

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

Dissertação de Mestrado

Efeito do estresse crônico repetido e da reposição com estradiol sobre a nocicepção, a liberação e a captação de glutamato e o estresse oxidativo em medula espinhal de ratas ovariectomizadas

Leonardo Machado Crema

Orientadora: Prof^a Dr^a Carla Dalmaz

Co-orientadora: Dr^a Fernanda Fontella

Porto Alegre, fevereiro de 2007.

*Dedico esse trabalho ao meu falecido avô e pai de criação
Marconi Penna Crema.*

Agradecimentos

À minha mãe, Marilei: querida, guerreira e amiga. Muito obrigado pelo seu grande incentivo para eu continuar estudando e claro sem você, eu não estaria aqui;

À minha mãe científica, Carla Dalmaz, pelos conselhos, por sua calma, por sua simpatia, por sua inteligência e por sua excelente orientação;

À toda minha família: Marion, Moacir, Marlei, Leandro, Candinha, seus conjugues, meus primos amados (Duda, Lucas, Mayara, Melissa, William, Yasmim e ao meu pai adotivo, Gilberto Gubert, com seu carisma e incentivo já é membro da família Crema, amo todos vocês;

Aos meus grandes amigos e irmãos: Juliano Coelho, amigão em todos os momentos, além de mostrar-me um exemplo de família e união: família Coelho, da qual sou membro efetivo. Luisa Diehl, grande parceira nas minhas reclamações do dia a dia, das frustrações amorosas e uma grande profissional me ajudando em todos os experimentos;

À Dr. Neiva em ajudar na modulação do meu sistema límbico;

À professora Deusa Vendite pelos seus conselhos e a grande ajuda na pesquisa;

Ao Lab. 37., principalmente à Ana Paula Horn pelos transportadores de glutamato e sua grande amizade;

Ao professor William Peres pela amizade e sinceridade;

À Letícia Pettenuzzo pelo grande apoio, principalmente no término desse trabalho;

À Fernanda Fontella pela co-orientação;

Ao pessoal do laboratório: Edelvan Nunes, Ana Paula Aguiar, Simone Assis, sempre de prontidão. Martha, Linda, Andrelisa, Carla, Christie, Rachel, Liane, Mauro, Eduardo, Lenir, Fernanda, Anderson, Atahualpa, Paty, Aline, Paty Pelufo, André, Zé Menna e ao Professor Alex;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, universidade pública e de muita qualidade e ao Departamento de Bioquímica pelo acolhimento;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, pela oportunidade;

Ao pessoal do Biotério do DPTO de Bioquímica, Valeri e equipe, sempre disponíveis e simpáticos e também a todos os funcionários do Departamento;

*À espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar por ser a matéria prima dos meus trabalhos científicos;*

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão dessa dissertação, o meu muito obrigado;

Sumário

Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	viii
Resumo.....	ix
1- Introdução.....	1
1.1- Definição de Estresse.....	1
1.2- Estresse e Nocicepção.....	3
1.3- Nocicepção e Estradiol.....	5
1.4- Nocicepção e Glutamato.....	6
1.5- Estresse Oxidativo.....	8
1.6- Estresse e EROs.....	15
2- Objetivos.....	17
2.1- Objetivos gerais.....	17
2.2- Objetivos específicos.....	17
3- Materiais e Métodos.....	19
3.1- Animais.....	19
3.2- Cirurgia para a ovariectomia.....	19
3.3- Exposição ao estresse por contenção.....	20
3.4- Medida da latência de retirada de cauda (TFL).....	21
3.5- Exposição a sabores agradáveis e desagradáveis.....	22
3.6- Preparação de sinaptossomas.....	23
3.7- Captação de glutamato.....	23
3.8- Liberação de glutamato.....	24
3.9- Análise de <i>Western Blot</i>	25

3.10- Preparação das amostras para determinação de estresse oxidativo.....	27
3.11- Determinação do potencial antioxidante total (TRAP).....	28
3.12- Avaliação da lipoperoxidação (TBARS).....	29
3.13- Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	29
3.14- Determinação da atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx).....	30
4- Resultados.....	32
4.1- Nocicepção.....	32
4.2- Captação e liberação de glutamato.....	33
4.3- Expressão dos transportadores de glutamato.....	34
4.4- Parâmetros de estresse oxidativo.....	35
5- Discussão.....	48
6- Conclusões.....	59
7- Perspectivas.....	61
8- Referências Bibliográficas.....	62

Lista de Figuras

- Figura 1:** Etapas da reação em cadeia da peroxidação lipídica.....10
- Figura 2:** Reações importantes para a produção e defesa de radicais livres em neurônios.....14
- Figura 3:** Ilustração do aparelho de *Tail Flick* utilizado nas medidas de latência de retirada de cauda.....21
- Figura 4:** Aparelho para eletroforese usando gel de poliacrilamida. Utilizado para a separação de proteínas através de seu peso molecular.....26
- Figura 5:** *Blotter*. Aparelho utilizado na transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose.....26
- Figura 6:** Resumo do princípio das reações da análise de *Western Blot*.....27
- Figura 7:** Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a nocicepção após exposição ao sabor palatável (doce) em ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol.....37
- Figura 8:** Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a nocicepção após exposição ao sabor desagradável (ácido acético 5%) em ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol.....38
- Figura 9:** Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a captação de glutamato por sinaptossomas de medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol.....39

Figura 10: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a liberação de glutamato por sinaptossomas de medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol.....	40
Figura 11: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a expressão do imunocontéudo do transportador de glutamato GLAST em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol.....	41
Figura 12: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a expressão do imunocontéudo do transportador de glutamato GLT1 em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol.....	42
Figura 13: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a expressão do imunocontéudo do transportador de glutamato EAAC1 em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol.....	43
Figura 14: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol.....	44
Figura 15: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a lipoperoxidação (TBARS) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol.....	45
Figura 16: Efeito da exposição ao estresse crônico repetido por contenção sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol.....	46
Figura 17: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a atividade da enzima glutationala peroxidase (GPx) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol.....	47

Lista de Abreviaturas

CAT: Catalase

CuZnSOD: Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

EAAC1: Carreador de aminoácidos excitatórios

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GCs: Glicocorticóides

GLAST: Transportador de glutamato e aspartato

GLT1: Transportador de glutamato tipo 1

Glu: Glutamato

GPx: Glutathione peroxidase

GSH: Glutathione reduzida

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HPA: Hipotálamo - Pituitária – Adrenal

L• : Radical lipídico

LO• : Radical alcóxila

LOO• : Radical peróxila

MDA: Malondialdeído

MnSOD: Superóxido dismutase dependente de manganês

O₂^{•-}: Ânion superóxido

O₂: molécula de oxigênio

OH•: Radical hidroxila

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

SOD: Superóxido dismutase

TBARS: Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TRAP: Potencial antioxidante total

Resumo

Vários estudos mostram que exposição ao estresse crônico induz alterações na nocicepção. Essas alterações são dependentes de vários fatores. Por exemplo, há diversos trabalhos que sugerem que hormônios gonadais, incluindo o estradiol, possam modular respostas nociceptivas em diferentes fases do ciclo estral em ratas. Os efeitos sobre as respostas nociceptivas induzidas por estresse e por estradiol possivelmente envolvem mudanças neuroquímicas em regiões do sistema nervoso central, como a medula espinhal. O glutamato é de fundamental importância na sinalização nociceptiva. Além disso, a transmissão glutamatérgica pode ser regulada por hormônios do estresse e estradiol, e seu desequilíbrio pode induzir um estado de estresse oxidativo. Partindo do exposto acima, nosso objetivo foi (1) avaliar o envolvimento do estresse repetido e da reposição com estradiol em ratas ovariectomizadas sobre a nocicepção, utilizando a medida da latência de retirada de cauda antes e após a exposição a sabores palatáveis (doce) e não palatáveis (ácido); (2) avaliar o envolvimento do estresse crônico e da reposição com estradiol em ratas ovariectomizadas sobre a liberação e captação de glutamato em sinaptossomas de medula espinhal; e (3) avaliar o envolvimento do estresse crônico e da reposição com estradiol em ratas ovariectomizadas sobre parâmetros de estresse oxidativo. Primeiro, ratas Wistar foram ovariectomizadas (OVX) e divididas em 2 grupos: com reposição de estradiol e veículo (óleo de girassol), e então subdivididas em 2 grupos: submetidas ao estresse crônico (contenção durante 40 dias, 5 dias/semana, 1h/dia), e controles (sem estresse), resultando nos seguintes grupos experimentais: CO (controle-óleo); CH (controle-hormônio); EO (estresse-óleo) e EH (estresse-hormônio). Após o período de estresse crônico foi avaliada a medida da latência de retirada de cauda (basal) e após a exposição aos sabores doce (Froot Loops) e ácido (ácido acético 5%). Verificamos que houve interação entre o tratamento com estradiol e a exposição ao sabor doce, aumentando o limiar nociceptivo, porém não houve diferença na medida da latência basal. Houve efeito do ácido aumentando o limiar nociceptivo em todos os grupos e houve interação significativa entre o estresse crônico e a exposição ao ácido, potencializando o aumento do limiar nociceptivo nos grupos estressados. Vinte e quatro h após a última sessão de estresse as ratas foram decapitadas e a medula espinhal dissecada, sendo verificado a captação de liberação de glutamato em sinaptossomas. Houve um aumento da captação de glutamato nas ratas com reposição de estradiol e uma diminuição nos animais submetidos ao estresse crônico. Observou-se também um aumento da expressão dos transportadores de glutamato analisados por *western blot* (GLAST, GLT1 e EAAC1) no grupo EO, sem efeito do estresse sobre a expressão desses transportadores. Não houve diferença significativa na liberação de glutamato. No que concerne a avaliação do estresse oxidativo, houve uma diminuição do potencial antioxidante total (TRAP) e um aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) naqueles animais submetidos ao estresse crônico (EO e EH). Além disso, os grupos com reposição de estradiol (CH e EH) apresentaram uma diminuição da atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx). Não houve diferença na lipoperoxidação analisada pelo teste de TBARS. Os resultados acima sugerem que o estradiol module a resposta nociceptiva ao sabor doce. O ácido acético foi capaz de induzir antinocicepção, e esse efeito foi potencializado pelo estresse. Os resultados sobre a captação de glutamato sugerem um possível efeito neuroprotetor da reposição com estradiol, aumentando a captação de glutamato pela diminuição de seus transportadores. Em contraste, o estresse crônico diminui a captação de glutamato. Além disso, o estresse crônico diminuiu defesas antioxidantes e aumenta a atividade da enzima SOD, talvez por um aumento da formação de íons superóxidos. Com isso, tanto a exposição ao estresse crônico como o tratamento de reposição de estradiol parecem induzir mecanismos plásticos na medula espinhal.

1- Introdução

Desde o pioneiro trabalho do austríaco Hans Selye: “*What is stress*” (1936), o uso da palavra *stress* tornou-se popular em todo o mundo, tanto na literatura médico – científica quanto na sociedade em geral (Karel, 2001; Korte, 2005). A palavra *stress*, no início do século 20, foi retirada de estudos da Física, onde era usada para definir um grau de deformidade sofrido por um material sólido quando submetido a um esforço ou tensão (Strain). Popularmente, o termo é utilizado em relação a qualquer fator que possa virtualmente causar alguma doença em animais, inclusive em humanos.

A maioria dos cientistas interpreta o estresse como uma situação onde o eixo hipotálamo- hipófise- adrenal está respondendo com elevados níveis de ACTH e glicocorticóides (Ganong, 1995). Outros sugerem que a ativação de outros sistemas com ou sem elevação de ACTH podem refletir um distúrbio à homeostase induzido por estressores (Karel, 2001).

1.1- Definição de Estresse

Walter Cannon (1929, 1939) foi o primeiro a introduzir o termo “homeostase” para descrever “*um conjunto de processos fisiológicos coordenados os quais mantêm a maioria dos estados de repouso do organismo*”. Ele ressaltou a importância do sistema nervoso simpático como um sistema essencial na manutenção da homeostase após distúrbios induzidos por agentes aversivos

promovendo a sobrevivência do organismo. Contudo, ele nunca utilizou o termo estresse.

Como citado acima, somente em 1936 o termo *stress* foi popularizado por Selye por meio de uma carta publicada na revista *Nature*. Baseado em uma tríade patológica descrita como hipertrofia das adrenais, ulceração gastrointestinal e involução timicolinfática, provavelmente causada por uma série de estressores, Selye (1936) formulou sua teoria do estresse na qual enfatiza que o organismo reage a qualquer tipo de situação aversiva com respostas fisiológicas generalizadas introduzindo, desse modo, a “síndrome do estresse”. Esse autor focou principalmente o eixo Hipotálamo – Pituitária - Adrenal (HPA) como chave efetora na resposta ao estresse. Ele considerou o córtex da adrenal “um órgão de integração, o qual participa dos estados fisiológicos normais e patológicos de virtualmente todos os tecidos do organismo”.

Selye também introduziu o conceito - “síndrome da adaptação geral”, determinado por três estágios sucessivos: o de alarme, onde o agente estressor seria notado; o de resistência, no qual o organismo estaria combatendo o agente nocivo; e o de exaustão, que representaria o esgotamento do organismo por responder a um agente aversivo durante um tempo prolongado.

Recentemente, McEwen (1998) introduziu o termo Alostase na pesquisa relacionada ao estresse, no qual refere-se à habilidade do organismo em manter estável seu estado fisiológico geral perante mudanças induzidas por estressores. Essa estabilização recrutaria a produção de vários mediadores como esteróides das adrenais, catecolaminas, citocinas, mediadores teciduais e, recentemente, a regulação gênica de receptores de glicocorticóides (GCs), modulando as

respostas ao estresse no sistema nervoso central (SNC) (Keith *et al.*, 2005). Por exemplo, sobre situações de exposição a um estresse crônico, um conjunto de respostas são iniciadas levando a mudanças adaptativas (alostase).

1.2- Estresse e Nocicepção

O Sistema Nervoso apresenta a capacidade de alterar seu funcionamento diante de situações novas, ou da repetição de situações semelhantes, o que chamamos de plasticidade. Entre os diferentes fenômenos de plasticidade neural estão as alterações plásticas sofridas pelo sistema nervoso frente a estímulos estressantes. Em relação aos efeitos da exposição do estresse crônico, incluem-se as alterações na nocicepção. Dados prévios do laboratório indicam que ratos machos estressados cronicamente por contenção apresentam diminuição na latência de retirada da cauda em resposta a um estímulo térmico nocivo (*tail-flick*), caracterizando uma resposta hipernociceptiva, tanto na medida basal quanto após exposição à imobilização (Gamaro *et al.*, 1998). Assim, sabemos que a exposição repetida a estressores induz hipernocicepção em ratos (Gamaro *et al.*, 1998). Embora os mecanismos responsáveis por esse efeito não estejam bem determinados, acreditamos que possa ser modulado por diferentes neurotransmissores e por hormônios (Torres *et al.*, 2002; 2003; Fontella *et al.*, 2004), e possivelmente também por hormônios sexuais, visto que esses efeitos apresentam-se diferentes em machos e em fêmeas (Gamaro *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2002).

Existem evidências de que a expressão da nocicepção seja modulada de maneira diferente segundo o sexo dos animais (Bodnar *et al.*, 1988; Kavaliers e Innes, 1987, 1992; Romero e Bodnar, 1986; Romero *et al.*, 1987). Além disso, diferenças no número e distribuição de receptores opióides centrais em machos e em fêmeas têm sido relatadas (Hammer, 1990; Dantas, 2005). Isto resulta na possibilidade de diferenças em uma variedade de componentes associados com a regulação da nocicepção. Conforme colocado acima, o estresse repetido por contenção em machos induz hipernocicepção, enquanto não foram observados efeitos do estresse em fêmeas sem controle do ciclo estral (Gamaro *et al.*, 1998). É importante observar que o limiar nociceptivo pode variar em fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (Martinez-Gomez *et al.*, 1994). Aparentemente, quando essas respostas são homogeneizadas por meio de ovariectomia, pode-se observar hipernocicepção após estresse repetido (Fontella *et al.*, 2004).

No que concerne as respostas nociceptivas ao estresse crônico, é interessante observar que ratos machos estressados apresentam diferentes respostas nociceptivas após exposição a sabores agradáveis e desagradáveis, quando comparados com os controles (Fontella *et al.*, 2004). Não se sabe como as fêmeas estressadas repetidamente respondem a esses estímulos relacionados a sabores.

Os mecanismos pelos quais a hipernocicepção é induzida nesses animais estressados não estão bem determinados. Diferentes mecanismos foram sugeridos, como alteração no sistema opióide (Torres *et al.*, 2003), por exemplo, diminuição na densidade de receptores opióides na medula espinhal, além de outras estruturas como hipocampo e córtex (Dantas *et al.*, 2005), ou alterações na hidrólise de

nucleotídeos da adenina (Torres *et al.*, 2002), mostrando o envolvimento do sistema adenosinérgico sobre as variáveis estresse e nocicepção. Essas observações nos dão um panorama parcial dos efeitos do estresse repetido sobre a neuromodulação na medula espinhal.

Entre os mecanismos potencialmente capazes de levar a um estado hipernociceptivo, está uma maior ativação do sistema glutamatérgico na medula espinhal, podendo esse estar sendo influenciado pelos efeitos do estresse e de hormônios gonadais, como o estradiol.

1.3- Nocicepção e Estradiol

O estradiol age na regulação de diferentes funções do encéfalo, incluindo aquelas que controlam a secreção de gonadotrofinas e o comportamento sexual feminino (Craft *et al.*, 2004). Também está envolvido na regulação da nocicepção e da analgesia. Contudo, a extensão de seus efeitos e os mecanismos pelos quais atua na sensibilidade dolorosa não são ainda completamente conhecidos (Craft *et al.*, 2004).

Diferentes estudos têm analisado a sensibilidade dolorosa durante o ciclo estral; contudo existem inconsistências no achados (Frye *et al.*, 1992). Verificou-se que durante a noite do proestro, quando os níveis de estradiol e progesterona estão diminuindo, as latências no teste de retirada de cauda são reduzidas quando comparadas ao metaestro (Frye *et al.*, 1992). Outros autores não observaram diferenças significativas na nocicepção durante o ciclo estral das ratas (Ryan e Meyer, 1988). Esses diferentes achados podem ser explicados talvez pelos

diferentes protocolos aplicados. Além disso, animais ovariectomizados tratados com estradiol apresentam aumento da sensibilidade dolorosa, com maior amplitude entre 1 e 3 dias de tratamento (Forman *et al.*, 1985). A hiperalgesia resultante pode ser devida a alterações nos níveis de β -endorfina no hipotálamo e nos receptores opióides (Forman *et al.*, 1985).

O aumento dos receptores Kappa opióides também tem sido sugerido para explicar a sensibilidade dolorosa elevada durante a administração de estradiol (Wilkinson *et al.*, 1985). Receptores ao estradiol não estão presentes somente em estruturas supraespinhais mas também em camadas da medula espinhal dorsal, ou seja, áreas do SNC onde ocorre o processamento inicial da sensibilidade dolorosa. Neurônios encefalinérgicos no corno dorsal superficial da medula espinhal são componentes essenciais do sistema inibitório da sensibilidade dolorosa endógena, mediando a inibição de células responsáveis por estímulos nociceptivos (Ma *et al.*, 1997). Por outro lado, a administração subcutânea de estradiol em ratas ovariectomizadas aumenta a transcrição do gene para a encefalina na medula espinhal (Amandusson *et al.*, 1999), em contraste com a redução desse peptídeo em ratas ovariectomizadas sem reposição do hormônio.

1.4- Nocicepção e Glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. Evidências provenientes das últimas décadas indicam que esse aminoácido tem um papel crucial no processo nociceptivo. Glutamato e seus

receptores estão localizados em áreas do encéfalo e medula espinhal que estão envolvidas com a transmissão e sensação dolorosa (nociceptiva). O glutamato atua em vários tipos de receptores (Cyr *et al.*, 2001), incluindo ionotrópicos (acoplado a canais iônicos) e metabotrópicos (acoplado a proteínas G, ativando cascatas de segundos mensageiros). Receptores ionotrópicos incluem aqueles que são seletivamente ativados por N-metil-D-aspartato, alfa-amino-3-hidroxi-5-metiloxazole-4-propiónico e kainato. Receptores do tipo metabotrópico para o glutamato são classificados em três grupos, com base em uma seqüência de homologia, mecanismos de transdução de sinal e farmacologia de receptores.

O glutamato também interage com o sistema opióide (Niederberger *et al.*, 2003); a co-administração sistêmica ou intratecal de antagonistas glutamatérgicos junto a opióides pode aumentar a analgesia e, além disso, reduzir o desenvolvimento da tolerância e da dependência opióide (Chiao *et al.*, 2004).

As ações do glutamato no encéfalo têm se mostrado muito complexas. Ativações de receptores de glutamato em algumas áreas encefálicas têm se mostrado como pró-nociceptivas (e.g. tálamo, núcleo trigeminal) (Cyr *et al.*, 2001), embora a ativação de receptores glutamatérgicos em outras regiões encefálicas evidencia-se como antinociceptiva (e.g. substância cinzenta periaquedutal, medula oblonga ventrolateral (Fundytus *et al.*, 2002). A aplicação de glutamato ou agonistas seletivos para um tipo específico de receptores glutamatérgicos em estruturas do Sistema Nervoso Periférico (SNP) e do Sistema Nervoso Central (SNC), como medula espinhal, induz comportamentos nociceptivos (Niederberger *et al.*, 2003). A inibição da liberação de glutamato ou o bloqueio de receptores

glutamatérgicos, na medula espinhal ou SNP atenua dores agudas e crônicas em modelos animais. Benefícios similares têm sido vistos em estudos envolvendo humanos (pacientes e voluntários); todavia, esses resultados mostram-se inconsistentes (Fundytus *et al.*, 2002). Esse neurotransmissor tem sido implicado na manutenção de estados de hipersensibilidade na medula espinhal em relação a estímulos nociceptivos (Niederberger *et al.*, 2003).

O glutamato é liberado a partir de vesículas na fenda sináptica e, em excesso, pode causar excitotoxicidade, de modo que sua recaptação é crucial para uma comunicação sináptica eficiente e prevenção da neurotoxicidade. Após a exposição ao estresse repetido, observou-se que a captação de glutamato por terminais sinápticos estava aumentada em hipocampo, assim como a liberação basal (independente de despolarização) de glutamato (Fontella *et al.*, 2004). É interessante verificar se tais alterações podem ser observadas em medula espinhal, o que poderá explicar, pelo menos em parte, as alterações nociceptivas observadas em ratas estressadas repetidamente em comparação com controles, com e sem reposição com estradiol.

1.5- Estresse Oxidativo

Nos últimos anos, têm aumentado as evidências de que as espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas em dano tecidual, como resultado de uma grande variedade de insultos. Essas substâncias incluem peróxido de hidrogênio e outras formas químicas conhecidas como radicais livres. Estes últimos são fortemente oxidantes e apresentam pelo menos um elétron

desemparelhado, geralmente no orbital mais externo (Meneghini, 1987). Portanto, “Radical Livre” (RL) é qualquer espécie química (átomo ou molécula) capaz de existência independente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no orbital mais externo (Halliwell e Gutteridge, 1984). Exemplos são o ânion superóxido, os radicais hidroxila e peroxila, os quais são produzidos a partir de muitas reações normais e essenciais dos processos biológicos (Halliwell e Cross, 1994).

A principal fonte de EROs é o metabolismo oxidativo mitocondrial, a partir de reações enzimáticas envolvendo uma função mista de oxidação e de auto-oxidação de pequenas moléculas. As EROs são formadas, por exemplo, durante o processo da respiração celular, quando o oxigênio (O_2) é transformado em água (H_2O) pela citocromo oxidase, recebendo quatro elétrons de uma só vez. Devido à configuração eletrônica do O_2 , ele possui a tendência de receber um elétron de cada vez. Assim, ocorre a formação de compostos intermediários altamente reativos, como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}). Reações de oxidação de função mista também ocorrem no citoplasma, membrana plasmática e nuclear, retículo endoplasmático e peroxissomas (Simonian e Coyle, 1996).

As EROs são altamente reativas e capazes de danificar muitas macromoléculas como ADN, ARN, proteínas e lipídios (Allen, 1993). Uma consequência particular dos ataques mediados pelas EROs é o acúmulo de macromoléculas danificadas oxidativamente, que acabam levando, se não forem

removidas *in vivo* em tempo, a mutações genéticas e senescência celular (Harman, 1992).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação de EROs, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (Mello Filho *et al.*, 1983). Conseqüentemente, há perda na seletividade da troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), culminando na morte celular (Hershko, 1989). A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas são apresentadas nas reações abaixo (Figura 1), onde L representa o lipídio (Gardês-Albert *et al.*, 1991).

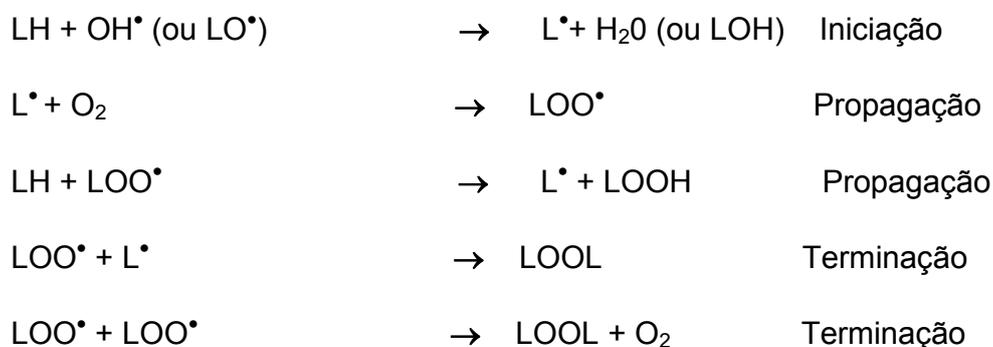


Figura 1: Etapas da reação em cadeia da peroxidação lipídica.

A reação acima inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo OH^{\bullet} ou pelo LO^{\bullet} (radical alcóxila), com conseqüente formação de L^{\bullet} (radical

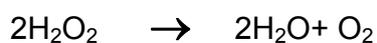
lipídico). Na primeira equação de propagação, o L^\bullet reage rapidamente com o O_2 , resultando em LOO^\bullet (radical peroxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o LOO^\bullet na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L^\bullet e LOO^\bullet) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem a si próprios.

A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, ao câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (Shan *et al.*, 1990). Cabe ressaltar que, assim como na formação de EROs, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (Halliwell e Gutteridge, 1990). Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (Ross e Moldeus, 1991).

Uma diversidade de sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como não-enzimáticos, funciona para controlar os níveis excessivos de EROs (Halliwell e Cross, 1994). Uma célula geralmente é capaz de manter o balanço apropriado entre oxidantes e antioxidantes em condições normais. Quando esse balanço é perturbado e se modifica, devido ao aumento nos oxidantes ou por diminuição nos antioxidantes, a célula torna-se mais susceptível a injúrias, como trauma, por exemplo (Sies, 1997). Estresse oxidativo, portanto, se refere às conseqüências citopatológicas do desequilíbrio entre produção de radicais livres e a habilidade da célula de se defender contra eles.

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação desse substrato enzimático ou não-enzimático (Halliwell & Gutteridge, 1999). Na lipoperoxidação (LPO), antioxidantes podem atuar diminuindo as concentrações localizadas de O₂, podem prevenir a iniciação por ação de "scavenger" sobre radicais iniciadores como o hidroxil e também podem se ligar a íons metálicos (quelantes), impedindo a geração de espécies iniciadoras ou não decompondo lipídios peróxido a radicais alcoxila e peroxila. Os antioxidantes também podem decompor peróxidos, convertendo-os em produtos não-radicais como álcoois (glutathiona peroxidase) ou, ainda, podem neutralizar radicais intermediários como peroxila e alcoxila, prevenindo a propagação. Neste caso são chamados "quebradores de cadeia", pois impedem a reação em cadeia resultante da lipoperoxidação; esses normalmente são fenóis e aminas aromáticas.

Para proteger as células contra o dano oxidativo ocasionado por oxidantes produzidos durante o metabolismo do oxigênio, enzimas antioxidantes constituem um importante sistema de defesa para neutralizar as prejudiciais EROs *in vivo*. A superóxido dismutase (SOD), incluindo a MnSOD na mitocôndria e a CuZnSOD no citosol, rapidamente converte o ânion superóxido (O₂^{•-}) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) podem decompor H₂O₂ a água (Cabala-Picot *et al.*, 1992). A catalase catalisa a reação:



As peroxidases apresentam como reação geral:



Alguns fatores que diminuem as atividades das enzimas antioxidantes levam ao acúmulo de EROs e, subseqüentemente, a dano oxidativo a macromoléculas biológicas (Cabalas-Picot *et al.*, 1992).

O radical hidroxila (OH^*) pode ser formado a partir da reação do ânion superóxido com o peróxido de hidrogênio em presença de íons divalentes de metais de transição (reação de Haber-Weiss), pela reação de Fenton ou, ainda, a partir do óxido nítrico. Na Figura 2, estão expressas algumas reações importantes do ponto de vista de produção de EROs e de defesa celular enzimática.

Além dos sistemas de defesa enzimática acima citados, existe um sistema de interceptação dos radicais formados, que vem a ser um sistema de defesa não enzimático. Neste caso, ocorre a desativação e destruição das EROs, impedindo a oxidação posterior de outras moléculas. As substâncias envolvidas nesse tipo de defesa são denominadas "*scavengers*", uma vez que elas se ligam com um radical livre, formando um não-radical ou um radical menos lesivo. "*Scavenger*" é uma substância que neutraliza a ação dos RL na fase de iniciação ou propagação da lipoperoxidação (LPO), formando produtos (radicais) menos tóxicos. O sistema de defesa não-enzimático é composto de antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides, flavonóides) e de antioxidantes hidrofílicos (ascorbato, glutathione, indóis, catecóis) (Sies e Murphy, 1991). É nesse sistema de defesa (não-

enzimático) que se enquadram os estrógenos. Eles agem como "scavenger" de RL, uma vez que são terminadores da reação de oxidação em cadeia dos RL, suprimindo a peroxidação tanto *in vivo* como *in vitro* (Niki e Nakano, 1990).

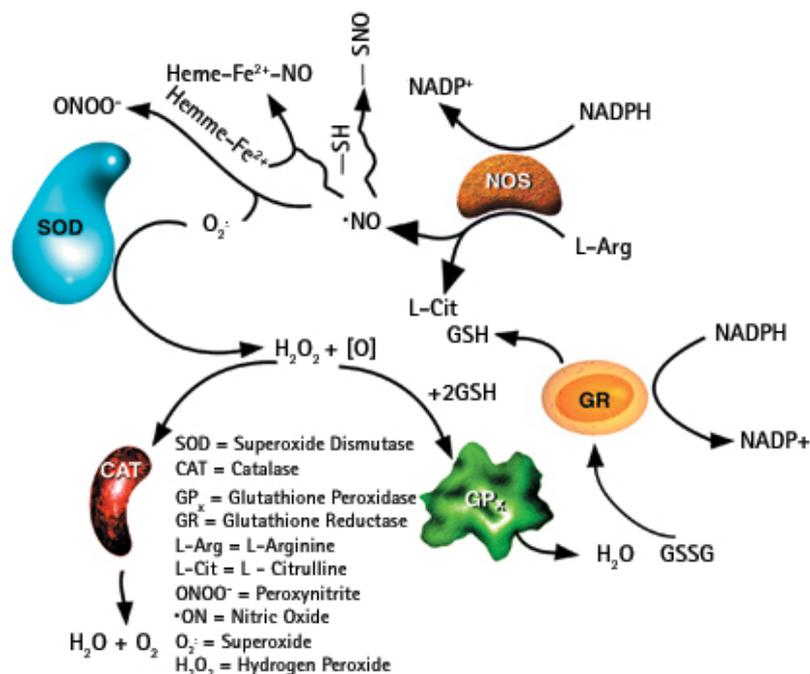


Figura 2: Reações importantes para a produção e defesa de radicais livres em neurônios (www.merckbiosciences.co.uk/html/cbc/oxidative).

O estresse oxidativo está envolvido em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, a esclerose amiotrófica lateral e a doença de Parkinson (Simonian e Coyle, 1996; Richardson, 1993; Ben-Shachar e Riederer, 1991). EROs também estão envolvidas na injúria causada pela isquemia por reperfusão

(Braugher e Hall, 1989), no envelhecimento (Ames *et al.*, 1993), nos efeitos induzidos pela exposição ao estresse crônico (Manoli *et al.*, 2000) e no envolvimento de processos nociceptivos (Guedes *et al.*, 2006)

1.6- Estresse e EROs

Vários estudos têm mostrado que o estresse é acompanhado pela ativação de processos mediados por radicais livres, particularmente a peroxidação lipídica. (Sudakov e Sosnovsky, 1996). Esse evento pode danificar membranas celulares e interferir com a atividade das enzimas associadas às membranas. Esse processo é normalmente interrompido pela presença de sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Além disso, Fontella e colaboradores (2005) demonstram que o estresse por imobilização induz a formação de espécies reativas de oxigênio, levando ao prejuízo das defesas antioxidantes, ocasionando dano oxidativo e mudança considerável no balanço entre fatores oxidativos e antioxidantes no encéfalo.

Uma exposição prolongada aos glicocorticóides (GCs) no estresse crônico, como já relatado, pode gerar diversos efeitos deletérios, incluindo dano aos neurônios, além de acelerar o processo de envelhecimento (Sapolsky, 2004). A grande variedade de insultos relacionados com os GCs indicam um desvio de uma ou mais vias celulares fundamentais. As características comuns bem conhecidas dos insultos que são exacerbados pelos GCs incluem desvio e diminuição da energia celular, problemas na homeostasia do cálcio e ativação da cascata de aminoácidos excitatórios (McEwen, 1992; Sapolsky, 1994). Todas essas

características estão relacionadas com um aumento na geração de EROs, que podem diretamente danificar proteínas celulares, ADN e lipídios, afetando, assim, todas as funções celulares.

Os GCs, além de estarem envolvidos no aumento das EROs, também afetam enzimas antioxidantes em tecidos expostos a eles, tanto em um nível basal quanto na presença de um estressor oxidativo (McIntosh *et al.*, 1998).

2- Objetivos:

2.1- Objetivos Gerais:

De acordo como o exposto acima, a presente dissertação de mestrado teve como objetivos gerais pesquisar a influência do estresse crônico repetido por contenção e da reposição com estradiol sobre a nocicepção, sobre a transmissão glutamatérgica e sobre o estresse oxidativo na medula espinhal em ratas ovariectomizadas.

2.2 - Objetivos Específicos:

2.2.1- verificar o efeito do estresse repetido por contenção sobre a resposta nociceptiva em fêmeas ovariectomizadas com e sem reposição com estradiol após estímulos agradáveis (sabor doce) ou desagradáveis (sabor ácido);

2.2.2- verificar o efeito do estresse repetido por contenção sobre a liberação de glutamato por sinaptossomas de medula espinhal e sobre a captação de glutamato por sinaptossomas de medula espinhal, como também investigar a expressão de transportadores de glutamato: transportador de glutamato e aspartato (GLAST),

transportador de glutamato tipo 1 (GLT1) e carreador de aminoácidos excitatórios tipo 1 (EAAC1) em fêmeas ovariectomizadas com e sem reposição com estradiol;

2.2.3- estudar o efeito do estresse repetido por contenção em fêmeas ovariectomizadas com e sem reposição com estradiol sobre parâmetros do estresse oxidativo em medula espinhal. Para isso, os seguintes parâmetros foram analisados:

Ensaio não-enzimáticos:

2.2.4-TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Potential*), potencial antioxidante total;

2.2.4- TBARs (*Thiobarbituric Acid-Reactive Substances*), ensaio de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, o qual avalia a lipoperoxidação.

Ensaio enzimáticos:

2.2.5- Atividade da superóxido dismutase (SOD);

2.2.6- Atividade da glutaciona peroxidase (GPx).

3- Materiais e Métodos

3.1. Animais:

Foram utilizadas ratas *Wistar* adultas (60 dias). Os animais, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, foram mantidos em caixas-moradia, confeccionadas em "plexiglas", medindo 41 x 34 x 16 cm, com assoalho recoberto de serragem. Os animais foram submetidos a um ciclo normal claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 7 às 19 h), com ração padronizada e água "*ad libitum*".

3.2. Cirurgia para ovariectomia:

Ovariectomia (OVX) foi realizada anestesiando-se os animais com 120 mg/kg cetamina HCl (Dopalen: Agribands, Campinas, SP, Brasil) e 16 mg/kg xilazina (Anasedan: Agribands, Campinas, SP, Brazil) i.p., e a ovariectomia bilateral foi realizada por uma única incisão abdominal. Foi feita uma incisão de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na pele e tecido sub-cutâneo entre a última costela e a coxa, a cerca de 1 cm da linha mediana. Uma segunda incisão atinge a camada muscular, expondo a cavidade peritoneal. Os ovários são expostos, efetua-se uma ligadura abaixo da tuba uterina, e os ovários são retirados. Após, os tecidos foram suturados, em planos separados, a camada muscular e a cutânea.

Após um período de recuperação de pelo menos uma semana, os animais foram novamente submetidos à anestesia e receberam implantes subcutâneos de uma cápsula de silicone (1.02 mm diâmetro interno x 2.16 mm diâmetro externo; Medicone®, Multiplast, Brazil) contendo 10 µl de β-estradiol a 5% (p:v) ou veículo (óleo de girassol).

Os animais foram distribuídos entre os seguintes grupos: 1) OVX (cápsula contendo óleo), N=50; 2) OVX (cápsula contendo óleo) + estresse repetido, N=50; 3) OVX + reposição com estradiol (cápsula contendo 17β-estradiol), N=50; 4) OVX + reposição com estradiol (cápsula contendo 17β-estradiol) + estresse repetido, N=50.

3.3. Exposição ao estresse por contenção:

Para o estresse crônico, os animais foram imobilizados em um tubo de plástico, com cerca de 7 cm de diâmetro, sendo que esse diâmetro podia ser ajustado segundo o animal, durante 1 h por dia, 5 dias/semana, por 40 dias, entre 12:00 e 16:00 (Gamaro *et al.*, 1998). Após esse período os animais foram submetidos aos testes comportamentais (TFL) e às análises bioquímicas.

3.4. Medida da resposta nociceptiva a um estímulo térmico nocivo (medida da latência de retirada de cauda, TFL):

Foi feita em aparelho de *tail-flick* (TFL) (Figura 3), conforme técnica descrita por D'Amour e Smith (1941). Os ratos foram contidos, utilizando-se uma toalha de pano, e colocados no aparelho com a cauda imobilizada sobre uma fenda delimitada por duas chapas de metal. Uma fonte luminosa fixa estava colocada 2 a 3 cm rostral à ponta da cauda do animal. O acionamento da fonte luminosa dispara automaticamente um cronômetro digital. A deflexão da cauda, motivada pelo calor irradiado pela lâmpada, desobstrui o feixe de luz que ativa uma fotocélula, o que, por sua vez, encerra a medida (trava o cronômetro). Um limite superior de 10 s foi imposto às medidas para evitar danos teciduais aos animais. O teste baseia-se no princípio de que o calor intenso produzido pela focalização da luz na cauda provoca um reflexo medular de caráter nociceptivo (D'Amour e Smith, 1941; Netto *et al.*, 1987). Foi realizada uma primeira medida com a finalidade de habituar o animal ao aparelho 24 horas antes da medida efetiva.

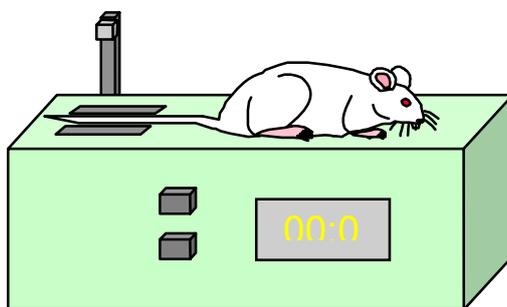


Figura 3: Ilustração do aparelho de *Tail Flick* utilizado nas medidas de latência de retirada de cauda.

3.5. Exposição a sabores agradáveis e desagradáveis:

Para determinar o efeito de sabores agradáveis e desagradáveis sobre a nocicepção, os animais foram submetidos a ambos os sabores, porém em dias diferentes. O procedimento aconteceu do seguinte modo:

- (a) Efeito do sabor doce sobre a nocicepção: Os animais foram expostos nas suas caixas-moradia, durante 5 minutos com 10 roscas doces (Froot loops, Kellogg's[®]). Os animais foram familiarizados com esse procedimento previamente. A nocicepção foi avaliada através do teste de latência de retirada da cauda antes (medida basal) e imediatamente após essa exposição ao sabor doce.
- (b) Efeito de um sabor desagradável sobre a nocicepção: Os animais foram retirados de sua caixa-moradia e com uma seringa de 1 ml o experimentador administrou oralmente aos animais 0,2 ml de ácido acético 5%. Os animais foram submetidos a esse procedimento previamente (mas sem exposição ao sabor ácido, ao invés disso, foi utilizada água) para evitar a novidade do procedimento. A nocicepção foi avaliada através do teste de latência de retirada da cauda antes e imediatamente após a exposição com ácido acético.

3.6. Preparação dos sinaptossomas:

O isolamento de sinaptossomas tem sido intensamente usado como um sistema modelo para a investigação de fenômenos pré-sinápticos, especialmente a captação e liberação de neurotransmissores (Dunkley *et al*, 1988 e Harrison *et al*, 1988).

Aproximadamente 24 h após a última sessão de estresse, os animais foram decapitados e a medula rapidamente dissecada em gelo e homogeneizada em 10 volumes de meio consistindo de sacarose 320 mM, EDTA 1 mM e ditioneitol 0,25 mM, pH 7.4. A fração sinaptossomal foi isolada em um gradiente descontínuo de percoll, de acordo com Dunkley *et al*. (1988). Após centrifugação do homogeneizado a 1000 g por 10 min, o sobrenadante foi colocado gentilmente sobre um gradiente de percoll consistindo de percoll (v:v) 23%, 15%, 10% e 3%, contendo ainda sacarose 320 mM, EDTA 1 mM e ditioneitol 0,25 mM, pH 7,4. Os tubos foram centrifugados a 32.500 g e a fração na interface entre 15% e 23% foi coletada. O material foi preparado no dia do experimento e mantido entre 0 e 4 °C.

3.7. Captação de glutamato de alta afinidade dependente de Na⁺

Foi realizada conforme descrito por Leal *et al*. (2001). As preparações sinaptossomais foram lavadas duas vezes por meio de ressuspensão em três volumes de sacarose 300 mM contendo tampão Tris/acetato 15 mM (pH 7,4) e

centrifugadas a 13.000 *g* por 15 min a 4 °C. O sedimento final foi ressuspenso nesse mesmo meio e incubado em HBSS (solução salina tamponada Hepes/Cl) pH 7,4 (HEPES 27 mM, NaCl 133 mM, KCl 2,4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM , Glicose 12 mM, CaCl₂ 1,0 mM) na presença de 2 μM L-[³H]glutamato (Amersham International, UK, atividade específica 1,97 x 10⁶ GBq/mol), por 1 min a 37 °C. A reação foi interrompida por filtração (filtros GF/B). Os filtros foram lavados três vezes com tampão gelado contendo acetato de amônio 155 mM e a radioatividade nos filtros contada em um cintilador líquido. A captação específica foi determinada pela diferença entre a captação no meio de incubação conforme descrito acima e a captação obtida em uma incubação semelhante contendo cloreto de colina ao invés de NaCl.

3.8. Liberação de glutamato:

Foi medida de acordo com Miguez *et al.* (1999), com pequenas modificações. As preparações sinaptossomais foram lavadas duas vezes por meio de ressusensão em três volumes de HBSS (pH 7,4) e centrifugação a 13.000 *g* por 15 min a 4 °C. O sedimento final foi ressuspenso em 500 μl HBSS (pH 7,4) e incubado no mesmo meio por 15 min a 37 °C, na presença de [³H]glutamato (concentração final, 2 μM). Alíquotas de sinaptossomas marcados foram centrifugadas a 13.000 *g* por 1 min. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos lavados 4 vezes em HBSS por centrifugação a 13.000 *g* por 1 min a 4 °C. A liberação basal de [³H]glutamato foi avaliada ressuspendendo o sedimento em HBSS por 60 s a 37 °C.

A incubação foi interrompida por centrifugação imediata (16.000 g por 1 min a 4 °C). A radioatividade presente nos sedimentos foi medida. A liberação de [³H]glutamato foi calculada como a porcentagem do total de radioatividade na preparação em relação ao início da incubação. A liberação de [³H] glutamato estimulada por K⁺ foi avaliada como descrito acima, exceto que o meio de incubação continha KCl 40 mM (com diminuição proporcional do NaCl) a fim de induzir a despolarização dos sinaptossomas.

3.9. Análise de *Western Blot*

Vinte e quatro horas após a última sessão de estresse, os animais foram sacrificados por decapitação, as medulas espinhais foram dissecadas e congeladas a -70° C. Amostras de medula espinhal foram homogeneizadas em tampão de lise (4% SDS, 2,1 mM EDTA, 50 mM Tris) e foram retiradas alíquotas para a dosagem de proteínas (método de Peterson). Após, β-mercaptoetanol foi adicionado em uma concentração final de 5%. Amostras contendo 40 µg de proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (SDS- PAGE) (Figura 4). Essas proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando o aparato de transferência semi-seco (Bio-Rad Trans-Blot SD) (Figura 5). Após 1 h de incubação a 4°C em solução bloqueadora com leite em pó 5% e 0,1% Tween-20 em Tampão Tris-HCl Salino (TBS; 50 mM Tris-HCl, 1,5% NaCl, pH 7,4), as membranas foram incubadas com anticorpo primário diluído na mesma solução bloqueadora. Anticorpos primários contra suas proteínas específicas foram usados. EAAC1

(1:500, Alpha Diagnostic), GLAST (1:500) e GLT1 (1:500) e permaneceram com a membrana por, aproximadamente, 12 horas. Subseqüentemente, as membranas foram lavadas e incubadas por 2 h com anticorpos secundários conjugados com peroxidase, os quais reconhecem como antígenos os anticorpos primários (diluição 1:1000 em solução bloqueadora) (Figura 6). A imunorreatividade das bandas foi revelada por um Kit amplificador de quimioluminescência (ECL, Pharmacia) e detectada usando filmes de raio X. Os filmes de *immunoblot* foram escaneados e as imagens digitalizadas e analisadas com o *software* Optiquant (Packard Instrument). Para cada experimento, os grupos testados foram comparados com o grupo controle (OVX - cápsula contendo óleo), o qual assumiu-se ter um sinal de intensidade de 100%.



Fig. 4: Aparelho para eletroforese usando gel de poliacrilamida. Utilizado para a separação de proteínas através de seu peso molecular

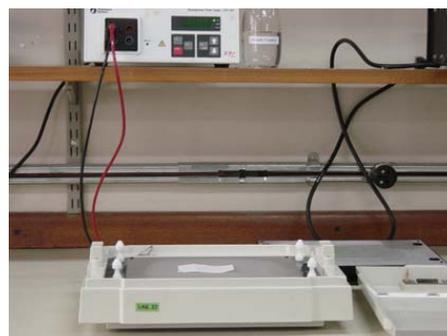


Fig. 5: *Blotter*. Aparelho utilizado na transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose.

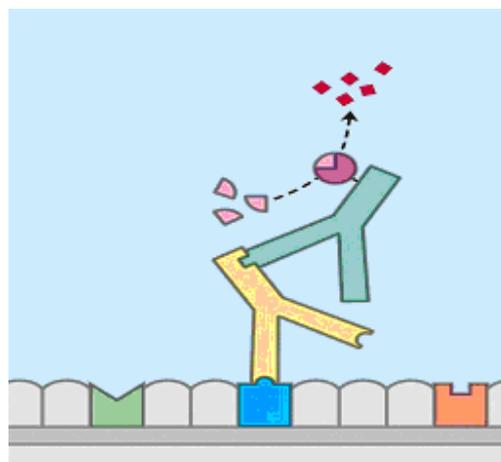
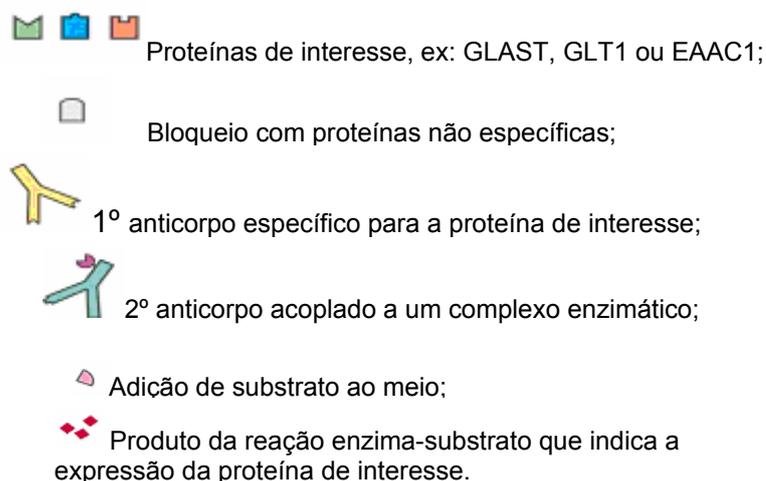


Figura 6: Resumo do princípio das reações da análise de *Western Blot*. Após a transferência para a membrana de nitrocelulose, esta é incubada com um 1º anticorpo específico para a proteína analisada. Após, há uma segunda incubação com um 2º anticorpo (acoplado a uma peroxidase) contra o 1º anticorpo. Após adição de peróxidos, o produto da reação da peroxidase com os peróxidos formará um composto colorido que irá indicar o padrão de expressão da proteína de interesse.

3.10. Preparação das amostras para determinação de estresse oxidativo:

Após os 40 dias de exposição ao estresse, os animais foram sacrificados por decapitação 24 h após a última sessão de estresse. A medula espinhal foi rapidamente dissecada e congelada em nitrogênio líquido. Amostras foram armazenadas a -70° C até a realização das análises, quando foram homogeneizadas em 9 volumes de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 a 4° C. O homogeneizado foi centrifugado a 1.000 g para remover os restos celulares, e o

sobrenadante foi utilizado para ensaios de TBARS, TRAP e enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e glutathione peroxidase). A proteína foi determinada pelo método de Lowry, usando albumina sérica bovina como padrão (Lowry *et al.*, 1951).

3.11. Determinação do potencial antioxidante total (TRAP):

O sobrenadante da centrifugação a 1000 x g foi utilizado para esta determinação. Uma alíquota (50 µl) deste sobrenadante foi adicionada a um sistema gerador de radicais livres e o potencial antioxidante total (TRAP) foi determinado pelo método da quimioluminescência produzida pelo sistema gerador de radicais livres, o qual usa uma fonte de radicais alquilperoxila (2,2'-azo-bis-2-amidinopropano, ABAP) e um amplificador da resposta, luminol, 4mM (Lissi *et al.*, 1992, 1995). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, em sala escura. Aos frascos de cintilação foram adicionados tampão glicina 0,1 M, pH 8,6. Os frascos foram colocados no cintilador líquido beta para medida da quimioluminescência basal. Foi então adicionado ABAP (4mL, 10mM), sendo esta solução de ABAP preparada no dia do experimento, sendo também adicionado luminol (10µl, 4mM). Os frascos foram novamente colocados no cintilador líquido para medida da quimioluminescência inicial (na presença de ABAP). Após, o homogeneizado foi adicionado e a quimioluminescência medida (15 contagens de 20 segundos). Os frascos utilizados para esta técnica foram lavados separadamente de outros materiais do laboratório, com solução detergente (extran 20%), exaustivamente enxaguados com água destilada, fervidos por 10 min e mantidos no

escuro 12h antes do experimento. Foram utilizados frascos novos para evitar contaminação com radioatividade. Os resultados foram expressos como nmol de trolox por mg de proteína.

3.12. Avaliação da Lipoperoxidação (TBARS)

A quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada pelo método baseado na formação de um composto corado entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) adicionado e o malondialdeído (MDA) resultante da lipoperoxidação (Yagi, 1998; Sugihama *et al.*, 1999). Alíquotas das amostras foram incubadas com 10% de ácido tricloroacético (TCA) e 0,67% de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi fervida por 15 min, após isso, n-butanol foi adicionado e a mistura foi centrifugada. A fase orgânica foi extraída e medida sua fluorescência. O composto corado resultante é um aduto, monitorado em espectrofluorímetro com emissão a 553 nm e excitação a 515 nm. 1,1,3,3 tetrametoxipropano foi utilizado como padrão.

3.13. Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD):

O sobrenadante resultante da centrifugação a 1.000 x g foi utilizado para estas determinações. O método utilizado foi feito conforme descrito por Spitz e Oberley (1989), utilizando um kit comercial (RANDOX) e baseia-se na redução de *nitroblue tetrazolium* (NBT) por radicais superóxido, acompanhada a 560 nm à temperatura ambiente. Xantina / xantina oxidase são utilizadas para gerar um fluxo

de radicais superóxido. A mistura para a reação contém xantina 0,15 mM, NBT 0,6 mM, ácido dietilenotriaminopentacético 1 mM, 1 unidade de catalase, 0,13 mg/ml de albumina sérica bovina, ácido batocuprioinedissulfônico, além da amostra. Após 3 min de pré-incubação, a reação foi iniciada pela adição de xantina oxidase. Uma unidade de atividade de superóxido dismutase é definida como a quantidade necessária para reduzir a velocidade da reação em 50%.

3.14. Determinação da atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPX):

O sobrenadante resultante da centrifugação a 1.000 x g foi utilizado para as determinações. O método foi feito conforme descrito por Sinet e colaboradores (1975) e baseia-se na oxidação do NADPH acompanhada a 340 nm a 37° C. A amostra foi adicionada à mistura de reação, contendo glutaciona reduzida (1mM), glutaciona redutase (1,87 U/mL) e NADPH (0,2 mM). Após 5 min de pré-incubação, a absorbância foi acompanhada durante 4 min para monitorar a oxidação de NADPH independente de hidroperóxido. A seguir, hidroperóxido de tert-butila 1 mM foi adicionado à mistura e a velocidade de oxidação de NADPH foi monitorada durante 4 min. A atividade da glutaciona peroxidase foi calculada pela velocidade da oxidação de NADPH menos a velocidade da mesma independente de hidroperóxido menos o valor do branco (sem a amostra).

Análise estatística:

Os dados paramétricos foram expressos como média \pm erro padrão. As comparações de diversos grupos experimentais foram realizadas por análise de variância de duas vias ou de medidas repetidas (estresse e hormônio como variáveis).

Aspectos éticos:

Os procedimentos propostos para o projeto da presente dissertação são de uso habitual por autores que trabalham e publicam na área e foram aprovados pelo Comitê de Ética desta Universidade.

4- Resultados

4.1- Nocicepção:

4.1.1- Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a nocicepção após exposição ao sabor palatável.

Uma ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo da exposição ao doce [$F(1,45)=8,96$, $P=0,004$], além de uma interação significativa entre o tratamento com reposição de estradiol e a exposição ao sabor doce [$F(1, 45)=5,18$, $P=0,028$], apresentando um aumento na latência de retirada de cauda. Não houve diferença significativa na medida da latência basal de retirada de cauda (antes da exposição ao doce) entre os grupos CO, CH, EO e EH, como também não houve efeito do estresse (Figura 7).

4.1.2- Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a nocicepção após exposição ao sabor desagradável (ácido acético 5%).

Uma ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo da exposição ao ácido em todos os grupos estudados (CO, CH, EO e EH) [$F(1, 45)=62,89$, $P<0,001$]. Além disso, houve uma interação significativa entre o estresse crônico repetido e a exposição ao sabor ácido [$F(1, 45)=10,91$, $P<0,05$],

pois os animais estressados apresentaram uma resposta antinociceptiva mais robusta ao sabor ácido que os animais não estressados (Figura 8).

4.2- Captação e liberação de glutamato:

4.2.1- Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a captação de glutamato por sinaptossomas de medula espinhal.

Uma ANOVA de duas vias mostra um efeito da reposição com estradiol (observado no grupo não estressado cronicamente, CH), aumentando a captação de glutamato em sinaptossomas de medula espinhal [$F(1,20)=5,39$, $p=0,003$]. Além disso, houve efeito significativo do estresse crônico (observado no grupo sem reposição de estradiol, EO), diminuindo a captação de glutamato em sinaptossomas de medula espinhal em ratas ovariectomizadas [$F(1,20)=7,94$, $p=0,01$] (Figura 9). No grupo submetido aos dois tratamentos houve uma somação dos efeitos.

4.2.2- Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a liberação de glutamato por sinaptossomas de medula espinhal.

Uma ANOVA de medidas repetidas mostra diferença significativa entre a liberação com baixo K^+ e liberação com alto K^+ [$F(1,16) = 22,99$, $p<0,001$], como era esperado. Porém, não houve diferença na liberação de glutamato entre os grupos (Figura 10).

4.3- Expressão de transportadores de glutamato

4.3.1- Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a expressão do imunoconteúdo do transportador de glutamato GLAST em medula espinhal.

A Figura 11.A apresenta uma amostra representativa dos *imunoblots* obtidos. Na quantificação da expressão do transportador GLAST (Figura 11.B), observou-se que o estradiol parece aumentar a expressão deste transportador, mas somente no grupo não submetido ao estresse crônico (CH) (teste t de Student, pareado; $P = 0,06$). Não houve efeito do estresse crônico.

4.3.2- Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a expressão do imunoconteúdo do transportador de glutamato GLT1 em medula espinhal.

A Figura 12.A apresenta uma amostra representativa dos *imunoblots* obtidos. Na quantificação da expressão do transportador GLT1 (Figura 12.B), observou-se um efeito do estradiol somente no grupo não submetido ao estresse crônico (CH), aumentando expressão do transportador GLT1 (teste t de Student, pareado; $P < 0,05$). Não houve efeito do estresse crônico.

4.3.2- Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a expressão do imunoconteúdo do transportador de glutamato EAAC1 em medula espinhal.

A Figura 13.A apresenta uma amostra representativa dos *imunoblots* obtidos. Na quantificação da expressão do transportador EAAC1 (Figura 13.B), teste t de Student pareado mostrou um efeito do estradiol somente no grupo não submetido ao estresse crônico (CH), aumentando expressão do transportador EAAC1 ($p < 0,05$). Não houve efeito do estresse crônico.

4.4- Parâmetros de estresse oxidativo

4.3.1- Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com reposição de estradiol ou não.

Uma ANOVA de duas vias mostra que os grupos submetidos ao estresse crônico (EO e EH) apresentaram um menor potencial antioxidante total (TRAP) quando comparado com os grupos sem estresse crônico (CO e CH), não havendo efeito da reposição com estradiol (Figura 14).

4.3.2- Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a lipoperoxidação (avaliada pela medida de TBARS) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com ou sem reposição com estradiol.

Uma ANOVA de duas vias mostra que não houve efeito significativo do estresse crônico, da reposição com estradiol e nem interação entre os tratamentos sobre a lipoperoxidação, avaliada pelo teste do TBARS (Figura 15) ($p > 0,05$ para todos os casos).

4.3.3- Efeito da exposição ao estresse crônico repetido por contenção sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com ou sem reposição com estradiol.

Como pode ser observado na Figura 16, uma ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do estresse crônico, aumentando a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos grupos EO e EH ($p < 0,05$), não havendo efeito da reposição com estradiol ($p > 0,05$).

4.3.4- Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com ou sem reposição com estradiol.

Uma ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo da reposição com estradiol, diminuindo a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) nos grupos CH e EH ($p < 0,05$ para o tratamento com hormônio). Não houve efeito do estresse crônico ou interação entre os tratamentos (Figura 17).

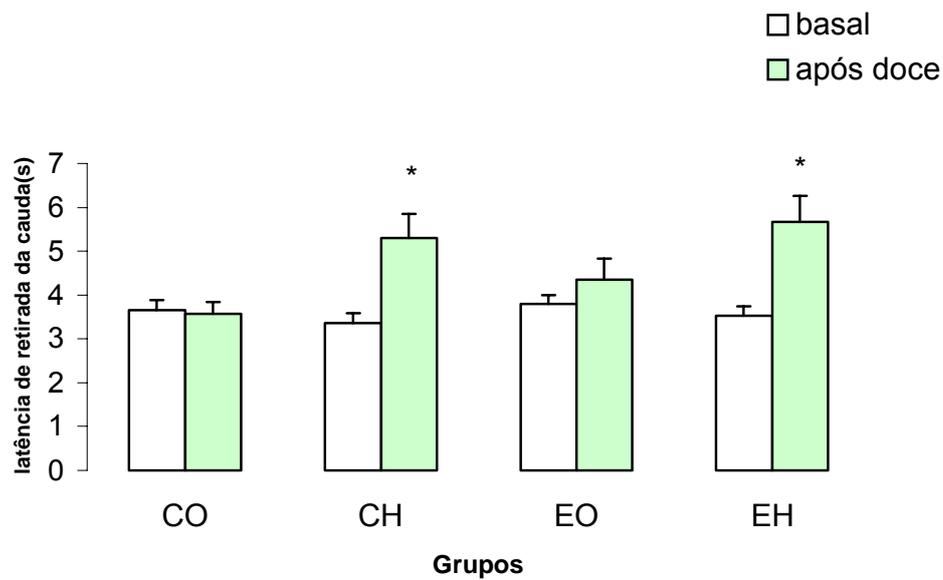


Figura 7: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a nocicepção após exposição ao sabor palatável (doce) em ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão para os grupos: controle + óleo (CO), controle + hormônio (CH), estresse + óleo (EO) e estresse + hormônio (EH). Foi utilizada uma ANOVA de medidas repetidas. * $p < 0,05$, efeito significativo da reposição com estradiol após a exposição ao sabor doce. N=19-21 animais por grupo.

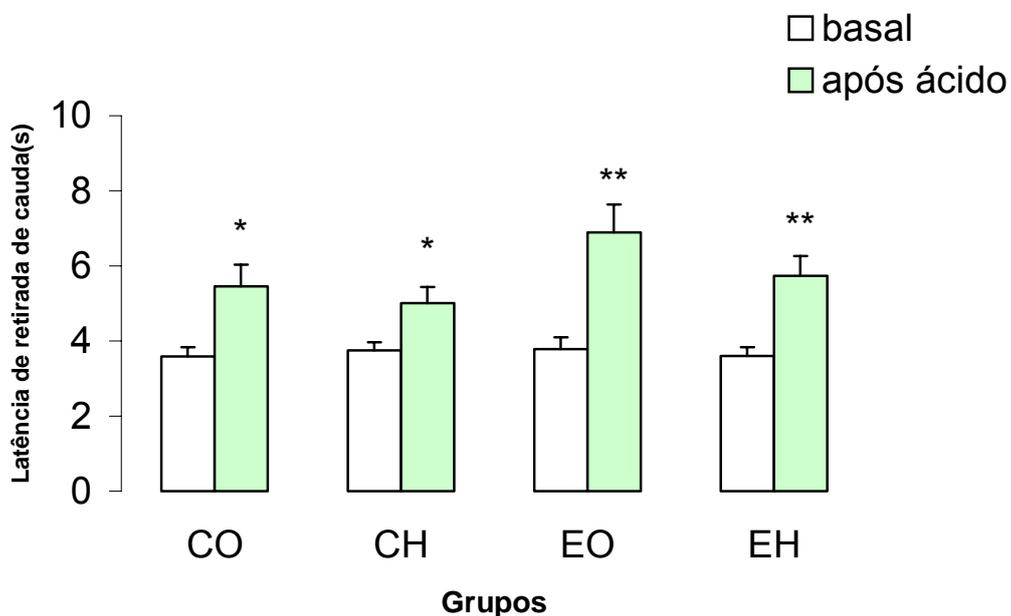


Figura 8: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a nocicepção após exposição ao sabor desagradável (ácido acético 5%) em ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão para os grupos: controle + óleo (CO), controle + hormônio (CH), estresse + óleo (EO) e estresse + hormônio (EH). Foi utilizada uma ANOVA de medidas repetidas. * $P < 0,05$, diferença significativa entre a medida de latência de retirada de cauda basal e após a exposição ao ácido. ANOVA de medidas repetidas. ** interação significativa do tratamento com estresse crônico e exposição ao sabor ácido. N=19-21 animais por grupo.

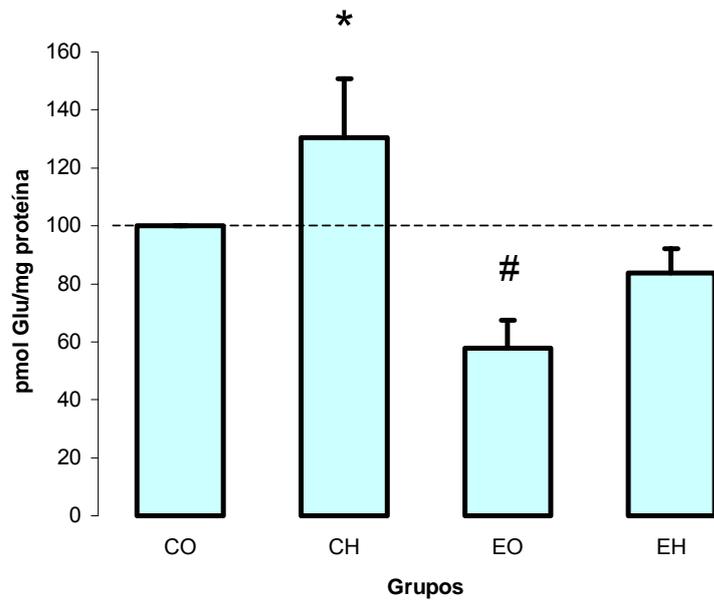


Figura 9: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a captação de glutamato por sinaptossomas de medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão para os grupos: controle + óleo (CO), controle + hormônio (CH), estresse + óleo (EO) e estresse + hormônio (EH). * $P < 0,05$ para o tratamento com estresse. # $P < 0,05$ para o tratamento com estradiol, ANOVA de duas vias. N= 5-7 animais por grupo.

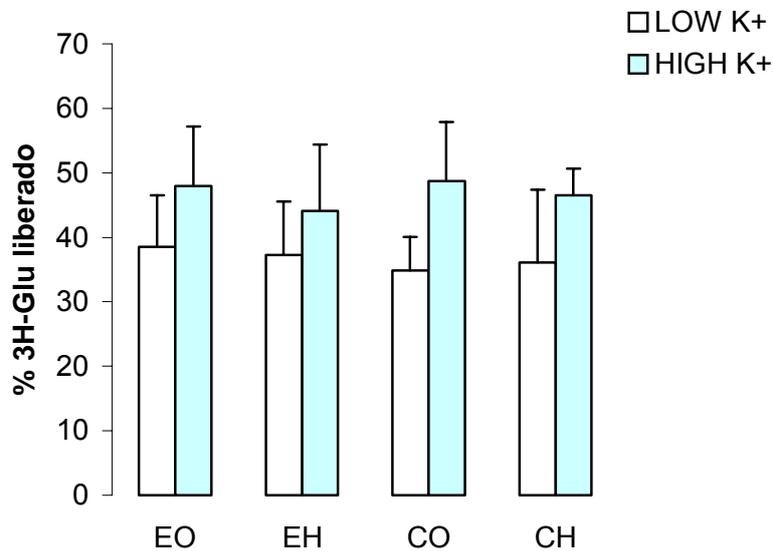


Figura 10: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a liberação de glutamato por sinaptossomas de medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média para os grupos: controle + óleo (CO), controle + hormônio (CH), estresse + óleo (EO) e estresse + hormônio (EH). $P < 0,05$ para alto K^+ , em relação ao baixo K^+ . ANOVA de medidas repetidas. Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$ para todos os casos). $N = 5-7$ animais por grupo.

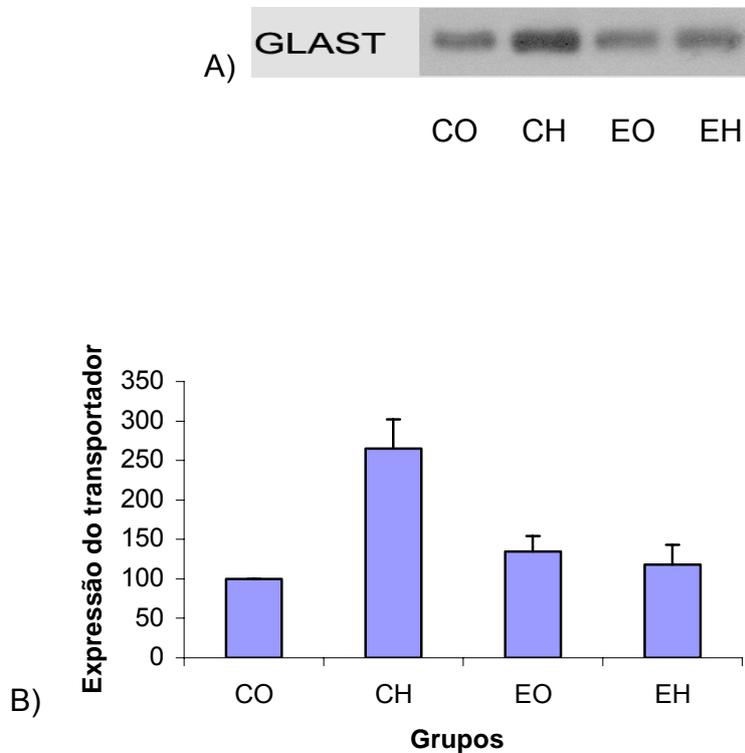


Figura 11: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a expressão do imunoconteúdo do transportador de glutamato GLAST em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol. A parte A apresenta uma amostra representativa dos *imunoblots* obtidos. A parte B mostra os dados expressos como média \pm erro padrão da média e analisados em relação à porcentagem do grupo controle (CO), sendo os grupos: controle + óleo (CO), controle + hormônio (CH), estresse + óleo (EO) e estresse + hormônio (EH). $P=0,06$ para o tratamento com estradiol (CH) em relação ao controle (CO). $N= 6$ animais por grupo.

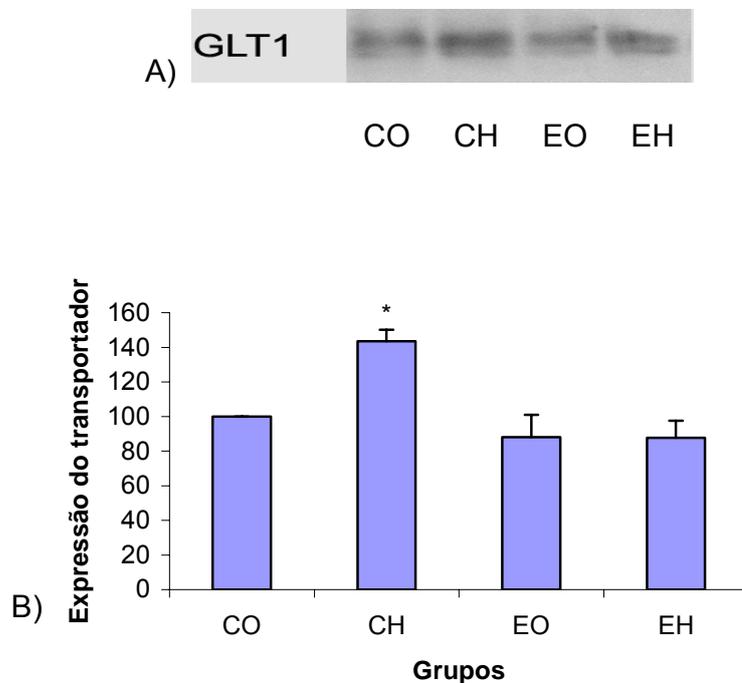


Figura 12: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a expressão do imunocontéudo do transportador de glutamato GLT1 em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol. A parte A apresenta uma amostra representativa dos *imunoblots* obtidos. A parte B mostra dados expressos como média \pm erro padrão da média e analisados em relação à porcentagem do grupo controle (CO), sendo os grupos: controle + óleo (CO), controle + hormônio (CH), estresse + óleo (EO) e estresse + hormônio (EH). N= 6 animais por grupo.

* $P < 0,05$ para o tratamento com estradiol (CH) em relação ao controle (CO) (teste t de Student pareado).

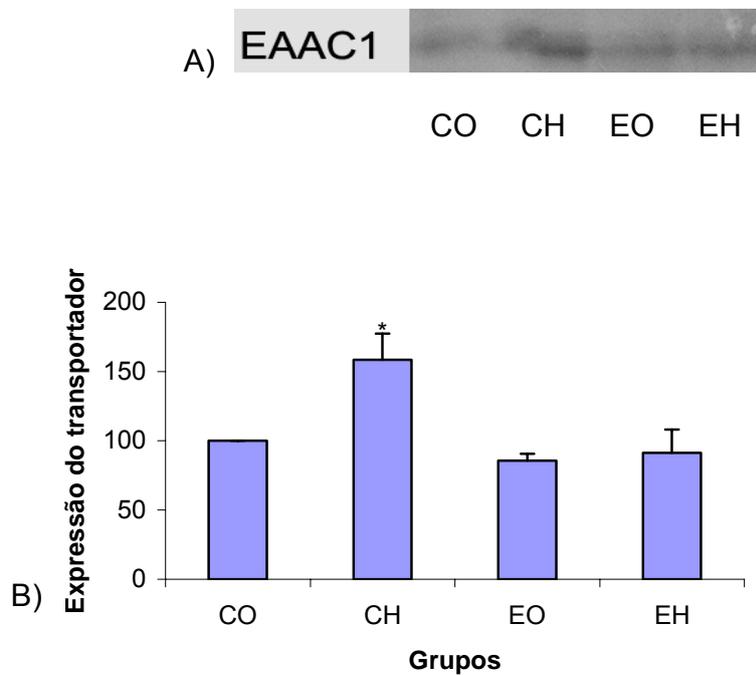


Figura 13: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a expressão do imunoconteúdo do transportador de glutamato EAAC1 em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol. A parte A apresenta uma amostra representativa dos *immunoblots* obtidos. A parte B mostra os dados expressos como média \pm erro padrão da média e analisados em relação à porcentagem do grupo controle (CO), sendo os grupos: controle + óleo (CO), controle + hormônio (CH), estresse + óleo (EO) e estresse + hormônio (EH). N= 6 animais por grupo.

* $P < 0,05$ para o tratamento com estradiol (CH) em relação ao controle (CO) (teste t de Student para amostras dependentes).

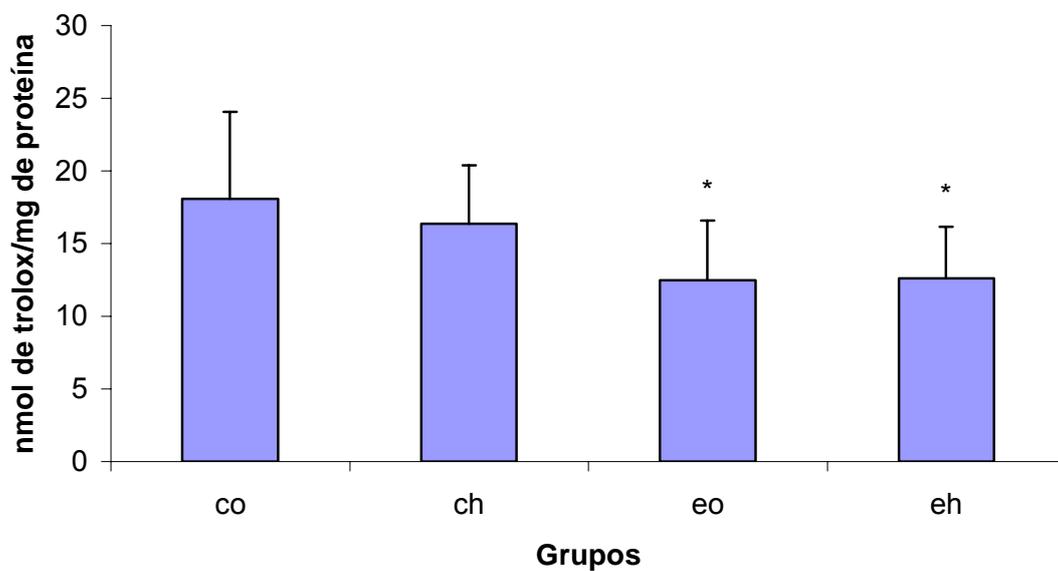


Figura 14. Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média para os grupos: controle + óleo (CO), controle + hormônio (CH), estresse + óleo (EO) e estresse + hormônio (EH). Foi utilizada uma ANOVA de duas vias, * $P < 0,05$ para o tratamento estresse. $N = 6-8$ animais por grupo.

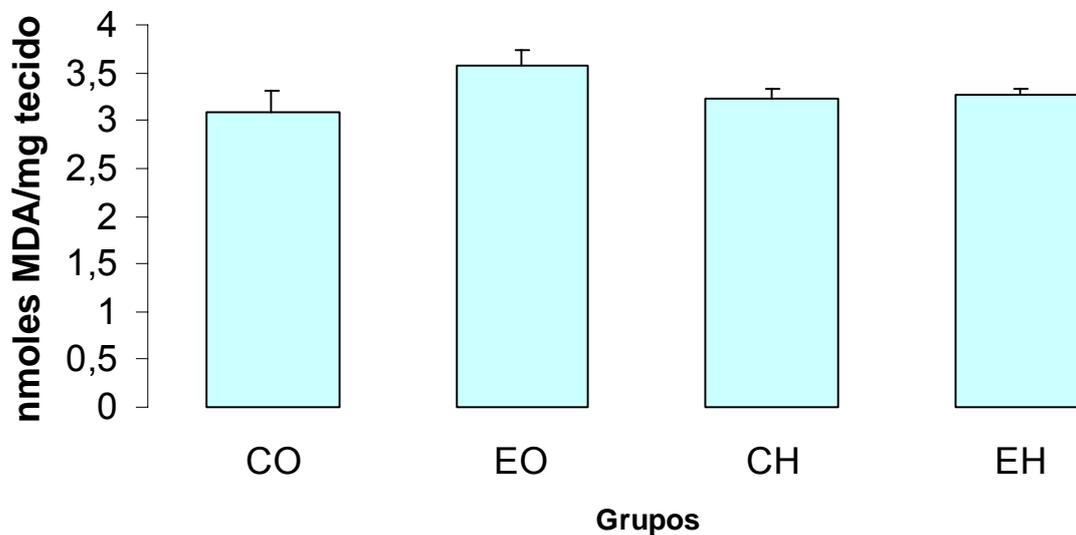


Figura 15: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a lipoperoxidação (TBARS) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média para os grupos: controle + óleo (CO), controle + hormônio (CH), estresse + óleo (EO) e estresse + hormônio (EH). Foi utilizada uma ANOVA de duas vias. Não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$ em todos os casos). N= 6-8 animais por grupo.

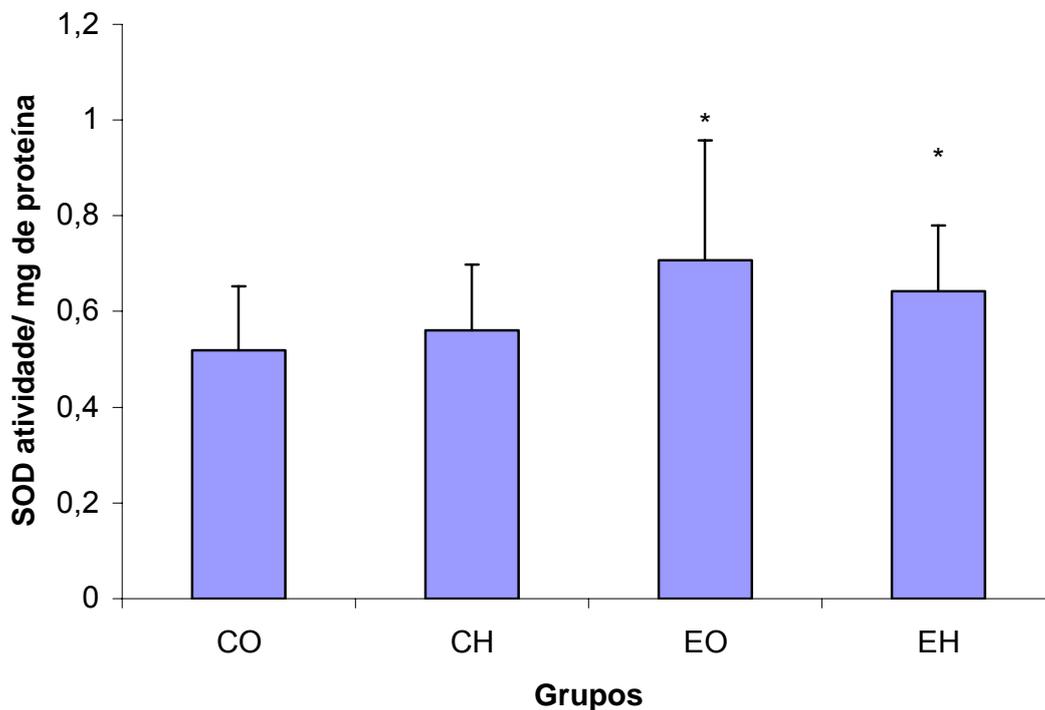


Figura 16: Efeito da exposição ao estresse crônico repetido por contenção sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média para os grupos: controle + óleo (CO), controle + hormônio (CH), estresse + óleo (EO) e estresse + hormônio (EH). Foi utilizada uma ANOVA de duas vias, * $P < 0,05$ para o tratamento com estresse, aumentando a atividade da SOD. N= 6-8 animais por grupo.

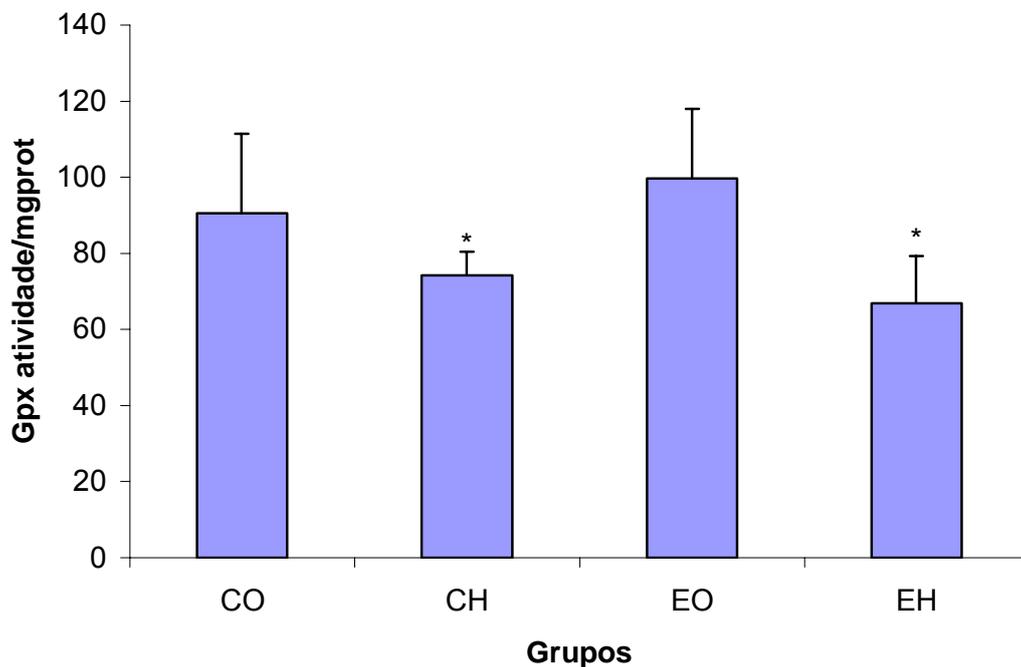


Figura 17: Efeito da exposição ao estresse repetido por contenção sobre a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) em medula espinhal de ratas ovariectomizadas, com e sem reposição de estradiol. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão para os grupos: controle + óleo (CO), controle + hormônio (CH), estresse + óleo (EO) e estresse + hormônio (EH). Foi utilizada uma ANOVA de duas vias, * $P < 0,05$ para o tratamento com estradiol. N= 6- 8 animais por grupo.

5- Discussão

O presente trabalho demonstrou que a exposição ao estresse repetido por contenção e o tratamento com reposição de estradiol *per se* não foram capazes de alterar o limiar nociceptivo basal nessas ratas. Esses achados contrastam com resultados obtidos anteriormente (Balk, 2004), onde ratas ovariectomizadas estressadas cronicamente sem reposição de estradiol apresentaram uma diminuição da latência de retirada de cauda nesse teste, efeito que não foi observado quando esses animais foram submetidos a reposição com estradiol. As diferenças observadas entre os presentes resultados e aqueles de Balk (2004) talvez sejam devidas a diferentes intensidades de estímulo térmico. Conforme considerado anteriormente, existem inconsistências nos achados referentes à sensibilidade dolorosa durante o ciclo estral (Frye *et al.*, 1992; Ryan e Meyer, 1988). Contudo, resultados recentes da literatura têm demonstrado que o estradiol é capaz de diminuir comportamentos induzidos por estímulos nociceptivos, e.g. injeção de formalina no apêndice posterior induz um aumento de mordidas e lambidas nessa região, no entanto quando se administra estradiol nesses animais há uma diminuição significativa desses comportamentos, essa resposta antinociceptiva mostrou-se dose-dependente (Kuba, 2006).

No presente estudo, quando os grupos tratados com estradiol foram expostos a rosquinhas doces, um estímulo gustativo de caráter agradável, houve um aumento da latência de retirada de cauda (reflexo espinhal nociceptivo) quando comparado com a medida basal (antes da exposição ao doce). Esses dados

sugerem que a exposição crônica ao estradiol acentua a resposta antinociceptiva a sabores agradáveis. Evidências da literatura mostram que o consumo de soluções doces palatáveis produz analgesia em animais (Anseloni, 2002; Kanarek, 2001). O consumo de soluções de sacarose ou de alimentos doces, como no presente estudo, pode mudar a sensibilidade nociceptiva pela ativação de mecanismos opióides (Kanarek, 2001), mas não podemos descartar a possibilidade do envolvimento de outros neurotransmissores, como a serotonina, pois o bloqueio de receptores de serotonina no núcleo da rafe dorsal diminui a antinocicepção induzida por sacarose (Miyase, 2005).

Fêmeas parecem ser mais sensíveis aos efeitos da sacarose na antinocicepção induzida por morfina do que machos (Kanarek *et al.*, 2000), o que nos permite pensar num possível envolvimento de esteróides gonadais nesse processo. Os dados citados acima foram obtidos usando-se fêmeas da linhagem de ratos Long-Evans. A partir de nossos resultados, podemos sugerir que altos níveis de estradiol em ratas Wistar ovariectomizadas possam modular a percepção do sabor doce, recrutando, provavelmente, diferentes sistemas neurotransmissores como o opioidérgico e o serotoninérgico, citados acima. Assim, modulando os efeitos desencadeados pela exposição a um sabor doce e que poderão determinar antinocicepção nesses animais.

Além disso, a exposição ao ácido acético 5% (estímulo desagradável) foi capaz de aumentar a latência de retirada de cauda em todos os grupos comparados com suas respectivas medidas basais (sem exposição ao ácido). Com isso, se levarmos em consideração que esses animais não foram previamente expostos ao ácido acético, podemos sugerir que os efeitos antinociceptivos desse sabor podem

ser devidos à novidade, uma vez que trabalhos da literatura mostram que a novidade induz analgesia (Torres *et al.*, 2001).

Por outro lado, é interessante observar que, neste trabalho, os grupos estressados cronicamente (EO e EH) mostraram um maior aumento da latência de retirada de cauda após a exposição ao ácido acético em relação aos grupos não estressados (CO e CH). Um estudo de Torres *et al.*, 2001 mostrou que ratos machos submetidos ao estresse crônico apresentaram redução da resposta antinociceptiva à novidade; assim, é possível que o efeito induzido pelo ácido acético tenha um mecanismo não relacionado ao fato desse sabor representar uma novidade.

O fato dos grupos estressados apresentarem maior aumento do limiar nociceptivo (antinocicepção) após a exposição ao ácido acético pode estar relacionado a mudanças fisiológicas como consequência da exposição crônica ao estresse. Por exemplo, a exposição a um agente aversivo após a exposição ao estresse crônico poderia potencializar o efeito do sabor ácido, fenômeno denominado de facilitação (Andres *et al.*, 1999). Estes dados estão de acordo com experimentos prévios do nosso laboratório realizados em machos (Fontella *et al.*, 2004), em que ratos submetidos a estímulos desagradáveis, quando estressados cronicamente, respondem com maior intensidade a esses estímulos.

Assim, comparado ao estudo de Fontella *et al.* (2004), o presente trabalho demonstra similaridades na resposta a sabores desagradáveis após exposição ao estresse crônico entre machos (conforme observado no trabalho citado) e fêmeas ovariectomizadas (no presente trabalho), com ou sem reposição de estradiol. Por outro lado, enquanto observamos que fêmeas do grupo controle também

apresentam antinocicepção induzida pelo sabor desagradável, tal efeito não tem sido observado em machos (Fontella *et al.*, 2004).

Devido à importância da transmissão glutamatérgica na nocicepção, além do fato de que a captação de glutamato é crítica para a manutenção normal da transmissão sensorial na medula espinhal de ratos (Wen-Jinn Liaw, 2005), decidimos estudar o efeito do estresse repetido por contenção sobre a liberação e captação de glutamato por sinaptossomas de medula espinhal em fêmeas ovariectomizadas com e sem reposição de estradiol e verificamos uma alteração na transmissão glutamatérgica nesses animais.

Embora não tenha sido observado efeito na liberação de glutamato por sinaptossomas da medula espinhal em função do estresse crônico repetido e da reposição com estradiol, o estresse crônico foi capaz de diminuir a captação de glutamato de alta afinidade dependente do Na^+ nos terminais sinápticos da medula espinhal, contudo esse efeito somente foi observado no grupo estressado sem reposição de estradiol (EO). O tratamento com estradiol, por sua vez, aumentou a captação de glutamato somente no grupo não estressado cronicamente (CH), ou seja, no grupo submetido a ambos os tratamentos, houve um somatório dos dois efeitos. É interessante notar que todas as medidas foram feitas 24 h após a última sessão de estresse. Esse tempo foi escolhido para haver influência somente dos efeitos do estresse crônico.

Trabalhos da literatura sugerem a influência do estresse crônico (21 dias) e subcrônico (7 dias) por imobilização diminuindo a captação de glutamato de alta afinidade dependente do Na^+ , analisado em sinaptossomas encefálicos (Madrigal, 2003). No presente trabalho nós enfocamos a medula espinhal por ser

uma estrutura do sistema nervoso central fundamental na transmissão sensorial, incluindo a nocicepção, e em especial no reflexo de retirada da cauda.

Na presente dissertação, verificamos que o estresse crônico diminui a captação espinhal de glutamato por sinaptossomas, desse modo podendo potencialmente causar um aumento desse neurotransmissor excitatório nos terminais sinápticos, o que pode ser um mecanismo que induz hipernocicepção e um aumento da frequência de disparos de potenciais de ação em neurônios do corno dorsal da medula espinhal (Weng, 2006). Wen-Jinn Liaw e colaboradores (2005) sugerem que injeção intratecal de bloqueadores do transporte de glutamato, DL-treo- β -benziloxiaspartato (TBOA) e diidroquinato, produz aumentos significativos sobre comportamentos espontâneos nociceptivos e esses efeitos são dose-dependentes. No entanto, a diminuição da captação espinhal de glutamato, induzida pelo estresse, observada na presente dissertação, não foi capaz de induzir hipernocicepção em ratas ovariectomizadas estressadas cronicamente com e sem reposição de estradiol. Aqui é importante considerar que acredita-se que os transportadores neuronais de glutamato representam uma pequena parcela dos transportadores para esse aminoácido excitatório (Danbolt, 2001).

Interessantemente, o tratamento crônico com 17 β -estradiol foi capaz de aumentar a captação de glutamato em sinaptossomas de medula espinhal, sugerindo um importante papel na modulação da neurotransmissão glutamatérgica e prevenção da excitotoxicidade em casos de estresse repetido (Danbolt, 2001; Sapolsky, 1994). Embora a neuroproteção induzida pelo tratamento com estradiol tenha sido estudada em modelos *in vivo* e *in vitro*, os mecanismos específicos que contribuem para essa proteção permanecem desconhecidos. Pensando nisso, o

próximo alvo do nosso estudo foi verificar os mecanismos moleculares envolvidos no aumento da captação de glutamato induzida por 17 β -estradiol sem a presença de estresse e na diminuição da captação de glutamato induzida por estresse crônico repetido. Dessa forma, avaliamos os efeitos desses tratamentos na expressão dos três transportadores de aminoácidos excitatórios presentes na medula espinhal: GLAST, GLT1 e EAAC1. Os dois primeiros são geralmente expressos em células astrogliais e o último encontra-se predominantemente em neurônios. GLAST e EAAC1 são encontrados em alta densidade nas lâminas I e II do corno dorsal enquanto GLT1 encontra-se difusamente em todo o corno dorsal da medula espinhal (Vera-Portocarrero, 2002; Weng, 2005).

Dados da literatura mostram que a expressão dos transportadores de aminoácidos excitatórios na medula espinhal são fundamentais na modulação da nocicepção, sugerindo que o transporte de glutamato é de particular interesse para a transmissão nociceptiva (Niederberger *et al.*, 2006). Vários modelos nociceptivos têm mostrado que a estimulação nociva periférica induz alterações na expressão dos transportadores de glutamato na medula espinhal. Em um modelo de dor neuropática EAAC1, GLT1 e GLAST foram superexpressos em fases recentes pós-operatórias, mas diminuíram sua expressão nas fases mais tardias (Sung, 2003). Lesão na medula espinhal leva a um aumento da expressão de GLAST e GLT1 nas regiões de injúria (Vera-Portocarrero, 2002). Todos esses dados juntos sugerem que esse aumento da expressão desses transportadores envolvem mecanismos plásticos da medula espinhal frente a insultos.

Nossos resultados demonstraram que a reposição com 17 β -estradiol foi capaz de aumentar a expressão dos três transportadores analisados através da

técnica de Western Blotting: GLAST, GLT1 e EAAC1. É provavelmente por esse mecanismo que ocorre o aumento da captação de glutamato de alta afinidade dependente de Na^+ na medula espinhal dessas ratas com reposição de estradiol e não submetidas ao estresse crônico por contenção. Nossos resultados estão de acordo com trabalhos da literatura, que mostram que a reposição com 17β -estradiol aumenta a captação de glutamato em sinaptossomas de ratos tratados com proteína β -amilóide (Keller, 1997) e em astrócitos de pacientes com doença de Alzheimer (Liang *et al.*, 2002).

Com isso, sugerimos que o estradiol seja neuroprotetor frente a alterações na neurotransmissão glutamatérgica induzida pelo estresse crônico, uma vez que o grupo estresse sem reposição de estradiol (EO) diminui a expressão dos transportadores e o grupo estresse com reposição de estradiol apresentou um nível de expressão similar ao grupo não estressado cronicamente e com óleo (CO), considerado nosso grupo controle.

Interessantemente, nesse trabalho, o estresse crônico repetido sem reposição de estradiol, diminuiu a captação de glutamato, enquanto nenhum efeito na expressão dos transportadores foi verificado nesse mesmo grupo (EO). Em contraste, dados da literatura mostram uma diminuição da expressão desses transportadores em ratos estressados cronicamente por 21 dias em sinaptossomas encefálicos (Madrigal, 2003), porém no presente trabalho, o período de estresse crônico foi durante 40 dias e, além disso, na medula espinhal de fêmeas ovariectomizadas. É possível que haja influência do gênero e da duração do tratamento sobre a expressão dos transportadores de glutamato,

devendo também se ter em mente que diferentes estruturas do sistema nervoso podem apresentar diferentes efeitos.

Todos esses resultados juntos parecem envolver uma ligação entre os aumentos da captação de glutamato espinhal e dos transportadores (GLAST, GLT1 e EAAC1) induzidos pelo hormônio 17β - estradiol como um mecanismo de neuroproteção contra os efeitos deletérios do estresse crônico em estados de excitotoxicidade glutamatérgica. Esses resultados demonstram mudanças no sistema glutamatérgico que estão, possivelmente, envolvidos na plasticidade do sistema nervoso induzida por mudanças fisiológicas frente a situações aversivas (estresse) e reposição com hormônios esteróides, como o estradiol.

Estes resultados indicam que o estresse crônico por contenção pode alterar a transmissão glutamatérgica na medula espinhal dessas ratas. Devido à relação entre alterações na transmissão glutamatérgica e danos oxidativos, decidimos estudar o efeito do estresse repetido por contenção em fêmeas ovariectomizadas com e sem reposição com estradiol sobre parâmetros do estresse oxidativo na medula espinhal. Verificamos uma diminuição do potencial antioxidante total (TRAP) nos grupos submetidos ao estresse crônico repetido (EO e EH), não havendo efeito significativo dos tratamentos sobre a lipoperoxidação (TBARs) nos grupos estudados. Nos ensaios enzimáticos, houve um aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) na medula espinhal dos animais estressados cronicamente (EO e EH) e uma diminuição da atividade da glutationala peroxidase (GPx) naqueles submetidos a reposição com estradiol (CH e EH).

O TRAP tem sido amplamente utilizado para medir o potencial antioxidante total em amostras biológicas. Esse teste analisa ambos antioxidantes, os não-enzimáticos como glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico, α -tocoferol, β -carotenos, entre outros, bem como os antioxidantes enzimáticos (Lissi *et al.*, 1995). Isso é importante pois analisa o perfil geral antioxidante de uma amostra. O presente trabalho demonstrou que o estresse crônico foi capaz de diminuir o TRAP, sugerindo uma maior vulnerabilidade dos animais estressados a agentes oxidantes. Exposição a glicocorticóides ou estresse já foram sugeridos induzir a formação de EROS, podendo levar a injúrias oxidativas em vários tecidos. Em nosso estudo, porém, não houve alteração em nenhum dos grupos na lipoperoxidação (avaliada pelo TBARs).

Esses dados corroboram estudos prévios do nosso laboratório, em que foi demonstrado que o estresse crônico repetido é capaz de diminuir a reatividade antioxidante total (avaliada pelo TAR) na medula espinhal, tanto em ratos machos quanto fêmeas (sem controle do ciclo estral), não havendo diferença na lipoperoxidação quando comparados com seus respectivos controles (Tabajara *et al.*, 2003); o mesmo acontece em hipocampo de ratos machos submetidos a esse modelo de estresse (Fontella *et al.*, 2005). Ambos os testes, TAR e TRAP analisam os antioxidantes totais presentes na amostra, porém o TAR verifica principalmente a qualidade dos antioxidantes presentes no homogeneizado e constitui uma medida usada como um índice da capacidade de um composto ou fluido de modular o dano associado com o aumento na produção de radicais livres (Lissi *et al.*, 1995) e o TRAP avalia a concentração de antioxidantes na amostra capaz de neutralizar os radicais peróxil formados no meio, ou seja, a quantidade de antioxidantes funcionais

agindo contra moléculas reativas presentes no meio em um período mais prolongado, sugerindo um método que avalia uma defesa antioxidante mais duradoura. Assim, esse trabalho sugere que diminuição do TRAP pelo estresse crônico seja resultado do consumo de antioxidantes, provavelmente com o propósito de reduzir danos oxidativos e assim evitar a lipoperoxidação na medula espinhal dessas ratas submetidas ao estresse crônico por contenção. É importante salientar que esses animais foram sacrificados 24 h após a última sessão de estresse e que mesmo este período não foi suficiente para recuperar as defesas antioxidantes ao nível basal (semelhante aos controles).

Nas análises enzimáticas foi verificado que o estresse crônico aumentou a SOD. É possível que esse aumento seja uma resposta a uma maior quantidade de íons superóxido, de modo a estimular um aumento da atividade da SOD pelo aumento da concentração de substrato, como um mecanismo compensatório. Tartarolo e colaboradores (2004) verificaram que um aumento da expressão da SOD diminui a expressão de GLT1 em cultura de astrócitos primários de camundongos (embora não tenha havido diferença na expressão do GLAST). Assim, é possível que esse aumento da SOD esteja relacionado à diminuição dos transportadores de glutamato induzida pelo estresse crônico, conforme descrito acima.

Os grupos tratados com estradiol apresentaram diminuição da atividade da GPx. Essa diminuição pode ser consequência de uma menor quantidade de peróxidos sendo produzidos, ou pode ser um fator de aumento da vulnerabilidade para este grupo. Não houve, porém, qualquer efeito sobre a lipoperoxidação ou sobre o TRAP nesses grupos, de modo que acreditamos que essa redução da

atividade da GPx não represente um dano oxidativo. Desse modo sugerimos que o estradiol possa estar diminuindo a concentração de peróxidos.

Hormônios como o estradiol são esteróides que também têm propriedades tróficas e neuroprotetoras. Reposição com estradiol tem se mostrado neuroprotetora em estudos *in vitro* contra os danos ocasionados pelo estresse oxidativo (Maurice, 2002). Muitas hipóteses concernentes aos mecanismos de ação relacionados a esses efeitos têm sido exploradas. O mecanismo clássico de ação dos esteróides envolve a ligação a receptores intracelulares que podem agir como fatores de transcrição e regular a expressão gênica, assim diminuindo a expressão da enzima glutathiona peroxidase. Além disso, outros mecanismos têm sido sugeridos para o efeito neuroprotetor do estradiol, como um aumento de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl (Harms *et al.*, 2001), ou por suas propriedades como *scavenger* (Xia *et al.*, 2002). Muitos desses mecanismos envolvem proteção contra o estresse oxidativo.

6- Conclusões

Para concluir, o estresse crônico repetido e o tratamento com reposição de estradiol não tiveram efeito na medida de latência de retirada de cauda basal, porém as ratas com reposição de estradiol após a exposição ao alimento doce (palatável) mostraram um aumento do limiar nociceptivo espinhal sugerindo que o estradiol potencialize a antinocicepção provavelmente frente a estímulos gustativos agradáveis. Já a exposição a um estímulo gustativo de caráter desagradável (ácido) foi capaz de induzir antinocicepção em todos os grupos estudados, sendo importante salientar que o tratamento com estresse crônico exacerbou essa resposta antinociceptiva.

Houve efeito dos tratamentos, alterando a captação de glutamato na medula espinhal de ratas ovariectomizadas. A reposição de estradiol foi capaz de aumentar a captação de glutamato em sinaptossomas, como também aumentou a expressão do três transportadores de aminoácidos excitatórios analisados (GLAST, GLT1 e EAAC1) na medula espinhal, porém somente naqueles animais não submetidos ao estresse crônico. Em contraste, as ratas submetidas ao estresse crônico sem reposição de estradiol apresentaram diminuição da captação de glutamato por sinaptossomas (embora não tenha havido diferença significativa na expressão dos transportadores). Não houve efeito dos tratamentos na liberação de glutamato em

sinaptossomas da medula espinhal. Assim, a reposição crônica com estradiol parece modular a transmissão glutamatérgica alterando a expressão dos transportadores de glutamato na medula espinhal, desse modo esse hormônio pode atuar como neuroprotetor através de mecanismos compensatórios, ou seja, aumento da expressão dos transportadores, provavelmente retirando o glutamato rapidamente da fenda sináptica e evitando uma possível superestimulação neural devido ao acúmulo desse neurotransmissor excitatório.

Além disso, o estresse crônico repetido diminuiu o Potencial Antioxidante Total (TRAP) e aumentou a atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em medula espinhal, enquanto o tratamento com estradiol diminuiu a atividade da Glutathione Peroxidase (GPx). Embora tenham ocorrido essas alterações, não houve diferença sobre a Lipoperoxidação (TBARs) na medula de ratas ovariectomizadas, tanto submetidas ao estresse como submetidas à reposição de estradiol. Desse modo, tanto a exposição ao estresse crônico quanto à reposição de estradiol foram capazes de modular defesas antioxidantes enzimáticas (SOD e GPx) e não enzimáticas (TRAP), verificadas nesse trabalho, evitando danos oxidativos em lipídios demonstrado pelo teste do TBARs.

Conclui-se que a redução da captação de glutamato observada em ratas ovariectomizadas estressadas cronicamente deve-se a uma redução na expressão de transportadores, e pode levar a um aumento na transmissão glutamatérgica na medula espinhal, o que pode levar a uma maior sensibilidade à dor, mas nada relacionado foi observado no estado basal pelo teste de latência de retirada da cauda. A reposição com estradiol protegeu contra esses efeitos do estresse crônico.

Alterações em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo podem colaborar com esses efeitos.

7- Perspectivas

São perspectivas para a continuação deste trabalho:

- Investigar comportamentos relacionados com o “gostar” como protrusões de língua ou exposição de dentes, utilizando soluções de diferentes concentrações de sacarose e ácido acético (Experimento em andamento);
- Investigar a captação de glutamato em fatias organotípicas e verificar os níveis de proteína astrogliar S100B em medula espinhal de ratos machos e fêmeas;
- Verificar a expressão de receptores de adenosina na medula espinhal de ratos machos e fêmeas, uma vez que esse neuromodulador está relacionados em processos nociceptivos como também na regulação da transmissão glutamatérgica.

- Investigar a liberação e captação de glutamato em medula espinhal de ratos machos estressados cronicamente como também avaliar a expressão dos transportadores de glutamato.

8- Referências Bibliográficas

Aebi, H., Bergmeyer, H.U.; Bergmeyer, J.; Grabl, M., 1983. eds. Methods of enzymatic analysis. 3rd. Ed. p. 273-296.

Allen, R. G., 1993. Free Radicals and differentiation: the interrelationship of development and aging. In: Yu. B.P., ed. Free radicals in aging, Boca Raton. FL:CPC: 12-23.

Almeida, T. F.; Roizenblatt, S.; and Tufik S., 2004. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. Brain Research 1000, 40-50.

Amandusson, A., Hallbeck, M., Hallbeck, A. L., Hermanson O., Blomqvist, 1999. Estrogen-induced alterations of spinal cord enkephalin gene expression. Pain. 83: 243-248.

Ames, B. N., Shigenaga, M.D., and Hagen, T. M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci. 90: 7915-7922.

Andres R, Marti O, Armario A. Direct evidence of acute stress-induced facilitation of ACTH response to subsequent stress in rats. *Am J Physiol* 1999;277:R863.

Anseloni V.C.Z., H.-R. Weng, R. Terayama, D. Letizia, B.J. Davis, K. Ren, R. Dubner, M. Ennis, 2002. Age-dependency of analgesia elicited by intraoral sucrose in acute and persistent pain models, *Pain* 97:93–103.

Balk, S. B., 2004. Interações entre o estresse repetido e o estradiol no comportamento de ratas ooforectomizadas. Dissertação de Mestrado, UFRGS, ICBS. 72 pp.

Ben-Shachar, D., Riederer, P., 1991. Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: Implication for Parkinson's disease. *J. Neurochem*, 57: 1609-1614.

Bodnar R.J., Romero M-T., Kramer E.,1998. Organismic variables and pain inhibition: Roles of gender and aging. *Brain Res Bull*, 21: 947-953.

Braugher, J. M., Hall, E. D., 1989. Central nervous System trauma and stroke. Biochemical considerations for oxygen radicals formation and lipid peroxidation. *J. Free Radical Biol. Med.* 6: 289-301.

Cabalas-Picot, I., Nicole, A., Clement, M., Bourke, J., Signet, P., 1992. Age-related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of controls and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Mutat. Res.* 275:281-293.

Cannon, W. B., 1929. Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev.* 9: 399-431.

Cannon, W. B., 1939. *The wisdom of the body.* New York: WW Norton.

Chiao Y.C., Wong C.S., 2004. Opioid tolerance: is there a dialogue between glutamate and beta-arrestin? *Acta Anaesthesiol Taiwan.* Jun;42(2):93-101.

Craft R. M., Mogil J. S., Aloisi A. M., 2004. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *European Journal of Pain* 8 (2004) 397–411.

Morissete M

Cyr M., Ghribi O, Thibault C, Morissete M., Landry M., Di Paolo T.,2001. Ovarian steroids and selective estrogen receptor modulators activity on rat brain NMDA and AMPA receptors. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001 Nov;37(1-3):153-61.

D'amour, F.E.; Smith, D.L.,1941. A method for determining loss of pain. *J. Pharmacol. Ther.*, 72: 74-9.

Danbolt, N. C. 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65:1–105.

Dantas G. Torres I.L.S., Crema L.M., Diogo R. Lara and Carla Dalmaz, 2005. Repeated Restraint Stress Reduces Opioid Receptor Binding in Different Rat CNS Structures. *Neurochemical Research.* 30:1-7.

Dubrovsky B.O., 2005. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Progress in Neuro -Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 29, 169-192.

Dunkley, P.R., Heath, J.W., Harrison, S.M., Jarvie, P.E., Glenfield, P.J., and Rostas, J.A.P., 1988. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res.* 441:59-71.

Erin C. Stoffela, Catherine M. Ulibarrib, Rebecca M. Craft, 2003. Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. *Pain* 103: 285–302.

Fontella F.U., Vendite D.A., Tabajara A.S., Porciuncula L.O., Da Silva Torres I.L., Jardim F.M., Martini L., Souza D.O., Netto C.A., Dalmaz C., 2004. Repeated restraint

stress alters hippocampal glutamate uptake and release in the rat. *Neurochem Res.* 29(9):1703-9.

Fontella, F. U., Siqueira, I. R., Vasconcellos, A. P. S., Tabajara A. S., Carlos A. Netto, and Dalmaz C., 2005. Repeated Restraint Stress Induces Oxidative Damage in Rat Hippocampus. *Neurochemical Research*, Vol. 30: 105–111.

Fontella, F.U, De Leon, M., Crema L.M., Balk, R.S., Netto, C.A., 2004. Taste modulation of nociception differently affects chronically stressed rats. *Physiol Behav.* ;80(4):557-61.

Fontella, F.U., Bruno, A.N., Balk, R.S., Rücker, B., Crema, L.M., Corrêa, M.D., Battastini, A.M.O, Sarkis, J.J.F., Netto, C.A., Dalmaz, C. , 2005. Repeated Stress Effects on Nociception and on Ecto-Nucleotidase Activities in Spinal Cord Synaptosomes of Female Rats. *Physiology & Behavior* 85: 213 – 219.

Forman, L.J., Marquis, D.E., Stevens, R., 1985. The effect of chronic estrogen treatment on immunoreactivity β - endorphin levels in intact female rats. *Biology Medicine.* 179, 217-228.

Frye, C., Bock, B. C., Kanarek, R.B., 1992. Hormonal milieu affects tailflick latency in females rats may be attenuated by access to sucrose. *Physiology and Behavior* . 52: 699-706.

Fundytyus M. E., 2001. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs* 15(1): 29-58.

Gamaro, G.D., 1998. Estresse crônico variável: estudo de alguns parâmetros bioquímicos e comportamentais. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com ênfase em Bioquímica, UFRGS. 123 pp.

Gamaro, G.D., Xavier, M.H., Denardin, J.D., Pilger, J.A., Ely, D.R., Ferreira, M.B.C., Dalmaz, C., 1998. The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiol. Behav.* 63, 693-697.

Ganong, W. F., 1995. Review of medical physiology. Norwalk, CT, Appleton & Lange, pp. 327-351.

Gardès-Albert, M., Jore, D., Ferradini, C., 1991 Membrane lipid peroxidation: pulse and gamma-radiolysis in oxyradical research. In Vigo-Pelfrey C (ed): Membrane lipid oxidation. 1st ed. Santa Clara, CRC press, 2-30.

Garry E. M.; Jones E.; Fleetwood- Walker S., 2004. Nociception in vertebrates: key receptors participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals. *Brain Research Reviews* 46, 216-224.

Guedes P. R., Dal Bosco L., Teixeira C.M., Araújo A., Llesuy S., Bello-Klein A. Ribeiro M. F., Partata W. A., 2006. Neuropathic Pain Modifies Antioxidant Activity. *Neurochem Res.*, 31:603–609.

Halliwell, B., Cross, C. E., 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Enviro. Health Prespect.* 102 suppl 10:5-12.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal*, 219: 1-14.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free radicals in biology and medicine.* Claredon Press, Oxford Univ. 2th ed.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.

Hammer, R.P. Jr., 1990. μ -opiate receptor binding in the medial preoptic area is cyclical and sexually Dimorphic. *Brain Res*, 515: 187-192.

Harman, C., 1992. Free radical theory of aging. *Mutat. Res.* 275:257-266.

Harms, C., Lautesnschlager, M., Bergk, A., Katchannov, J., Freyer, D., Kapinya, K., Herwig, U., Megow, D., Dirnagl, U., Weber, J.R., Hortnagl, H., 2001.

Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J. Neurosc.* 21(8): 2600-2609.

Harrison S.M., Jarvie PE, Dunkley PR.,1988. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: viability subcellular fractions. *Brain Res.* 1988 Feb 16;441(1-2):72-80.

Hershko, C., 1989. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Gematol* 26:277-285 in *Rat Spinal Cord. Neurochem Res* (2006) 31:603–609.

Irusta, A.E.C., Savoldi, M., Kishi R., Resende, G.C.C., Freitas, R.L., Carvalho, A.D., Coimbra, N.C., 2001. Psychopharmacological evidences for the involvement of muscarinic and nicotinic cholinergic receptors on sweet substance-induced analgesia in *Rattus norvegicus*, *Neurosci. Lett.* 305:115–118.

Kanarek R.B., Mandillo, S., Wiar, C., 2001. Chronic sucrose intake augments antinociception induced by injections of mu but not kappa opioid receptor agonists into the periaqueductal gray matter in male and female rats, *Brain Res.* 920:97–105.

Kanarek, R. B., And Homoleski, B., 2001. Modulation of Morphine-Induced Antinociception by Palatable Solutions in Male and Female Rats. PII S0091-3057(00)00251-3.

Kavaliers M. & Innes D., 1987. Stress-induced opioid analgesia and activity in deer mice: sex and population differences. *Brain Res*, 425: 49-56.

Kavaliers M. & Innes D., 1992. Sex differences in the effects of neuropeptide FF and IgG from neuropeptide FF on morphine- and -stress-induced analgesia. *Peptides*, 13: 603-607,.

Keith T. Akama and Bruce S. McEwen., 2005. Gene therapy to bet on: protecting neurons from stress hormones. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, April Vol.26, No.4

Keller J.N., Germeyer A, Begley J.G., Mattson M.P., 1997. 17 β -Estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na⁺/K⁺-ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid beta-peptide and iron. *J Neurosci Res* 50:522–530.

Korte S. M., Koolhaas J. M., Wingfield J. C., McEwen B. S., 2005. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience and Biobehavioral. Reviews* 29 , pp 3–38.

Kuba, T., Wu, K. H., Nazarian, A., Festa, E. D., Barr, G. A., Jenab, S., Inturrisi, C. E. and Quinones-Jenab, V., 2006. Estradiol and progesterone differentially regulate formalin-induced nociception in ovariectomized female rats. *Horm. Behav.* April;49(4):441-9

Leal, M.B., Emanuelli, T., Porciuncula, L.D., Souza, D.O., And Elisabetsky, E., 2001. Ibogaine alters synaptosomal and glial glutamate release and uptake. *Neuroreport* 12:263-7.

Liang, Z., Valla, J., Sefidvash-Hockley, S., Rogers, J., Li, R., 2002. Effects of estrogen treatment on glutamate uptake in cultured human astrocytes derived from cortex of Alzheimer's disease patients. *J Neurochem.* Mar;80(5):807-14.

Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., and del Castillo, M. D. 1995. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 18:153–158.

Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; Castillo, M.D., 1995. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biology & Medicine* 18(2): 153-158.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., AND Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Ma, W., Ribeiro da Silva, A., De Konink, Y., Radhakrishnan, V., Cuello, A.C., Henry, J.L., 1997. Substance P and enkephalyn immunoreactivities in axonal boutons presynaptic to physiologically identified dorsal horn neurons. *Neuroscience*, 77: 733-811.

Madrigal, J. L. M., Caso, J. R., Cristóbal, J., Cárdenas, A., Leza, J. C., Lizasoain, I., Lorenzo, P. and Moro, M. A., 2003. Effect of subacute and chronic immobilisation stress on the outcome of permanent focal cerebral ischaemia in rats. *Brain Research*, 979 (1-2), pp. 137-145.

Maurice, T., 2002. Improving Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits with sigma1 Receptor Agonists. *Drug News Perspect* 15:617-625.

McEwen, B.S., 1992. Reexamination of the glucocorticoid hypothesis of stress and aging. *Prog. Brain Res.*, 93:368-389.

McEwen, B.S., 1998. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 May 1;840:33-44. Review.

McIntosh, L. J., Cortopassi, K.M., Spolsky, R.M., 1998. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. *Brain Research*, 791:215-222.

Mello Filho, A. C., Hoffman, M.E., Meneghini, R., 1983. Cell Killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.* 218: 273-275.

Meneghini, R., 1987. A Toxicidade do Oxigênio. *Ciência Hoje*, 5(6): 57-62.

Migues, P.V., Leal, R.B., Mantovani, M., Nicolau, M, And Gabilan, N.H., 1999. Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Neuroreport* 10:67-70.

Miyase C. I., Kishi, R., Freitas R. L., Paz D., Coimbra N. C., 2005. Involvement of pre- and post-synaptic serotonergic receptors of dorsal raphe nucleus neural network in the control of the sweet-substance-induced analgesia in adult *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae) *Neuroscience Letters* 379: 169–173.

Netto, C.A.; Siegfried, B.; Izquierdo, I.,1987. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent an post-training stressful stimulation. *Behav. Neural Biol.*, 48: 304-309.

Niederberger E., Schmidtko A., Coste O., Marian C., Ehnert, C. and Geisslinger G., 2006. The glutamate transporter GLAST is involved in spinal nociceptive processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346: 393–399

Niederberger, E., Schmidtko, A., Rothstein, J.D., Geisslinger, G., Tegeder, I., 2003. Modulation of spinal nociceptive processing through the glutamate transporter GLT-1. *Neuroscience* 116: 81-87.

Pakác Karel and Palkovits M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews* 22(4), pp. 502- 548.

Richardson, S. J., 1993. Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 695:73-76.

Romero, M.T., Bodnar, R.J., 1986. Gender differences in two forms of cold-water swim analgesia. *Physiol Behav*, 37: 893-897.

Romero, M.T., Kepler, K.L., Cooper, M.L., Kommisaruk, B.R., Bodnar, R.J., 1987. Modulation of gender-specific effects upon swim analgesia in gonadectomized rats. *Physiol Behav*, 40: 39-45.

Ryan, S.M., Maier, S. F., 1988. The estrous cycle and estrogen modulate stress-induced analgesia. *Behavioral Neuroscience*. 102, 371-380.

Sapolsky, R. M., 1994. Glucocorticoids, stress and exacerbation of excitotoxic neuron death. *Sem. Neusosci*. 6:323-331.

Sapolsky, R. M., 2004. Organismal stress and telomeric aging: an unexpected connection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101(50):17323-4

Selye, H., 1936. A Syndrome produced by diverse nocious agents. *Nature* 138:32.

Shan, X., Aw, T.Y., Jones, D.P., 1990. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther* 47:61-71.

Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol*. 82:291-295.

Sies, H., Murphy, M.E., 1991. Role of tocopherols in the protection of biological against oxidative damage. *J. Photochem. Photobiol. B.Biol*. 8:211-224.

Simonian, N.A., Coyle, J.T., 1996. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *A. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 36: 83-106.

Sinet, P.M.; Michelson, A.M.; Bazin, A.; Lejeune, J.; Jerome, H. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67: 910-915.

Spitz, D.R.; Oberley, L.W., 1989. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal. Biochem.*, 179: 8-18.

Sriram, K.; Bouyd, M.R.; Ravindranath, V., 1997. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Research* 749: 44-52.

Starowiicz, K., Przewlocka, B., 2003. The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception. *Life Sciences* 73, 823-847.

Sugihara, N.; Arakawa, T.; Ohnishi, M.; Furuno, K., 1999. Anti and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radical Biology & Medicine*, 27: 1313-1323.

Sung, B., Lim, G., Mao, J., 2003. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J. Neurosci.* 23: 2899– 2910, Order.

Tabajara A.S., Fontella F.U., Torres I.L., Dalmaz, C., 2003. Gender differences in oxidative stress in spinal cord of rats submitted to repeated restraint stress. *Neurochem Res.* 28(9):1315-20.

Torres I.L., Buffon A., Dantas, G., Furstenau, C.R., Bohmer A.E., Battastini, A.M., Sarkis, J.J.F., Dalmaz, C., Ferreira, M.B., 2002. Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 74(1):181-6.

Torres, I.L.S., Cucco, S.N., Vasconcellos, A.P., Dalmaz, C. 2002. Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. *Braz J Med Biol Res* 34:241–4.

Torres, I.L.S., Cucco, S.N.S., Bassani, M.; Duarte, M.S., Silveira, P.P., Vasconcellos, A.P., Sampaio, A.T., Dantas, G., Fontella, F.U.; Dalmaz, D., Ferreira, M.B.C., 2003. Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats – effect of morphine administration. *Neuroscience Research* 45: 277-283.

Tortarolo M, Crossthwaite AJ, Conforti L, Spencer JP, Williams RJ, Bendotti C, Rattray M., 2004. Expression of SOD1 G93A or wild-type SOD1 in primary cultures of astrocytes down-regulates the glutamate transporter GLT-1: lack of involvement of oxidative stress. *J Neurochem.* Jan;88(2):481-93.

Vera-Portocarrero LP, Mills CD, Ye Z, Fullwood SD, Mcadoo DJ, Hulsebosch C.E., 2002. Rapid changes in expression of glutamate transporters after spinal cord injury. Westlund K.N. Brain. Res. Feb 8;927(1):104-10.

Weng H.R., Chen, J.H. and Cata, J.P., 2006. Inhibition of glutamate uptake in the spinal cord induces hyperalgesia and increased responses of spinal dorsal horn neurons to peripheral afferent stimulation. Neuroscience;138(4):1351-60.

Wen-Jinn Liaw, Robert L. Stephens Jr, Brian C. Binns, Yachun Chu, Jehuda P. Sepkuty, Roger A. Johns, Jeffery D. Rothstein , Yuan-Xiang Tao. Spinal glutamate uptake is critical for maintaining normal sensory transmission in rat spinal cord. Pain 115 (2005) 60–70.

Wilkinson, M., Brawer, J.R., Wilkinson, D., 1985. Gonadal steroids induced modifications of opiate bindings sites in anterior hypothalamus of female rats. Biology Reproduction. 32:501-506.

Xia, S., Cai, Z.Y., Thio, L.L., Kim-Han, J.S., Dugan, L.L., Covey, D.F., Rothman, S. M., 2002. The estrogen receptor is not essential for all estrogen neuroprotection: new evidence from a new analog. Neurobiol. Dis. 9:282-293.

Yagi, K. 1995. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma
In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 108: Free Radical and Antioxidant Protocols, p.
101-106.

Yasmineh, W.G., Chung, M. And Caspers, J.I., 1992. Determination of catalase
activity on a centrifugal analyzer by an NADP/NADPH coupled enzyme reaction
system. *Clin. Biochem.* 25, pp. 21–27.