e fibromialgia há uma redução da concentração circulante de DHEA (MORALES *et al.*, 1995; DESSEIN *et al.*,1999). Sua concentração plasmática também está reduzida no envelhecimento (KIMONIDES *et al.*, 1998; MORLEY *et al.*, 1997) e a terapia de reposição deste hormônio resultou em aumento da força muscular, da massa corporal, da função imune, na melhora do sono (MAJEWSKA *et al.*, 1995), da libido (MACLUSKY & NAFTOLIN, 1981), da qualidade de vida e da habilidade para enfrentar eventos estressantes em homens e mulheres (BAULIEU *et al.*, 2001; HIMEL, 2001). Em Rodentia, a DHEA e a metil-DHEA foram capazes de inibir a agressividade, e esta parece ter decorrido da diminuição da concentração cerebral de sulfato de pregnenolona (KAASIK, *et al.*, 2003; ROBEL *et al.*, 1999).

A forma sulfatada da DHEA, por sua vez, é mais abundante no tecido nervoso do que na circulação, e raramente atravessa a barreira hematoencefálica (BAULIEU, *et al.*, 1999). Desta forma, a maior parte da DHEAS presente no tecido encefálico resulta de sua síntese neste local. É sabido que a DHEAS pode ser convertida em DHEA e vice-versa por ação da enzima sulfotransferase (MENSAH-NYAGAN *et al.*, 1999; VARET *et al.*, 2004). De

acordo com Rhodes *et al.* (1997), a atividade desta enzima pode estar envolvida na regulação da concentração de DHEAS no encéfalo. Estudos em ratos demonstraram um aumento da concentração de DHEAS após a administração de um inibidor seletivo desta enzima, o (p-O-sulfamoil)-N-tetradecanoil tiramina (DU-14) (RHODES *et al.*, 1997). Está demonstrado ainda que a DHEAS, ao contrário da DHEA, é antagonista de receptores GABA_A (ZINDER & DAR, 1999; MEYER *et al.*, 1999; PARTRIDGE & VALENZUELA, 2001), o que sugere que este esteróide poderia desempenhar um papel contrário ao da DHEA na modulação da nocicepção. Entretanto, estudos realizados em humanos mostraram que baixas concentrações encefálicas de DHEAS ocasionaram aumento nas queixas de dor dos pacientes, bem como acréscimo desta sensação em diversos locais do corpo (FINSET *et al.*, 2004; MORRISON *et al.*, 1998). Este resultado sugere que o papel da DHEAS na nocicepção seja similar àquele da DHEA, ou seja, pode estar relacionada à antinocicepção.

1.2.2. Progesterona

Assim como a DHEA, a progesterona também parece desempenhar importantes funções no tecido nervoso. Diversos estudos *in vivo* mostraram sua participação nos processos de regeneração neuronal (VONGHER & FRYE, 1999; SCHUMACHER *et al.*, 1996). Em situações de axotomia, o tratamento de ratos adultos com progesterona resultou na sobrevivência de motoneurônios

da medula espinal (YU, 1989). A administração deste hormônio foi capaz de reduzir o edema cerebral e a alteração comportamental que acompanha as lesões de córtex frontal (ROOF *et al.*, 1993). Está demonstrado ainda que concentrações endógenas elevadas de progesterona promoveram mielinização em situações de regeneração axonal (SHUMACHER, *et al.*, 1996). Foi sugerido também que a progesterona possa estimular diretamente a formação de mielina em células de Schwann e, desta forma, o crescimento axonal (SCHUMACHER *et al.*, 1999; 2004).

Outro papel atribuído à progesterona no tecido nervoso é sua propriedade anestésica e sedativa (FRYE & DUNCAN, 1994; PATTE-MENSAH *et al.*, 2005). Nessas condições foi sugerido que este efeito seria decorrente de alterações em lipídios constituintes das membranas das células neuronais, o que resultaria em disfunção dessa membrana (PAUL & PURDY, 1992). Segundo esses autores, isto seria similar aos resultados obtidos nos estudos com colesterol, barbitúrios e inalação de anestésicos.

A progesterona, similar ao que ocorre com a DHEA, parece modular o receptor NMDA. Ela atua como um antagonista deste tipo de receptor, o qual estaria agindo via receptor σ (MONNET *et al.*, 1995). Também parece possuir papel na modulação do receptor GABA_A e, assim, na abertura de canais de cloreto (MAJEWSKA, 1992), o que poderia contribuir para seus efeitos anestésicos, hipnóticos e ansiolíticos (PAUL & PURDY, 1992; CRAWLEY *et al.*, 1986; KAVALIERS, 1988; 1988b).

1.3. Anfíbios como Modelos para a Nocicepção

Os anfíbios têm sido utilizados como modelos experimentais em uma grande quantidade de estudos morfológicos e fisiológicos, inclusive em estudos sobre a nocicepção (HAMAMOTO & SIMONE, 2003; WILLEMBRING & STEVENS, 1996; KUFFLER, *et al.*, 1997; STOSKOPF, 1994; STEVENS, 2003; 1996). A escolha destes animais decorreu de sua grande tolerância às condições ambientais adversas, à facilidade de aquisição de espécimes em comércio local, e a similaridade de funcionamento de seus sistemas, inclusive o sistema nervoso, com aqueles de mamíferos (ROCHA & BRANCO, 1998; ADLI *et al.*, 1988).

Uma espécie de anfíbio muito empregado como modelo experimental é a rã *Rana catesbeiana*, conhecida como rã-touro. Este anfíbio aquático resistente às baixas temperaturas, pertencente à família Ranidae, é típico da região norte dos Estados Unidos, mas que se adaptou às condições climáticas do Brasil, sendo o espécime encontrado em criadouros locais (STORER *et al.*, 1984).

O sistema nervoso deste animal compreende no sentido céfalo-caudal o lobo olfatório, o telencéfalo, o diencéfalo, os lobos ópticos, o cerebelo, a medula oblonga, a medula espinal, os gânglios e os nervos espinhais e cranianos, sendo muitas das terminações nervosas destes receptores sensoriais (BECCARI, 1943; BUTLER & HODOS, 1996; KARDONG, 1997). Estes últimos, similar ao que é observado em mamíferos, possuem ou não bainha de mielina. De acordo com sua morfologia, velocidade de condução e

latência de resposta, estas fibras foram classificadas em três tipos: 1) as chamadas fibras do tipo A, que possuem uma espessa bainha de mielina, 2) as chamadas fibras do tipo B, que são envolvidas por uma bainha de mielina pouco espessa, e 3) as chamadas fibras do tipo C, que não possuem envoltório de mielina (para revisão rever Stevens, 2004). Com relação à nocicepção, os estudos demonstraram que os estímulos térmicos, mecânicos e químicos nocivos foram transmitidos para o SNC pelas fibras do tipo B (MARUHASKI *et al.*, 1952; ADRIAN *et al.*, 1931, APUD STEVENS, 2004). No entanto, resultados experimentais recentes, onde foi empregado o teste do ácido acético para excitar fibras aferentes isoladas, demonstraram que nesta situação tanto fibras do tipo B como às do tipo C foram excitadas, sendo a proporção de ambas igual (HAMAMOTO & SIMONE, 2003). Assim, parece que as fibras do tipo B e C estão envolvidas na transmissão de estímulos químicos nocivos em anfíbios, o que é semelhante ao observado em mamíferos, já que as fibras do tipo B e C dos anfíbios assemelham-se, quanto as suas características morfológicas e fisiológicas, às fibras do tipo A δ e C dos mamíferos (HAMAMOTO & SIMONE, 2003; GARRY *et al.*, 2004).

Assim como em mamíferos, os anfíbios também possuem em seu encéfalo a enzima esteroidogênica citocromo P450_{scc} e são capazes de produzir pregnenolona e sua forma sulfatada, estando estas elevadas nas fases reprodutivas do animal (MENSAH-NYAGAN *et al.*, 2001). Isto parece indicar que estes neuroesteróides poderiam agir como um modulador excitatório para aumentar a atividade neuronal nesta fase de vida dos animais (TAKASE *et al.*, 1999). Um estudo recente sugere ainda que o processo de

biossíntese dos neuroesteróides em rãs seja similar àquele descrito em mamíferos (MENSAH-NYAGAN *et al.*, 2000; 2001b). Nestes estudos foi evidenciado que a concentração de DHEAS do telencéfalo e do hipotálamo de rã é, respectivamente, quatro e onze vezes mais elevada do que a quantidade circulante. A concentração encefálica de progesterona foi cem vezes maior do que aquela plasmática, enquanto a concentração hipotalâmica deste hormônio foi apenas quatro vezes mais baixa do que o valor detectado na glândula adrenal.

Recentemente demonstrou-se que, em hipotálamo de rãs, neurônios produtores de esteróides expressaram receptores GABA_A e que o GABA foi capaz de inibir a atividade da enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase após a ativação de receptores GABA_A (DO-REGO, *et al.*, 2000). Nestes animais, foi observado ainda que duas endozepinas foram capazes de estimular a produção de neuroesteróides agindo em receptores centrais e periféricos de benzodiazepínicos (DO-REGO, *et al.*, 1998; 2001). Assim, uma relação entre GABA e neuroesteróides também parece existir em anfíbios.

De acordo com Mensah-Nyagan *et al.* (2001), os neuroesteróides presentes no encéfalo de anfíbios poderiam controlar diversos processos neurofisiológicos destes animais. No entanto, estes ainda permanecem em sua maioria desconhecidos. Considerando as similaridades entre rãs e mamíferos quanto à função e distribuição dos neuroesteróides no SNC, pode-se sugerir que, similar ao que ocorre em humanos e mamíferos, é possível que os neuroesteróides apresentem algum papel analgésico em anfíbios. Com o intuito de oferecer subsídios a esta questão, o presente estudo submeteu rãs ao

tratamento agudo e crônico com diferentes neuroesteróides e mediu o limiar nociceptivo destes animais em diferentes intervalos de tempo. Estes resultados, apesar de preliminares, constituíram a primeira demonstração dos efeitos dos neuroesteróides DHEA, DHEAS e progesterona sobre a nocicepção de rãs.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo determinar, mediante o emprego do teste químico do ácido acético, os efeitos da administração aguda de DHEA, DHEAS e progesterona sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, adultas, machos, utilizando para este estudo as doses de 1,0, 2,0 e 10,0 mg/kg dos hormônios citados e os intervalos de tempo de 2, 6 e 24 horas após a administração subcutânea dos mesmos no saco linfático dorsal para a realização dos testes de limiar nociceptivo.

Avaliou-se ainda, mediante o emprego do teste químico do ácido acético, os efeitos da administração crônica de 2,0 mg/kg de DHEA, DHEA-S e progesterona sobre o limiar nociceptivo de rãs *Rana catesbeiana*, adultas, machos, administrada na mesma via, durante um período de 14 dias, sendo que entre cada injeção decorria um intervalo de 72 horas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais: Procedência e Manutenção

Para este estudo foram utilizadas rãs *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino, com peso médio de 50-150g. Estes animais foram obtidos do ranário Ranasul (Imbé, RS), trazidos para o Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde permaneceram em tanques especiais, localizados em ambiente aberto, contendo água constantemente renovada e uma porção central com terra. Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração apropriada. A limpeza dos tanques era efetuada diariamente, e os animais foram empregados experimentalmente após duas semanas de adaptação a estas novas condições.

Durante o período experimental, as rãs permaneceram em aquários no laboratório de Neurobiologia Comparada do Departamento de Fisiologia. Estes contiveram aproximadamente 2 cm de água destilada. A limpeza dos aquários era efetuada todos os dias. A temperatura da sala onde permaneceram oscilou de acordo com flutuações da temperatura ambiental. As rãs não foram alimentadas nos dias em que seriam submetidas ao teste químico do ácido

acético. Todos os experimentos foram realizados durante o período de janeiro a agosto.

3.2. Administração dos Hormônios DHEA, DHEAS e Progesterona

Para a administração aguda, DHEA e DHEAS (Calbiochem) foram diluídas em solução de beta-ciclodextrina (Fluka) 20% nas concentrações de 1,0, 2,0 e 10,0 mg/kg de peso corporal. Estas diluições foram preparadas de modo que o máximo de volume injetado no animal fosse de 0,1 ml. A progesterona (Sigma), por sua vez, foi diluída em solução salina contendo 10 µl de Tween (Calbiochem) e preparada para resultar nas mesmas concentrações e condições citadas acima. Para os estudos de administração crônica de DHEA, DHEAS e progesterona, estes hormônios foram diluídos nas mesmas soluções descritas acima para resultar na concentração de 2,0 mg/kg de peso corporal. Da mesma forma, esta solução foi preparada para que o volume máximo injetado no animal fosse de 0,1 ml.

3.3. Teste Químico do Ácido Acético

O teste nociceptivo empregado foi o teste químico do ácido acético descrito por Pezala (1983), o qual demonstra o limiar nociceptivo das rãs. Para isto, um dia antes do começo do experimento as rãs foram aleatoriamente

divididas em animais pertencentes aos grupos controle, veículo e tratadas. Estes animais foram pesados e identificados com fitas de diferentes cores, sendo que cada animal recebia uma fita de uma dada cor, a qual permanecia com este até o final do experimento. Estas fitas foram colocadas nas patas anteriores e, assim, cada animal pode ser controle de sua própria resposta (Fig. 2).



Fig. 2: Rã *Rana catesbeiana*, adulta, macho, identificada com fita colorida em uma de suas patas dianteiras.

No dia do experimento, cada rã era colocada em um aquário individual. Para melhor visualização da resposta do teste, a água do aquário foi reduzida a 0,5 cm. O teste constituiu na aplicação de uma gota de ácido na pata posterior do animal, sendo o limiar nociceptivo considerado como a menor concentração de ácido acético que fez com que a rã retirasse vigorosamente a pata quando este foi colocado sobre a mesma (Fig. 3). Para isto foram utilizadas concentrações de ácido que variavam de 15 M até 0,18 M, tendo entre estes

valores 12 diluições igualmente espaçadas e obedecendo a uma escala logarítmica. As soluções foram codificadas em ordem crescente de concentração por número de 0 -11 (Tab. 1). O teste iniciou com a menor concentração, seguida de concentrações maiores até a obtenção da resposta desejada. Para evitar que o ácido pudesse danificar a pele do animal, a gota era colocada com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e após 4s, se nenhuma resposta fosse efetuada pelo animal, esta região era lavada várias vezes com água destilada e procedia-se a aplicação da próxima concentração do ácido, e assim, sucessivamente, até a obtenção da retirada da pata. Este momento foi definido como o limiar nociceptivo e a pata foi imediatamente lavada com água destilada para evitar lesão na pele do animal.



Fig. 3: Rã *Rana catesbeiana*, adulta, macho, sendo submetida ao teste químico do ácido acético, o qual é colocado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o tempo de retirada da pata medido com um cronômetro.

Tabela 1. Concentrações de ácido acético empregadas no teste químico do limiar nociceptivo das rãs

Concentração de ácido acético (Molar)	Código de numeração dos frascos
0,18 M	0
0,26 M	1
0,39 M	2
0,58 M	3
0,88 M	4
1,31 M	5
1,97 M	6
2,96 M	7
4,44 M	8
6,66 M	9
10,00 M	10
15,00 M	11

3.4. Procedimentos Experimentais

Os animais submetidos à administração aguda de DHEA e de DHEAS receberam uma dose subcutânea do hormônio na concentração de 1,0, 2,0 e 10,0 mg/kg de peso corporal (Fig. 4). Para controle destes experimentos foram utilizados dois grupos de animais: um grupo que não recebeu nenhuma injeção, denominado controle, e outro grupo, denominado veículo, que recebeu administração de beta-ciclodextrina na concentração de 20%. Estes mesmos grupos de animais controle foram empregados nos estudos dos efeitos da

administração de progesterona sobre o limiar nociceptivo de rãs, sendo que, neste caso, o grupo veículo recebeu solução salina acrescida de 10 µl de Tween.

Para a determinação do limiar nociceptivo desses animais, submetidos à administração aguda de DHEA, DHEAS e progesterona, o teste do ácido acético foi realizado 2 horas antes da administração dos respectivos fármacos e 2, 6 e 24 horas após a administração das diferentes doses de DHEA, DHEAS e progesterona.

No tratamento crônico com DHEA, DHEAS e progesterona, as rãs receberam 6 injeções subcutâneas destes hormônios no saco linfático dorsal, estando estas na concentração de 2,0 mg/kg de peso corporal. Com o intuito de minimizar os efeitos estressantes da manipulação do animal para a administração dos respectivos hormônios, as injeções foram realizadas com um intervalo de 72 horas entre cada uma delas. Este procedimento resultou no tratamento das rãs por um período de 14 dias. Para controle destes experimentos foram utilizados animais que não receberam nenhuma injeção (animais controle), animais que receberam a administração do veículo, beta-ciclodextrina na concentração de 20% para os grupos que receberam DHEA e DHEAS, e solução salina acrescida de 10 µl Tween para o grupo que recebeu progesterona (grupo veículo). Nos experimentos com a administração crônica de DHEA e DHEAS ainda houve outro controle, os animais que receberam injeção subcutânea no saco linfático dorsal de solução salina. Como não houve diferença estatisticamente significativa entre este grupo e aquele que não recebeu qualquer injeção, o mesmo não foi empregado nos demais

experimentos. Cabe destacar que este cuidado foi tomado pelo fato de que não há relatos na literatura de rãs tratadas com solução de beta-ciclodextrina.

O teste do limiar nociceptivo das rãs tratadas cronicamente com DHEA, DHEAS e progesterona foi realizado 2 horas antes da administração dos hormônios e 48 horas após a administração da última dose de DHEA, DHEAS e progesterona.

Nos animais tratados cronicamente com DHEA, um grupo de animais recebeu o hormônio nas condições acima citadas, porém este tratamento teve duração de uma semana. Após este período, a administração hormonal foi suspensa por 5 dias e o limiar nociceptivo determinado mediante o teste do ácido acético. Em seguida, foram administradas injeções de DHEA na mesma concentração e condições anteriores durante uma semana, ao final desta as rãs foram novamente submetidas ao teste químico do ácido acético.

Em todos os grupos experimentais foram utilizados 8 animais.



Fig 4. Rã *Rana catesbeiana*, adulta, macho, recebendo injeção subcutânea no saco linfático dorsal

3.5. Análise Estatística

O efeito da administração aguda e crônica das diferentes doses de DHEA, DHEAS e progesterona foram apresentados em mediana e percentis (25 e 75), ao passo que o grupo foi descrito através da frequência absoluta em cada experimento.

As comparações entre os grupos tratados com as diferentes doses foram realizadas mediante o emprego de ANOVA não-paramétrica seguida do Teste de Kruskal-Wallis. As comparações intragrupos foram feitas com o emprego do teste de Friedman para os experimentos de administração aguda, e do teste de Wilcoxon para os experimentos de administração crônica. Para complementação destas análises, foram realizados testes de comparações múltiplas conforme indicado por Campos (1983).

As análises estatísticas foram realizadas no sistema SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versão 8.0; e o nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Considerações Iniciais

Antes de iniciar a descrição dos resultados, é necessário enfatizar que o tratamento das rãs com beta-ciclodextrina e as diferentes doses de DHEA, DHEAS e progesterona não ocasionaram modificações no comportamento dos animais. Além disso, esses hormônios não foram letais e nem tóxicos para as mesmas. Tanto as rãs tratadas com os hormônios e soluções-veículo como aquelas controle exibiram respostas comportamentais similares frente às mudanças na iluminação, presença do investigador e vigor na retirada da pata durante o teste químico do ácido acético. Cabe destacar que nenhuma rã, em qualquer uma das concentrações hormonais empregadas ou períodos de tempo considerados aqui, mostrou-se inábil no desempenho normal de atividades motoras, tais como reflexo de endireitamento ou resposta de fuga. Sendo assim, tomou-se o cuidado usual com o fechamento dos aquários em todos os grupos experimentais para evitar a fuga das mesmas.

A comparação das respostas de retirada da pata entre as rãs controle, veículo e aquelas que receberam solução salina foram similares ao longo dos períodos experimentais. A pequena variação observada na resposta das rãs

controle e veículo, na situação de administração aguda de progesterona, não foi estatisticamente significativa (Tabela 2).

Outra questão que deve ser ainda enfatizada é que os experimentos, apesar de terem sido realizados durante os meses de janeiro a agosto, os quais compreenderam diferentes estações do ano, as análises estatísticas dos mesmos não demonstraram a existência de variação sazonal no limiar nociceptivo das rãs controles. Este limiar mostrou-se muito similar ao longo deste período experimental (Tabela 2, 3 e 4).

Antes de iniciar a descrição dos resultados obtidos com os diferentes tratamentos hormonais cabe salientar que estes resultados estão representados em medianas e percentis (25 e 75). As medianas obtidas quando foram consideradas as medidas em diferentes tempos dentro de um mesmo grupo experimental estão representadas nas tabelas 2, 3 e 4. A comparação entre os diferentes grupos experimentais estão apresentados nas figuras 5 a 15. Nestas figuras, o eixo da ordenada representa a mediana das numerações de 0 a 11 dos frascos contendo as diferentes concentrações de ácido acético (0,18 M a 15 M), sendo que o valor da mediana é a média obtida a partir dos resultados dos diferentes animais que compõe cada grupo.

4.2. Tratamento Agudo com DHEA, DHEAS e Progesterona

A administração aguda de DHEA, tanto na dose de 1,0 mg/kg de peso corporal como naquela de 2,0 mg/kg de peso corporal, não modificaram

significativamente o limiar nociceptivo das rãs nos intervalos de 2, 6 e 24 horas após os tratamentos (Tabela 2, Figs. 5 e 6). Entretanto, a administração aguda de DHEA, na concentração de 10,0 mg/kg de peso corporal, ocasionou aumento no limiar nociceptivo, o qual só se manifestou nos intervalos de 6 e 24 horas após a administração da mesma (Tabela 2, Fig. 7). Note que o valor obtido às 24 horas foi menor do que aquele observado às 6 horas após o tratamento, indicando que esta alteração já estava retornando aos seus valores basais (Tabela 2, Fig. 7). Os animais controles, bem como naqueles tratados com o veículo (no caso a beta-ciclodextrina na concentração de 20%), não mostraram mudanças significativas no limiar nociceptivo em todos os intervalos de tempo considerados neste estudo (Tabela 2, Figs. 5, 6 e 7).

Similar a estes resultados, o tratamento agudo das rãs com DHEAS, nas doses de 1,0 e 2,0 mg/kg de peso corporal também não ocasionou alterações estatisticamente significativas no limiar nociceptivo destes animais (Tabela 2, Figs. 8 e 9). Já a dose de 10,0 mg/kg de peso corporal provocou um aumento no limiar nociceptivo, o qual também apareceu às 6 horas após a administração e permaneceu até as 24 horas, sendo que este valor também estava abaixo daquele obtido às 6 horas (Tabela 2, Fig. 10). Neste estudo também não houve modificações significativas nos resultados obtidos nos animais controle e tratados com o veículo (Tabela 2, Figs. 8, 9 e 10).

No tratamento agudo dos animais com progesterona, nas doses de 1,0, 2,0 e 10,0 mg/kg de peso corporal, não houve alterações estatisticamente significativas no limiar nociceptivo das rãs nos intervalos de tempo considerados, ou seja, 2, 6 e 24 horas após a administração (Tabela 2, Figs.

11, 12 e 13). Os animais controle e veículo não apresentaram modificações significantes no limiar nociceptivo (Tabela 2, Figs. 11, 12 e 13). Apesar das mudanças observadas nos valores das medianas, principalmente no grupo que recebeu o veículo, as mesmas não foram estatisticamente significativas quando comparadas entre os grupos e dentro do mesmo grupo.

4.3. Tratamento Crônico com DHEA, DHEAS e Progesterona.

A administração crônica de DHEA, na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal, durante o período de 14 dias, resultou em acréscimo no limiar nociceptivo das rãs, ou seja o animal respondeu com a retirada da pata quando uma concentração mais elevada de ácido foi colocada na mesma (Tabela 3, Fig. 14).

A administração de DHEAS e progesterona, na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal, durante um período de 14 dias, também provocou elevação do limiar nociceptivo das rãs, o qual foi estatisticamente significativo (Tabela 3, Figs. 16 e 17). Tanto no tratamento com DHEA, bem como naquele com DHEAS e progesterona, não foi observada nenhuma modificação significativa nos valores do limiar nociceptivo de rãs controle, tratadas com solução salina e com o veículo empregado nas diluições dos respectivos hormônios (Tabela 3, Figs. 14, 15, 16 e 17).

Para verificar se este aumento poderia ser revertido, fez-se a administração de DHEA na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal durante 7 dias,

sendo que ao final deste período o teste químico do ácido acético foi realizado, mostrando um acréscimo deste limiar (Tabela 4, Fig. 15). Neste momento, houve a interrupção do tratamento por um intervalo de 5 dias, o que fez o limiar retornar aos seus valores basais (Tabela 4, Fig. 15). Porém, a repetição da administração crônica de DHEA, na concentração de 2,0 mg/kg de peso corporal, durante o período de 7 dias, elevou novamente o limiar nociceptivo (Tabela 4, Fig. 15).

Tabela 2: Variabilidade da resposta ao teste químico do ácido acético em rãs controle, veículo e aquelas submetidas ao tratamento agudo com DHEA, DHEAS e progesterona (PROG) nas concentrações de 1, 2 e 10 mg/kg de peso corporal.

Tratamento	Antes administração	2h após	6h após	24h após
DHEA (1.0 mg/kg)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Veículo	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Controle	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
P	0,492	0,513	0,287	0,287
DHEA (2.0 mg/kg)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Veículo	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Controle	1(1-1.25)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
P	0,492	0,513	0,287	0,287
DHEA (10.0 mg/kg)	1(1-1)	1(1-1)	2(1-3)*	1.5(1-2)*
Veículo	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Controle	1(1-1.25)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
P	0,952	0,513	0,003	0,016
DHEAS (1.0 mg/kg)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Veículo	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Controle	1(1-1.25)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
P	0,492	0,513	0,287	1,000
DHEAS (2.0 mg/kg)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Veículo	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Controle	1(1-1.25)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
P	0,492	0,617	1,000	1,000
DHEAS (10.0 mg/kg)	1(1-1)	1(1-1)	2(1-4)*	1.5(1-2)*
Veículo	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Controle	1(1-1.25)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
P	0,492	0,617	0,003	0,016
PROG (1.0 mg/kg)	2(1-2)	2(2-3)	2(1-5)	2(2-2)
Veículo	2(2-3)	2(2-3)	3(1-4)	2(2-2)
Controle	2(2-2)	2(2-4)	2(1-2)	1(1-2)
P	0,745	0,517	0,545	0,326
PROG (2.0 mg/kg)	2(1-2)	1(1-4)	3(2-5)	2(2-3)
Veículo	2(2-3)	2(2-3)	3(1-4)	2(2-2)
Controle	2(2-2)	2(2-2)	2(1-2)	1(1-2)
P	0,559	0,703	0,337	0,078
PROG (10.0 mg/kg)	2(1-2)	2(2-3)	2(1-5)	2(2-2)
Veículo	2(2-3)	2(2-3)	3(1-4)	2(2-2)
Controle	2(2-2)	2(2-2)	2(1-2)	1(1-2)
P	0,559	0,564	0,629	0,326

O número antes dos parênteses indica a mediana dos códigos empregados nas numerações dos frascos contendo as soluções de ácido acético nas concentrações em que os animais responderam ao teste nos diferentes grupos experimentais. Os valores dentro dos parênteses, por sua vez, representam a variação da resposta nestes grupos. Cada grupo experimental foi composto por 8 animais.

* Diferença estatisticamente significativa em relação aos valores obtidos antes da administração, $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis e Wilcoxon).

Tabela 3: Variabilidade da resposta ao teste químico do ácido acético em rãs controle, veículo, salina e aquelas submetidas ao tratamento crônico com DHEA, DHEAS e progesterona (PROG) na concentração de 2 mg/kg de peso corporal.

Tratamento	Antes da administração	14 dias após
DHEA (2.0 mg/kg)	1(1-1)	2(2-2) [*]
beta-ciclodextrina	1(1-1)	1(1-1)
Solução salina	1(1-1)	1(1-1)
Controle	1(1-1)	1(1-1)
P	1,000	0,000
DHEAS (2.0 mg/kg)	1(1-1)	2(2-2) [*]
beta-ciclodextrina	1(1-1)	1(1-1)
Solução salina	1(1-1)	1(1-1)
Controle	1(1-1)	1(1-1)
P	1,000	0,000
PROG (2.0 mg/kg)	1(1-1)	2(1-2) [*]
Veículo	1(1-1)	1(1-1)
Controle	1(1-1)	1(1-1)
P	1,000	0,004

O número antes dos parênteses indica a mediana dos códigos empregados nas numerações dos frascos contendo as soluções de ácido acético nas concentrações em que os animais responderam ao teste nos diferentes grupos experimentais. Os valores dentro dos parênteses representam, por sua vez, a variação da resposta nestes grupos. Cada grupo experimental foi composto por 8 animais.

* Diferença significativa dos valores obtidos antes da administração, $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis e Wilcoxon)

Tabela 4: Variabilidade da resposta ao teste químico do ácido acético em rãs controle, veículo, salina e aquelas submetidas à repetição do tratamento crônico com DHEA, na concentração de 2 mg/kg de peso corporal por um período de 7 dias, com suspensão do mesmo por um intervalo de 5 dias e novamente o retorno da administração de DHEA por um período de 7 dias.

Tratamento	Antes da administração	7 dias com administração de DHEA	5 dias sem da administração de DHEA	7 dias após o retorno de DHEA
DHEA (2.0 mg/kg)	1(1-1)	3(2-3) [*]	1(1-1)	2(2-3) [*]
beta-ciclodextrina	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Solução salina	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
Controle	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)	1(1-1)
P	1,000	0,001	1,000	0,003

O número antes dos parênteses indica a mediana dos códigos empregados nas numerações dos frascos contendo as soluções de ácido acético nas concentrações em que os animais responderam ao teste nos diferentes grupos experimentais. Os valores dentro dos parênteses representam, por sua vez, a variação da resposta nestes grupos. Cada grupo experimental foi composto por 8 animais.

* Diferença significativa dos valores obtidos antes da administração de DHEA, $p < 0.05$ (teste de Kruskal Wallis)

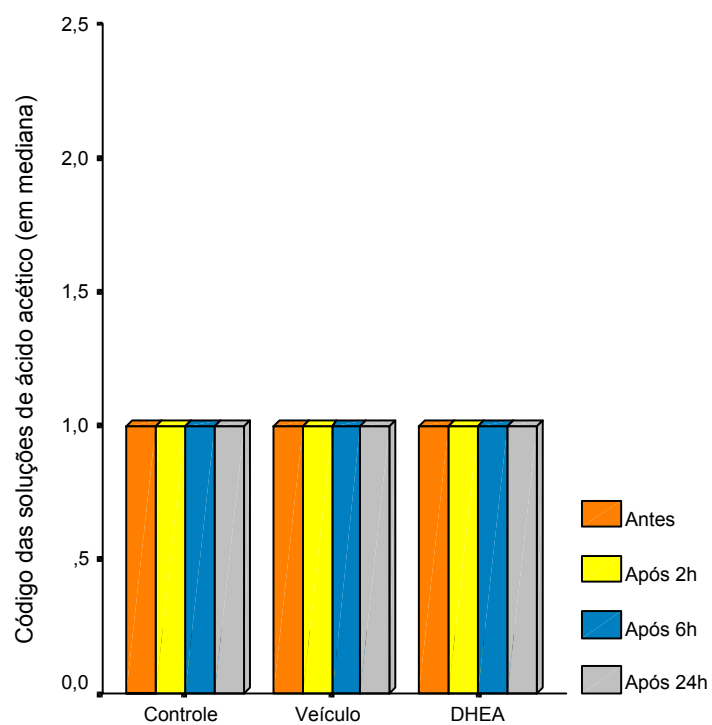


Fig.5 – Efeito da administração aguda de DHEA, na dose de 1 mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abscissa representa os grupos experimentais (controle, veículo e DHEA) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração em ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. Não houve diferença estatística entre os grupos. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Friedman, $p < 0,05$.

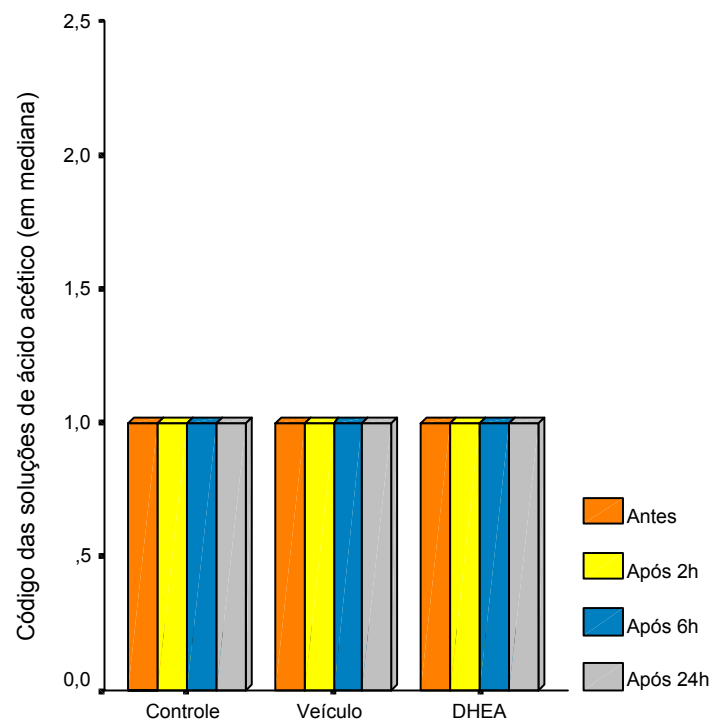


Fig.6 – Efeito da administração aguda de DHEA , na dose de 2mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abscissa representa os grupos experimentais (controle, veículo e DHEA) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração em ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. Não houve diferença estatística entre os grupos. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Friedman, $p < 0,05$.

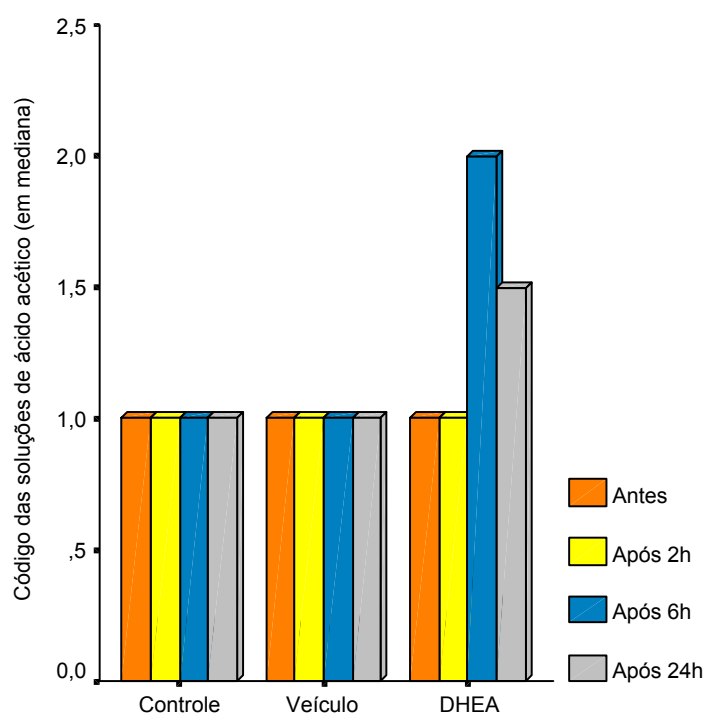


Fig.7 – Efeito da administração aguda de DHEA , na dose de 10mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abscissa representa os grupos experimentais (controle, veículo e DHEA) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração em ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. * Diferença significativa em relação ao valor obtido antes do tratamento e aos grupos controle e veículo. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Friedman, $p < 0,05$.

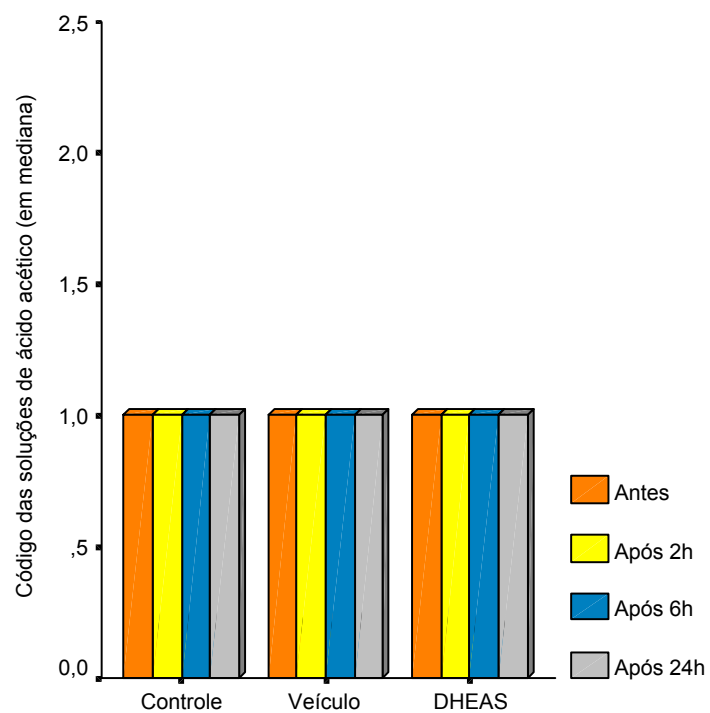


Fig.8 – Efeito da administração aguda de DHEAS, na dose de 1mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abscissa representa os grupos experimentais (controle, veículo e DHEAS) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração em ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. Não houve diferença estatística entre os grupos. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Friedman, $p < 0,05$.

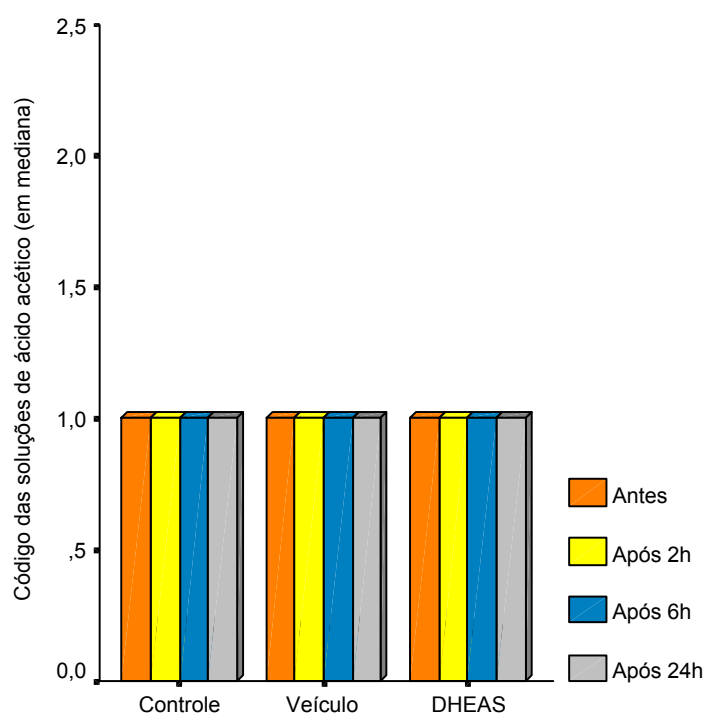


Fig.9 – Efeito da administração aguda de DHEAS, na dose de 2mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino, antes e após 2, 6 e 24 horas. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abcissa representa os grupos experimentais (controle, veículo e DHEAS) e o eixo da ordenada representa a mediana das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. Não houve diferença estatística entre os grupos. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Friedman, $p < 0,05$.

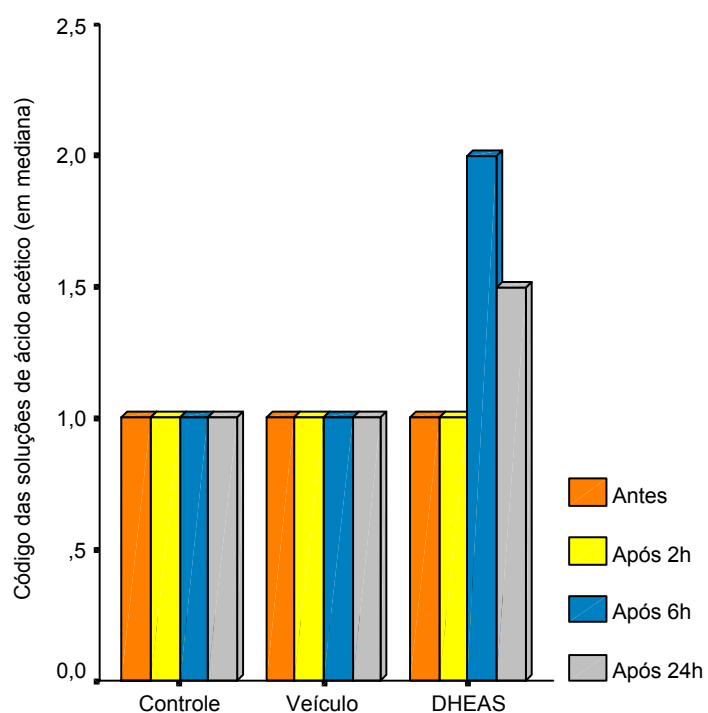


Fig.10 – Efeito da administração aguda de DHEAS, na dose de 10mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abscissa representa os grupos experimentais (controle, veículo e DHEAS) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração em ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. * Diferença significativa em relação ao valor obtido antes do tratamento e aos grupos controle e veículo. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Friedman, $p < 0,05$.

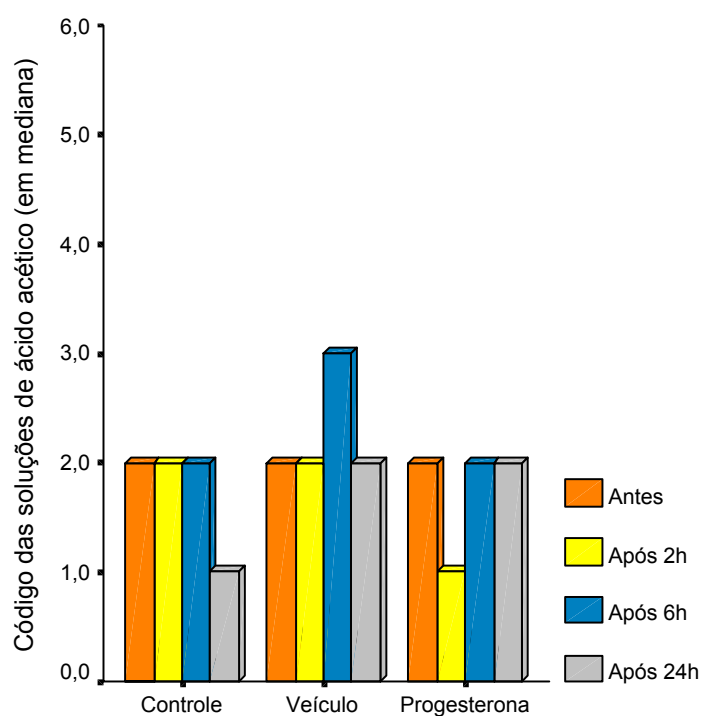


Fig.11 – Efeito da administração aguda de progesterona, na dose de 1mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abscissa representa os grupos experimentais (controle, veículo e progesterona) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração em ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. Não houve diferença estatística entre os grupos. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Friedman, $p < 0,05$.

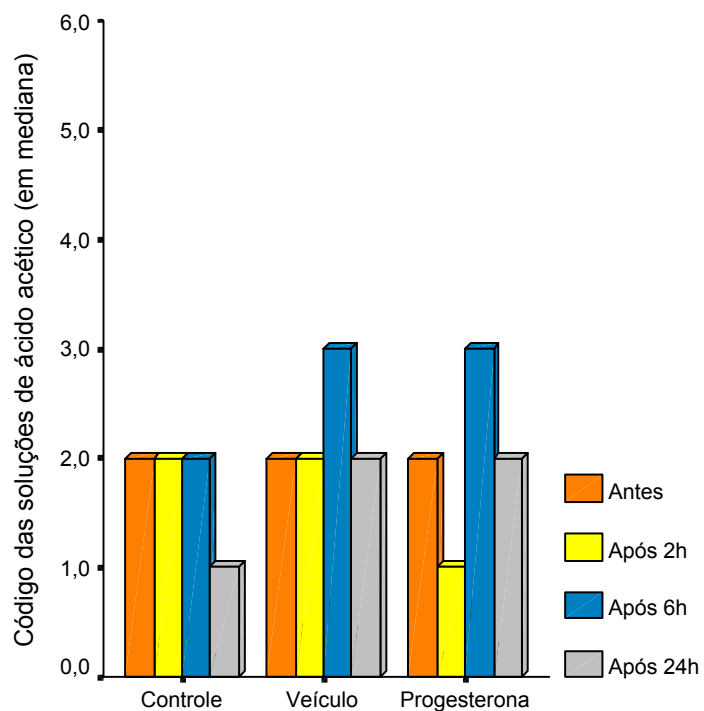


Fig.12 – Efeito da administração aguda de progesterona, na dose de 2mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abscissa representa os grupos experimentais (controle, veículo e progesterona) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração em ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. Não houve diferença estatística entre os grupos. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Friedman, $p < 0,05$.

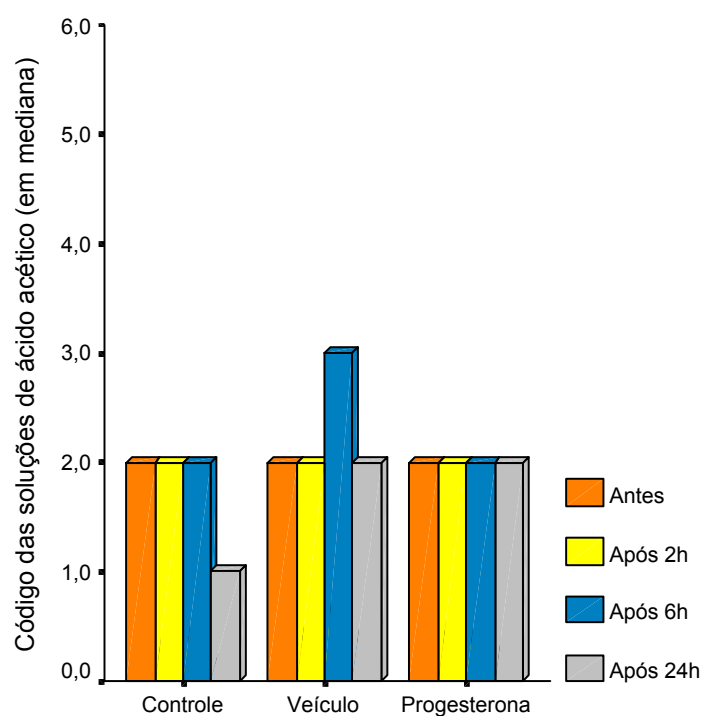


Fig.13 – Efeito da administração aguda de progesterona, na dose de 10mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino, antes e após 2, 6 e 24 horas do tratamento. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abcissa representa os grupos experimentais (controle, veículo e progesterona) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração em ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. Não houve diferença estatística entre os grupos. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Friedman, $p < 0,05$.

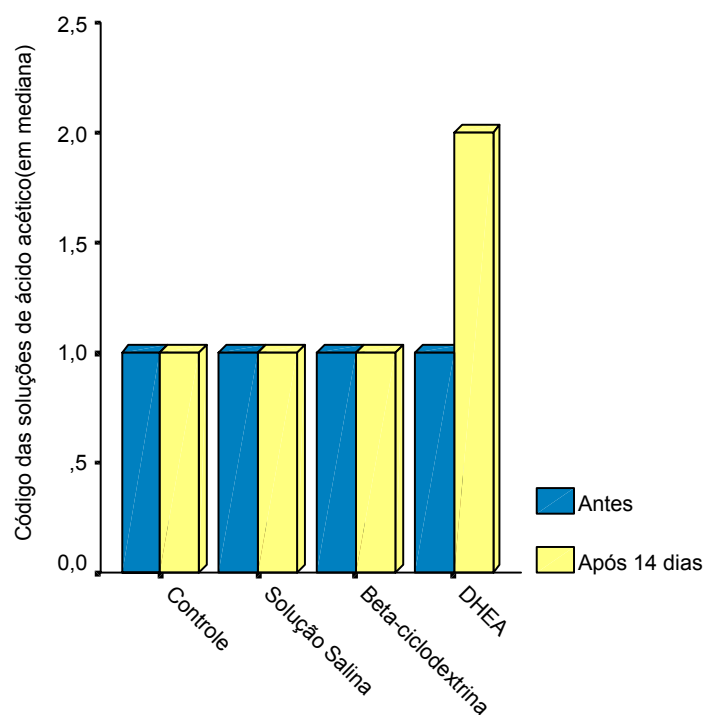


Fig.14 – Efeito da administração crônica de DHEA, na dose de 2mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino, antes e após 14 dias de tratamento. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abscissa representa os grupos experimentais (controle, veículo, solução salina e DHEA) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração em ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. * Diferença significativa em relação ao valor obtido antes do tratamento e aos grupos controle e veículo. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$.

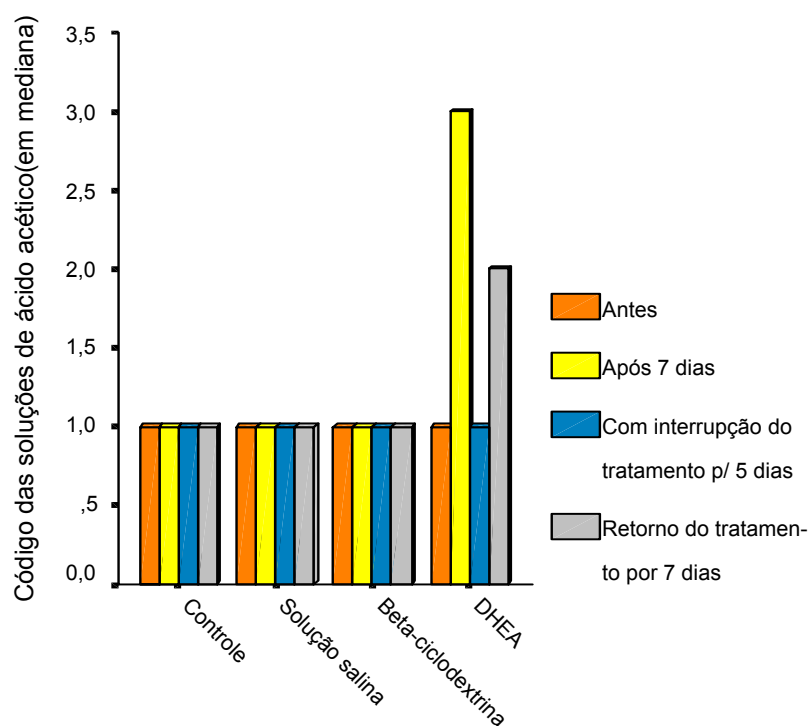


Fig.15 – Efeito da administração crônica de DHEA, na dose de 2mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino após 7 dias de tratamento, com a interrupção do mesmo por 5 dias e a repetição desta administração por 7 dias. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abscissa representa os grupos experimentais (controle, veículo, sham e DHEA) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração em ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. * Diferença significativa em relação ao valor obtido antes do tratamento e aos grupos controle e veículo. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$.

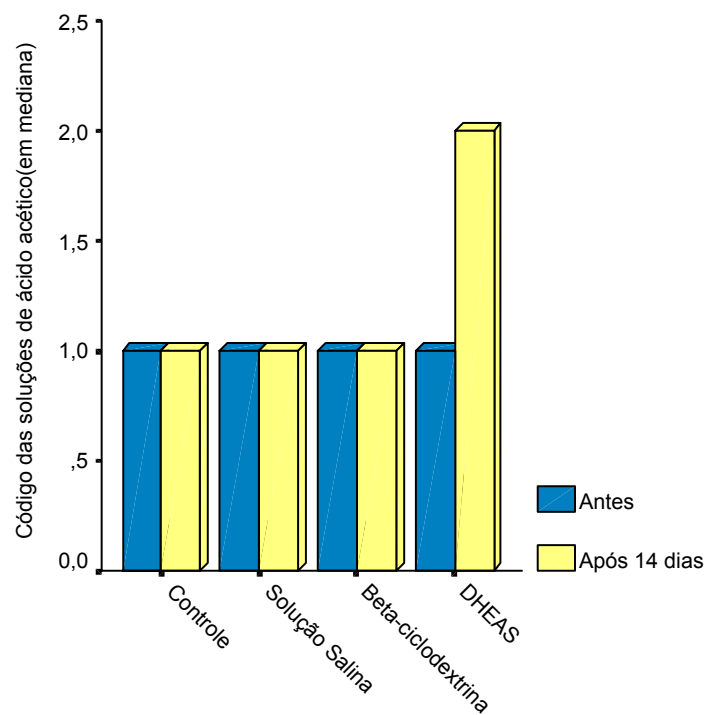


Fig.16 – Efeito da administração crônica de DHEAS, na dose de 2mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino, antes e após 2 semanas de tratamento. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abscissa representa os grupos experimentais (controle, veículo, solução salina e DHEAS) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração de ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. * Diferença significativa em relação ao valor obtido antes do tratamento e aos grupos controle e veículo. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$.

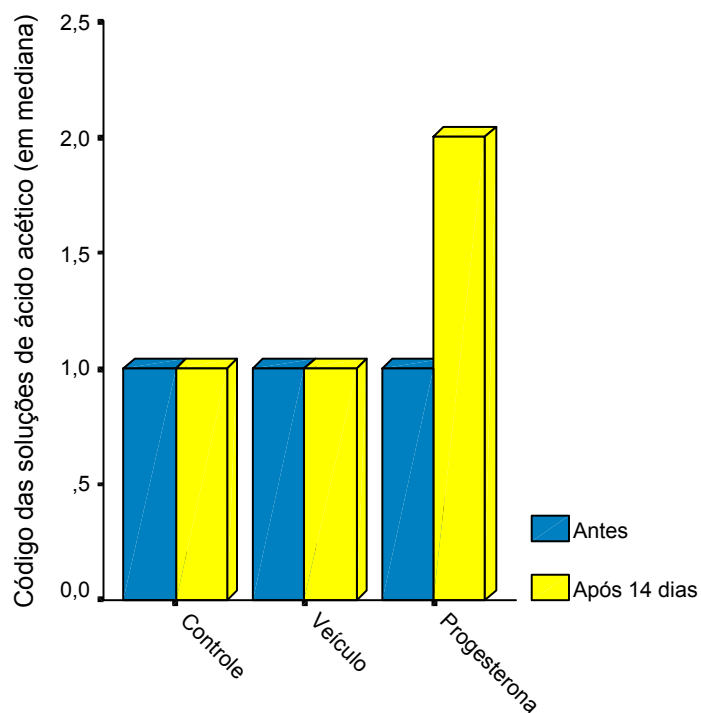


Fig.17 – Efeito da administração crônica de progesterona, na dose de 2mg/kg de peso corporal, sobre o limiar nociceptivo de rãs, *Rana catesbeiana*, adultas, do sexo masculino antes e após 2 semanas de tratamento. Os valores estão representados por mediana. O eixo da abscissa representa os grupos experimentais (controle, veículo e progesterona) e o eixo da ordenada representa a mediana da numeração em ordem crescente das concentrações de ácido acético empregado no teste nociceptivo. * Diferença significativa em relação ao valor obtido antes do tratamento e aos grupos controle e veículo. Cada grupo foi composto por 8 animais. Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Wilcoxon, $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

5.1. Concentrações Hormonais

O presente estudo demonstrou que as concentrações de 1,0, 2,0 e 10,0 mg/kg de DHEA, DHEAS e progesterona não ocasionaram modificações nos padrões comportamentais motores da rã *Rana catesbeiana* analisados. Apesar de terem sido estas observações preliminares, pode-se sugerir que estas doses não foram tóxicas. Todavia, cabe ser destacado aqui que, em humanos adultos, alguns autores recomendam que a administração de DHEA não deveria ultrapassar o valor de 5,0 mg/dia, uma vez que doses maiores poderiam induzir aumento da excitabilidade neuronal, bem como indução de arritmias cardíacas (SAHELIAN, 1998; SKERRET, 1996). Segundo estes autores, esta dose de DHEA não ocasionou sedação nos pacientes, resposta que é similar àquela obtida nas rãs tratadas com este neuroesteróide. Outro fato que apóia esta sugestão, e que cabe ser ressaltado neste momento, é que, em experimentos-piloto, onde foi realizada a administração de DHEA, em concentrações de 50 e 100 mg/kg, as rãs mostraram-se agitadas, saltando

compulsivamente dentro dos aquários, além de apresentarem uma resposta exacerbada ao teste químico do ácido acético (dados não apresentados). Isto nos fez pensar em um aumento da excitabilidade neuronal. Em ratos, a administração intraperitoneal de DHEA, em concentrações de 100 a 150 mg/kg, provocou convulsões tônicos-clônicas (MAJEWSKA, *et al.*, 1990). Em humanos, tratamentos com doses tão elevadas de DHEA, de 100 e 200 mg/kg, são geralmente empregadas no tratamento de pacientes com insuficiência adrenal ou da produção de ACTH pela hipófise anterior (CELEC & STÁRKA, 2003; OSTATNÍKOVÁ, *et al.*, 2002). Estas doses altas induziram diversos efeitos colaterais adversos, os quais desapareceram com a redução da concentração do hormônio administrado para 50 mg/kg (WOLF, *et al.*, 1997). Todavia, é interessante o fato de que também há relatos mostrando que o tratamento com DHEA, na concentração de 50 mg/kg, durante o período de 6 meses, não produziu efeitos indesejáveis em humanos (MORALES, *et al.*, 1998). Considerando este resultado, pode-se sugerir uma maior sensibilidade das rãs ao tratamento com DHEA. Cabe ser ressaltada a necessidade de estudos adicionais sobre os efeitos da administração de dose mais elevada de DHEA em rãs, uma vez que os nossos experimentos foram estudos-piloto.

É possível que a maior excitabilidade das rãs tenha decorrido do fato de que o tratamento foi realizado durante o verão, período em que as rãs mostram-se mais agitadas. É possível também que esta dose mais elevada tenha sido tóxica para as rãs por estes animais serem adultos normais. Está

demonstrado que as rãs apresentam concentrações plasmáticas e neurais de DHEA, DHEAS e progesterona similares às encontradas em mamíferos (MENSAH-NYAGAN, *et al.*, 2001). Provavelmente tal resposta não ocorreria se as rãs fossem submetidas a uma situação hipotética de reposição hormonal. Todavia, é interessante esta similaridade de resposta entre rãs e mamíferos. Assim, pode-se pensar que o emprego de doses altas de DHEA induz alterações comportamentais em vertebrados e humanos. Isto reforça a possibilidade de emprego das rãs como modelos experimentais nos estudos sobre os efeitos do tratamento de DHEA sobre diversas funções, bem como naquelas abordagens que visam esclarecer os mecanismos celulares e moleculares da ação da DHEA sobre a nocicepção.

Isto também é válido para a progesterona. Em humanos e mamíferos, similar ao que ocorreu com as rãs, a administração de progesterona em doses similares às empregadas no presente estudo não provocou alterações fisiológicas significativas (BAULIEU *et al.*, 1999b; LAPCHAK, 2004; PAUL & PURDY, 1992; CHEN *et al.*, 1999). Entretanto, quando foram empregadas doses mais elevadas deste hormônio (1200 mg), este tratamento resultou em fadiga e sinais característicos de síndrome pré-menstrual (MURPHY *et al.*, 2004; BIEDERMANN & SCHOCH, 1985). Concentrações tão altas de progesterona não foram ainda administradas em rãs. Mas parece sugestivo pensar que a utilização destas doses mais altas poderia provocar mudanças

em reações fisiológicas das rãs. Somente a realização de estudos focando esta questão poderia comprovar ou descartar esta hipótese.

5.2. Administração Aguda e Crônica de DHEA e DHEAS

Conforme apresentado nos resultados, o tratamento agudo de rãs com DHEA e DHEAS, nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg/kg de peso corporal, não provocou mudanças estatisticamente significativas no limiar nociceptivo destes animais. Este resultado foi similar àquele encontrado em ratos. O tratamento agudo com DHEA e DHEAS em ratos, nas doses de 3,0 e 7,5 mg/kg de peso corporal, também não induziu alterações significativas no limiar nociceptivo após 1 e 24 horas de tratamento (FRYE & LACEY, 1998).

Um achado interessante neste estudo foi a demonstração de que o tratamento agudo de rãs com DHEA e DHEAS, na concentração de 10,0 mg/kg do peso corporal, provocou aumento no limiar nociceptivo das mesmas, o que também ocorreu quando estes animais foram tratados cronicamente com a dose de 2,0 mg/kg de peso corporal. Em humanos com fibromialgia, o tratamento a longo prazo de DHEA levou a uma redução das queixas sobre a sensação de dor (MORALES *et al.*, 1995; DESSEIN *et al.*, 1999). Um estudo recente demonstrou também a existência de uma relação inversa entre a concentração plasmática de DHEA e a intensidade, bem como os locais de

queixas de dor, os quais foram medidos mediante o emprego de escalas analíticas validadas de dor e o uso de questões descritivas (MORRISON, *et al.*, 1998; FINSET *et al.*, 2004).

Recentemente foi demonstrado que a administração de DHEA, na concentração de 50 mg/dia, durante um período de 3 meses, não ocasionou melhora na sensação de dor de pacientes com fibromialgia, além de não induzir melhoras em suas funções cognitivas e em suas sensações de fadiga (FINCKH *et al.*, 2005). De acordo com Genazzani *et al.* (2003), a administração de DHEA em concentração de 25 mg/dia, provocou aumentos na concentração plasmática desse hormônio, bem como de DHEAS e progesterona, somente após 12 meses de tratamento. É possível que estas respostas divergentes tenham resultado do emprego de diferentes doses de DHEA nos dois estudos. Porém, deve-se considerar também a possibilidade de que as divergências sejam resultado da modificação no período de tratamento. Se for considerada essa última hipótese, pode-se sugerir ainda que para que a DHEA possa exercer seus efeitos sobre a sensibilidade dolorosa humana é preciso que seja administrada por um longo período. Se essa hipótese for verdadeira, torna-se intrigante o fato de que, em rãs, uma semana de administração de DHEA, em doses baixas, já foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo desses animais. Diante deste fato pode-se pensar que as rãs possuem uma sensibilidade maior aos efeitos do tratamento com DHEA e DHEAS. Apesar da necessidade de realização de estudos mais

detalhados sobre este tema, é possível que esta sensibilidade maior à DHEA também tenha ocasionado o aumento do limiar nociceptivo no tratamento agudo de DHEA e DHEAS na dose de 10 mg/kg. Não parece viável sugerir que este efeito não seja decorrente da ação destes hormônios em células neurais, uma vez que a interrupção do tratamento com DHEA resultou em retorno desta resposta aos seus valores basais, ou seja, aqueles apresentados antes do início da administração de DHEA, ocorrendo novamente acréscimo deste limiar com o repetição do tratamento. Possivelmente esta mesma resposta ocorra com a DHEAS.

Estes resultados estão indicando que a DHEA e a DHEAS somente exerceram seus efeitos sobre o limiar nociceptivo de rãs quando administradas agudamente em doses mais elevadas, ou quando administradas em concentrações mais baixas, porém de forma crônica. Isto permite inferir que para a DHEA e a DHEAS promoverem mudanças no limiar nociceptivo torna-se necessário que os neurônios sensoriais entrem em contato súbito com doses elevadas destes hormônios, ou que permaneçam durante algum tempo em contato com doses menores dos mesmos, porém estas agindo continuamente sobre a célula-alvo. É provável que isto também aconteça em mamíferos e humanos. Aliás, esta hipótese parece plausível para explicar os resultados experimentais obtidos em humanos, onde a DHEA e a DHEAS diminuíram a sensação de dor após um longo período de tratamento (GENAZZANI *et al.*, 2003). É possível que tanto o contato curto e rápido de

neurônios sensoriais com uma grande quantidade de DHEA e DHEAS como a permanência contínua de baixas doses destes hormônios esteja modificando a excitabilidade neuronal. Como foi inicialmente apresentado na introdução da descrição deste estudo, os neuroesteróides exercem seus efeitos em neurônios agindo em receptores próprios localizados na membrana celular e núcleo, ou em receptores de outros neurotransmissores, como GABA, glutamato e receptores do tipo sigma (UCHIDA *et al.*, 2002; LAMBERT *et al.*, 2003; MEUNIER & MAURICE, 2004). Assim, parece viável sugerir que o aumento do limiar nociceptivo de rãs, mamíferos e humanos tenha decorrido da ação da DHEA e da DHEAS tanto em receptores próprios como em receptores de outros neurotransmissores.

Em mamíferos, está demonstrado que a DHEA e a DHEAS podem atuar em receptores GABA_A (REDDY & ROGAWSKI, 2002; RUPPRECHT, 2003), os quais participam na modulação da sensibilidade nociceptiva (WALL & MELZACK, 1999; LOESER & BONICA, 2001; MAJEWSKA, 1999). Diversos dados farmacológicos demonstraram que agentes como barbitúricos, esteróides e benzodiazepínicos, podem agir como agonistas ou antagonistas de receptores GABA, bem como modular a atividade destes receptores (LOESER & BONICA, 2001; VANOVER, *et al.*, 1999; 2000), induzindo, assim, mudanças nas funções encefálicas, tais como sedação e déficit motor (FÜRST, 1999). Desde que este neurotransmissor pode atenuar a propagação da informação nociceptiva por inibir a propagação de impulsos em terminais

sensoriais primários que chegam até a medula espinal (MILLAN, 1999), é possível que isto também esteja acontecendo em rãs. Neste animal foi demonstrada a existência de uma grande quantidade de neurônios gabaérgicos na região da banda médio-lateral da medula espinal, região esta por onde passam fibras sensoriais primárias que estão se dirigindo para o lado contralateral da medula espinal. Estes neurônios imunorreativos ao GABA também emitiram projeções que pareciam chegar até o campo terminal dorsal, uma região que recebe aferentes sensoriais primários (GUEDES *et al.*, 2004b). Se a DHEA também exerce efeito agonista gabaérgico em rãs, é possível que o aumento do limiar nociceptivo demonstrado neste estudo seja o resultado deste efeito, o qual poderia estar ocorrendo na medula espinal e/ou em regiões mais superiores do neuroeixo. É sabido que neurônios imunorreativos ao GABA estão amplamente distribuídos no SNC de anfíbios (ANADÓN *et al.*, 1998). Em *Rana temporária*, botões pré-sinápticos imunorreativos ao GABA estabeleceram sinapses axoaxônicas em fibras aferentes primárias (VESSELKIN, *et al.*, 2003). Desta forma, a hipótese da DHEA agindo em receptores gabaérgicos e desencadeando uma ativação deste receptor parece plausível desde que estudos em diencéfalo de rãs mostraram que uma das ações dos neuroesteróides parece ser a modulação da atividade de receptores gabaérgicos (MENSAH-NYAGAN *et al.*, 2000; 2001; DO-REGO, *et al.*, 2000). Assim, o aumento do limiar nociceptivo das rãs pode ter sido resultado da ativação de receptores gabaérgicos. Neste contexto, seria interessante a

determinação dos efeitos do tratamento com DHEA e DHEAS sobre receptores GABA_A de rãs.

Todavia, é intrigante o fato de que a administração de DHEAS, tanto aguda como crônica, também aumentou o limiar nociceptivo de rãs. Em mamíferos, este neuroesteróide parece agir como um antagonista do receptor GABA_A (ZINDER & DAR, 1999; MEYER *et al.*, 1999; PARTRIDGE & VALENZUELA, 2001). Se esta ação antagônica estivesse ocorrendo, provavelmente não haveria mudanças no limiar nociceptivo de rãs. Entretanto, deve-se considerar também a hipótese de que esteja ocorrendo a transformação da DHEAS em DHEA pela ação de enzimas sulfotransferases (MENSAH-NYAGAN *et al.*, 1999; VARET *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que a proporção entre DHEAS e DHEA no SNC de mamíferos é de apenas 3 vezes enquanto no plasma essa proporção chega a 100 vezes (KIMONIDES *et al.*, 1998). Assim, é possível que boa parte da DHEAS tenha sido convertida em DHEA, e esta é que tenha exercido efeitos sobre o limiar nociceptivo de rãs. Neste contexto, parece interessante determinar o valor desta relação no sistema nervoso central de rãs, o que muito contribuiria para o entendimento das ações da DHEA e da DHEAS no tecido nervoso destes animais.

É possível também que o efeito da administração aguda e crônica de DHEA e DHEAS sobre o limiar nociceptivo dessas rãs tenha ocorrido pela ação desses hormônios sobre a liberação de glutamato. Está amplamente demonstrado que, em mamíferos, a nocicepção produz aumento na liberação

de glutamato (SLUKA *et al.*, 1994). Em anfíbios permanece desconhecido se esta situação também ocasiona aumento na liberação de glutamato. Todavia, a secção do nervo ciático de rãs provoca mudanças no padrão de imunorreatividade à substância P, neuropetídeo Y, GABA, serotonina e tirosina hidroxilase que foram similares às aquelas encontradas em mamíferos, havendo, entretanto, diferenças temporais na manifestação destas alterações (GUEDES *et al.*, 2004). Em *Rana temporária*, um estudo recente demonstrou que terminais pré-sináptico imunorreativos ao glutamato estabeleceram sinapses axoaxônicas com fibras aferentes primárias (VESSELKIN, *et al.*, 2003), o que, segundo os autores, representaria um substrato morfológico para a regulação glutamatérgica da liberação da transmissão de fibras aferentes primárias em rãs. Em mamíferos tanto a DHEA como a DHEAS parecem controlar a liberação de glutamato. Diversos estudos demonstraram que estes neuroesteróides podem prevenir e/ou reduzir a neurotoxicidade decorrente da ativação dos receptores NMDA (KIMONIDES *et al.*, 1998; LHULLIR *et al.*, 2003; PARTRIDGE & VALENZUELA, 2001). Este efeito parece depender da concentração de DHEA e DHEAS utilizadas nos estudos. Quando estes hormônios foram administrados em baixa concentração (100-500 µg/kg), ocasionaram aumento na liberação de glutamato, que por sua vez, ocasionou a ativação dos receptores NMDA (BERGERON *et al.*, 1996). Já a administração intravenosa de DHEA, na dose de 2 mg/kg, não foi capaz de aumentar a secreção de glutamato (BERGERON *et al.*, 1996). Esta mesma

resposta foi observada nos tratamentos crônicos com DHEA administrada nas doses de 100-500 µg/kg (BERGERON, *et al.*, 1999). De acordo com Cardounel *et al.* (1999), o efeito dos neuroesteróides sobre a liberação de glutamato dependeria da dose empregada e da forma de administração dos mesmos. É possível que estes efeitos também ocorram em rãs. Se essa hipótese for verdadeira, pode-se sugerir que as doses de 1,0 e 2,0 mg/kg de DHEA e DHEAS, quando administradas de forma aguda, podem ter potencializado a liberação de glutamato, o que, por sua vez, não permitiu o aumento do limiar nociceptivo. Se assim for, este resultado difere daquele obtido em mamíferos, pois apenas doses micromolares de DHEA foram capazes de potencializar a liberação de glutamato (LHULLIR *et al.*, 2003). Entretanto, quando as rãs foram tratadas de forma aguda com DHEA e DHEAS na dose de 10,0 mg/kg, bem como com estes hormônios na concentração de 2,0 mg/kg, porém administrados cronicamente, houve aumento do limiar nociceptivo. Isto pode sugerir que nestas condições a DHEA e a DHEAS podem não ter potencializado a liberação de glutamato e, conseqüentemente, a ativação de receptores NMDA.

É preciso considerar ainda que o efeito da DHEA e da DHEAS sobre o limiar nociceptivo tenha resultado da ação destes neuroesteróides em prolongamentos neurais que contenham tanto GABA como glutamato. Em ratos, 4,1% das varicosidades espinais de neurônios pré-ganglionares simpáticos contêm GABA e glutamato (LLEWELLYN-SMITH *et al.*, 1997). De

acordo com estes autores, este poderia ser o substrato anatômico para as respostas reflexas simpáticas exageradas e o baixo tônus simpático que resultaria de injúrias à medula espinal.

Outra possibilidade a ser considerada aqui é o fato de que tanto a DHEA como a DHEAS possam estar sendo metabolizadas pelo fígado, resultando na formação de metabólitos ativos, cuja ação poderia ter resultado no aumento do limiar nociceptivo de rãs. Esta hipótese foi recentemente sugerida para os mamíferos (RUPPRECHT *et al.*, 2001). É sabido que a DHEA pode ser convertida em metabólitos como a 7 α -hidroxi-DHEA e 7 β -hidróxi-DHEA (DOOSTZADEH & MORFIN, 1997; ROSE, *et al.*, 2001; LARDY *et al.*, 1995). Seria interessante determinar se estes metabólitos possuem ação sobre a nocicepção. É comum na fisiologia a conversão de substratos em produtos ativos. A morfina, por exemplo, possui dois metabólitos ativos, que é a morfina-3-glucuronida e a morfina-6-glucuronida, os quais são produzidos a partir do metabolismo hepático da morfina e possuem efeitos analgésicos similares àquele da morfina (STOFFEL *et al.*, 2002; BAKER & RATKA, 2001). Assim, não se pode até o presente momento descartar a possibilidade de que o efeito analgésico da DHEA e da DHEAS tenha decorrido da ação de seus metabólitos ativos e não propriamente da ação direta destes hormônios em neurônios sensoriais.

Cabe ainda ressaltar que DHEA e DHEAS podem ser convertidas em testosterona e estradiol (BAULIEU, *et al.*, 1999), sendo assim, é possível que

o efeito antinociceptivo possa ser decorrente desta conversão e não propriamente da ação direta de DHEA e de DHEAS. Já foi demonstrado aumento do limiar nociceptivo em ratos tratados com estradiol (FRYE & DUNCAN, 1994; FRYE *et al.*, 1996), o que indica que este hormônio pode ter um efeito analgésico.

5.3. Administração Aguda e Crônica de Progesterona

O tratamento agudo das rãs com progesterona, nas concentrações de 1,0, 2,0 e 10,0 mg/kg de peso corporal, não provocou modificações estatisticamente significativas no limiar nociceptivo destes animais. Em ratos, a administração aguda de progesterona, na dose de 8 mg/kg de peso corporal, produziu sedação nos animais (LAPCHAK, 2004). Já o tratamento agudo periférico destes animais com progesterona em concentrações entre 0,5 e 6,4 mg/kg de peso corporal, provocou aumento da latência de resposta na retirada da cauda submetida a estímulo nociceptivo (FRYE & DUNCAN, 1994). Resultado similar também foi obtido quando ratos receberam administração intracerebroventricular com progesterona nas doses de 0,1 a 2,0 µg/kg (McCARTHY, *et al.*, 1990). É intrigante esta diferença entre rãs e ratos, uma vez que as concentrações de progesterona utilizadas no presente estudo foram similares às utilizadas nos estudos realizados em ratos. É possível

que esta resposta obtida com as rãs constitua uma peculiaridade deste animal. Neste contexto, parece ser importante o emprego de outras espécies de anfíbios nos estudos acerca dos efeitos da administração de progesterona sobre a nocicepção.

Em ratos, o tratamento com doses elevadas de progesterona (150 mg/kg) provocou redução na ativação de receptores GABA_A (CZLONKOWSKA *et al.*, 2001), o que poderia também ter ocorrido nas rãs tratadas com a dose de 10,0 mg/kg de progesterona. Se essa hipótese for verdadeira, as rãs, similar ao que parece ocorrer com o tratamento de DHEA, apresentam maior sensibilidade à progesterona. Todavia, quando a progesterona foi administrada cronicamente, provocou aumento no limiar nociceptivo das rãs, o que é semelhante ao observado em ratos. Nestes animais, a administração de doses de progesterona, as quais variaram entre 0,1 e 2,0 µg/kg durante um período de 14 dias, ocasionou aumento da resposta de latência destes animais quando os mesmos foram submetidos a estímulo nociceptivo (RATKA & SIMPKINS, 1991). Outros resultados experimentais, também realizados em ratos, mostraram que o tratamento crônico com progesterona, na dose de 1,0 mg/kg de peso corporal, provocou aumento da resposta nociceptiva, a qual foi medida pela utilização do teste da placa quente (FRYE *et al.*, 2004).

Não é possível, até o presente momento, explicar as similaridades e diferenças de respostas ente rãs e ratos. É possível que a diferença aqui apresentada tenha sido decorrente de limitações do teste empregado para

medir o limiar nociceptivo. Frye *et al.* (1996) sugeriram que as respostas sedativas obtidas após a administração de progesterona dependeriam dos métodos empregados para a mensuração da resposta comportamental. Todavia, está demonstrado que o teste químico do ácido acético é equivalente ao teste da placa quente utilizado em roedores (WILLENBRIG & STEVENS, 1996).

Para alguns autores o efeito do tratamento crônico de progesterona sobre a nocicepção parece depender da dose utilizada. Frye *et al.* (1996) observaram maior efeito analgésico da progesterona em ratos quando esta foi empregada em concentrações de 0,5 e 1 mg/kg de peso corporal do que nas doses de 2 e 4 mg/kg de peso corporal. Provavelmente a utilização de doses menores de progesterona no tratamento crônico das rãs deverá ocasionar um aumento maior no limiar nociceptivo das mesmas.

De acordo ainda com Frye *et al.* (1996), as respostas sedativas obtidas após o tratamento com progesterona parecem depender, além da dose empregada, da via de administração, da duração do tratamento e do veículo empregado na diluição da progesterona. Para estes autores, o período de tratamento seria importante dado ao fato que a progesterona poderia ser metabolizada, originando metabólitos ativos que poderiam influenciar a resposta final. É sabido que os metabólitos 3 α -hidroxiesteróides podem interagir com receptores GABA_A, tanto no encéfalo como em tecidos periféricos (MAJEWSKA, *et al.*, 1986). Em mamíferos, esses metabólitos

exerceram uma atividade agonista gabaérgica quando administrados em concentração micromolar (PUIA *et al.*, 1990). É possível que em rãs também esteja ocorrendo esta conversão de progesterona nestes metabólitos ativos, os quais também poderiam estar ativando receptores GABA_A. Esta hipótese decorreu do fato de que, nestes animais já foi demonstrada a existência de modulação de receptores GABA_A por metabólitos 3 α -hidroxiesteróides (ORCHINIK *et al.*, 1991). Ainda em rãs, estudos recentes demonstraram que o GABA, agindo mediante ativação de receptores do tipo A, inibiu a atividade da enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase (3 β -HSD), a qual é necessária para a biossíntese de progesterona a partir de pregnenolona. (DO-REGO *et al.*, 2000; MENSAH-NYAGAN *et al.*, 2001b; BEAUJEAN *et al.*, 2002; IBANEZ *et al.*, 2003; GUENNOUN *et al.*, 1995). É sabido também que o octadecaneuropeptídeo endozepínico (ODN), o qual é um ligante natural de receptores centrais de benzodiazepina, é um potente modulador alostérico dos receptores gabaérgicos, sendo sua distribuição no encéfalo de rã similar àquela da enzima 3 β -HSD (DO-REGO, *et al.*, 2001). Estes autores mostraram também que o ODN foi capaz de produzir um aumento na conversão de pregnenolona marcada com trítio em vários esteróides ativos, dentre estes a 17-hidroxipregnenolona, progesterona, 17-hidroxiprogesteron, DHEA e diidrotestosterona (DO-REGO, *et al.*, 2001). A conversão de pregnenolona nestes esteróides também ocorre após a administração de uma outra endozepina, o composto triakontetranuropeptídeo (DO-REGO, *et al.*, 1998).

Este efeito da progesterona sobre receptores GABA_A não parece ser uma ação específica de mamíferos e rãs. Em humanos, a redução da progesterona pelas enzimas 5 α -redutase e 5 β -redutase resulta respectivamente nos compostos alopregnanolona e pregnanolona, ambos ativadores de receptores GABA_A (VANOVER, *et al.*, 1999; PAUL & PURDY, 1992). Ainda em humanos, sabe-se que mulheres apresentam uma diminuição na concentração plasmática de progesterona no período pré-menstrual, ocasião que se tornam mais sensíveis a estímulos dolorosos (SCHACHTER, 1988). Este resultado deixa evidente o papel da progesterona sobre a nocicepção de humanos. Em decorrência desta demonstração, autores recomendam o uso da administração crônica de progesterona para alívio da dor em distúrbios geniturinários (PALAGIANO *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2004; HERMANN *et al.*, 2003; CHWALISZ *et al.*, 2005).

É preciso considerar ainda a possibilidade que a diferença entre as repostas de rãs e ratos aqui descrita para a progesterona sejam decorrentes do veículo empregado para a sua diluição, tal como foi sugerido por Frye, *et al.* (1996). Nos estudos acerca dos efeitos da administração aguda e crônica de progesterona foram empregados diversos veículos, como óleo vegetal (WALL & FRYE, 2003), solução de Tween na concentração de 2% (CZLONKOWSKA, *et al.*, 2001), solução de ciclodextrina 37% (FRYE & DUNCAN, 1994), solução salina (RHODES & FRYE, 2005), propileno glicol (FRYE, *et al.*, 2004) e ciclodextrano (FRYE & SCALISE, 2000). Como no nosso estudo foi utilizada

para a diluição de progesterona solução salina acrescida de 10 µl Tween, o que é diferente das soluções citadas anteriormente, deve-se considerar a possibilidade de que as diferenças entre as respostas de rãs e ratos sejam decorrentes do emprego de diferentes veículos para a preparação da solução de progesterona. Se isto for verdadeiro, torna-se intrigante o fato de que nos estudos crônicos a resposta entre estes dois modelos experimentais foi similar. Se assim for, pode-se sugerir que nestas condições o efeito do emprego de diferentes soluções para a diluição da progesterona não se manifestou, ou que o mesmo foi sobreposto pelo efeito analgésico deste hormônio.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que o tratamento de rãs com os esteróides DHEA, DHEAS e progesterona aumentou o limiar nociceptivo quando foram cronicamente administrados na dose de 2,0 mg/kg, mas somente a DHEA e DHEAS apresentaram este efeito quando foi realizado o tratamento agudo com a dose de 10,0 mg/kg de peso corporal. Nenhum destes esteróides ocasionou mudança estatisticamente significativa no limiar nociceptivo quando foram empregadas doses de 1,0 e 2,0 mg/kg de peso corporal nos tratamentos agudos.

Estes resultados permitem inferir que a DHEA, a DHEAS e a progesterona participam dos mecanismos de controle ou modulação da nocicepção de rãs, similar ao que ocorre em mamíferos e humanos, podendo estes animais serem utilizados em futuros estudos visando o entendimento dos mecanismos moleculares e celulares destes neuroesteróides na nocicepção.

Possibilitam ainda deduzir que a presença de analgesia nas rãs tratadas com estes esteróides, cuja resposta é também similar àquela observada em mamíferos e humanos, tenha sido um evento que apareceu precocemente durante o processo evolutivo. Porém, quando desenvolvido este se manteve

ao longo da evolução, estando ainda presente em humanos. Desta forma, a rã, um representante dos anfíbios, os primeiros vertebrados terrestres, muito pode contribuir para o esclarecimento das muitas questões ainda especulativas sobre o papel dos neuroesteróides DHEA, DHEAS e progesterona no SNC.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLI, D. S. H., ROSENTHAL, B. M., YUEN, G. L., HO, R. H. & CRUCE, W. L. R. 1988. Immunohistochemical localization of substance P, somatostatin, enkephalin, and serotonin in the spinal cord of the northern leopard frog *Rana pipiens*. J Comp Neurol. 275: 106-116.

AIRES, M. M. Fisiologia (1999). Guanabara Koogan. 2º edição.

ANADÓN, R., ADRIO, F. & RODRÍGUEZ-MOLDES, I. (1998). Distribution of GABA Immunoreactivity in the Central and Peripheral Nervous System of Amphioxius (*Branchiostoma lanceolatum* Pallas). The Journal of Comparative Neurology. 401: 293-307.

BAKER, L. & RATKA, A. (2001). Sex-specific differences in levels of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine antinociception in rats. Pain. 95: 65-74.

BAULIEU EE., ROBEL, P. & SCHUMACHER, M. (2001). Neurosteroids: beginning of the story. College de France, Paris, France. Int Ver Neurobiol 46; 1-32.

BAULIEU, EE., ROBEL, P. & SCHUMACHER, M., (1999). Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system. Humana Press, New Jersey, USA.

BAULIEU EE., THOMAS, G., LEGRAIN, S., LAHLOU, N., ROGER, M., DEBUIRE, B., FAUCOUNAU, V., GIRARD, L., HERVY, MP. LATOUR, F., LEAUD, MC., MOKRANE, A., PITTI-FERRANDI, H., TRIVALLE, C., LACHARRIÈRE, O., NOUVEAU, S., RAKOTO-ARISON, B., SOUBERBIELLE, JC., RAISON, J.; BOUC, Y. L., RAYNAUD, A., GIRERD, X. & FORETTE, F. (1999b). Deydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: Contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. PNAS. 97: 4279-4284.

BAULIEU, EE. & ROBEL, P. (1998). Dehydroepiandrosterona (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. France. 95: 4089-4091.

BEAR, M.F., CONNORS, B.W. & PARADISO, M.A. (2001). Neuroscience: exploring the brain. Lippincott Williams & Wilkins.

BEAUJEAN, D., DO-REGO, JL., GALAS, L.; MENSAH-NYAGAN, A. G., FREDRIKSSON, R., LARHAMMAR, D., FOURNIER, A., LUU-THE, V., PELLETIER, G. & VAUDRY, H. (2002). Neuropeptide Y inhibits the biosynthesis of sulfated neurosteroids in the hypothalamus through action of Y₁ receptors. Endocrinology 143 (5): 1950-1963.

BECCARI, N. (1943). Neurobiologia Comparata: anatomo-funzionale dei vertebrati, compreso l'uomo. Sansoni Edizioni Scientifiche.

BERGERON, R., de MONTIGNY, C. & DEBONNEL, G. (1999). Pregnancy reduces brain sigma receptor function. British Journal of Pharmacology. 127: 1769-1776.

BERGERON, R., de MONTIGNY, C. & DEBONNEL, G. (1996). Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *The Journal of Neuroscience*. 16: 1193-1202.

BIEDERMANN, K. & SCHOCH, P. (1985). Do neuroactive steroids cause fatigue in pregnancy?. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 58: 1256-1260.

BROCKES, J. P., FIELDS, K. L. & RAFF, M. C. (1979) Studies on cultured rat Schwann cells. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res* 165: 105-118.

BUTLER, A.B. & HODOS, W. (1996). *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: evolution and adaptation*. Wiley-Liss, Inc.

BYERS, M.R. & BONICA, J.J. (2001). Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: Loeser, J. D., Butler, S. H., Champman, R. & Turk, D.C. (eds). *Bonica's management of pain*. Lippincott Williams & Wilkins, 26-72.

CAMPOS, H. (1983). *Estatística Experimental não-paramétrica*. 4º ed, USP.

CARDOUNEL, A., ROGELSON, W. & KALIMI, M. (1999). Dehydroepiandrosterone protects hippocampal neurons against neurotoxin-induced cell death: mechanism of action. *P.S.E.B.M.* 222: 145-149.

CELEC, P. & STÁRKA, L. (2003). Dehydroepiandrosterone – Is the Fountain of youth Drying Out? *Physiol. Res.* 52: 397-407

CHEN, J., CHOPP, M. & LI, Y. (1999). Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neurol Sci.* 171: 24-30.

CHWALISZ, K., PEREZ, M. C., DEMANNO, D. WINKEL, C., SCHUBERT, G. & ELGER, W. (2005). Selective progesterone receptor modulator development and use the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocr Rev.* 26: 423-438.

COMPAGNONE, N.A. & MELLON, S.H. (1998). Dehydroepiandrosterone: A potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Neurobiology.* 95: 4678-4683.

COMPAGNONE, N.A., BULFONE, A., RUBENSTEIN, J.L. & MELLON, S.H. (1995). Expression of the steroidogenic enzyme P450_{scc} in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology.* 1995 Jun;136:2689-2696.

CORPECHOT, C., ROBEL, P., AXELSON, M., SJOVALL, J. & BAULIEU, EE. (1981). Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci.* 78: 4704-4707.

CRAWLEY, J.N.; GLOWA, J.R.; MAJEWSKA, M.D. & PAUL, S.M. (1986). Anxiolytic activity of endogenous adrenal steroid. *Brain Res.* 339: 382-386.

CZLONKOWSKA, A. I., KRZASCIK, P., SIENKIEWICZ-JAROSZ, H., SIEMIATKOWSKI, M., SZYNDLER, J., MACIEJAK, P. BIDZINSKI, A. & PLAZNIK. A. (2001). Rapid down-regulation of GABA_A receptors after pretreatment of mice with progesterone. *Polish Journal of Pharmacology.* 53: 385-388.

DEGROOT, L. J. & JAMESON, J. L. (2001). *Endocrinology*. 4th ed. W. B. Saunders Company.

DESSEIN, P. H., SHIPTON, E. A., JOFFE, B. I., HADEBE, D. P., STANWIX A. E. & VAN DER MERWE, B. A. (1999). Hyposecretion of adrenal androgens and the relation of serum adrenal steroids, serotonin and insulin-like growth factor-1 to clinical features in women with fibromyalgia. *Pain*. 83: 313-319.

DOOSTZADEH, J. & MORFIN, R. (1997). Effects of cytochrome P450 inhibitors and steroid hormones on the formation of 7-hydroxylated metabolites of pregnenolone in mouse brain microsomes. *Journal of Endocrinology*. 155: 343-350.

DORAN, J. (2000). Recent developments management of pain. *The Pathophysiology of Pain*. ASTRA Pharmaceuticals Education Booklet. *Journal of Pain and Symptom Management* January 2000, Vol 19, Number 15

DO-REGO, JL., MENSAH-NIAGAN, A. G., BEAUJEAN, D., LEPRINCE, J., TONON, MC., LUU-THE, V., PELLETIER, G. & VAUDRY, H. (2001). The octadecaneuropeptide ODN stimulates neurosteroid biosynthesis through activation of central-type benzodiazepine receptors. *Journal of Neurochemistry*. 76: 128-138.

DO-REGO, JL., MENSAH-NIAGAN, A. G., BEAUJEAN, D., VAUDRY, D., SIEGHART, W., LUU-THE, V., PELLETIER, G. & VAUDRY, H. (2000). γ -aminobutyric acid, acting through γ -aminobutyric acid type A receptors, inhibits the biosynthesis of neurosteroids in the frog hypothalamus. *PNAS*. 97: 13925-13930.

DO-REGO, JL., MENSAH-NIAGAN, A. G., FEUILLOLEY, M., FERRARA, P., PELLETIER, G. & VAUDRY, H. (1998). The endozepine trikontatetrapeptide diazepam-binding inhibitor [17-50] stimulates neurosteroid biosynthesis in the frog hypothalamus. *Neuroscience*. 83: 555-570.

FFRENCH-MULLEN, J.M.H. & SPENCE, K.T. (1991). Neurosteroids block Ca^{2+} channel current in freshly isolated hippocampal CA1 neurons. *Eur J Pharmacol*. 202: 269-272.

FINCKH, A., BERNER, I. C. AUBRY-ROZIER, B. & SO, A. K. (2005). A randomized controlled trial of dehydroepiandrosterone in postmenopausal with fibromialgia. *J Reumatol*. 32: 1336-1340.

FINSET, A., OVERLIE, I. & HOLTE, A. (2004). Musculo-skeletal pain, psychological distress, and hormones during the menopausal transition. *Psychoneuroendocrinology*. 29: 49-64.

FLYNN, M. A., WEAVER-OSTERHOLTZ, D., SHARPE-TIMMS, K. L., ALLEN, S. & KRAUSE, G. (1999). Dehydroepiandrosterone replacement in aging humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. V84, N5: 1527-1533.

FRYE, C. A., WALF, A. A., RHODES, M. E. & HARNEY, J. P. (2004). Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 1 5α -reductase. *Brain Research*. 1004: 116-124.

FRYE, C. A. & SCALISE, T. J. (2000). Anti-seizure effects of progesterone and 3 α ,5 α -THP in kainic acid and perforant pathway models of epilepsy. *Psychoneuroendocrinology*. 25: 407-420.

FRYE, C. A. & LACEY, E. H. (1998). The neurosteroids DHEA and DHEAS may influence cognitive performance by altering affective state. *Physiology & Behavior*. V66, N1: 85-92.

FRYE, C. A., VAN KEUREN, K. R., RAO, P. N. & ERSKINE, M. S. (1996). Analgesic effects of the neurosteroid 3 α -androstenediol. *Brain Research*. 709: 1-9.

FRYE, C. A. & DUNCAN, J. E. (1994). Estradiol benzoate potentiates neuroactive steroids' effects on pain sensitivity. *Pharmacology biochemistry and behavior*. 53: 27-32.

FÜRST, S. (1999). Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res. Bull.* 48: 129-141.

GANONG, W. F. (1995). *Review of Medical Physiology*. 17th ed. A Lange Medical Book.

GARRY, E. M., JONES, E. & FLEETWOOD-WALKER, S. M. (2004). Nociception in vertebrates: key receptors participating in spinal mechanism of chronic pain in animals. *Brain Research reviews* 46: 216-224.

GENAZZANI, A. D., STOMATI, M., BERNARDI, F. PIERI, M., ROVATI, L. & GENAZZANI, A. R. (2003). Long-term low-dose dehydroepiandrosterone oral supplementation in early and late postmenopausal women modulates

endocrine parameters and synthesis of neuroactive steroids. *Fertility and Sterility*. 80: 1495-1501.

GUEDES, R.P., MARCHI, M. I., ACHAVAL, M. & PARTATA, W. A. (2004). Complete sciatic nerve transection induces increase of neuropeptide Y-like immunoreactivity in primary sensory neurons and spinal cord of frogs. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 139: 461-467.

GUEDES, R.P., MARCHI, M. I., ACHAVAL, M. & PARTATA, W. A. (2004b). Somatostatin-, calcitonin gene-related peptide, and γ -aminobutyric acid-like immunoreactivity in the frog lumbosacral spinal cord: distribution and effects of sciatic nerve transection. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 138: 19-28.

GUENNOUN, R., FIDDES, R. J., GOUEZOU, M., LOMBES, M. & BAULIEU, EE. (1995). A key enzyme in the biosynthesis of neurosteroids, 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase (3β -HSD), is expressed in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 30: 287-300.

GUYTON, A. C. and HALL, J. E. (1996). *Textbook of medical physiology*. W.B. Saunders Company

HAMAMOTO, S. & SIMONE, D. A. (2003). Characterization of cutaneous primary afferents fibers excited by acetic acid in a model of nociception in frogs. *J Neurophysiol* 90: 566-577.

HERMANN, F., SPEICH, R. & SCHNEEMANN, M. (2003). *Dtsch Méd Wochenscher*. 128: 1935-1938.

HIMEL, P.B. (2001). Dhydroepiandrosterone: An analysis of status in healthcare actual and protocols practics for the use by doctor. New York.

HU, Z. Y., BOURREAU, E., JUNG-TESTAS, I., ROBEL, P. & BAULIEU, EE. (1987) Neurosteroid: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. Proc Natl Acad Sci. 84:8215-8219.

IBANEZ, C., GUENNOUN, R., LIERE, P., EYCHENNE, B., PIANOS, A., EL-ETR, M., BAULIEU, EE. & SCHUMACHER, M. (2003). Developmental expression oh genes involved in neurosteroidogenesis: 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 Isomerase in the rat brain. Endocrinology. 144: 2902-2911.

IRWIN, R. P., LIN, S. Z., ROGAWSKI M. A., PURDY, R. H. & PAUL, S. M. (1994). Steroid potentiation and inhibition of N-Methyl-D-Aspartate receptor-mediated intracellular Ca⁺⁺ responses: structure-activity studies. J Pharmac Exp Ther. 271: 677-682.

IRWIN, R. P., MARAGAKIS, N. J., ROGAWSKI M. A., PURDY, R. H., FARB, D. H. & PAUL, S. M. (1992). Pregnenolone sulfate augments NMDA receptor mediated increases in intracellular Ca²⁺ in cultures rat hippocampal neurons. Neurosci Lett. 141: 30-34.

JUNG-TESTAS, J., RENOIR, M., BUGNAR, H, GREENE G. L. & BAULIEU, EE. (1992) Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells. J Steroid Biochem Mol boil 41: 621-631.

JUNG-TESTAS, J., HU, Z. Y., BAULIEU, EE. & ROBEL, P. (1989). Neurosteroids: biossynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of the rat glial cells. Endocrinology. 125: 2083-2091.

KAASIK, A., SAFIULINA, D., KALDA, A., ZHARKOVSKY, A. (2003) Dehydroepiandrosterone with other neurosteroids preserve neuronal mitochondria from calcium overload. *Journal of Steroid biochemistry & Molecular Biology*. 87: 97-103.

KANDEL, E. R., SCHAWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. (2000). *Principles of neural Science*. McGraw-Hill, New York, 1414p.

KARDONG, K.V. (1997). *Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution*. 2nd ed. McGraw-Hill, 589-672.

KAVALIERS, M. (1988). Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res Bull*, 21:923-931.

KAVALIERS, M (1988b). Inhibitory influences of adrenal steroid, 3 α ,5 α -tetrahydrodeoxycorticosterone on aggression and defeat-induced analgesia in mice. *Psychopharmacol*. 95: 488-492

KIMONIDES, V. G., KHATIBI, N. H., SVENDSEN, C. N. & HERBERT, J. (1998). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Neurobiology*. 95: 1852-1857.

KUFFLER, D. P., LYFENKO, A., VYKLICKY, L. & VLACHOVÁ, V. (2002). Cellular mechanisms of nociception in the frog. *J Neurophysiol*. 88: 1843-1850.

LAMBERT, J. J., BELELLI, D., PEDEN, D. R., VARDY, W. V. & PETERS, J. A. (2003). Neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Progress in Neurobiology*. 71: 67-80.

LAPCHAK, P. A. (2004). The neuroactive steroid 3- α -ol-5- β -pregnan-20-one hemisuccinate, a selective receptor antagonist improves behavioral performance following spinal cord ischemia. *Brain Reserch*. 997: 152-158.

LARDY, H., PARTRIDGE, B., KNEER, N & WEI, Y. (1995). Ergosteroids: Induction of thermogenic enzyme in liver of rats treated with steroids derived from dehydroepiandrosterone. *Proc Natl Acad Sci*. 92: 6617-6619.

LE BARS, D., DICKENSON, A. H., BESSON, J. M. & VILLANUEVA, L. (1979). Aspects of sensory processing through convergent neurons. In: Yaksh, T. L. (ed) (1986) *Spinal afferent processing*. New York: Plenum Press. 467-504.

LHULLIER, F. L. R., NICOLAIDIS, R., RIERA, N. G. CIPRIANI, F., JUNQUEIRA, D., DAHM, K. C. S., BRUSQUE, A. M. & SOUZA, D. O. (2003). Dehydroepiandrosterone increases synaptosomal glutamate release and improves the performance in inhibitory avoidance task. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 77: 601-606.

LLEWELLYN-SMITH, I. J., CASSAM, A. K., KRENTZ, N. R., KRASSIOUKOV, A. V. & WEAVER, L. C. (1997). Glutamate and GABA-immunoreactive synapses on sympathetic preganglionic neurons caudal to a spinal cord transection in rats. *Neuroscience*. 80: 1225-1235.

LOESER, J.D. & BONICA, J.J. (2001). History of pain concepts and therapies. In: Loeser, J.D.; Butler, S.H.; Champman, R.; Turk, D.C. (eds). *Bonica's manegement of pain*. Lippincoott Williams & Wilkins, 3-25.

MACLUSKY N.J. & NAFTOLIN, F. (1981). Sexual differentiation of the nervous system. *Science*, 211: 1294-1302.

MAJEWSKA, M. D. (1999) Neurosteroid antagonists of the GABA_A receptors. In Baulieu, EE., Robel, P. & Schumacher, M. (1999). Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system. Humana Press, New Jersey, USA, 155-165.

MAJEWSKA, M. D. (1995). Neuronal actions of dehydroepiandrosterone. Possible roles in brain development, aging, memory, and affect. *Ann N Y Acad Sci.* 29: 111-120.

MAJEWSKA M.D. (1992). Neurosteroids: Endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* 38: 379-395.

MAJEWSKA, M. D. & VAUPEL, B. (1991) Steroid regulation of uterine motility via GABA_A receptor in the rabbit: a novel mechanism? *J Endocrin* 131: 427-434.

MAJEWSKA, M. D., DEMIRGOREN, S., SPIVAK, C. E. & LONDON, E. D. (1990). The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an antagonist of the GABA_A receptor. *Brain Res.* 526: 143-146.

MAJEWSKA, M.D., HARRISON, N.L., SCHWARTZ, R.D., BARKER, J.L. & PAUL, S.M. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiture-like modulators of the GABA receptor. *Science.* 232: 1004-1007.

MARTIN, J. H. (1996). *Neuroanatomy: text and atlas.* Appleton & Lange.

MAYO, W., VALLEÉ, M., DARNAUDÉRY, M. & MOAL, M. L. (1999) Neurosteroid: behavioral studies. In Baulieu, EE.; Robel, P. & Schumacher, M.,

(1999). Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system. Humana Press, New Jersey, USA, 317-335.

MAYO, W., DELLU, F., ROBEL, P., CHERKAOUI, J., BAULIEU, EE. & SIMON, H. (1993). Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis mango cellularis affects conigive processes in the rat. *Brain Res* 607: 324-328.

McCARTHY, M. M., CABA, M., KOMISURAK, B. R. & BEYER, C. (1990). Modulation by estrogen and progesterone on the effect of muscimol on nociceotion in the spinal cord. *Pharmacol, Biochem. Behav.* 37: 123-128.

McEWEN, B. S. & SAPOLSKY, R. M. (1995). Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5: 205-216.

MELLON, S. H. & COMPAGNONE, N. A. (1999) molecular biology and developmental regulation of the enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of neurosteroid. In Baulieu, EE.; Robel, P. & Schumacher, M., (1999). Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system. Humana Press, New Jersey, USA, 27-49.

MELLON, S. H. & DESCHEPPER C. F. (1993). Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Res* 629: 283-292.

MENSAH-NYAGAN, A. G., BEAUJEAN, D., LUU-THE, V, PELLETIER, G. & VAUDRY, H. (2001). Anatomical and biochemical evidence for the synthesis of unconjugated and sulfated neurosteroids in amphibians. *Brain Research* 37: 13-24.

MENSAH-NYAGAN, A. G., DO-REGO, J.L., BEAUJEAN, D., LUU-THE, V., PELLETIER, G. & VAUDRY, H. (2001b). Regulation of neurosteroid biosynthesis in the frog diencephalon by GABA and endozepines. *Hormones and Behavior*. 40: 218-225.

MENSAH-NYAGAN, A. G., BEAUJEAN, D., DO-REGO, J.L., MATHIEU, M.; VALLARINO, M.; LUU-THE, V, PELLETIER, G. & VAUDRY, H. (2000). In vivo evidence for the production of sulfated steroids in the frog brain. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 126: 213-219.

MENSAH-NYAGAN, A. G., DO-REGO, J.L., BEAUJEAN, D., LUU-THE, V., PELLETIER, G. & VAUDRY, H. (1999). Neurosteroids: Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacological Reviews*. 51: 63-81.

MEUNIER, J. & MAURICE, T. (2004). Beneficial effects of the sigma₁ receptor agonists igmesine and dehydroepiandrosterone against learning impairments in rats prenatally exposed to cocaine. *Neurotoxicology and Teratology*. 26: 783-797.

MEYER, J. H., LEE, S., WITTENBERG, G. F.; RANDALL, R. D. & GROUL, D. L. (1999). Neurosteroid regulation of inhibitory synaptic transmission in the rat hippocampus *in vitro*. *Neuroscience* 90 (4): 1177-1183.

MILLAN, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57: 1-164.

MILLER, W. L. (2002). Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198: 7-14.

MONNET F. P., MAHE, V., ROBEL, P. & BAULIEU, EE. (1995). Neurosteroids, via sigma receptor, modulate [³H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3774-3778.

MONNET, F. P., DEBONNEL, G., BERGERON, R., GRONIER, B. & DE MONTIGNY, C. (1994). The effects of sigma ligand and of neuropeptide Y on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation of CA3 dorsal hippocampus neurons are differentially affected by pertussis toxin. *Br J Pharmacol.* 112: 709-715.

MORALES, A. J., HAUBRICH, R. H., HWANG, J. Y., ASAKURA, H. & YEN, S. S. (1998). The effect of six months treatment with a 100 mg daily dose of dehydroepiandrosterone (DHEA) on circulating sex steroids, body composition and muscle strength in age-advanced men and women. *Clin Endocrinol.* 49: 491-432.

MORALES, A. J., NOLAN, J. J., NELSON, J. C. & YEN, S. S. (1995). Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab.* 80:2799-2806.

MORLEY, J. E., KAISER, F., RAUM, W. J., PERRY, H. M., FLOOD, J. F., JENSEN, J., SILVER, A. J & ROBERTS, E. (1997). Potentially predictive and manipulable blood serum correlates of aging in the healthy human male: Progressive decreases in bioavailable testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and the ratio of insulin-like growth factor 1 to growth hormone. *Medical Sciences*, 94: 7537-7542.

MORRISON, M. F., KATZ, I. R., PARMALEE, P., BOYCE, A. A. & TENHAVE, T. (1998). Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and psychiatric and

laboratory measures of frailty in a residential care population. *The American Journal of Geriatric psychiatry*. 6: 277-284.

MURPHY, B. E. P., ABBOTT, F. V., ALLISON, C. M., WATTS, C. & GHADIRIAN, A. M. (2004). Elevated levels of some neuroactive progesterone metabolites, particularly isopregnanolone, in women with chronic fatigue syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 29: 245-268.

ORCHINIK, M., MURRAY, T. F. & MOORE, F. L. (1991). A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science*. 252: 1848-1851.

OSTATNÍKOVÁ, Z., LAZNIBATOVÁ, J., PUTZ, Z., MATASEJE, A., DOHNANYIOVA, M. & PASTOR, K. (2002). Biological aspects of intellectual giftedness. *Studia Psychologica*. 44: 3-13.

PALAGIANO, A., BULLETTI, C., PACE, M. C., DE ZIEGLER, D., CICINELLI, E. & IZZO, A. (2004) Effects of vaginal progesterone on pain and uterine contractility in patients with threatened abortion before twelve weeks of pregnancy. *Ann N Y Acad Sci*. 1034: 200-210.

PARTRIDGE, L. D. & VALENZUELA, C. F. (2001). Neurosteroid-induced enhancement of glutamate transmission in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters*. 301: 103-106.

PATTE-MENSAH, C., KIBALY, C. & MENSAH-NYAGAN, A. G. (2005). Substance P inhibits progesterone conversion to neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: A potential component of nociception. *PNAS*. 122: 9044-9049.

PAUL, S.M. & PURDY, R.H. (1992). Neuroactive steroids. *FASEB J* 6:2311-2322.

PEÑA, B. M. G. (1997). Dehydroepiandrosterone (DHEA). *Clinical Toxicology Review*. 19: 12.

PEZALLA, R. D. (1983). Morphine-induced analgesia and explosive motor behavior in an amphibian. *Brain Research*. 273:297-305.

PUIA, G., SANTI, M. R., VICINI, S., PRITCHETT, D. B., PAUL, S. M., SEEBURG, P. M., COSTA, E. (1990). Neurosteroids act on recombinant human GABA_A receptors. *Neuron*. 4: 759-765.

RATKA, A. & SIMPKINS, J. W. (1991). Effects of estradiol and progesterone on the sensitivity to pain and on morphine-induced antinociception in female rats. *Horm. Behav.* 25: 217-228.

REDDY, D. S. & ROGAWSKI, M. A. (2002). Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA_A receptor function and seizure susceptibility. *The Journal of Neuroscience*. 22: 3795-3805.

RHODES, M. E. & FRYE, C. A. (2005). Actions at GABA_A receptors in the hippocampus may mediate some antiseizure effects of progestins. *Epilepsy & Behavior*. 6: 320-327.

RHODES, M. E., LI, P. K., BURKE, A. M. & JOHNSON, D. A. (1997). Enhanced plasma DHEAS, brain acetylcholine and memory mediated by steroid sulfatase inhibition. *Brain Res*. 773: 28-32.

ROBEL, P., SCHUMACHER, M. & BAULIEU, EE. (1999). Neurosteroids: from definition and biochemistry to physiopathologic function. In Baulieu, EE.; Robel, P. & Schumacher, M., (1999). Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system. Humana Press, New Jersey, USA, 1-25.

ROBEL P., YOUNG, J., CORPÉCHOT, C., MAYO, W., PERCHÉ, F., HAUG, M., SIMON, H. & BAULIEU, EE. (1995). Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: Functional correlates. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 335-360.

ROBEL, P. & BAULIEU, EE. (1994). Neurosteroids: biosynthesis and function. *Trends Endocrinol Metab.* 5: 1-8.

ROCHA, P. L. & BRANCO, L. G. S. (1998). Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and responses to temperature and hypoxia in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J Exp Biol*, 201: 761-768.

ROOF, R. L., DUVDEVANI, R. & STEIN, D. G. (1993). Gender influences outcome of brain injury – Progesterone plays a protective role. *607*: 333-336.

ROSE, K., ALLAN, A., GAULDIE, S., STAPLETON, G., DOBBIE, L., DOTT, K., MARTIN, C. WANG, L., HEDLUND, E., SECKEL, J. R., GUSTAFSSON, JA., & LATHE, R. (2001). Neurosteroid hydroxylase CYP7B vivid reporter activity in dentate gyrus of gene-targeted mice and abolition of a widespread pathway of steroid and oxysterol hydroxylation. *The Journal of Biological Chemistry.* 276: 23937-23944.

RUPPRECHT, R. (2003). Neuroactive steroids: mechanism of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology.* 28: 139-168.

RUPPRECHT, R., MICHELE F., HERMANN, B., STRÖHLE, A., LANCEL, M., ROMEO, E. & HOLSBOER, F. (2001). Neuroactive steroids: molecular mechanisms of action and implications for neuropsychopharmacology. *Brain Research Reviews*. 37: 59-67.

SAHELIAN, R. (1998). *Annals of Internal Medicine*. 129: 588.

SCHACHTER, S. C. (1988). Hormonal considerations in women with seizures. *Arch Neurol*. 45: 1267-1270.

SHUMACHER, M., GUENNOUN, R., ROBERT, F., CARELLI, C., CAGO, N., GHOUMARI, A., DENISELLE, M. C. G., GONZALEZ, S. L., IBANEZ, C., LABOMBARDA, F., COIRINI, H., BAULIEU, EE. & DE NICOLA, A. F. (2004). Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Hormone & IGF Research*. 14: 18-33.

SCHUMACHER M. (1999). Rapid membrane effects of steroids hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci*. 13:359-362.

SCHUMACHER, M., ROBEL & BAULIEU, EE. (1996). Development and Regeneration of the Nervous System: A Role for Neurosteroids. 18: 6-21.

SKERRET, P. J. (1996) DHEA: Ignore the Hype. *The New England Journal of medicine*.

SLUKA, K. A. & WESTLUND, K. N. (1993). Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthristis model in rats. *Pain*. 55: 367-377.

SONG, Y. J., LIN, S. Q., WU, Z. H., WENG, X. S. QIU, G. X. & CHEN, F. L. (2004). Effect of combined continued hormone replacement therapy on knee osteoarthritis symptom of postmenopausal women. *Zhongguo Yi Xue Ke yan Xue Bao*. 26: 571-575.

STEVENS, C. W. (2004). Opioid research in amphibians: an alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. *Brain Research Reviews* 46: 204-215.

STEVENS, C. W. (2003). Opioid research in amphibians: a unique perspective on mechanism of opioid analgesia and the evolution of opioid receptors. *Reviews in Analgesia*. 7: 69-82.

STEVENS, C. W. (1996). Relative analgesic potency of mu, delta and kappa opioids after spinal administration in amphibians. *J Pharmacol Exp Ther*. 276: 440-448.

STOFFEL, E. C., ULIBARRI, C. M. & CRAFT, R. M. (2003). Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. *Pain*. 103: 285-302.

STOFFEL-WAGNER, B. (2001). Neurosteroid metabolism in the human brain. *European Journal of Endocrinology*. 145: 669-679.

STORER, T.I., USINGER R. L., STEBBINS, R. C. & NYBAKKEN J. W. (1984). *Zoologia Geral*. Companhia Editorial Nacional, 618-641.

STOSKOPF, M. K. (1994) Pain and analgesia in birds, reptiles, amphibians and fish. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 35: 775-780.

STRAUSS, J. F. & BARBIERI, R. L. (2004). Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology – Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. 5th ed. Elsevier Saunders.

TAKASE, M., UKENA, K., YAMAZAKI, T., KOMINAMI, S. & TSUTSUI, K. (1999) Pregnenolone, pregnenolona sulfato, and cytochrome P₄₅₀ side-chain cleavage enzyme in the amphibian brain their seasonal changes. *Endocrinology*. 140: 1936-1944.

TERMAN, G. W. & BONICA, J. J. (2001). Spinal mechanisms and their modulation. In: Loeser, J.D.; Butler, S.H.; Champman, R.; Turk, D.C. (eds). *Bonica's management of pain*. Lippincott Williams & Wilkins, 73-152.

UCHIDA, H., MIZUNO, K., YOSHIDA, A. & UEDA, H. (2002). Neurosteroid-induced hyperalgesia through a histamine release is inhibited by progesterone an *p,p'*-DDE, an endocrine disrupting chemical. *Neurochemistry*, 42: 401-407.

VALLÉE, M., MAYO, W., DARNAUDÉRY, M., CORPÉCHOT, C., YOUNG, J., KOEHL, M., MOAL, M. L., BAULIEU, EE, ROBEL, P. & SIMON, H. (1997). Neurosteroids: Deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Neurobiology*, 99: 14865-14870.

VANOVER, K. E., ROSENZWEIG-LIPSON, S., HAWKINSON, J. E., LAN, N. C., BELLUZZI, J. D., STEIN, L., BARRET, J. E., WOOD, P. L. & CARTER, R. B. (2000). Characterization of the anxiolytic properties of a novel neuroactive steroid, Co 2-6749 (GMA-839; WAY-141839; 3 α ,21-dihydroxy-3 β -trifluoromethyl-19-nor-5 β -pregnan-20-one), a selective modulador de γ -aminobutyric acid_A receptors. *The Journal of Pharmacology an Experimental Therapeutics*. 295: 337-345.

VANOVER, K. E., SURUKI, M., ROBLEDO, S., HUBER, M., WIELAND, S., LAN, N. C., GEE, K. W., WOOD, P. L. & CARTER, R. B. (1999). Positive allosteric modulators of the GABA_A receptor: differential interaction of benzodiazepines and neuroactive steroids with ethanol. *Psychopharmacology*. 141: 77-82.

VARET, J., VINCENT, L., AKWA, Y., MIRSHAHI, P., LAHARY, A., LEGRAND, OPOLON, P., MISHAL, Z., BAULIEU, EE., SORIA, J., SORIA, C. (2004). Dose-dependent effect of dehydroepiandrosterone, but not of its sulphate ester, on angiogenesis. *European Journal of Pharmacology*. 502: 21-30.

VESSELKIN, N. P., ADANINA, V. O., RIO, J. P. & REPÉRANT, J. (2003). Ultrastructural study of glutamate- and GABA-immunoreactive terminals contacting the primary afferent fibers in frog spinal cord A double postembedding immunocytochemical study. *Brain Research*. 960: 267-272.

VONGHER, J. M. & FRYE, C. A. (1999). Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 64: 777-785.

WALL, A. A. & FRYE, C. A. (2003). Anti-nociception following exposure to trimethylthiazoline, peripheral or intra-amygdala estrogen and/or progesterone. *Behavioural Brain Research*. 144: 77-85.

WALL, P.D. & MELZACK, R. (1999). *Textbook of Pain*. Churchill Livingstone, New York, 4^o ed.

WANG, H., LIU, R. J., ZHANG, R. X. & QIAO, J. T. (1996). Peripheral NMDA receptors contribute to activation of nociceptors: a c-fos expression study in the rats. *Neuroscience Letters*. 221: 101-104.

WEHLING, M. (1994). Nongenomic actions of steroid hormones. *Trends Endocrinol Metab*. 5: 347-353.

WILLENBRING, S. & STEVENS C. W. (1996). Thermal, Mechanical and chemical peripheral sensation in amphibians: opioid and adrenergic effects. *Life Sciences*. 58: 125-133.

WILLIAM, R. H. & WILSON, J. D. (1985). *Textbook of Endocrinology*. 6th ed. W. B. Saunders Company.

WILLIS, W. D. & WESTLUD, K. N. (1997). Neuroanatomy of the Pain System and of the Pathways That Modulate Pain. *Journal of Clinical Neurophysiology*. 14: 2-31.

WOLF, O. T., NEUMANN, O. HELLHAMMER, D. H., GEIBEN, A. C., STRASBURGER, C. J., DRESSENDORFER, R. A., PIRKE, K. M. & KIRSCHBAUM, C. (1997). Effects of a two-week physiological dehydroepiandrosterone substitution on cognitive performance and well-being in healthy elderly women and men. *J Clin Endocrinol Metab*. 82: 2363-2367.

YU, W.H. (1989). Survival of motoneurons following axotomy is enhanced by lactation or by progesterone treatment. *Brain Res*, 491: 379-382.

ZAHN, P. K., SLUKA, K. A., BRENNAN, T. J. (2002). Excitatory amino acid release in the spinal cord caused by plantar incision in the rat. *Pain*. 100: 65-76.

ZINDER, O. & DAR, D. E. (1999). Neuroactive steroids: their mechanism of action and their function in the stress response. *Acta Physiol Scand.* 167: 181-188.

ZWAIN, I.H. & YEN, S.S. (1999). Dehydroepiandrosterone: Biosynthesis and Metabolism in the Brain. *Endocrinology* 140 (2): 880-887.

