



Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Administração de Morfina Durante o Período Neonatal: Avaliação de
Sistemas de Neurotransmissão, Parâmetros Comportamentais e
Bioquímicos.**

Carla de Oliveira

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Administração de Morfina Durante o Período Neonatal: Avaliação de
Sistemas de Neurotransmissão, Parâmetros Comportamentais e
Bioquímicos.**

Autora: Carla de Oliveira

Orientadora: Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

de Oliveira, Carla
Administração de Morfina Durante o Período Neonatal: Avaliação de Sistemas de Neurotransmissão, Parâmetros Comportamentais e Bioquímicos. / Carla de Oliveira. -- 2017.
142 f.

Orientadora: Iraci Lucena da Silva Torres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Dor. 2. Neonatos. 3. Morfina. 4. Deprivação Materna. I. Lucena da Silva Torres, Iraci, orient. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Artur Francisco Schumacher Schuh
(PPGCM-UFRGS)

Dra. Luciana Paula Cadore Stefani
(PPGCM-UFRGS)

Dra. Giovana Duzzo Gamaro
(PPGBBio-UFPEL)

Dra. Izabel Cristina Custodio de Souza
(PPGBBio-UFPEL)

“Começamos a pensar em nossos ritmos cotidianos e descobriremos que existe uma pulsação subjacente a todos, que nos identifica e nos diferencia dos demais.”

Carlos Fregtman

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

- Agradeço muito à minha Orientadora Dra. Iraci Lucena da Silva Torres, pela oportunidade, confiança, por todos os conselhos e comentários inteligentes, pela brilhante orientação, pelo apoio e empenho, pelo incentivo constante. Obrigada por tudo.
- Por apoiar e acreditar em mim desde o início agradeço a minha eterna professora Dra. Izabel Cristina Custodio de Souza. Obrigada pela confiança.
- Gostaria de destacar a atenção e estimada colaboração da minha querida amiga e colega Dra. Vanessa Leal Scarabelot, por ter sido tão compreensiva e dedicada comigo. Por me auxiliar durante este período indicando a melhor direção no caminho em busca do saber. Agradeço-te pela paciência inesgotável, sugestões e apoio a este trabalho. Agradeço por estar sempre ao meu lado em toda a minha trajetória acadêmica científica. Muito Obrigada.
- Obrigada também a querida colega e amiga, Lauren Naomi Spezia Adachi, pela atenção e companheirismo, e por toda ajuda prestada durante este trabalho.
- Também gostaria de agradecer muitíssimo as colegas, Lisiane Santos Silva e Gabriela Gregory Regner, e ao admirável colega Diego Evandro da Silva Rios por toda ajuda nos experimentos, permitindo a realização deste estudo. Muito obrigada.
- À aluna de Iniciação Científica Natália de Paula Silveira, meu especial e afetuoso agradecimento por tudo que fizeste no transcorrer deste trabalho. A dedicação mostrada, o interesse, a disponibilidade, a responsabilidade e o carinho que tiveste comigo. Muito Obrigada.
- Especiais agradecimentos às colegas, Andressa de Souza e Joice Soares de Freitas, que trabalharam com muito empenho e energia para que pudéssemos concluir com êxito este trabalho.

- Às colegas Dra. Liciane Fernandes Medeiros, Dra. Isabel Cristina de Macedo e Stefania Giotti Cioato, por compartilharem suas experiências comigo ao longo destes anos.
- A todos os colegas do grupo de pesquisa em Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-Clínicas, pelo convívio e pela valiosa contribuição em alguns dos protocolos experimentais.
- Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - GPPG-HCPA, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto (15-0614), por dispor da Unidade de Experimentação Animal (UEA) e da Unidade de Análises Moleculares e Proteína (UAMP) onde o trabalho foi desenvolvido com eficácia e firmeza.
- Pela assistência, atenção e dedicação na minha pesquisa, sou grata à Marta Cioato, Tuane N Alves Garcez e à Daniela Campagnol da Unidade de Experimentação Animal. Também agradeço a minha querida Rosalina A Braga, Karen Schwambach, Sônia Rodrigues e Vera L Gonçalves por todo suporte para o desenvolvimento deste estudo.
- Pela benevolência e generosidade, agradeço aos queridos amigos Everaldo B de Almeida (CPE) e Jeferson B da Silva (UAMP). Obrigada por toda ajuda prestada.
- Agradeço muito à UFRGS, pela oportunidade, a CAPES, por ter financiado meus estudos. Agradeço também aos órgãos de fomento CNPq e FINEP que contribuíram para realização deste trabalho.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pela oportunidade de desenvolver meu Doutorado nesta instituição.
- Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Dr. Wolnei Caumo, obrigada pela confiança depositada em mim.
- A Vera Susana V. Ribeiro e aos demais funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, pelas informações e ajuda quando solicitadas.

- BIC/UFRGS, PIBIC CNPq/UFRGS e PROCAD, pelas bolsas dos alunos que participaram deste trabalho.
- Agradeço imensamente o amor da minha vida, Dr. Rafael Vercelino, pela paciência, companheirismo, amizade, amor e palavras de incentivo, motivando-me sempre a seguir em frente. Obrigada por tudo.
- Meu eterno agradecimento àqueles que me encorajaram e me apoiaram nestes anos de pesquisa e escrita: minha mãe, Maria Rejane de Oliveira, e meu pai, Luiz Carlos de Oliveira que acreditaram em mim e neste trabalho e que carregaram fardos extras a fim de que eu pudesse concluir com mérito a minha pesquisa. Obrigada sempre por tudo.
- Agradeço o incentivo e apoio dos meus irmãos Patrícia Cassidy e Eduardo Augusto de Oliveira.
- Por fim, muitas pessoas contribuíram para a realização desta pesquisa. Algumas compartilhando generosamente conhecimento, outras oferecendo incentivo constante por meio de palavras e gestos e outras apoiando e dando sustentação dia após dia na concretização deste ideal. A todos expresso meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
APRESENTAÇÃO.....	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Estratégias para Localizar e Selecionar Informações.....	6
2.2 Dor.....	8
2.3 Dor e Nocicepção em Neonato.....	12
2.4 Sistema Opioide	16
2.5 Morfina em Neonatos.....	19
2.6 Deprivação Materna	23
2.7 Biomarcadores.....	26
III. JUSTIFICATIVA	31
IV. OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo Geral	35
4.2 Objetivos Específicos.....	35
V. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	36
VI. ARTIGOS CIENTÍFICOS	53
6.1 Artigo 1	55
6.2 Artigo 2	89
VII. CONSIDERAÇÕES GERAIS	129
VIII. PERSPECTIVAS.....	132
IX. ANEXOS.....	134
A) APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	135
B) DIVULGAÇÕES	136
C) ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DO DOUTORADO	137
D) ARTIGO 1 SUBMETIDO AO PERIÓDICO BRAIN RESEARCH.....	141
E) ARTIGO 2 SUBMETIDO AO PERIÓDICO BRAIN, BEHAVIOR AND IMMUNITY ..	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da pesquisa realizada com as palavras-chave	7
Figura 2. Transmissão do estímulo nociceptivo.....	11
Figura 3. Linha de tempo da nocicepção em seres humanos.....	16

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA = Ácido α -Amino-3-Hidróxi-5-Metil-4-Isoxazolepropiónico

AMPC = Adenosina Monofosfato Cíclico

ANOVA = *Analysis of Variance* (Análise de Variância)

BDNF = *Brain Derived Neurotrophic Factor* (fator neurotrófico derivado do encéfalo)

CGRP = Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

DM = Deprivação Materna

δ = Delta

IASP = *International Association for Study of Pain* (Associação Internacional para o Estudo da Dor)

IL-1 β = Interleucina 1 beta

IL-4 = Interleucina 4

IL-5 = Interleucina 5

IL-6 = Interleucina 6

IL-7 = Interleucina 7

IL-10 = Interleucina 10

H⁺ = Íons Hidrogênio

HHA = Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

K⁺ = Íons Potássio

k = Kappa

LAM = Labirinto Aquático de Morris

LTP = *Long Term Potentiation* (potenciação de longa duração)

NK = Neurocinina

NMDA = N-metil-d-aspartato

NGF = *Neural Growth Factor* (fator de crescimento neural)

P1= 1º Dia Pós-Natal

P7 = 7º Dia Pós-Natal

P8 = 8º Dia Pós-Natal

P14 = 14º Dia Pós-Natal

RNs = Recém-nascidos

SN = Sistema Nervoso

SNC = Sistema Nervoso Central

SNP = Sistema Nervoso Periférico

s.c. = Subcutânea

TNF- α = *Tumor Necrosis Factor Alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

TrkB = Receptor Tirosina Quinase B

UTIs = Unidades de Terapia Intensiva

UTINs = Unidades de Terapia Intensiva Neonatal

μ = mu

APRESENTAÇÃO

Esta Tese está estruturada em 3 partes: - Parte I - Introdução, Revisão da Literatura, Objetivos e Referências Bibliográficas;

- Parte II - Materiais e Métodos, Resultados e Discussão na forma de artigos científicos;

- Parte III – Considerações Finais, aprovação do comitê de ética e a produção acadêmica durante o período de doutorado.

O item Referências Bibliográficas refere-se somente às referências contidas nos itens Introdução, Revisão da Literatura e Considerações Finais.

Detalhes técnicos mais precisos sobre a metodologia empregada em cada um dos trabalhos apresentados podem ser encontrados nos trabalhos científicos.

RESUMO

Dor em pediatria tem sido o foco de muitos estudos nas últimas décadas devido ao fato de que neonatos apresentam menor limiar a estímulos nocivos e inócuos em relação aos adultos. Desta forma, o uso de analgésicos é frequente para sedação e analgesia em UTIs pediátricas, e entre os opioides, a morfina é um dos mais utilizados. Adicionalmente, exposição a estímulos estressantes como a privação materna está entre os fatores ambientais relacionados a alterações no desenvolvimento neural. O estresse social ou a negligência do cuidado parental, e mais precisamente do cuidado materno em ratos, está associado a importantes alterações comportamentais na vida adulta. Entre estas alterações apresentadas ao longo da vida estão alterações na resposta ao estresse, e à alteração na sensibilidade a estímulos dolorosos, indexadas por hiperalgesia. Consequentemente, o estresse social gerado pela privação materna está relacionado a prejuízos cognitivos, emocionais e sociais, além de alterações neuroquímicas de longo prazo. Deste modo, é necessária atenção, prevenção e tratamento a esses eventos físicos, emocionais e comportamentais no período neonatal e durante a infância, uma vez que as bases neurobiológicas envolvidas nestes fenômenos ainda não foram completamente elucidadas. Considerando a relevância do tema, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos do tratamento com 5 µg de morfina, uma vez ao dia, do P8 ao P14 e a exposição a privação materna por 3 horas durante os primeiros 10 dias de vida em curto (P16), médio (P30) e longo prazo (P60), sobre o desenvolvimento dos reflexos neuromotores da prole por meio do Reflexo de Endireitamento, Geotaxia Negativa e Marcha; comportamento nociceptivo por meio dos testes Tail-Flick e Placa Quente, respectivamente. Um total de 58 filhotes foi utilizado. Os animais foram divididos em 5 grupos: controle total (C), que não recebeu nenhuma intervenção; salina (S), que recebeu solução salina; morfina (M), que recebeu morfina; privado salina (DS), que foram submetidos a privação materna e receberam solução salina; e privado morfina (DM), que foram submetidos a

deprivação materna e receberam morfina. Em relação aos testes neuroquímicos, foram analisados níveis de BDNF, NGF, IL-1 β e IL-4 em tronco e córtex cerebral que estão relacionados a fenômenos modulatórios em sistemas nervoso e imune. Os animais que receberam morfina e os privados maternos que receberam morfina apresentaram atraso no desenvolvimento dos reflexos iniciais. Alterações neuroquímicas também foram observadas. Os níveis de BDNF no tronco encefálico foram diminuídos em animais que receberam morfina e privação materna. Animais privados apresentaram um aumento nos níveis de NGF no tronco encefálico. Além disso, observou-se um aumento nos níveis de NGF do córtex cerebral em animais que receberam morfina, privados maternos e privados maternos que receberam morfina. Uma diminuição no limiar nociceptivo foi observada em animais que receberam morfina, privados maternos e os privados maternos que receberam morfina. Também houve interações em tronco encefálico e córtex cerebral nos níveis de BDNF, IL-1 β e IL-4 entre as variáveis independentes: tratamento, privação e tempo, o que levou à modificação nos níveis centrais dos neuroimunomoduladores avaliados. Estes dados demonstram a importância de estudos focados nos efeitos do tratamento com morfina no período neonatal ao longo da vida, assim como na busca por alternativas terapêuticas que possam reverter possíveis alterações decorrentes da separação materna no período neonatal.

Palavras-Chave: dor, neonatos, morfina, privação materna, respostas comportamentais, nociceptivas e neuroquímicas.

ABSTRACT

Pediatric pain has been the focus of many studies in the last decades due to the fact that neonates have a lower threshold for innocuous and noxious stimuli than for adults. Thus, the use of analgesics is frequent for sedation and analgesia in pediatric intensive care units, and among opioids, morphine is one of the most used. Additionally, exposure to stressful stimuli such as maternal deprivation is among the environmental factors related to changes in neural development. The social stress or neglect of parental care, and more precisely maternal care in rats, is associated with important behavioral changes in adult life. Among these changes presented throughout life are changes in the response to stress, and the change in sensitivity to painful stimuli, indexed by hyperalgesia. Consequently, the social stress generated by maternal deprivation is related to cognitive, emotional and social impairments, further to long-term neurochemical changes. Thus, attention, prevention and treatment are necessary to these physical, emotional and behavioral events in the neonatal period and during childhood, since the neurobiological bases involved in these phenomena have not yet been fully elucidated. Considering the relevance of the subject, the objective of this study was to verify the effects of treatment with 5 µg of morphine once a day from P8 to P14 and exposure to maternal deprivation for 3 hours during the first 10 days of short (P16), medium (P30) and long-term (P60), on the development of neuromotor reflexes of offspring through the righting Reflex, Negative Geotaxis and Gait; nociceptive behavior through the Tail-Flick and Hot Plate tests, respectively. A total of 58 puppies were utilized. The animals were divided in 5 groups: the total control group (C), which did not receive any intervention; saline group (S), which receive saline solution; morphine group (M), which receive morphine; deprived saline (DS), which were subjected to maternal deprivation and receive saline solution; and deprived morphine group (DM), which were subjected to maternal deprivation and receive morphine.

In relation to the neurochemical tests, levels of BDNF, NGF, IL-1 β and IL-4 were analyzed in the brainstem and cerebral cortex and are related to modulatory phenomena of the nervous and immune systems. Animals that received morphine and deprived animals that received morphine showed a delay in the development of early reflexes. Neurochemical changes were also observed. BDNF levels in the brainstem were decreased in animals receiving morphine and maternal deprivation. Deprived animals had an increase in NGF levels in the brainstem. Besides, an increase in NGF levels of the cerebral cortex was observed in animals receiving morphine, maternal deprivation and maternal deprivation receiving morphine. A decrease in the nociceptive threshold was observed in animals receiving morphine, maternal deprivation, and maternal deprivation receiving morphine. There were also interactions in the brainstem and cerebral cortex in the levels of BDNF, IL-1 β and IL-4 among the independent variables: treatment, deprivation and time, which led to the modification in the central levels of the neuroimmunomodulators evaluated. These data demonstrate the importance of studies focused on the effects of treatment with morphine in the neonatal period throughout life, as well as on the search for therapeutic alternatives that may reverse possible changes due to maternal deprivation in the neonatal period.

Keywords: pain, neonates, morphine, maternal deprivation, behavioral, nociceptive and neurochemical responses.

I. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Dor no neonato é um fenômeno complexo e envolve diferentes sistemas de neurotransmissores em um Sistema Nervoso (SN) em desenvolvimento (Smith et al., 2000; Fitzgerald & Beggs, 2001). Recém-nascidos (RNs) rotineiramente sofrem procedimentos dolorosos necessitando de cuidados intensivos, e nos últimos anos, têm sido documentados efeitos deletérios de longos períodos de exposição a procedimentos dolorosos em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTINs) (El Sayed et al., 2007; Anand et al., 2007; Pacifici, 2016). Não obstante, apesar do conhecimento de que a exposição a eventos dolorosos e estressantes no período neonatal significam sofrimento e desconforto para os RNs, é necessário à busca de tratamentos para minimizá-los, demonstrando a importância do estudo da dor em neonatos (Pereira et al., 2007; Pacifici, 2016). Sabe-se que os componentes do SN envolvidos na transmissão do estímulo doloroso ao córtex cerebral estão presentes em RNs a termo e em prematuros, porém a maturação e a organização desse sistema neurossensorial continua durante a vida pós-natal (Guinsburg et al., 2000). A indicação de analgesia deve ser individualizada e sempre considerada em todos os RNs submetidos a procedimentos invasivos, cirúrgicos ou não, pois tais procedimentos levam à alteração na sensibilidade a estímulos dolorosos, indexadas por hiperalgesia e alodinia (De Lima et al., 1999; Whitfield & Grunau, 2000; Grunau et al., 2001) e na resposta ao estresse (Grunau et al., 2004). É essencial, portanto, uma correta avaliação do quadro doloroso e o estabelecimento da intervenção adequada para o alívio deste são imprescindíveis para diminuir ou evitar efeitos nocivos ao desenvolvimento dos RNs. Deste modo, e levando em conta que o alívio da dor é uma das missões médicas primordiais, o uso de analgésicos vem crescendo em pacientes nesta faixa etária (De Lima et al., 1996; Suresh & Anand, 2001, El Sayed et al., 2007; Prestes et al., 2016).

Entre os analgésicos, os opioides e, sobretudo a morfina é um dos mais utilizados para sedação e analgesia em neonatos. Estudos prévios demonstram que em animais a exposição

de RNs a estímulos nocivos pode resultar em alterações comportamentais e nociceptivas na idade adulta (Anand et al., 1999; Bhutta et al., 2001; Anseloni et al., 2005, Rozisky et al., 2008, Medeiros, et al., 2011). Corroborando estes dados, estudos demonstram que RNs expostos a agentes nocivos podem ter aumento ou diminuição da sensibilidade aos estímulos nociceptivos na idade adulta, dependendo do tipo e duração do estímulo (Wang et al., 2004; Hohmann et al., 2005; Randich et al., 2006). É provável que a natureza plástica do SN do neonato seja responsável por estes efeitos (Ruda et al. 2000; Walker et al., 2003; Saab et al., 2004). Estudos em modelos animais evidenciaram que no 1º dia pós-natal (P1), os receptores opioides já se encontram bem distribuídos no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo que os receptores μ (mu) e κ (kappa) são os que predominam neste período. Entretanto, o pico de densidade do receptor μ ocorre no sétimo dia pós-natal (P7) e declina gradualmente até a terceira semana quando, então, atinge os níveis do adulto (Beland & Fitzgerald, 2001; Kar & Quirion, 1995).

Deste modo, tem sido sugerido que a potência analgésica da morfina é maior no neonato e declina com o avanço da idade (Nandi & Fitzgerald, 2005). Também foi demonstrado que alterações induzidas pela exposição à morfina no período pré-natal podem ter impacto, ao longo do desenvolvimento, sobre processos de neuroplasticidade (Schrott et al., 2008). A exposição à morfina no período pré-natal diminui os níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) em hipocampo, o que sugere a presença de alterações neuroplásticas (Schrott et al., 2008). Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que animais submetidos à exposição repetida de morfina no início da vida apresentam comportamento hiper nociceptivo na vida adulta (Rozisky et al., 2011) e aumento dos níveis de BDNF no hipocampo associado a possível sensibilização central, em médio e em longo prazo (Rozisky et al., 2013). Nesse contexto, a exposição a fármacos no início da vida pode ter implicações duradouras para o SN em desenvolvimento, como alterações neuroquímicas e

comportamentais em longo prazo em roedores (Rozisky et al., 2008, 2010, 2012, 2013, 2014, 2016).

Adicionalmente, crescente número de estudos clínicos demonstra a influência de fatores externos sobre dor (Tall, 2009; Gabriel et al., 2009; Gabriel et al., 2010). Além disso, fortes evidências apontam que, em seres humanos, transtornos psiquiátricos apresentados na vida adulta, tais como ansiedade, depressão, medo e esquizofrenia, também têm sido citados como decorrentes de processos dolorosos na infância (Reichert et al., 2000; Carbajal et al., 2008; McGrath, 2011; Rodkey & Pillai Riddell, 2013; Victoria & Murphy, 2016).

Além das consequências associadas à manipulação dolorosa e/ou a tratamentos farmacológicos, a privação materna (DM) pós-natal é um dos mais potentes estressores naturais durante o desenvolvimento (Bentetti et al., 2009). A exposição a DM pode causar um atraso no desenvolvimento, afetando negativamente o desenvolvimento cerebral e, assim, aumentando o risco de ocorrência de dificuldades comportamentais (Macri et al., 2011; Weiss et al., 2011). De fato, a exposição a estímulos estressantes é, sobretudo, um dos fatores ambientais relacionados a alterações no desenvolvimento neural (Lai et al., 2006; Aisa et al., 2009). Desta forma, o ambiente é um fator determinante desde o nascimento até o início da vida adulta, quando o SN está mais suscetível às adaptações (Fernández-Teruel et al., 2002; Nunes et al., 2003). Considerando que neonatos em UTINs são submetidos a procedimentos dolorosos e que esse é um período em que naturalmente estes se encontram privados de suas mães; é de alta relevância clínica, investigar em modelos pré-clínicos o papel da administração repetida de morfina em ratos neonatos associado a DM, uma vez que permite verificar as alterações comportamentais e neuroquímicas envolvidas com o processo nociceptivo no período neonatal.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para Localizar e Selecionar Informações

Nesta revisão de literatura buscou-se apresentar os principais aspectos da dor em neonatos, morfina, privação materna e a relação com biomarcadores. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (site PubMed), LILACS, SciELO. Foram selecionados artigos publicados entre 1996 e 2016.

Nos sites PubMed, LILACS, SciELO foram realizadas buscas utilizando os termos: *neonates pain*, *morphine*, *maternal deprivation*, *BDNF*, *NGF*, *IL-1 β* e *IL-4*. Em relação ao termo *neonates pain*, foram encontrados 5.666 artigos no PubMed e 56 artigos no LILACS, já no SciELO foram encontrados 59 artigos. Utilizando-se o termo *morphine* foram encontrados 26.131 artigos no PubMed, 437 artigos no LILACS e 334 no SciELO. Com o descritor *maternal deprivation* a busca no PubMed encontrou 2.438 artigos, 29 no LILACS e 24 no SciELO. Com o descritor *BDNF*, foram encontrados 17.484 no PubMed, 64 no LILACS e 46 no SciELO. Para *NGF*, 9.871 artigos foram encontrados no PubMed, 85 no LILACS e 21 no SciELO. Em relação a *IL-1 β* 31.649 artigos foram encontrados no PubMed, 103 no LILACS e 86 no SciELO. Por último, a busca simples de *IL-4* revelou 37.717 artigos no PubMed, 330 no LILACS e 1.026 no SciELO.

Refinando-se a busca, com cruzamentos entre as palavras-chave foi encontrado um reduzido número de artigos como mostrado na Figura 1.

Palavras-Chave

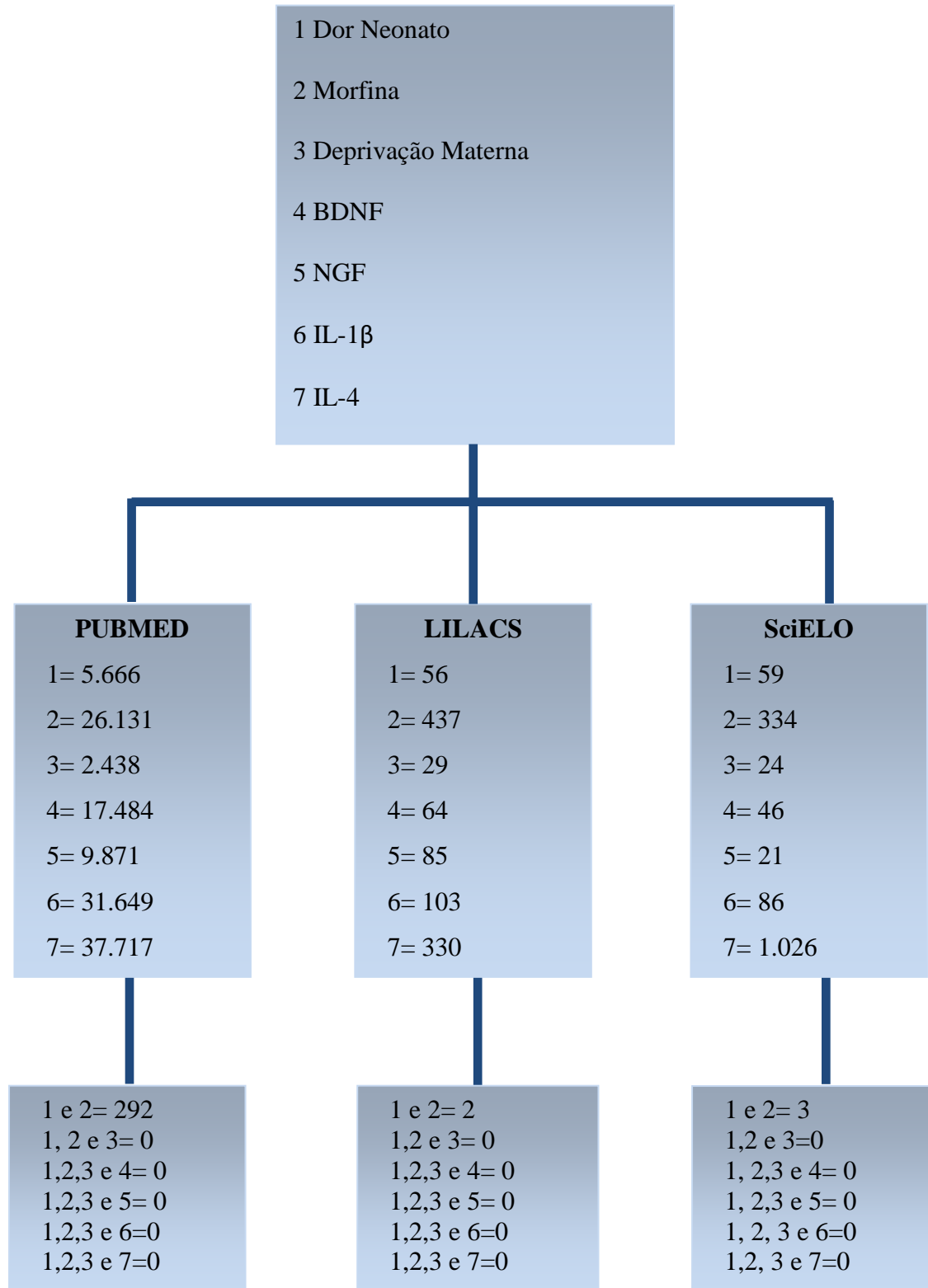


Figura 1. Fluxograma da pesquisa realizada com as palavras-chave

2.2 Dor

Dor é considerada uma das grandes preocupações da humanidade. Desde os primórdios da civilização, de acordo com os registros gráficos da pré-história e com os diversos documentos escritos posteriormente, o ser humano busca esclarecer as razões que justificam a ocorrência da dor e desenvolver procedimentos destinados ao seu controle (Madigan & Raj, 2000). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano” (Merskey & Bogduk, 1994). No entanto, estudo publicado recentemente sugere uma nova definição no conceito dor, abrangendo aspectos cognitivos e sociais (Williams & Craig, 2016). Tais pesquisadores sugerem que a definição existente é parcial, omitindo as qualidades essenciais necessárias para promover uma boa ciência e ótimos cuidados de saúde. Assim, definem a dor como “uma experiência angustiante associada a dano tecidual real ou potencial com componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais” (Williams & Craig, 2016).

Distinguem-se dois componentes envolvidos na dor; a sensação dolorosa propriamente dita ou nocicepção, e a reatividade emocional à dor. O termo nocicepção, derivado de *noci* (dano ou lesão em latim), é empregado para descrever a resposta neural aos estímulos nocivos, os quais podem ser exógenos (mecânicos, químicos, físicos e biológicos) ou endógenos (como inflamação e isquemia cerebral). Além disso, compreende a recepção dos estímulos nocivos por receptores específicos (nociceptores), condução até o SNC por meio de vias sensoriais e a integração da sensação dolorosa em níveis talâmico e cortical (Loeser et al., 2001). A reatividade emocional à dor corresponde à interpretação afetiva da dor, de caráter individual e influenciada por estados ou traços psicológicos, experiências prévias e fatores sociais, culturais e ambientais (Jones, 1993; Wall & Melzack, 1994). Deste modo, a dor é sempre uma manifestação subjetiva. Em modelos animais fala-se de nocicepção, uma vez que

a dor é avaliada indiretamente por meio de respostas comportamentais (Millan, 1995). Em relação à transdução dos estímulos dolorosos, esta depende da ativação de receptores especializados, os nociceptores, que são terminações nervosas livres das fibras C e A δ . Os nociceptores são ativados quando um estímulo atinge o limiar nocivo (Schaible, 2007) e a resposta pode aumentar progressivamente de acordo com a intensidade do estímulo, se a estimulação for contínua, pode ocorrer diminuição do limiar de resposta destes nociceptores, fenômeno conhecido como sensibilização (Riedel & Neeck, 2001; Schaible, 2007).

O estímulo nociceptivo é detectado pelos nociceptores, receptores sensoriais ativados por estímulos nocivos transmitindo o sinal para o SNC como estímulo elétrico (potenciais de ação) (Zhang & Bao, 2006). Estes nociceptores estão localizados nas terminações nervosas livres, e encontram-se amplamente distribuídos no organismo. Os nociceptores são classificados, de acordo com suas modalidades, em mecânicos, térmicos e polimodais, e são constituídos por fibras mielinizadas (tipo A δ), possuindo velocidade de condução rápida de aproximadamente 5-30 m/s. Ainda, os nociceptores polimodais são ativados por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos de alta intensidade e são constituídos por fibras não mielinizadas (tipo C) e possuem velocidade de condução lenta de aproximadamente 1,0 m/s. As projeções destas fibras entram no corno dorsal, ascendem por segmentos pelo trato pósterolateral (Trato de Liassauer) e terminam nas lâminas superficiais do corno dorsal (Cervego & Iggo, 1980). No corno dorsal da medula espinhal tais fibras fazem sinapse com neurônios aferentes secundários, interneurônios e neurônios do corno ventral motor (Basbaum & Jessel, 2000; Loeser et al., 2001). A lâmina I (lâmina marginal) recebe somente aferências nociceptivas, enquanto a lâmina II (substância gelatinosa) é formada por interneurônios excitatórios e inibitórios, os quais respondem às estimulações nocivas e não nocivas (Basbaum & Jessel, 2000) (Figura 2).

Os nociceptores são estimulados por substâncias como a serotonina, H⁺, K⁺, histamina, bradicinina, colecistocinina e substância P (Loeser et al., 2001). A condução do

estímulo por meio das fibras induz a liberação de neurotransmissores entre os neurônios de 1^a e 2^a ordem no corno dorsal da medula espinhal como o glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). O glutamato promove potenciais excitatórios pós-sinápticos rápidos por meio da ativação de receptores ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA); entretanto, os potenciais lentos são produzidos por meio da liberação de peptídeos como substância P e CGRP (Menescal-de-Oliveira, 2008). Algumas dessas fibras se projetam para o sistema límbico, responsável pelas respostas de luta e fuga e emocionais desagradáveis ao estímulo nociceptivo (Loeser et al., 2000; Basbaum & Jessel, 2001).

As vias ascendentes de condução são os tratos espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e espino-hipotalâmico. O trato espinotalâmico é a via mais proeminente na medula espinhal. Os axônios cruzam a linha média no nível da comissura anterior e chegam até o tálamo, que é subdividido em espinotalâmico lateral ou via neoespinotalâmica, e espinotalâmico medial ou via paleoespinotalâmica. A via neoespinotalâmica projeta-se no núcleo póstero-lateral do tálamo, de onde partem projeções para o córtex somatossensorial primário, onde ocorre a percepção da dor; este trato é relacionado com aspectos discriminativos da dor como localização, intensidade e duração (Loeser et al., 2001). Por outro lado, a via paleoespinotalâmica, a partir da medula, projeta-se para o tálamo medial e posteriormente para o córtex cerebral de ambos os hemisférios, e perde-se, assim, a somatotopia do estímulo (Ferreira, 2004). As aferências chegam ao tálamo, estrutura responsável pela integração dos impulsos nociceptivos, que envia projeções até o córtex por meio dos neurônios de 3^a ordem (DeMarco & Pascoe, 2008). O córtex é essencial para determinar aspectos discriminativos como localização, intensidade, duração e natureza do estímulo nocivo e aspectos afetivo-cognitivos como emoção, percepção, aprendizado e memória (Craig & Dostrovsky, 1999; Sherman & Guillery, 1996, 2002).

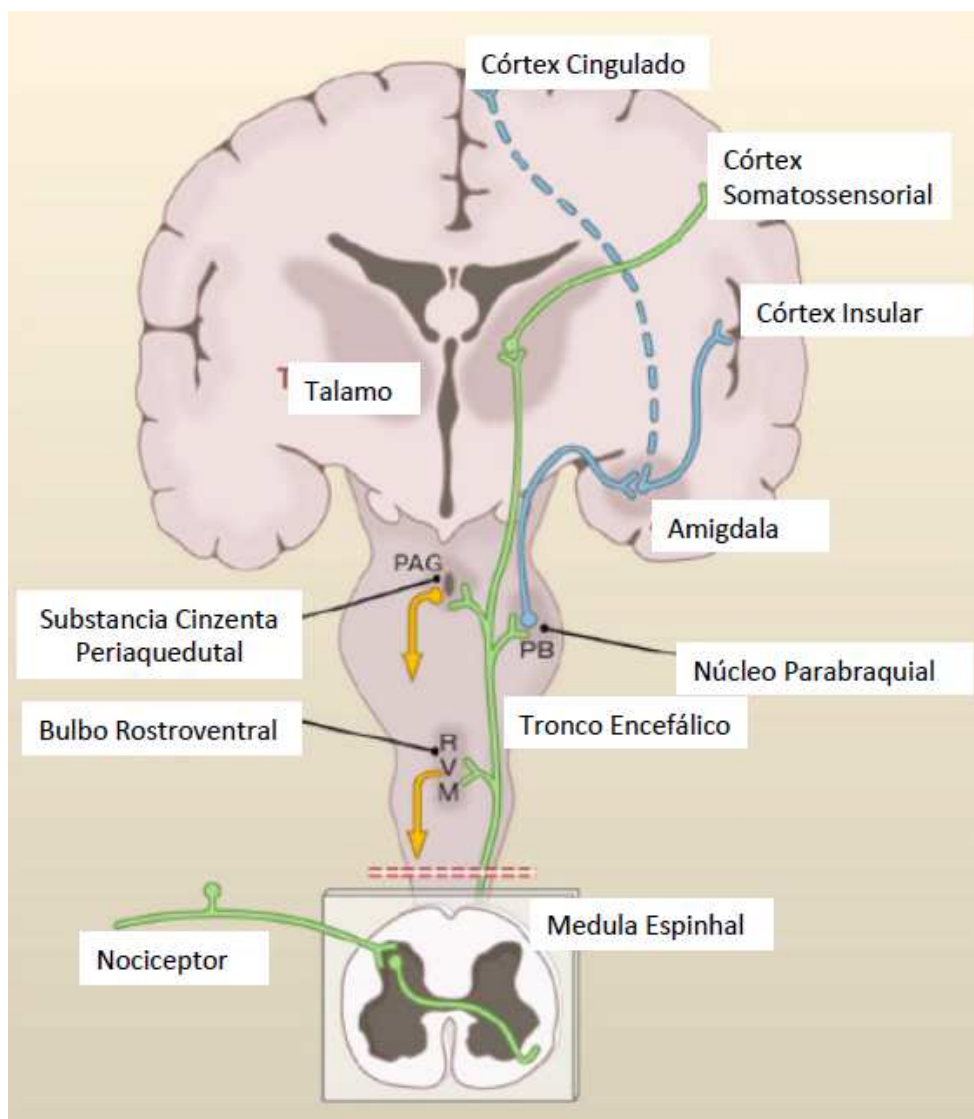


Figura 2. Transmissão do estímulo nociceptivo. (Adaptado de Basbaum et al., 2009).

A transmissão nociceptiva é influenciada por processos centrais e periféricos e liberação de substâncias mediadoras (neurotransmissores, peptídeos e neuromoduladores) que podem ativar ou inibir este processo. De acordo com a complexidade na transmissão do estímulo nociceptivo, os processos de dor crônica podem desencadear alterações plásticas em diversos níveis deste sistema, levando à sensibilização tanto em nível periférico quanto central (Ji et al., 2003; Basbaum et al., 2009; Costigan et al., 2009). De fato, a sensibilização periférica está envolvida com o acúmulo de moduladores locais liberados em resposta ao dano e que atuam sobre a aferência nociceptiva primária. Esta sensibilização tem como consequência a exacerbação da resposta ao estímulo doloroso (Woolf & Chong, 1993; Aida et

al., 1999). Dentre os mediadores, a bradicinina e a substância P promovem intensa vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, contribuindo para o aumento da inflamação (Karabucak et al., 2005) e as prostaglandinas promovem a diminuição do limiar dos nociceptores (O'Banion, 1999). A sensibilização central pode resultar de processos independentes (sensibilização sináptica clássica, *wind up* e potenciação de longa duração – LTP) (Ji et al., 2003). A sensibilização sináptica clássica está relacionada aos estímulos periféricos que aumentam a resposta das fibras A e C (potenciação homossináptica) e fibras A β (potenciação heterossináptica). O *wind up* resulta da estimulação aferente repetida de baixa frequência (inferior a 5 Hz) por tempo prolongado com liberação de neurotransmissores excitatórios, sobretudo glutamato, no corno dorsal da medula espinhal. O glutamato liga-se a receptores NMDA resultando em influxo de cálcio e ativação da proteína cinase C, que modifica estruturalmente o canal de NMDA, aumentando sua sensibilidade ao glutamato e a resposta à dor frente a estímulos repetidos de mesma intensidade (Schaible, 2007). A LTP torna mais eficiente a transmissão sináptica (Zhuo, 2009) e está relacionada a estímulos repetidos de alta frequência com posterior ativação de receptores AMPA e de neurocinina (NK)-1 (Randic et al., 1993).

Nos diversos estágios das vias de dor, diferentes sistemas de controle modulam, constantemente, tanto de maneira ascendente quanto descendente, a transmissão da informação nociceptiva (Woolf, 2011). Os receptores NMDA e opioides fazem parte dos dois sistemas mais importantes na modulação da nocicepção e antinocicepção e estão distribuídos em praticamente todas as regiões do SNC (Riedel & Neeck, 2001).

2.3 Dor e Nocicepção em Neonato

Neonatos prematuros, bem como indivíduos de menor idade, são frequentemente submetidos a uma série de procedimentos dolorosos tais como intubação, acesso venoso,

coleta de exames por punção arterial, punção lombar, aspiração de tubo orotraqueal, ventilação mecânica, drenagem de tórax e punção de calcânhar (Anand et al., 2006). Na prática clínica, prematuros em UTINs são rotineiramente expostos a uma média de dez terapias ou procedimentos invasivos por dia, sem analgésicos (Carbajal et al., 2008; Lee et al., 2016). Os RNs não podem relatar dor ou desconforto da mesma maneira que crianças de maior idade ou adultos (Anand et al., 2006). Por conseguinte, muitos dos instrumentos de estudo padrão usados para medir a eficácia da analgesia ou definir as metas de sedação ou analgesia não pode ser aplicado nesta população (Buttner & Finke, 2000). Estudos indicam que tanto crianças, (Guinsburg et al., 2000; El Sayed et al., 2007; Disher et al., 2016) quanto animais (Falcon et al., 1996; Rozisky et al., 2008; 2012, 2013, 2014, 2016; Lee et al., 2016) de menor faixa etária são capazes de responder a estímulos dolorosos indicativos de dor, uma vez que o processo de maturação das vias nociceptivas inicia na gestação e continua após o nascimento.

Nesse contexto, estudos com modelos animais possibilitam uma melhor compreensão da neurofisiologia da dor no RN determinando que neonatos não somente sentem dor como também são capazes de responder aos estímulos dolorosos (Fitzgerald & Beggs, 2001; Rozisky et al., 2008, 2012, 2013, 2014, 2016). Desde então, tem havido um crescimento em estudos focados no sistema neurobiológico do desenvolvimento das vias nociceptivas (Fitzgerald & Beggs, 2001; Rozisky et al., 2008; 2012, 2013; 2014, 2016).

O processo nociceptivo envolve alterações neurobiológicas sequenciais induzidas pela ativação de nociceptores periféricos com consequente modulação central (Basbaum & Jessen, 2000). Entretanto, se a dor no neonato for de longa duração ou recorrente, o desenvolvimento do sistema nociceptivo pode ser modificado, resultando em alterações em nível espinhal e supraespinhal (Anand & Scalzo, 2000). Anand & Scalzo relatam que modelos de experiência precoce, como dor repetitiva, sepse ou privação materna em roedores e outras espécies promovem alterações múltiplas no encéfalo adulto, correlacionadas com fenótipos

comportamentais específicos, dependendo do momento e da natureza do insulto (Anand & Scalzo, 2000). Nos diversos estágios das vias de dor, diferentes sistemas de controle modulam, constantemente, tanto de maneira ascendente quanto descendente, a transmissão da informação nociceptiva (Woolf, 2011). Assim, o processamento nociceptivo começa a ser traçado a partir da presença dos nociceptores próximos à epiderme e, gradualmente, eles descem para as camadas mais profundas de acordo com o desenvolvimento epitelial (Anand & Carr, 1989; Fitzgerald, 1991). Durante a 16ª semana de gestação, os receptores sensoriais cutâneos encontram-se presentes, na 30ª semana de gestação as vias nociceptivas talâmicas e espinhais encontram-se mielinizadas e as vias aferentes nociceptivas atingem o córtex entre a 20ª e 26ª semanas de gestação (Simons & Tibboel, 2006). A partir da 26ª semana de gestação o feto já apresenta considerável maturação das vias ascendentes periféricas, espinhais e supraespinhais. Porém, a maturação das vias inibitórias descendentes ocorre somente após as vias ascendentes estarem pré-estabelecidas (Berde & Sethna, 2002).

Ratos RNs apresentam maturação das vias nociceptivas semelhantes às de um feto humano de 24 semanas de gestação (Marsh et al., 1997); com uma semana de vida, estas vias, no rato, se assemelham às de um humano RN a termo (Figura 3), e com 21 dias são semelhantes a uma criança de um ano de idade (Fitzgerald & Anand, 1993). Evidências sugerem que dores não tratadas em crianças e adolescentes podem desencadear alterações no perfil de resposta nociceptiva, aumentando a necessidade de analgesia no pós-operatório em procedimentos na vida adulta (Caumo et al., 2003; Peters et al., 2005). Assim, as consequências da dor intensa ou persistente no prematuro ou neonato podem provocar alterações de comportamento como déficits cognitivos e comportamentais, bem como a percepção da dor, que podem persistir ao longo da vida (Bhutta & Anand, 2002). Estudos prévios sugerem que exposição à morfina durante o período neonatal de ratos pode promover mudanças em vias de sinalização da dor que pode ser expressa como um aumento da resposta nociceptiva na vida adulta (Sweitzer et al., 2004; Rozisky et al., 2011; 2012; 2016).

Adicionalmente, outros estudos têm documentado os efeitos deletérios de longa duração resultantes da exposição repetida a procedimentos dolorosos em UTINs, como resposta alterada ao estresse (Grunau et al., 2004) e hiperalgesia (Whitfield & Grunau, 2000; Grunau et al., 2001; Rozisky et al., 2011, 2016). Recentemente, um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que a administração repetida de baixas doses de morfina no período neonatal induz hiperalgesia em ratos adultos (Rozisky et al., 2016). Cabe salientar que esta resposta nociceptiva aumentada foi totalmente revertida pela administração de melatonina sugerindo que a melatonina pode ser uma importante opção terapêutica para inibir os efeitos deletérios na ontogenia das vias nociceptivas induzidas pela exposição à morfina no período neonatal (Rozisky et al., 2016). Desta forma, estudos em animais têm contribuído nas investigações dos efeitos deletérios do estímulo doloroso resultante de procedimentos invasivos (Ruda et al., 2000; Beland & Fitzgerald, 2001; Rozisky et al., 2008; 2012, 2013, 2014, 2016).

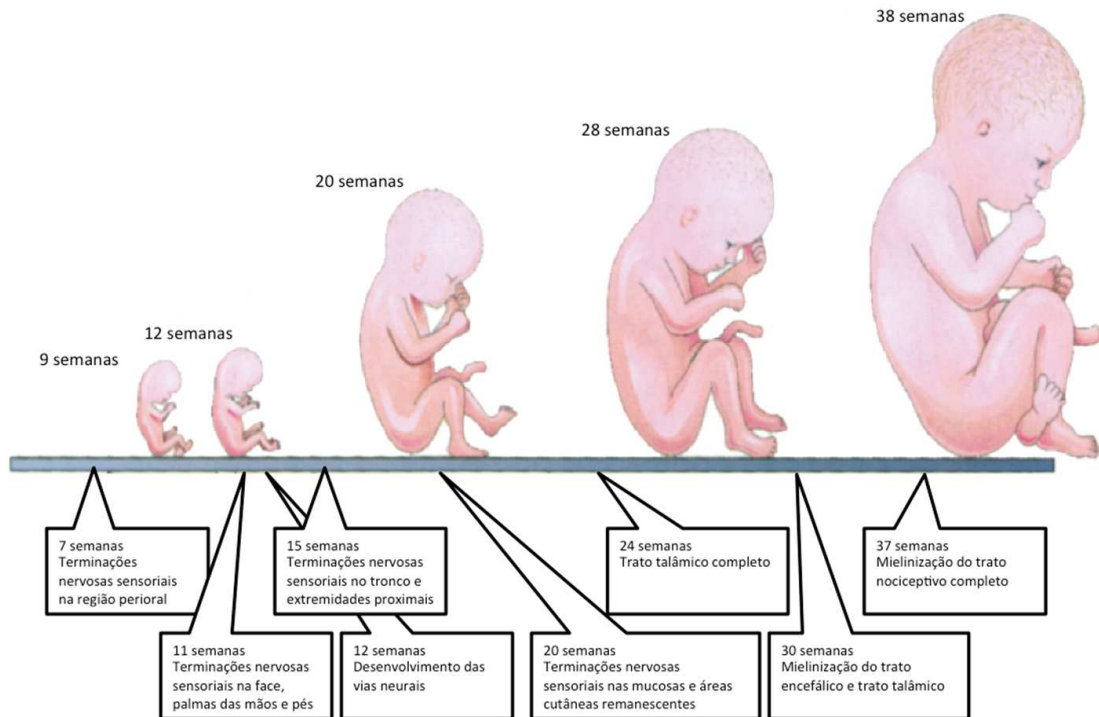


Figura 3. Linha de tempo da nocicepção em seres humanos. (Adaptado de Moore & Persuad, 1998).

2.4 Sistema Opioide

O conhecimento do ópio remonta à pré-história ou, pelo menos, aos períodos históricos muito distantes (Booth, 1998). Consta que desde tempos imemoriais, o ópio e os seus derivados, além de exercerem ponderável influência sobre o comportamento dos seres humanos, têm sido empregados como sedativo e como analgésico (Duarte, 2005). Na década de 1960, Paul Janssen sintetizou pela primeira vez o fentanil em seu laboratório e, nos anos 1970, foram isolados e purificados os primeiros polipeptídeos endógenos, as encefalinas e β -endorfinas (Pasternak et al., 1976). Alguns anos após, em 1973, ocorreu a descoberta dos receptores opioides por meio de estudos farmacológicos com antagonistas e agonistas em que foram identificados os receptores μ (mu) e κ (kappa) (Pert & Snyder, 1973). Na década de

1980, outro grupo de polipeptídeos endógenos foi identificado e foi chamado de dinorfinas (Brownstein, 1993). Mais tarde, Kosterlitz e col. (1980), utilizando-se de *vas deferens* de ratos, determinou um novo tipo de receptor e, seguindo a mesma regra de nomenclatura, denominou δ (delta), com isso, totalizando três receptores opioides (Brownstein, 1993; Pert & Snyder, 1973). Portanto, a partir do século XIX, com o isolamento dos alcalóides do ópio e as facilidades para o emprego dessas substâncias por via parenteral, houve aumento do interesse pelo uso criterioso dos opioides na área médica e da análise das consequências sociais de seu uso abusivo (Duarte, 2005; Prestes et al., 2016).

Os opioides desempenham um papel central na nocicepção. Opioides endógenos modulam a experiência da dor, sendo a terapêutica de opioides fundamental para o manejo clínico da dor aguda e crônica (Marvizon et al., 2010). Quando utilizados em dosagens adequadas, os opioides produzem alívio seletivo da dor sem afetar a consciência. Apesar do uso generalizado, terapias atuais com opioides não são benéficas em todos os tipos de dor, e podem resultar em efeitos secundários desfavoráveis (Marvizon et al., 2010). A analgesia é consequência da ação em diferentes níveis do SNC (Rocha et al., 2004). A morfina é um agonista de receptores opioides μ , k e δ (delta), frequentemente utilizado em ambiente hospitalar para aliviar a dor moderada a grave durante o período neonatal devido à presença de receptores opioides espinhais desde o nascimento (Rahman & Dickenson, 1999). Sabe-se que receptores opioides estão amplamente expressos em várias estruturas do SNC e no sistema nervoso periférico (SNP) (Beland & Fitzgerald, 2001; Pereira et al., 2007). Um estímulo aos receptores inibe a transmissão do estímulo nociceptivo aos centros superiores de processamento, assim os opioides inibem a aferência da dor em medula espinhal e ativam vias descendentes inibitórias (Pereira et al., 2007).

Os receptores opioides presentes nas membranas celulares são acoplados à proteína G inibitória e sua ativação promove a inibição de adenilato ciclase, diminuindo a concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Em sequência ocorre o fechamento

dos canais de cálcio voltagem-dependentes nas terminações pré-sinápticas, reduzindo a liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato. Os receptores opioides também atuam na pós-sinapse, abrindo canais de potássio (K^+), promovendo hiperpolarização neuronal, reduzindo a excitabilidade evocada pelas fibras A δ e C, bloqueando a transmissão do estímulo doloroso (Jordan & Devi, 1999). Desde 1º dia pós-natal (P1), os receptores já se encontram distribuídos no SNC, sendo que os receptores μ e κ são os que prevalecem neste período. Igualmente, em ratos, no período neonatal, μ e κ são os receptores predominantes. O pico de ligação do receptor μ ocorre no 7º dia pós-natal (P7), e declina gradualmente até a terceira semana, quando atinge os níveis de adulto (Beland & Fitzgerald, 2001; Kar & Quirion, 1995). Dessa forma, alguns autores sugerem que a potência analgésica da morfina é maior no neonato e declina com o avanço da idade (Nandi & Fitzgerald, 2005; Rozisky et al., 2008).

As ações dos opioides dependem da afinidade pelo subtipo de receptores e da localização dos mesmos no SN. Receptores κ estão localizados no hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa, além de neurônios sensitivos periféricos. Estes receptores κ estão envolvidos na resposta nociceptiva, mas também em termorregulação, controle de diurese e secreção neuroendócrina (Dhawan et al., 1996). Receptores δ são responsáveis primariamente pela analgesia, mas também modulam funções cognitivas e de dependência física. Estão localizados nos núcleos pontinos, amígdalas, bulbo olfatório, córtex cerebral profundo e neurônios sensitivos periféricos (Dhawan et al., 1996). Os receptores μ regulam processos nociceptivos, ciclo respiratório e trânsito intestinal; localizam-se no córtex cerebral, tálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa e trato gastrintestinal (Dhawan et al., 1996). A morfina é agonista dos receptores opioides atuando por meio de sua ligação aos receptores do tipo μ , classificados nos subtipos μ_1 e μ_2 , que estão distribuídos ao longo da medula espinhal (Valadão et al., 2002). Assim, a morfina atua no

mesencéfalo e medula, ativando as vias nociceptivas descendentes, que modulam a nocicepção, e no sistema límbico, alterando os componentes emocionais da dor.

2.5 Morfina em Neonatos

Desde o início dos anos 80, tem-se tornado cada vez mais evidente que o feto e o RN percebem e respondem a estímulos dolorosos por uma série de complexos bioquímicos, fisiológicos e alterações comportamentais (Fitzgerald & Beggs, 2001; Anand et al., 2006). A partir de estudos neurobiológicos do desenvolvimento da dor, observou-se que os pacientes nesta faixa etária não só sentem dor, como apresentam diminuição no limiar da dor em resposta ao estímulo nocivo e inócuo em relação às crianças de maior idade e aos adultos (Grunau et al., 1994; Johnston et al., 1996). Os primeiros reflexos são respostas automáticas a uma forma de estimulação e constituem a base para as habilidades motoras, assim o desenvolvimento prejudicado pode indicar um fator preditivo de modificações comportamentais na idade adulta por meio da avaliação de reflexos neonatais e dessa forma é possível identificar a persistência ou ausência de reflexos e detectar atraso no desenvolvimento (Berk, 2006). Associado a isto, sabe-se que as primeiras experiências dolorosas podem ter efeitos em longo prazo sobre as respostas nociceptivas (Johnston et al., 1996; Grunau et al., 1994, 2004; Ruda et al., 2000). Estudos pré-clínicos demonstram que a administração de morfina no período neonatal pode induzir efeitos em longo prazo nos circuitos da dor, levando à hiperalgesia induzida pelo opioide na vida adulta (Rozisky et al., 2011, 2016). Devido a estas importantes descobertas e com o reconhecimento dos efeitos em longo prazo da dor subtratada em lactentes e crianças, tem ocorrido um aumento da utilização de analgésicos nesta população de pacientes (De Lima et al., 1996; Suresh & Anand, 2001, El Sayed et al., 2007).

Ao longo das últimas décadas, o uso de analgésicos opioides como a morfina aumentou em UTINs como consequência de mudanças e avanços na compreensão, identificação e tratamento da dor em crianças (Suresh & Anand, 2001; El Sayed et al., 2007). Os avanços dos cuidados neonatais dos RNs de baixo peso, especialmente aqueles RNs abaixo de 1000g requereram muitos processos invasivos. Entre estes, estão a intubação endotraqueal e a ventilação prolongada, devido à severa imaturidade pulmonar, doença da membrana hialina e displasia broncopulmonar (Aranda et al., 2005; Anand et al., 2006). Estima-se mais da metade dos RNs de baixo peso ao nascer entre 401-1500g sejam intubados na sala de parto e 70% destes RNs com peso menor que 1500g ao nascer recebam em algum momento ventilação mecânica durante a sua hospitalização (Aranda et al., 2005; Anand et al., 2006). Deste modo, melhorias nos resultados clínicos de curto e longo prazo de RNs criticamente doentes necessitaram o amplo uso de fármacos opioides para analgesia e sedação (Suresh & Anand, 2001; El Sayed et al., 2007). Neonatos são rotineiramente tratados com morfina para o alívio da dor, especialmente com exposição crônica para sedação para permitir ventilação mecânica nas UTIs pediátricas (Anand et al.; 1999; Aranda et al., 2005). Estudo de Anand e colaboradores (1999) reforçam a hipótese que os RNs que receberam morfina apresentaram menor risco de morte e menor morbidade neurológica comparado com os RNs que receberam midazolam, que embora possua propriedades sedativas, é destituída de efeito analgésico. Os autores acreditam que o efeito benéfico observado naqueles que receberam morfina se deva à diminuição do estresse, estabilidade da pressão e melhora da oxigenação.

A morfina, quando administrada em neonatos humanos, apresenta início de ação rápida, de aproximadamente 5 minutos, e o pico do efeito analgésico é de 15 minutos. É metabolizada pelo fígado pela enzima uridina 5'-difosfato glucoroniltransferase em dois compostos: morfina-3- glucuronídeo (M3G) e morfina-6 glucuronídeo (M6G), e o *clearance* ocorre por meio da eliminação dos seus metabólitos pela urina (Guinsburg, 1999). Dentre os efeitos adversos da morfina destacam-se depressão respiratória, náuseas e vômitos e retenção

urinária, comuns a todos os opioides. A morfina desencadeia também liberação de histamina, a qual está relacionada a prurido e broncoespasmo, este último especialmente em neonatos portadores de doença pulmonar crônica. Além disso, tolerância e síndrome de abstinência podem ser observadas, dependendo do tempo de utilização do fármaco e da estratégia empregada para a sua suspensão (Arnold et al., 1990; Guinsburg, 1999). A tolerância é definida como alterações da resposta fisiológica ou celular à exposição repetida a opioides levando a diminuição do efeito analgésico, e a dependência representa a manifestação dos sintomas que ocorrem após a retirada do opioide (Richardson et al., 2006). Do mesmo modo, o tratamento com opioide durante o período neonatal também pode desencadear alterações comportamentais após a retirada do fármaco (síndrome de abstinência). Mais de 48% dos bebês e crianças que recebem doses terapêuticas de opioides intravenosos demonstram sintomas de retirada e dependência aos opioides, tais como sinais disfóricos e aversivos, os quais são também demonstrados por meio de modelos animais (Franck & Vilardi, 1995; 1998; Taddio, 2002; Pereira et al., 2007).

Entretanto, a eficácia analgésica da morfina na redução da dor em animais neonatos tem sido demonstrada em muitos estudos na área (Nandi & Fitzgerald, 2005; Rozisky et al., 2008, 2011, 2012, 2013, 2014, 2016). Embora mecanismos inibitórios descendentes não sejam completamente formados até a terceira semana de vida (Nandi & Fitzgerald, 2005), morfina e outros agonistas dos receptores opioides são analgésicos eficazes durante o período neonatal, devido à presença de receptores opioides espinhais desde o nascimento (Rahman & Dickenson, 1999). Alguns autores sugerem que a potência analgésica da morfina é maior no neonato e declina com o avançar da idade (Nandi & Fitzgerald, 2004). Outros postulam que o efeito da morfina aumenta com a idade devido à proliferação dos receptores opioides (Auguy-Valette et al., 1978; Zhang & Pasternak, 1981) e pela maturação dos mecanismos inibitórios de modulação na terceira semana após o nascimento (Nandi & Fitzgerald, 2004). Além das evidências relacionadas à maturidade do sistema neurobiológico, a mudança de resposta ao

efeito da morfina também tem sido demonstrada a partir de estudos comportamentais. Prévios estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que animais que receberam morfina no período neonatal, do P8 ao P14, apresentam maior tempo de analgesia no último do que no primeiro dia de tratamento (Rozisky et al., 2008), portanto não desenvolveram tolerância ao opioide. No entanto, quando submetidos à exposição aguda a morfina na idade adulta apresentaram maior tempo de analgesia do que os que não foram tratados previamente com morfina. Assim, estes resultados refletem possíveis alterações em longo prazo induzidas pela morfina em estruturas do SNC que modulam as respostas nociceptivas (Rozisky et al., 2008).

Possivelmente, a variação na expressão de receptor opioide e na sensibilidade aos agonistas explique as flutuações na susceptibilidade à analgesia e ao desenvolvimento de tolerância ao longo do desenvolvimento. Outro estudo do nosso grupo em que os animais foram submetidos à exposição repetida de morfina no início da vida apresentou comportamento hiper nociceptivo na vida adulta (Rozisky et al., 2011). Este aumento da resposta nociceptiva foi revertido por um antagonista do receptor de N-metil-d-aspartato (NMDA) (Rozisky et al., 2011), o que sugere que a exposição à morfina no início da vida reduz o limiar nociceptivo devido a possíveis adaptações no sistema glutamatérgico. Além disto, Rozisky et al. (2013) demonstraram que o tratamento repetido com morfina no início da vida pode levar ao aumento dos níveis de BDNF no hipocampo, associado a possível sensibilização central, a médio e longo prazo. Recentemente, outro estudo do nosso grupo explorou uma nova abordagem farmacológica para reverter à hiperalgesia induzida pelo opioide na vida adulta. A melatonina foi escolhida devido ao seu conhecido efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, além da sua capacidade de interagir com o sistema opioide. Os resultados mostraram que a melatonina foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida pela exposição repetida à morfina no período neonatal a médio e longo prazo, podendo ser utilizada como um fármaco adjuvante na terapia da dor, envolvendo componentes neurogênicos e inflamatórios (Rozisky et al., 2016). Sendo assim, a exposição a

fármacos no início da vida pode ter implicações duradouras para o SN em desenvolvimento, como alterações neuroquímicas e comportamentais de longo prazo em roedores (Rozisky et al., 2008, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2016).

2.6 Deprivação Materna

Nos últimos anos, vários modelos comportamentais de estresse precoce em roedores, como a DM têm sido usados para estudar a base neurobiológica de transtornos emocionais e motivacionais (Martini & Valverde, 2012; Fuentes et al., 2014; Gracia-Rubio et al., 2015). Em humanos, experiências estressantes no início da vida pós-natal, tais como a negligência do cuidado parental ou o abuso durante a infância, estão associados com o risco aumentado de alterações emocionais que podem persistir na idade adulta (Gross & Hen, 2004; Heim & Binder, 2012). Contudo, interações genéticas e ambientais regulam os mecanismos neurais envolvidos no desenvolvimento de determinados comportamentos. Entre as diversas estratégias de investigação dos efeitos de experiências estressantes no início da vida de um rato, está a DM repetida (Mello et al., 2009; Benetti et al., 2009; Kikusui et al., 2009). Este modelo é muito utilizado na literatura e atua como um dos mais potentes estressores para os filhotes durante o período de desenvolvimento e consiste em um tempo diário de 3 a 6 horas de privação dos filhotes da mãe durante os primeiros 10 dias de vida (Mello et al., 2009; Benetti et al., 2009; Kikusui et al., 2009).

Em mamíferos, incluindo roedores, intervenções na relação mãe-filhote nas fases iniciais da vida promovem alterações na emocionalidade bem como nas funções cognitivas que perduram ao longo da vida. Dessa forma, essas alterações podem representar um considerável fator de risco para o desenvolvimento de doenças de ordem psiquiátricas e neurodegenerativas como déficits de memória (Benetti et al., 2009; Kikusui et al., 2009). Além disso, exposição a estímulos estressantes estão entre os fatores ambientais que podem

interferir no desenvolvimento neural (Lee et al., 2007; Aisa et al., 2009). Portanto, o ambiente é um fator determinante desde o nascimento até o início da vida adulta, quando o SN está mais suscetível às adaptações (Fernández-Teruel et al., 2002; Nunes et al., 2003). O estresse social ou a negligência do cuidado parental, e mais precisamente do cuidado materno em ratos, está associado a mudanças comportamentais importantes na vida adulta, como alterações na resposta ao estresse e maior risco de desenvolvimento de psicopatologias ao longo da vida (Huot et al., 2004; Benetti et al., 2009; Amini-Khoei et al., 2015).

É importante salientar que as duas primeiras semanas de vida de um rato constituem o chamado período hiporresponsivo ao estresse (Levine, 2002), esta fase representa um período crítico para o desenvolvimento neural e, conseqüentemente a estimulação precoce atua sobre o desenvolvimento do SN e induz a uma variedade de mudanças neuroquímicas e comportamentais na fase adulta. Estudos prévios demonstram que a DM promove alterações neuroquímicas e comportamentais que persistem ao longo da vida (Lee et al., 2001; Aisa et al., 2009; Amini-Khoei et al., 2015). Corroborando estes dados, foi demonstrado que ratos privados da mãe no período neonatal apresentam maiores níveis de comportamento do tipo ansioso em resposta a um agente estressor na vida adulta (Renard et al., 2005; 2007), altos níveis de corticosterona (Huot et al., 2004; Plotsky et al., 2005), maior inibição comportamental provocada por exposição a ambiente novo (Madruga et al., 2006) e maior imobilidade (Aissa et al., 2007). Evidências sugerem que a DM é um estresse psicossocial potente e que afeta as funções cerebrais, sejam elas plásticas ou neuroquímicas. Estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram que vários mecanismos explicam as conseqüências deletérias da DM na idade adulta, tais como alterações na neurotransmissão em diferentes áreas do encéfalo (Martisova et al., 2012; Xue et al., 2013).

Em 2000, foi proposto por Anand & Scalzo que a falta de atividade do receptor NMDA a partir da DM e do isolamento sensorial leva a aumento de apoptose em múltiplas áreas do encéfalo imaturo. Por outro lado, a exposição à dor repetitiva pode causar uma

ativação excessiva de aminoácidos NMDA/excitatórios resultando em danos excitotóxicos nos neurônios em desenvolvimento. Contudo, essas mudanças promovem dois fenótipos comportamentais distintos caracterizados por aumento da ansiedade, sensibilidade à dor alterada, distúrbios de estresse, hiperatividade decorrente do transtorno de déficit de atenção, levando a habilidades sociais prejudicadas e padrões de comportamento autodestrutivo. Sendo assim, a importância clínica destes mecanismos consiste na prevenção de insultos precoces, tratamento eficaz da dor e estresse neonatal e, possivelmente, na descoberta de novas abordagens terapêuticas que limitam a excitotoxicidade neuronal ou a apoptose (Anand & Scalzo, 2000). Além disso, a DM neonatal demonstra ter efeitos duradouros sobre uma série de respostas, incluindo nocicepção e eficácia analgésica, que pode se estender até a idade adulta em ratos (Iijima & Chaki, 2005; Dickinson et al., 2009). Sabe-se que o sistema opioide endógeno e seus receptores são amplamente expressos em várias regiões do SNC (Erbs et al., 2015). Sob condições estressantes, o sistema opioide sofre alterações consideráveis que contribuem para a regulação de comportamentos como nocicepção (Martenson et al., 2009). Neste sentido, estudos mostraram que a experiência de adversidade durante a infância, como a DM, induziu alterações duradouras na regulação do sistema endógeno de opioides, tanto em humanos quanto em animais (Troisi et al., 2012; Preter et al., 2014). A este respeito, pesquisas anteriores propuseram que o estresse por DM reduziu o limiar de dor em animais e que esse efeito foi correlacionado com a hipofunção do sistema opioide no SNC (Bernardi et al., 1986; Kwok et al., 2014).

Estímulos estressantes como a DM têm a capacidade de interferir sobre o sistema límbico, o qual se relaciona com o hipotálamo. Tal fato ocasiona disfunções no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), como aumento da ansiedade e também falhas de aprendizagem e na memória (Aissa et al., 2007). Em 1999, Lehmann e seus colaboradores estudaram os efeitos na cognição do paradigma da DM usando um protocolo de 24 horas de separação única e demonstraram que ratos privados apresentavam déficits cognitivos na

memória de medo condicionado e na esquiiva ativa (Lehmann et al., 1999), mas não tinham déficits cognitivos no labirinto aquático de Morris (LAM) (Lehmann et al., 1999; 2002), e atribuíram esses efeitos cognitivos a uma maior ansiedade e liberação de glicocorticoides no hipocampo. Por outro lado, estudos usando ratos e camundongos, mostraram que a DM no período neonatal diminuiu a expressão de BDNF (Fumagalli et al., 2004; Lippmann et al., 2007) e alterou a expressão de receptores glutamatérgicos em hipocampo em ratos (Pickering et al., 2006). Em camundongos, ocorre diminuição não só a produção de BDNF como também a neurogênese (Kikosui et al., 2009). Ratos adultos privados repetidamente mostram um aumento na apoptose neuronal e redução no número de neurônios hipocampais, evidenciando as alterações estruturais (Huot et al., 2002; Mirescu et al., 2004). Assim o estudo da DM em modelos animais é de alta relevância clínica, uma vez que permite a investigação das alterações neuroquímicas e comportamentais que podem estar associadas com o processamento da dor.

2.7 Biomarcadores

Biomarcadores podem ser utilizados como parâmetros de avaliação em diversas situações, entre elas, confirmação de diagnóstico, relação causa-efeito e efetividade de tratamento. Estes biomarcadores podem ser encontrados periférica ou centralmente, sendo de fácil mensuração como aqueles que estão em soro ou plasma. Atualmente, estudos buscam marcadores que possam estar relacionados com processos de doenças entre elas, a dor crônica. O processo doloroso é capaz de ativar diversos sistemas como endócrino, autonômico e imune. Um biomarcador sugerido é o BDNF, neurotrofina amplamente expressa em várias estruturas do SNC, apresentando elevados níveis em hipocampo (Davies, 1994). Sua ligação ao receptor tirosina quinase B (TrkB) regula a sobrevivência neuronal, promove o crescimento neuronal e mantém a conectividade sináptica no SN adulto (Zhang & Ko, 2009).

Estudos clínicos demonstraram que a exposição à opioide leva a alterações nos níveis de BDNF (Akbarian et al., 2001; Bolaños & Nestler, 2004; Hatami et al., 2007). Corroborando estes dados, estudos em modelos animais demonstraram que a exposição à morfina no período perinatal e pós-natal diminuiu os níveis de BDNF em hipocampo (Schrott et al., 2008; Rozisky et al., 2013). Possivelmente as alterações provocadas pela morfina durante o período pré-natal tenham impacto sobre processos de plasticidade sináptica ao longo do desenvolvimento (Schrott et al., 2008). Além disso, estudo clínico com pacientes adictos de heroína demonstrou que estes pacientes apresentavam níveis séricos de BDNF diminuídos (Angelucci et al., 2007).

Administração de BDNF induz hiperalgesia térmica e alodinia mecânica (Miki et al., 2000; Zhou et al., 2000), assim como um aumento no grau de despolarização de receptores NMDA em medula espinhal *in vitro*, um mecanismo de sensibilização central de neurônios espinhais (Kerr et al., 1999). BDNF atua sobre os receptores NMDA nas vias nociceptivas ascendentes e descendentes (Malenka & Bear, 2004) e na regulação de interneurônios gabaérgicos em córtex cerebral (Woo & Lu, 2006). Adicionalmente, outros estudos mostraram que o BDNF possui ação neuromoduladora no aprendizado, na memória, na depressão e na dependência química (Grimm et al., 2003; McGough et al., 2004; Filip et al., 2006). Tem sido demonstrado que intervenções na relação mãe-filhote em roedores nas fases iniciais da vida promovem alterações na emocionalidade, bem como em funções cognitivas ao longo da vida (Fumagalli et al., 2004; Lippmann et al., 2007). Também, há evidências de que, após a retirada de opioides, o BDNF tem um papel significativo em processos de plasticidade sináptica (Li et al., 2005) e sensibilização locomotora (Liang et al., 2011).

BDNF e fator de crescimento neuronal (NGF) são neurotrofinas essenciais, amplamente expressas no SNC e SNP em desenvolvimento (Huang & Reichardt, 2001). Eles estão envolvidos na sobrevivência neuronal, no crescimento axonal, bem como na regulação da atividade neuronal e na plasticidade sináptica e dendrítica (Huang & Reichardt, 2001).

Tem sido demonstrado que, assim como o BDNF, o NGF também atua no processo nociceptivo, tanto em nível central quanto periférico (Bennet, 2001; Bannwarth & Kostine, 2014). Cahill et al. (2003) demonstrou que administração intratecal de NGF restaurou a efetividade da morfina em atenuar a hipersensibilidade a dor após a lesão do nervo periférico. Em estudos clínicos, há evidências da neurogênese durante a retirada de opioide. Os níveis séricos de NGF estão aumentados em pacientes abstinentes à heroína (Mousa et al., 2007; Heberlein et al., 2012). Estudo pré-clínico, recentemente publicado, sugere que o sistema de sinalização de NGF é um novo alvo potencial para tratamento de tolerância induzida por opioides (Cheppudira et al., 2016). Assim, sugere-se que o NGF tem importante papel de modulação em analgesia a opioide e dependência (Mousa et al., 2007; Bhalla et al., 2016).

Além do mais, nos estudos pré-clínicos que simulam situações adversas precoces, o estresse da DM alterou os níveis de NGF e BDNF em áreas límbicas, bem como induziu mudanças duradouras no comportamento emocional e respostas alteradas ao estresse. Estes dados sugerem que essas neurotrofinas poderiam modular mecanismos subjacentes à ligação social (Meaney, 2001; Cirulli, 2003a; Roceri et al., 2004; Cirulli et al., 2007). Estudo publicado por Cirulli et al. (2000), mostrou que os efeitos da DM na expressão de NGF são mais fortes quando protocolos de privação são mais longos, e não se restringem à região do hipocampo, mas podem ser vistos também em outras áreas do encéfalo. Em geral, esses resultados indicam que fatores externos, como a presença ou ausência da mãe, podem modificar a disponibilidade do fator neurotrófico no encéfalo, apontando o NGF como um potencial agente na plasticidade cerebral modulada pelo meio ambiente durante o desenvolvimento (Cirulli et al., 2000).

Está bem estabelecido que citocinas apresentam atividade no processo nociceptivo (Ren & Torres, 2009; Üçeyler et al., 2009). Citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β induzem efeitos principalmente algícos; no entanto as anti-inflamatórias, como a IL-4 tem função analgésica (Üçeyler et al., 2009). A IL-1 β é liberada pela glia e capaz de regular o

desenvolvimento e plasticidade de circuitos neuronais (Deverman & Patterson, 2009), incluindo as vias nociceptivas (Schäfers & Sorkin, 2008; McMahon & Malcangio, 2009; Ren & Torres, 2009). O sistema imune, quando ativado, promove a liberação de mediadores como óxido nítrico, IL-6, TNF- α , IL-1 β , e NGF (Sommer et al., 2004; Coutaux et al., 2005; Zhang & Huang, 2006), que contribuem para a sensibilização periférica e central (Julius & Basbaum, 2001; Coutaux et al., 2005; Planells-Cases et al., 2005). As citocinas e outros mediadores inflamatórios são capazes de alterar correntes iônicas nos nociceptores (Binshtok et al., 2008).

Prévios estudos em animais sugerem que a morfina pode afetar as funções imunológicas (Börner et al., 2009; Madera-Salcedo et al., 2011). Um estudo demonstrou que a morfina exerce a ativação de células da glia, com o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, e IL-1 β (Hutchinson et al., 2011). Também foi demonstrado o papel da glia no desenvolvimento de tolerância à morfina e hiperalgesia induzida pela retirada da morfina, particularmente associada à citocinas pró-inflamatórias (Song & Zhao, 2001; Raghavendra et al., 2002). Um estudo com ratos mostrou que a administração crônica de doses crescentes de morfina induziu a alterações neuro-adaptativas que precipitam o desenvolvimento de tolerância a muitos dos efeitos agudos da morfina, como a analgesia, a ativação do eixo HHA e a supressão das atividades de células imunes (Ballard et al., 2006).

Adicionalmente, a exposição a estresse neonatal como a DM induz mudanças fisiológicas permanentes que podem influenciar o sistema imunológico (Vig et al., 2010). Muitos dos sistemas regulatórios, que são modificados pela DM também têm sido implicados na regulação imunológica (McEwen, 2000b), embora pouco se saiba sobre seu impacto em modelos de doenças clinicamente relevantes. Pesquisas experimentais demonstram, por exemplo, que exposição a DM resulta em mudanças nas respostas do sistema imune (Loram et al., 2011; Painsipp et al., 2011). O mesmo tem sido observado na pesquisa clínica onde a negligência parental pode afetar processos inflamatórios com o aumento de biomarcadores inflamatórios na vida adulta (Danese et al., 2007; Slopen et al., 2010). Um estudo que

investigou a expressão de múltiplos genes de citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-7, IL-10) em animais submetidos a DM mostrou que o estresse crônico gerado no início da vida resultou em uma resposta imunossupressora, com baixa regulação da expressão de vários genes de citocinas no encéfalo do rato (Dimatelis et al., 2012). Outro estudo em ratos comprovou que a DM durante o período neonatal aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) tanto em hipocampo como em córtex pré-frontal, além de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 no hipocampo (Pinheiro et al., 2015). Estudos prévios em modelos animais mostraram que a exposição ao estresse psicossocial, conhecido com derrota social, levou a um aumento nos níveis plasmáticos da IL-6 e IL-1 β e também aumentou estas citocinas no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos (Audet et al., 2010, 2011; Sukoff Rizzo et al., 2012). Estes dados sugerem que, o processo inflamatório é uma consequência imunológica resultante da exposição aos eventos estressantes no início da vida, como a negligência maternal (Danese et al., 2007). Desta forma, a produção de citocinas contribui para desregulação do eixo HHA e promove anormalidades na plasticidade neural, incluindo uma diminuição do suporte neurotrófico e uma neurogênese prejudicada (Gracia-Rubio et al., 2016).

III. JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Neonatos prematuros e a termo, assim como crianças com mais idade, são expostos com frequência a estímulos nocivos repetidos, incluindo vacinações, traumas e procedimentos necessários a tratamentos e diagnósticos. Ainda que o alívio da dor seja um dos princípios básicos da medicina, na prática, a analgesia em pacientes com dificuldades de verbalizar sensações e sentimentos é comumente negligenciada ou insuficiente. Analgésicos opioides, como a morfina, são os mais efetivos e frequentemente usados no alívio da dor moderada a severa. Além disso, evidências sugerem que experiências sensoriais negativas no período pós-natal como a privação materna podem aumentar a vulnerabilidade a alterações comportamentais na vida adulta e deste modo, desencadear prejuízos cognitivos, emocionais e sociais, muitas vezes associados a alterações neuroquímicas. Considerando que neonatos em UTINs são submetidos a procedimentos dolorosos e que esse é um período em que naturalmente estes se encontram privados de suas mães, é de alta relevância clínica, o desenvolvimento de estudos com modelos animais focados em sistemas de neurotransmissão envolvidos com o processo nociceptivo no período neonatal. O reconhecimento de possíveis alterações neuroquímicas decorrentes da exposição repetida à morfina contribui desta forma, para o aprimoramento dos conhecimentos pertinentes à farmacologia em indivíduos de menor idade. Por conseguinte, modelos experimentais como o aqui proposto é fundamental para o estabelecimento de efeitos decorrentes da exposição a fármacos no período neonatal e suas repercussões em curto, médio e longo prazo, resultantes de seu uso, permitindo suplantar limitações presentes em estudos clínicos, especialmente com pacientes pediátricos. Além disto, tornam possível a avaliação de repercussões comportamentais e neuroquímicas ao longo da vida decorrentes da exposição a experiências sensoriais negativas no período neonatal.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Considerando que a dor pediátrica tem sido foco de muitos estudos nas últimas décadas devido ao fato de que neonatos apresentam menor limiar a estímulos nocivos e inócuos em relação aos adultos, o objetivo deste trabalho foi avaliar as repercussões de tratamentos farmacológicos no período neonatal no processo de desenvolvimento neuroneuroquímico e comportamental ao longo da vida destes animais. Avaliou-se, em curto, médio e longo prazo o efeito da administração repetida de morfina e/ou de privação materna em ratos neonatos Wistar na ontogênese de parâmetros comportamentais e neuroquímicos.

4.2 Objetivos Específicos

Foi avaliado o efeito da administração repetida de morfina no período neonatal (P8-P14) e da exposição à deprivação materna precoce em curto (P16), médio (P30) e longo (P60) prazo sobre os seguintes parâmetros:

Artigo I

- ✓ Padrões de reflexos iniciais nos filhotes;
- ✓ Níveis de BDNF e de NGF em tronco encefálico e córtex cerebral;

Artigo II

- ✓ Resposta nociceptiva a estímulo térmico nocivo;
- ✓ Resposta hiperalgésica térmica;
- ✓ Níveis de BDNF, IL-1 β e IL-4 em tronco encefálico e córtex cerebral.

V. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Aida S, Baba H, Yamakura T, Taga K, Fukuda S, Shimoji K. The effectiveness of preemptive analgesia varies according to the type of surgery: a randomized, double-blind study. *Anesth Analg* 1999; 89:711-716.
2. Aissa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2007; 32: 256-266.
3. Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus* 2009; 19(12):1222-31.
4. Akbarian S, Bates B, Liu RJ et al Neurotrophin-3 modulates noradrenergic neuron function and opiate withdrawal. *Mol Psychiatry* 2001; 6:593–604.
5. Amini-Khoei H, Amiri S1, Shirzadian A, Haj-Mirzaian A, Alijanpour S, Rahimi-Balaei M, Mohammadi-Asl A, Hassanipour M, Mehr SE, Dehpour AR. Experiencing neonatal maternal separation increased the seizure threshold in adult male mice: Involvement of the opioid system. *Epilepsy Behav.* 2015; 52(Pt A):37-41.
6. Anand KJ, Carr DB. The neuroanatomy, neurophysiology, and neurochemistry of pain, stress, and analgesia in newborns and children. *Pediatr Clin North Am.* 1989; 36(4):795-822.
7. Anand KJ, Barton BA, McIntosh N, Lagercrantz H, Pelaya E, Young TE, Vasa R. Analgesia and sedation in preterm neonates who require ventilatory support: results from the NOPAIN trial. *Neonatal Outcome and Prolonged Analgesia in Neonates. Arch Pediatr Adolesc Med.* 1999; 153(4):331-8.
8. Anand KJ, Scalzo FM. Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? *Biol Neonate.* 2000; 77:69–82.
9. Anand KJ, Aranda JV, Berde CB, Buckman S, Capparelli EV, Carlo W, Hummel P, Johnston CC, Lantos J, Tutag-Lehr V, Lynn AM, Maxwell LG, Oberlander TF, Raju TN, Soriano SG, Taddio A, Walco GA. Summary proceedings from the neonatal pain-control group. *Pediatrics.* 2006; 117(3 Pt 2):S9-S22.
10. Anand KJ. Pharmacological approaches to the management of pain in the neonatal intensive care unit, *Journal of Perinatology.* 2007; 27 (Suppl. 1) S4–S11.
11. Aranda JV, Carlo W, Hummel P, Thomas R, Lehr VT, Anand KJ. Analgesia and sedation during mechanical ventilation in neonates. *Clin Ther* 2005; 27(6):877-99.
12. Angelucci F, Ricci V, Pomponi M, Conte G, Mathé AA, Attilio Tonali P, Bria P. Chronic heroin and cocaine abuse is associated with decreased serum concentrations of the nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J Psychopharmacol.* 2007;21(8):820-5.

13. Arnold JH, Truog RD, Orav EJ, Scavone JM, Hershenson MB. Tolerance and dependence in neonates sedated with fentanyl during extracorporeal membrane oxygenation. *Anesthesiology*. 1990; 73(6):1136-40.
14. Audet MC, Mangano EN, Anisman H (2010) Behavior and proinflammatory cytokine variations among submissive and dominant mice engaged in aggressive encounters: moderation by corticosterone reactivity. *Front Behav Neurosci* 4:156
15. Audet MC, Jacobson-Pick S, Wann BP, Anisman H (2011) Social defeat promotes specific cytokine variations within the prefrontal cortex upon subsequent aggressive or endotoxin challenges. *Brain Behav Immun* 25:1197–1205.
16. Ballard KA, Pellegrino TC, Alonzo NC, Nugent AL, Bayer BM. Enhanced immune sensitivity to stress following chronic morphine exposure. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; 1(1):106-15.
17. Bannwarth B, Kostine M. Targeting nerve growth factor (NGF) for pain management: what does the future hold for NGF antagonists? *Drugs*. 2014; 74(6):619–26.
18. Basbaum AI, Jessel TM. The Perception of Pain. In: Kandel ER, Scharzh JH, Jessel TM (eds). *Principles of Neural Science*. 4ed. New York: McGraw-Hill, 2000:472-491.
19. Beland B, Fitzgerald M. *Pain* 2001; 90(1-2):143-50.
20. Bennet DL. Neurotrophic factors: important regulators of nociceptive function. *Neuroscientist*. 2001; 7:13–17.
21. Benetti F, Araújo AP, Sanvitto G, Lucion AB. Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats. *Developmental Psychobiology*, 2009; 49 (3): 258-264.
22. Berde CB, Sethna NF. Drug therapy: analgesics for the treatment of pain in children. *N Eng J Med*. 2002; 347:1094-1103.
23. Berk, LE. *Child Development*, Pearson Education, Boston, 2006 (ISBN:9780205197668 0205197663).
24. Bernardi M, Genedani S, Tagliavini S, Bertolini A. Effects on long-term sensitivity to pain and morphine of stress induced in the newborn rat by pain or manipulation. *Physiol Behav* 1986; 37(5):827–31.
25. Bhalla S, Andurkar SV, Gulati A. Neurobiology of opioid withdrawal: Role of the endothelin system. *Life Sci*. 2016; 15; 159:34-42.
26. Bhutta, A.T.; Rovnaghi, C.; Simpson, P.M.; Gossett, J.M.; Scalzo, F.M.; Anand, K.J.; Interactions of inflammatory pain and morphine in infant rats. Long-term behavioral effects. *PhysiolBehav* 2001;73(1-2):51-8.
27. Binshtok AM, Wang H, Zimmermann K, Amaya F, Vardeh D, Shi L, Brenner GJ, Ji RR, Bean BP, Woolf CJ, Samad TA. Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *J Neurosci* 2008; 28:14062–14073.

28. Bhutta AT, Anand KJS. Vulnerability of the developing brain: neuronal mechanisms. *Clin Perinatol.* 2002; 29:357–372.
29. Booth M - *Opium - a History*, New York, St Martin's Griffin, 1998.
30. Börner C, Warnick B, Smida M, Hartig R, Lindquist JA, Schraven B, Höllt V, Kraus J. Mechanisms of opioid-mediated inhibition of human T cell receptor signaling. *J. Immunol.* 2009; 183, 882–889.
31. Bolaños CA, Nestler EJ. Neurotrophic mechanisms in drug addiction. *Neuromol Med*, 2004; 5:69–83.
32. Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;15;90(12):5391-3.
33. Buttner W, Finke W. Analysis of behavioural and physiological parameters for the assessment of postoperative analgesic demand in newborns, infants and young children: a comprehensive report on seven consecutive studies. *Paediatr Anaesth.* 2000; 10:303–318.
34. Cahill CM, Dray A, Coderre TJ. Intrathecal nerve growth factor restores opioid effectiveness in an animal model of neuropathic pain. *Neuropharmacology.* 2003; 45 543–552.
35. Carbajal R, Rousset A, Danan C, Coquery S, Nolent P, Ducrocq S, Saizou C, Lapillonne A, Granier M, Durand P, et al. Epidemiology and treatment of painful procedures in neonates in intensive care units. *JAMA.* 2008; 300:60–70.
36. Caumo W, Ferreira MBC. Perioperative anxiety: psychobiology and effects in postoperative recovery. *The Pain Clinic, Holanda.* 2003; v. 15, n. 2, p. 87-101.
37. Cervero F, Iggo A. The substantia gelatinosa of the spinal cord. A critical review. *Brain* 1980; 103:717-772.
38. Cheppudira BP, Trevino AV, Petz LN, Christy RJ, Clifford JL. Anti-nerve growth factor antibody attenuates chronic morphine treatment-induced tolerance in the rat. *BMC Anesthesiol.* 2016; 5;16(1):73.
39. Cirulli F, Alleva E, Antonelli A, Aloe L. NGF expression in the developing rat brain: effects of maternal separation. *Brain Res Dev Brain Res* 2000; 123:129–134.
40. Cirulli F, Berry A, Alleva E. Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* 2003a;27:73–82.
41. Cirulli F, Capone F, Bonsignore LT, Aloe L, Alleva E. Early behavioural enrichment in the form of handling renders mouse pups unresponsive to anxiolytic drugs and increases NGF levels in the hippocampus. *Behav Brain Res* 2007; 178:208–215.
42. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* 2009; 32: 1-32.
43. Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D: Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 2005, 72:359-371.

44. Craig A, Dostrovsky JO. Medulla to thalamus. In "Textbook of Pain" (P. Wall and R. Melzack, eds.), 1999;pp 183–214. Churchill, Edinburgh.
45. Danese A, Pariante CM, Caspi A, Taylor A, Poulton R (2007) Childhood maltreatment predicts adult inflammation in a life-course study. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1319–1324.
46. Davies AM. The role of neurotrophins during successive stages of sensory neuron development. *Prog Growth Factor Res.* 1994; 5(3):263-89.
47. De Lima J, Lloyd-Thomas AR, Howard RF, Sumner E, Quinn TM. Infant and neonatal pain: anaesthetists' perceptions and prescribing patterns. *BMJ.* 1996; 313 (7060):787.
48. DeMarco GJ, Pascoe PJ. Anatomy, Physiology, and Effects of Pain. IN: Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals.* San Diego: Elsevier, 2008, p.3-25.
49. Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development. *Neuron.* 2009; 64:61–78.
50. Dhawan BN, Cesselin F, Raghbir R, et al. Inter-national Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev.* 1996; 48(4):567-92.
51. Dickinson AL, Leach MC, Flecknell PA. Influence of early neonatal experience on nociceptive responses and analgesic effects in rats. *Lab Anim* 2009; 43(1):11-6.
52. Dimatelis JJ, Pillay NS, Mutyaba AK, Russell VA, Daniels WM, Stein DJ. Early maternal separation leads to down-regulation of cytokine gene expression. *Metab Brain Dis* 2012; 27(3):393-7.
53. Disher T, Benoit B, Johnston C, Campbell-Yeo M. Skin-to-skin contact for procedural pain in neonates: Acceptability of novel systematic review synthesis methods and GRADEing of the evidence. *J Adv Nurs.* 2016; Oct 12. doi: 10.1111/jan.13182. [Epub ahead of print].
54. Duarte DF. Opium and Opioids: A Brief History. *Rev Bras Anesthesiol* 2005; 55: 1: 135 – 146.
55. El Sayed MF, Taddio A, Fallah S, De Silva N, Moore AM. Safety profile of morphine following surgery in neonates. *JPerinatol.* 2007; 27(7):444-7.
56. Erbs E, Faget L, Scherrer G, Matifas A, Filliol D, Vonesch JL, et al. A mu–delta opioid receptor brain atlas reveals neuronal co-occurrence in subcortical networks. *Brain Struct Funct* 2015; 220(2):677–702.
57. Falcon M, Guendellman D, Stolberg A, Frenk H, Urca G. Development of thermal nociception in rats. *Pain.* 1996; 67(1):203-8.
58. Fernández-Teruel A, Giménez-Llort L, Escorihuela RM, Gil L, Aguilar R, Steimer T, Tobeña A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 1:233-245.
59. Ferreira MBC. Dor crônica. In: Kapczinski FP, Quevedo JL, Izquierdo IA. *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos.* Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 181-200.

60. Filip M, Faron-Górecka A, Kuśmider M, Gołda A, Frankowska M, Dziedzicka-Wasylewska M. Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. *Brain Res.* 2006; 1071:218-225.
61. Fitzgerald M. Development of pain mechanisms. *Br Med Bull.* 1991; 47(3):667-75.
62. Fitzgerald M, Anand KJ. Developmental neuroanatomy and neurophysiology of pain. In: Schechter NL, Berde CB, Yaster M (eds). *Pain in infant, children, and adolescents.* Baltimore: Williams & Wilkins, 1993; p. 11-31.
63. Fitzgerald M, Beggs S. The neurobiology of pain: developmental aspects. *Neuroscientist.* 2001; 7:246–257.
64. Fitzgerald M, Beggs S. The neurobiology of pain: developmental aspects. *Neuroscientist.* 2001; 7:246–257.
65. Franck L, Vilardi J. Assessment and management of opioid withdrawal in ill neonates. *Neonatal Netw* 1995; 14(2):39-48.
66. Franck LS, Vilardi J, Durand D, Powers R. Opioid withdrawal in neonates after continuous infusions of morphine or fentanyl during extracorporeal membrane oxygenation. *Am J Crit Care* 1998; 7(5):364-9.
67. Fuentes, S., Daviu, N., Gagliano, H., Garrido, P., Zelena, D., Monasterio, N., Armario, A., Nadal, R. Sex-dependent effects of an early life treatment in rats that increases maternal care: vulnerability or resilience? *Front. Behav Neurosci* 2014; 8, 56.
68. Fumagalli F, Bedogni F, Perez J, Racagni G, Riva MA. Corticostriatal brain-derived neurotrophic factor dysregulation in adult rats following prenatal stress. *Eur J Neurosci.* 2004; 20(5):1348-54.
69. Gabriel AF, Marcus MA, Honig WM, Helgers N, Joosten EA: Environmental housing affects the duration of mechanical allodynia and the spinal astroglial activation in a rat model of chronic inflammatory pain. *Brain Res.* 2009, 1276:83–90.
70. Gabriel AF, Paoletti G, Della Seta D, Panelli R, Marcus MA, Farabollini F, Carli G, Joosten EA. Enriched environment and the recovery from inflammatory pain: Social versus physical aspects and their interaction. *Behav Brain Res.* 2010; 208(1):90-5.
71. Gracia-Rubio I, Moscoso-Castro M, Pozo OJ, Marcos J, Nadal R, Valverde O. Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2016; 4;65:104-17.
72. Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su TP, Shaham Y. Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *J Neurosci.* 2003; 23: 742-7.
73. Gross, C., Hen, R. The developmental origins of anxiety. *Nat. Rev. Neurosci* 2004; 5, 545–552.

74. Grunau RV, Whitfield MF, Petrie JH, Fryer EL. Early pain experience, child and family factors, as precursors of somatization: a prospective study of extremely premature and fullterm children. *Pain*. 1994; 56:353e9.
75. Grunau RE, Oberlander TF, Whitfield MF, Fitzgerald C, Lee SK. Demographic and therapeutic determinants of pain reactivity in very low birth neonates at 32 weeks' postconceptional age. *Pediatrics*. 2001; 107:105–112.
76. Grunau RE, Weinberg J, Whitfield MF. Neonatal procedural pain and preterm infant cortisol response to novelty at 8 months. *Pediatrics*. 2004; 114:77–84.
77. Guinsburg R. Assessing and treating pain in the newborn. *J Pediatr*. 1999; 75(3):149-60.
78. Guinsburg R, de Araújo Peres C, Branco de Almeida MF, de Cássia Xavier Balda R, Cássia Berenguel R, Tonelotto J, Kopelman BI. Differences in pain expression between male and female newborn infants. *Pain*. 2000; 85(1-2):127-33.
79. Hatami H, Oryan S, Semnani S, Kazemi B, Bandepour M, Ahmadiani A. Alterations of BDNF and NT-3 genes expression in the nucleus paragigantocellularis during morphine dependency and withdrawal. *Neuropeptides* 2007; 41:321–328.
80. Heberlein A, Dursteler-MacFarland KM, Frieling H, Groschl M, Lenz B, Bonsch D, et al. Association of nerve growth factor and vascular endothelial growth factor A with psychometric measurements of opiate dependence: results of a pilot study in patients participating in a structured diamorphine maintenance program, *Eur. Addict. Res*. 2012; 18:213–219.
81. Heim, C., Binder, E.B. Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. *Exp. Neurol* 2012; 233, 102–111.
82. Hohmann AG, Neely MH, Pina J, Nackley AG. Neonatal chronic hind paw inflammation alters sensitization to intradermal capsaicin in adult rats: A behavioral and immunocytochemical study. *J. Pain*. 2005; 6, 798–808.
83. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci*. 2001; 24, 677–736.
84. Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res*. 2002 Sep 20; 950(1-2):52-63.
85. Huot RL, Gonzalez ME, Ladd CO, Thirivikraman KV, Plotsky PM. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology*. 2004; 29(2):279-89.
86. Hutchinson MR, Shavit Y, Grace PM, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: an integrative review of mechanisms of central

- immune signaling and their implications for opioid analgesia. *Pharmacol Rev.* 2011; 63, 772–810.
87. Iijima M, Chaki S. Separation-induced ultrasonic vocalization in rat pups: further pharmacological characterization. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 82:652–7.
 88. Ji RR, Kohno T, Moore KA, Woolf CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* 2003; 26(12): 696-705.
 89. Johnston CC, Stevens BJ. Experience in a neonatal intensive care unit affects pain response. *Pediatrics.* 1996; 98:925–930.
 90. Jones SE. Effects of psychological processes on chronic pain. *Brit J Nurs* 1993; 2:463-467.
 91. Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 1999;399(6737):697-700.
 92. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413:203-210.
 93. Kar S, Quirion R. Neuropeptide receptors in developing and adult rat spinal cord: an in vitro quantitative autoradiography study of calcitonin gene-related peptide, neurokinins, mu-opioid, galanin, somatostatin, neurotensin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. *J Comp Neurol.* 1995; 354(2):253-81.
 94. Karabucak B, Walsch H, Jou YT, Simchon S, Kim S. The role of endothelial nitric oxide in the Substance P induced vasodilation in bovine dental pulp. *J Endod* 2005; 31(10):733-6.
 95. Kerr BJ, Bradbury EJ, Bennett DL, Trivedi PM, Dassan P, French J, Shelton DB, McMahon SB, Thompson SW. Brain- derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA evoked responses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1999; 19:5138–5148.
 96. Kikusui T, Ichikawa S, Mori Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 34(5):762-72.
 97. Kosterlitz HW, Lord JA, Paterson SJ, et al. Effects of changes in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with mu and delta receptors. *Br J Pharmacol* 1980;68(2):333-42.
 98. Kwok CH, Devonshire IM, Bennett AJ, Hathway GJ. Postnatal maturation of endogenous opioid systems within the periaqueductal grey and spinal dorsal horn of the rat. *Pain* 2014; 155(1):168–78.
 99. Lai MC, Holmes GL, Lee KH, Yang SN, Wang CA, Wu CL, Tiao MM, Hsieh CS, Lee CH, Huang LT. Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats: the role of corticosterone. *Epilepsy Res.* 2006; 68 (2):123-36.
 100. Lee HJ, Kim JW, Yim SV, Kim MJ, Kim SA, Kim YJ, Kim CJ, Chung JH. Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Mol Psychiatry.* 2001; 6(6):610, 725-8.

101. Lee JH, Espinera AR, Chen D, Choi KE, Caslin AY, Won S, Pecoraro V, Xu GY, Wei L, Yu SP. Neonatal inflammatory pain and systemic inflammatory responses as possible environmental factors in the development of autism spectrum disorder of juvenile rats. *J Neuroinflammation*. 2016; 16;13(1):109.
102. Lehmann J, Pryce CR, Bettschen D, Feldon J. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *PharmacolBiochemBehav*. 1999; 64(4):705-15.
103. Lehmann J, Russig H, Feldon J, Pryce CR. Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73(1):1415.
104. Levine, S. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotoxicity Research* 2002, 4: 557-564.
105. Li Y, Jia YC, Cui K, Li N, Zheng ZY, Wang YZ, Yuan XB. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature*. 2005; 43:4 894– 898.
106. Liang J, Zheng X, Chen J, Li Y, Xing X, Bai Y. Roles of bdnf, dopamine d(3) receptors, and their interactions in the expression of morphine-induced context-specific locomotor sensitization. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011; 21:825–834.
107. Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci*. 2007; 25(10):3091-8.
108. Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC (eds). *Bonica's Management of Pain*. 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
109. Loram LC, Taylor FR, Strand KA, Frank MG, Sholar P, Harrison JA, Maier SF, Watkins LR (2011) Prior exposure to glucocorticoids potentiates lipopolysaccharide induced mechanical allodynia and spinal neuroinflammation. *Brain Behav Immun* 25:1408–1415.
110. Macri S, Zoratto F, Laviola G. Early-stress regulates resilience, vulnerability and experimental validity in laboratory rodents through mother–offspring hormonal transfer. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35(7):1534–43.
111. Madera-Salcedo IK, Cruz SL, Gonzalez-Espinosa C. Morphine decreases early peritoneal innate immunity responses in Swiss-Webster and C57BL6/J mice through the inhibition of mast cell TNF- α release. *J. Neuroimmunol*. 2011; 232, 101–107.
112. Madigan SR, Raj PP. Historia y estado actual del tratamiento del dolor. In: Raj, PP (Ed). *Tratamiento prpactico del dolor*. Madrid: Mosby-Doyma, 2000. P. 3-15.
113. McEwen, B.S., 2000b. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*. 886, 172–189.

114. McGough NN, He DY, Logrip ML, Jeanblanc J, Phamluong K, Luong K, et al. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *J Neurosci.* 2004; 24:10542-52.
115. McGrath PJ. Science is not enough: the modern history of pediatric pain. *Pain.* 2011; 152, 2457–2459.
116. McMahon SB, Malcangio M. Current challenges in glia-pain biology. *Neuron.* 2009; 64:46–54.
117. Madruga C, Xavier LL, Achaval M, Sanvitto GL, Lucion AB. Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behav Brain Res.* 2006 Jan 30;166(2):241-6.
118. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004; 44:5–21.
119. Marsh DF, Hatch DJ, Fitzgerald M. Opioid system and the newborn. *Br J Anaesth.* 1997; 79:787-95.
120. Martenson ME, Cetas JS, Heinricher MM. A possible neural basis for stress-induced hyperalgesia. *Pain* 2009; 142(3):236–44.
121. Martini, M., Valverde, O. A single episode of maternal deprivation impairs the motivation for cocaine in adolescent mice. *Psychopharmacology (Berlin)* 2012; 219, 149–158.
122. Martisova E, Solas M, Horrillo I, Ortega JE, Meana JJ, Tordera RM, et al. Long lasting effects of early-life stress on glutamatergic/GABAergic circuitry in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 2012; 62(5-6):1944–53.
123. Marvizon JC, Ma YY, Charles AC, Walwyn W, Evans CJ. Pharmacology of the Opioid System. *Pharmacology of Pain*/editors, Pierre Beaulieu et al., 2010; IASP Press.
124. Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:1161–1192.
125. Medeiros LF et al. Lifetime behavioural changes after exposure to anaesthetics in infant rats. *Behavioural brain research.* 2011. 218(1), pp.51–6.
126. Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92(3):364-9.
127. Menescal-de-Oliveira, L. As Dores. In: Lent R. *Neurociência da Mente e do Comportamento.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.184-200.
128. Merskey, H., & Bogduk, N. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. In H. Merskey & N. Bogduk (Eds.), *Classification of chronic pain, IASP task force on taxonomy 1994* (2nd ed., pp. 209-214). Seattle, WA: IASP Press. Mirescu C, Peters JD, Gould E. early life experiences alter response of adult neurogenesis to stress. *Nature Neuroscience* 2004; 7: 841-846.

129. Miki K, Fukuoka T, Tokunaga A, Kondo E, Dai Y, Noguchi K. Differential effect of brain-derived neurotrophic factor on high-threshold mechanosensitivity in a rat neuropathic pain model. *Neurosci Lett* 2000; 278, 85–88.
130. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1995; 57(1): 1-164.
131. Moore, KL; Persaud, TVN. *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects* (5th edition), W.B. Saunders Company, Philadelphia (1998).
132. Morgan GE, Mikhail MS. Pain Management. In: Morgan GE, Mikhail MS (eds). *Clinical Anesthesiology*. 2ed. Stamford: Appleton & Lange, 1996. p. 274-316.
133. Mousa SA, Cheppudira BP, Shaqura M, Fischer O, Hofmann J, Hellweg R, et al. Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain, *Brain J. Neurol.* 2007; 130: 502–513.
134. Nunes CRO, Guerra FG, Bussab VSR. Enriquecimento ambiental, privação social e manipulação neonatal. *Revista de Ciências Humanas.* 2003; 34:365-394.
135. Nandi R, Fitzgerald M. Opioid analgesia in the newborn. *Eur J Pain* 2005; 9(2):105-8.
136. Nandi R, Beacham D, Middleton J, Koltzenburg M, Howard RF, Fitzgerald M. The functional expression of mu opioid receptors on sensory neurons is developmentally regulated; morphine analgesia is less selective in the neonate. *Pain* 2004; 111(1-2):38-50.
137. O'Banion MK. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* 1999;13:45-82.
138. Pacifici GM. Metabolism and pharmacokinetics of morphine in neonates: A review. *Clinics.* 2016; 71(8):474-80.
139. Painsipp E, Köfer MJ, Sinner F, Holzer P (2011) Prolonged depressionlike behaviour caused by immune challenge: influence of mouse strain and social environment. *PLoS One* 6:1–11.
140. Pasternak GW, Simantov R, Snyder SH. Characterization of an endogenous morphine-like factor (enkephalin) in mammalian brain. *Mol Pharmacol* 1976;12(3):504-13.
141. Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 1973; 9;179(4077):1011-4.
142. Peters JWB, Schouw R, Anand JKS, van Dijk M, Duivenvoorden HJ, Tibboel D. Does neonatal surgery lead to increased pain sensitivity in later childhood? *Pain.* 2005; 114: 444-454.
143. Planells-Cases R, Garcia-Sanz N, Morenilla-Palao C, Ferrer-Montiel A. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch* 2005, 451:151-159.
144. Pickering C, Gustafsson L, Cebere A, Nylander I, Liljequist S. Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. *Brain Res.* 2006; 12; 1099(1):101-8.

145. Pinheiro RM, de Lima MN, Portal BC, Busato SB, Falavigna L, Ferreira RD, Paz AC, de Aguiar BW, Kapczinski F, Schröder N. Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate. *J Neural Transm (Vienna)*. 2015; 122(5):709-19.
146. Plotsky PM, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30(12):2192-204.
147. Prestes AC, Balda Rde C, Santos GM, Rugolo LM, Bentlin MR, Magalhães M, Pachi PR, Marba ST, Caldas JP, Guinsburg R. Painful procedures and analgesia in the NICU: what has changed in the medical perception and practice in a ten-year period? *J Pediatr*. 2016; 92(1):88-95.
148. Preter M, Klein DF. Lifelong opioidergic vulnerability through early life separation: a recent extension of the false suffocation alarm theory of panic disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 3:345–51.
149. Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC, da Rocha AP, Achaval M, Netto CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 2007; 87(1):101-8.
150. Pereira LO, Strapasson AC, Nabinger PM, Achaval M, Netto CA. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female but not in male, rats after neonatal hypoxia–ischemia. *Brain Res*. 2008; 1218: 257–266.
151. Rahman W, Dickenson AH. Development of spinal opioid systems. *Reg. Anesth. Pain Med*. 1999; 24, 383–385.
152. Rahman W, Dickenson AH. Development of spinal opioid systems. *Reg. Anesth. Pain Med* 1999; 24, 383–385.
153. Raghavendra V, Rutkowski MD, DeLeo JA. The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *J. Neurosci*. 2002; 22, 9980–9989.
154. Randic M, Jiang MC, Cerne R. Long-term potentiation and long term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1993; 13:5228-5241.
155. Randich A, Uzzell T, DeBerry JJ, Ness T.J. Neonatal urinary bladder inflammation produces adult bladder hypersensitivity. *J. Pain*. 2006; 7, 469–479.
156. Reichert APS, Silva SLF, Oliveira JM. Dor no recém-nascido: uma realidade a ser considerada. *Rev. Nursing*. 2000; 3 (30): 28-30.
157. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Res Rev*. 2009; 60:57–64.
158. Renard GM, Suárez MM, Levin GM, Rivarola MA. Sex differences in rats: effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. *PhysiolBehav*. 2005; 30;85(3):363-9.

159. Renard GM, Rivarola MA, Suárez MM. Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitary-adrenal axis and behavior. *Int J Dev Neurosci.* 2007; 25(6):373-9.
160. Riedel W, Neeck G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Rheumatol.* 2001; 60(6): 404-415.
161. Rocha APC, Lemonica L, Barros G, Antônio M. Uso de Medicamentos por Via Subaracnóidea no Tratamento da Dor Crônica. *Revista brasileira de anestesiologia.* 2004; v.52, n.5.
162. Roceri M, Cirulli F, Pessina C, Peretto P, Racagni G, Riva MA. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry* 2004; 55:708–714.
163. Rodkey EN, Pillai Riddell R. The infancy of infant pain research: the experimental origins of infant pain denial. *J. Pain* 2013; 14, 338–350.
164. Rozisky JR, Dantas G, Adachi LS, Alves VS, Ferreira MB, Sarkis JJ, Torres IL. Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life. *Int J Dev Neurosci* 2008; 26(6):561-5.
165. Rozisky JR, da Silva RS, Adachi LS, Capiotti KM, Ramos DB, Bogo MR, Bonan CD, Sarkis JF, Torres IL. Neonatal morphine exposure alters E-NTPDase activity and gene expression pattern in spinal cord and cerebral cortex of rats. *Eur. J. Pharmacol* 2010; 642, 72–76.
166. Rozisky JR, Medeiros LF, Adachi LS, Espinosa J, De Souza A, Neto AS, Bonan CD, Caumo W, da Silva Torres IL. Morphine exposure in early life increases nociceptive behavior in a rat formalin tonic pain model in adult life. *Brain Res* 2011; 1367, 122–129.
167. Rozisky JR, Vendite D, Fontella FU, Nonose Y, Laste G, Dalmaz C, Caumo W, Torres IL. Morphine treatment in early life alters glutamate uptake in the spinal synaptosomes of adult rats. *Neurosci Lett* 2012; 31;529 (1):51-4.
168. Rozisky JR, Laste G, de Macedo IC, Santos VS, Krolow R, Noschang C, Vanzella C, Bertoldi K, Lovatel GA, de Souza IC, Siqueira IR, Dalmaz C, Caumo W, Torres IL. Neonatal morphine administration leads to changes in hippocampal BDNF levels and antioxidant enzyme activity in the adult life of rats. *Neurochem Res* 2013; 38(3):494-503.
169. Rozisky JR, Laste G, Medeiros LF, Souza VS, Adachi LS, Macedo IC, Caumo W, Torres IL. Morphine Treatment in Neonate Rats Increases Exploratory Activities: Reversal by Antagonist D2 Receptor. *British Journal of Medicine & Medical Research* 2014; 4(1): 351-367.
170. Rozisky JR, Scarabelot VL, Oliveira C, Macedo IC, Deitos A, Laste G, Caumo W, Torres IL. Melatonin as a potential counter-effect of hyperalgesia induced by neonatal morphine exposure. *Neurosci Lett* 2016, 28; 633:77-81.
171. Ruda MA, Ling QD, Hohmann AG, Peng YB, Tachibana T. Altered nociceptive neuronal circuits after neonatal peripheral inflammation. *Science* 2000; 289:628–631.

172. Saab CY, Park YC, Al-Chaer ED. Thalamic modulation of visceral nociceptive processing in adult rats with neonatal colon irritation. *Brain Res.* 2004; 22;1008(2):186-92.
173. Schäfers M, Sorkin L. Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neurosci Lett.* 2008; 437:188–193.
174. Schaible, H.G. Pathophysiology of pain. *Orthopade*, 2007; 36(1): 8-16.
175. Schrott LM, Franklin LM, Serrano PA. Prenatal opiate exposure impairs radial arm maze performance and reduces levels of BDNF precursor following training. *Brain Res.* 2008; 1198:132-40.
176. Sherman SM, Guillery RW. Functional organization of thalamocortical relays. *J Neurophysiol* 1996; 76, 1367–1395.
177. Sherman SM, Guillery RW. The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002; 357,1695–1708.
178. Slopen N, Lewis TT, Gruenewald TL, Mujahid MS, Ryff CD, Albert MA, Williams DR (2010) Early life adversity and inflammation in African Americans and whites in the midlife in the United States survey. *Psychosom Med* 72:694–701.
179. Smith RP, Gitau R, Glover V, Fisk NM. Pain and stress in the human fetus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;92:161–165.
180. Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett.* 2004; 361:184 –187.
181. Song P, Zhao ZQ. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosci Res.* 2001, 39, 281–286.
182. Sukoff Rizzo SJ, Neal SJ, Hughes ZA, Beyna M, Rosenzweig-Lipson S, Moss SJ, Brandon NJ (2012) Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes. *Transl Psychiatry* 2:e199.
183. Suresh S, Anand KJ. Opioid tolerance in neonates: a state-of-the-art review. *Paediatr Anaesth* 2001; 11(5):511-21.
184. Sweitzer SM, Allen CP, Zissen MH, Kendig JJ. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia upon acute opioid withdrawal in the neonatal rat. *Pain.* 2004; 269–280. Simons SH, Tibboel D. Pain perception development and maturation. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006; 11(4):227-31.
185. Taddio A. Opioid analgesia for infants in the neonatal intensive care unit. *Clin Perinatol* 2002; 29:493-509.
186. Tall JM. Housing supplementation decreases the magnitude of inflammation-induced nociception in rats. *Behav Brain Res.* 2009; 197:230–233.

187. Troisi A, Frazzetto G, Carola V, Di Lorenzo G, Coviello M, Siracusano A, et al. Variation in the mu-opioid receptor gene (OPRM1) moderates the influence of early maternal care on fearful attachment. *Soc Cogn Affect Neurosci* 2012; 7(5):542–7.
188. Uçeyler N, Schäfers M, Sommer C. Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Exp Brain Res*. 2009; 196(1):67-78.
189. Valadão CAA. Anestésicos dissociativos. In: Fantoni, D.T; Cortopassi, S.R.G. Anestesia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2002; cap. 35, p. 294-319.
190. Victoria NC, Murphy AZ. The long-term impact of early life pain on adult responses to anxiety and stress: Historical perspectives and empirical evidence. *Exp Neurol*. 2016; 275 Pt 2:261-73.
191. Vig R, Gordon JR, Thébaud B, Befus AD, Vliagoftis H. The effect of early-life stress on airway inflammation in adult mice. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(4):229-39.
192. Xue X, Shao S, Li M, Shao F, Wang W. Maternal separation induces alterations of serotonergic system in different aged rats. *Brain Res Bull* 2013; 95:15–20.
193. Zhang X, Bao L: The development and modulation of nociceptive circuitry. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16: 460-466, 2006.
194. Zhang JH, Huang YG. The immune system: a new look at pain. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119:930-938.
195. Zhang HN, Ko MC. Seizure activity involved in the up-regulation of BDNF mRNA expression by activation of central mu opioid receptors. *Neurosci*. 2009; 161: 301-10.
196. Zhou XF, Deng YS, Xian CJ, Zhong JH. Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *Eur J Neurosci* 2000; 12:100–105.
197. Zhuo M. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Mol Brain*. 2009; 3: 2-4.
198. Wall Pd, Melzack R. Textbook of pain. 3ed. Edinburg: Churchill Livingstone 1994; p. 1524.
199. Walker SM, Meredith-Middleton J, Cooke-Yarborough C, Fitzgerald M. Neonatal inflammation and primary afferent terminal plasticity in the rat dorsal horn. *Pain*. 2003; 105, 185–195.
200. Wang G, Ji Y, Lidow MS, Traub RJ. Neonatal hind paw injury alters processing of visceral and somatic nociceptive stimuli in the adult rat. *J. Pain*. 2004; 5, 440–449.
201. Weiss IC, Franklin TB, Vizi S, Mansuy IM. Inheritable effect of unpredictable maternal separation on behavioral responses in mice. *Front Behav Neurosci* 2011;5(3).
202. Whitfield MF, Grunau RE. Behavior, pain perception, and the extremely low-birth weight survivor. *Clin Perinatol*. 2000; 27:363–379.
203. Williams AC, Craig KD. Updating the definition of pain. *Pain*. 2016 Nov;157(11):2420-2423.

204. Woo NH, Lu B. Regulation of cortical interneurons by neurotrophins: From development to cognitive disorders. *Neuroscientist* 2006;12:43–56.
205. Woolf CJ, Chong MS. Preemptive analgesia – treating postoperative pain by prevention the establishment of central sensitization. *Anesth Analg* 1993;77:362-379.
206. Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011; 152(3): S2-15.

VI. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Morphine Exposure and Early Postnatal Maternal Deprivation Alters Neuromotor Development and Neuroplasticity Biomarkers Levels

Periódico: Brain Research

Status: Submetido

**Maternal Postnatal Deprivation and Exposure to Morphine Cause Central Alterations
Affecting Spinal Cord Nociceptive Process.**

Periódico: Brain, Behavior, and Immunity

Status: Submetido

VII. CONSIDERAÇÕES GERAIS

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Considerando a importância do estudo da farmacologia da dor em neonatos, nós buscamos abordar mecanismos neurobiológicos no processo de desenvolvimento do sistema nociceptivo e os possíveis efeitos das intervenções precoces sobre o curso do desenvolvimento. Esta questão se reveste de importância ainda maior, em vista de que experiências sensoriais negativas como exposição a fármacos e deprivação materna no período neonatal podem alterar a ontogênese das vias neurobiológicas produzindo alterações duradouras no comportamento e na percepção da dor, e deste modo, desencadear prejuízos cognitivos, emocionais e sociais, muitas vezes associados a alterações neuroquímicas.

Quando avaliamos os reflexos iniciais nos filhotes, nós demonstramos que exposição repetida à morfina e a deprivação materna induziram um atraso no desenvolvimento dos reflexos. Estes resultados afetam negativamente o desenvolvimento cerebral e aumentam o risco de alterações comportamentais. Deste modo, a administração precoce da morfina e a deprivação materna podem alterar, independentemente ou em conjunto, perfis fenotípicos importantes com alto significado adaptativo na idade adulta, demonstrando a importância do ambiente como gerador de mudanças plásticas em sistemas comportamentais.

Além disso, os resultados apresentados nesta tese demonstram que o tratamento repetido com morfina no período neonatal e deprivação materna de ratos levam a alterações em curto, médio e longo prazo em parâmetros nociceptivos e neuroquímicos. Nós mostramos que o trauma de vida precoce corresponde com o processamento de dor alterado na idade adulta, uma condição que pode ser clinicamente relevante para o tratamento de condições de dor crônica.

Estes resultados demonstram a necessidade de novas pesquisas focando em alternativas terapêuticas que possam reverter os efeitos deletérios sobre a ontogenia das vias nociceptivas induzidas pela exposição à morfina e deprivação materna no período neonatal.

VIII. PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Para investigar possíveis efeitos dos sistemas opioidérgico e glutamatérgico no processo nociceptivo neste estudo será avaliada a expressão do receptor opioide (μ) e glutamatérgico (NMDA) em medula espinhal por meio da técnica de *Western Blotting*.

Sabendo que existe uma interação entre os sistemas opioidérgico e colinérgico, e que exposição repetida à morfina e privação materna no início da vida podem causar efeitos neurobiológicos duradouros. Pretendemos investigar se alguns dos aspectos cognitivos desses déficits podem estar relacionados a uma disfunção no sistema colinérgico, medindo a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo por meio do método espectrofotométrico.

Esperamos compreender a interação entre os sistemas opioidérgico e dopaminérgico no modelo experimental proposto, avaliando os níveis de dopamina em hipocampo por meio de ensaio imunoenzimático ELISA.

IX. ANEXOS

A) APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 150614

Data da Versão do Projeto: 18/02/2016

Pesquisadores:

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

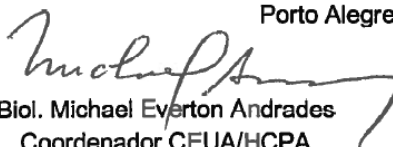
VANESSA LEAL SCARABELOT

Título: Administração de Morfina Durante o Período Neonatal: Avaliação de Sistemas de Neurotransmissão e Parâmetros Comportamentais, Bioquímicos e Moleculares.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

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

Porto Alegre, 24 de fevereiro de 2016.


Biol. Michael Everton Andrades
Coordenador CEUA/HCPA

B) DIVULGAÇÕES

2016:

1 de Oliveira, C; Vercelino, R; Scarabelot, V.L; Spezia Adachi, L.N; Silva, L.S; Regner, G.G; Silveira, N.P; Torres, I.L.S. **Deprivação Maternal Pós-Natal e Morfina Alteram a Resposta Nociceptiva de Ratos Adultos.** Apresentado sob a forma de **Painel.** In: IV Congresso Sul Brasileiro de Dor, Florianópolis, SC. Anais do IV Congresso Sul Brasileiro de Dor, 2016.

2 Silva Rios, D.E; de Oliveira, C; Scarabelot, V.L; Spezia Adachi, L.N; Vercelino, R; Macedo, I.C; Regner, G.G; Silveira, N.P; Silva, L.S; Torres, I.L.S. **Early Postnatal Maternal Deprivation Induces Thermal Hyperalgesia in Infant Rats and Remains in Adult Life.** Apresentado sob a forma de **Painel.** In: I Simpósio Gaúcho de Farmacologia, Porto Alegre, RS. Anais do I Simpósio Gaúcho de Farmacologia, 2016.

C) ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DO DOUTORADO

a) Autoria

1. **de Oliveira, C.**; Oliveira, CM; Macedo, I.C.; Quevedo, A.S.; Marques, P.; Silva, F.R.; Vercelino, R.; Souza, I.C.C.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Hypercaloric diet modulates effects of chronic stress: a behavioral and biometric study on rats. *Stress (Luxembourg. Print)*., v.18, p.514 - 523, **2015**.
2. **Oliveira, C.**, Scarabelot, V.L., Souza, A., Oliveira, C.M., Medeiros, L.F., Macedo, I.C., Marques, P., Cioato, S.G., Caumo, W., Torres, I.L.S. Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides. *Peptides (New York, N.Y. 1980)*, v. 51, p. 46-53, **2014**.
3. **Oliveira, C.**; Scarabelot, V.L.; Cioato, S.G.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Inter-relação entre Síndrome Metabólica, Estresse Cônico e Ritmos Circadianos de Marcadores Adipogênicos: Uma Revisão. *Revista HCPA (UFRGS. Impresso)*., v.33, p.257 - 268, **2013**.

b) Artigo submetido ao periódico Cytokine Journal

1. **de Oliveira, C.**; Scarabelot V.L.; Vercelino, R.; Macedo, I.C.; Souza, A.; Freitas, J.S.; Moreira, S.F.S.; Adachi, L.N.S.; Santos, D.S.; Visioli, F.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Effects of Transcranial Direct Current Stimulation on the Inflammatory Responses of Ovariectomized Rats. **2016**.

c) Coautoria

1. Rozisky, J.R.; Scarabelot, V.L.; **de Oliveira, C.**; Macedo, I.C.; Deitos, A.; Laste, G.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Melatonin as a potential counter-effect of hyperalgesia induced by neonatal morphine exposure. *Neuroscience Letters.*, v.633, p.77 - 81, **2016**.
2. Scarabelot, V.L.; Medeiros, L.F.; **Oliveira, C.**; Adachi, L.N.S.; Macedo, I.C.; Cioato, S.G.; Freitas, J.S.; Souza, A.; Quevedo, A.S.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Melatonin Alters the Mechanical and Thermal Hyperalgesia Induced by Orofacial Pain Model in Rats. *Inflammation.*, v.39, p.1649 - 1659, **2016**.
3. Macedo, I.C.; **de Oliveira, C.**; Vercelino, R.; Souza, A.; Laste, G.; Medeiros L.F.; Scarabelot, V.L.; Nunes, E.A.; Kuo, J.; Fregni, F.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Repeated Transcranial Direct Current Stimulation Reduces Food Craving in Wistar Rats. *Appetite (London. Print)*, v.103, p.29 - 37, **2016**.
4. Ceconello, A.L.; Torres, I.L.S.; **Oliveira, C.**; Zanini, P.; Niche, G.; Ribeiro, M.F.M. DHEA administration modulates stress-induced analgesia in rats. *Physiology & Behavior*, v.157, p.231 – 236; **2016**.
5. Cioato, S.G.; Medeiros, L.F.; Marques, P.; Vercelino, R.; Quevedo, A.S.; Souza, A.; Scarabelot, V.L.; **Oliveira, C.**; Adachi, L.N.S.; Fregni, F.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Long-Lasting Effect of Transcranial Direct Current Stimulation in the Reversal of Hyperalgesia and Cytokine Alterations Induced by the Neuropathic Pain Model. *Brain Stimulation: basic, translational and clinical research in neuromodulation*, v.9, p.209 - 217, **2016**.
6. Leffa, D.T; Souza, A.; Scarabelot, V.L.; Medeiros, L.F.; **Oliveira, C.**; Grevet, E.H.; Caumo, W.; Souza, D.O.; Rohde, L.A.P.; Torres, I.L.S. Transcranial Direct Current Stimulation Improves Short-term Memory in an Animal Model of

- Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *European Neuropsychopharmacology*, v.26, p.368 - 377, **2016**.
7. Moreira, S.F.S; Medeiros, L.F.; Souza, A.; **Oliveira, C.**; Scarabelot, V.L.; Fregni, F.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Neuromodulatory Effects on Mechanical Hyperalgesia and Cortical BDNF Levels in Ovariectomized Rats. *Life Sciences (1973)*, v.145, p.233 - 239, **2016**.
 8. Moreira, S.F.S; Nunes, E.A.; Kuo, J.; Macedo, I.C.; Muchale, A.V.; **de Oliveira, C.**; Scarabelot, V.L.; Marques, P.; Medeiros, L.F.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Hypoestrogenism Alters Mood: Ketamine Reverses Depressive-like Behavior Induced by Ovariectomy in Rats. *Pharmacological Reports*, v.68, p.109 - 115, **2016**.
 9. Macedo, I.C.; Rozisky, J.R.; **Oliveira, C.**; Oliveira, CM; Laste, G.; Nonose, Y.; Santos, V.S.; Marques, P.; Ribeiro, M.F.M.; Caumo, W.; Torres, I.L.S. Chronic Stress Associated with Hypercaloric Diet Changes the Hippocampal BDNF Levels in Male Wistar Rats. *Neuropeptides (Edinburgh)*, p.75 - 81, **2015**.
 10. Spezia Adachi, L.N., Quevedo, A.S., Souza, A., Scarabelot, V.L., Rozisky, J.R., **Oliveira, C.**, Marques, P.R., Medeiros, L.F., Fregni, F., Caumo, W., Torres, I.L.S. Exogenously induced brain activation regulates neuronal activity by top-down modulation: conceptualized model for electrical brain stimulation. *Experimental Brain Research*, v. 233, p. 1377-1389, **2015**.
 11. Souza, A.C., Souza, A. Medeiros, L.F., **Oliveira, C.**, Scarabelot, V.L., Silva, R.S., Bogo, M.R., Capiotti, K.M., Kist, L.W., Bonan, C.D., Caumo, W., Torres, I.L.S. Maternal caffeine exposure alters neuromotor development and hippocampus acetylcholinesterase activity in rat offspring. *Brain Research*, v. 1595, p. 10-18, **2015**.
 12. Marques, P.R., Vercelino, R., Cioato, S.G., Medeiros, L.F., **Oliveira, C.**, Scarabelot, V.L., Souza, A., Rozisky, J.R., Quevedo, A., Adachi, L.N.S., Sanches, P.R., Fregni, F., Caumo, W., Torres, I.L.S. Transcranial direct current stimulation (tDCS) reverts

- behavioral alterations and brainstem BDNF levels increase induced by neuropathic pain model: Long-lasting effect. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 64, p. 44-51, **2015**.
13. Souza, A., Dussan-Sarria, J.A, Medeiros, L.F., Souza, A.C., **Oliveira, C.**, Scarabelot, V.L., Adachi, L.N.S., Winkelmann-Duarte, E.C., Philippi-Martins, B.B., Netto, C.A., Caumo, W., Torres, I. L.S. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy reduces c-Fos activation in the rat hippocampus: evidence of a long-lasting effect. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 38, p. 213-222, **2014**.
14. Macedo, I.C., Medeiros, L.F., **Oliveira, C.**, Oliveira, C.M., Rozisky, J.R., Scarabelot, V.L., SOUZA, A., Silva, F.R., Santos, V.S., Cioato, S.G., Caumo, W., Torres, I.L.S. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides (New York, N.Y. 1980)*, v. 38, p. 189-196, **2012**.

D) ARTIGO 1 SUBMETIDO AO PERIÓDICO BRAIN RESEARCH

Dear Dr. Carla de Oliveira,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Brain Research

Corresponding Author: Iraci Lucena da Silva Torres

Co-Authors: Carla de Oliveira, Msc; Vanessa L Scarabelot, Dr; Rafael Vercelino, Dr; Lauren N Spezia Adachi, Msc; Lisiane S Silva, Graduate; Gabriela G Regner, Msc; Natalia P Silveira, Graduate; Andressa Souza, Dr; Wolnei Caumo, Dr;

Title: Morphine Exposure and Early Postnatal Maternal Deprivation Alters Neuromotor Development and Neuroplasticity Biomarkers Levels.

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at 87605@ufrgs.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/bres/1.asp?i=483780&l=9Q7IKMEW>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Brain Research

Elsevier Editorial System(tm) for Brain

Research

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Morphine Exposure and Early Postnatal Maternal Deprivation Alters Neuromotor Development and Neuroplasticity Biomarkers Levels.

Article Type: Research paper

Section/Category: Development and Aging

Keywords: morphine; maternal deprivation; neonate rats; development; neurotrophins.

Corresponding Author: Dr. Iraci Lucena da Silva Torres, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Carla de Oliveira, Msc

Order of Authors: Carla de Oliveira, Msc; Vanessa L Scarabelot, Dr; Rafael Vercelino, Dr; Lauren N Spezia Adachi, Msc; Lisiane S Silva, Graduate; Gabriela G Regner, Msc; Natalia P Silveira, Graduate; Andressa Souza, Dr; Wolnei Caumo, Dr; Iraci Lucena da Silva Torres, Ph.D.

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: The objective of this study was to verify whether repeated morphine administration and maternal deprivation in early life alters neurobehavioral development, as well as its effect on central BDNF and NGF levels. Total of 58 puppies were utilized. On postnatal day 1, litters were daily deprived of their mother for 3 hours during the first 10 days of life. Animals were divided in 5 groups: total control (C), did not receive any intervention; saline (S), receive saline solution; morphine (M), receive morphine; deprived-saline group (DS), were subjected to maternal deprivation and receive saline solution; and deprived-morphine (DM), were subjected to maternal deprivation and receive morphine. Newborn received subcutaneous injections of morphine or saline, 5 µg, starting on postnatal days 8 (P8), once daily for 7 days. Righting reflex, negative geotaxis and gait were chosen to evaluate postural parameters as an index of neuromotor reflexes. Righting reflex test, morphine induces a delay in the development of the animals. Performance of negative geotaxis was slower in M and DM groups. In gait test, all groups showed increase in daily performance in locomotion frequency. An increased number of rearing was observed in M, DS, and DM groups from P16 to P20. BDNF levels in brainstem were decreased in M and DS groups. DM group presented an increase NGF levels in the brainstem. It was observed an increased in cerebral cortex NGF levels in M, DS and DM groups. These finding have important implications for the maternal neonate interaction needed for normal brain development.

E) ARTIGO 2 SUBMETIDO AO PERIÓDICO BRAIN, BEHAVIOR AND IMMUNITY

Ms. Ref. No.: BBI-D-16-00877

Title: Maternal Postnatal Deprivation and Exposure to Morphine Cause Central Alterations Affecting Spinal Cord Nociceptive Process.

Brain, Behavior, and Immunity

Dear Dr. Lucena da Silva Torres,

Your submission entitled "Maternal Postnatal Deprivation and Exposure to Morphine Cause Central Alterations Affecting Spinal Cord Nociceptive Process." will be managed by Editor-in-Chief, Keith W. Kelley, Ph.D., Ph.D..

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/bbi/>.

Your username is: 87605@ufrgs.br

If you need to retrieve password details, please go

to: http://ees.elsevier.com/bbi/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to our journal. You should receive a decision letter from us within 30 days.

Kindest regards,

Brain, Behavior, and Immunity

Elsevier Editorial System(tm) for Brain,
Behavior, and Immunity
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Maternal Postnatal Deprivation and Exposure to Morphine Cause Central Alterations Affecting Spinal Cord Nociceptive Process.

Article Type: Full Length Article

Keywords: early neonatal experience; morphine; maternal deprivation; neonate rats; pain; nociception; BDNF; IL-1 β ; IL-4; neuroimmunomodulators.

Corresponding Author: Dr. Iraci Lucena da Silva Torres, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Carla de Oliveira, Msc

Order of Authors: Carla de Oliveira, Msc; Vanessa L Scarabelot, Dra.; Rafael Vercelesino, Dr.; Lauren Naomi Spezia Adachi, Msc; Lisiane S Santos, Graduate; Gabriela G Regner, Msc; Andressa Souza, Dra.; Joice S Freitas, Msc; Natalia P Silveira, Graduate; Diego Evandro S Rios, Graduate; Wolnei Caumo, Dr.; Iraci Lucena da Silva Torres, Ph.D.

Abstract: Morphine exposure and maternal deprivation during the neonatal period can promote changes in pain signaling pathways that can be expressed as an increased nociceptive response in adult life. Here, we investigated whether repeated morphine exposure and/or maternal deprivation alter the nociceptive response on postnatal days 16 (P16), 30 (P30), and 60 (P60). Besides, we evaluated their repercussions upon central biomarkers levels BDNF, IL-1 β and IL-4. A total of 58 puppies were utilized. At birth, litters were standardized to contain up to 8 pups per dam, and pups remained with their mothers until 21 days of age. On postnatal day 1 (PND 1), litters were daily deprived of their mother for 3 hours during the first 10 days of life. The animals were divided in 5 groups: the total control (C), which did not receive any intervention; saline (S), which receive saline solution; morphine (M), which receive morphine; deprived-saline group (DS), which were subjected to maternal deprivation and receive saline solution; and deprived-morphine (DM), which were subjected to maternal deprivation and receive morphine. Newborn received subcutaneous injections of morphine or saline, 5 μ g in the mid-scapular area, starting on postnatal days 8 (P8) to 14 (P14). The nociceptive responses were assessed by the hot plate and tail-flick tests. In the hot plate test, thermal hyperalgesia was indexed by significant decreases in the paw withdrawal latency at P16, P30 and P60 for the animals of the groups M, DS and DM. In the tail-flick test, a significant decrease in the nociceptive threshold in the DS at P16, M and DM groups at P30, and M, DS and DM groups at P60. There were interactions in the brainstem and cerebral cortex to BDNF, IL-1 β and IL-4 levels between the independent variables; treatment, deprivation, and timepoint, which led to the modification in the central levels of the neuroimmunomodulators evaluated. These findings may have important implications for the human neonate. Therefore, this study highlights the importance of conducting research in these fields to provide a comprehensive knowledge of the long-term effects of early life morphine treatment and maternal deprivation on nociceptive pathways.