

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

**ESTUDO DOS EFEITOS DE MANIPULAÇÕES
FARMACOLÓGICAS EM RATOS DE 21 DIAS SUBMETIDOS
A UM MODELO DE DOR PÓS-CIRÚRGICA**

GIOVANA DANTAS

ORIENTADORA

PROF^a DR^a MARIA BEATRIZ CARDOSO FERREIRA

CO-ORIENTADORA

PROF^a DR^a IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito
parcial para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências Biológicas: Neurociências

Abril de 2007

**A TODAS AS PESSOAS QUE ME
AJUDARAM EM ALGUM MOMENTO
DURANTE O DOUTORADO.
AO MEU FILHINHO AUGUSTO
QUE ESTÁ A CAMINHO.**

AGRADECIMENTOS

- À Professora Maria Beatriz Cardoso Ferreira, que aceitou me orientar quando eu estava grávida, situação que demandou um pouco mais de compreensão por parte da orientadora, visto o que estava por vir;
- Às veterinárias Eliane Dallegrave e Beatriz Melo por terem me ajudado muito na padronização da cirurgia, e por estarem presentes no início do doutorado quando tudo parecia mais difícil;
- Ao meu marido Eduardo pelo amor, compreensão, companheirismo e por ser um baita pai;
- Ao meu filhinho Álvaro por ter entendido a mamãe, todas as vezes que ela fez experimentos no sábado e não foi no parque brincar. Foram muitas vezes;
- À minha mãe Sônia e à minha sogra Noeli por terem cuidado do Álvaro para mim muitas vezes;
- Aos bolsistas Gabriela Rossi, Barbara Stenzel, Gustavo Dallegrave, Milene Moehleck, Afonso Medeiros, Joanna Rozisky e Lauren Adachi pela ajuda preciosa, amizade e companheirismo;
- Ao grupo da Professora Ana Maria Battastini por toda ajuda, em especial a Márcia Wink e à própria Ana. Que pena que os experimentos não entraram na tese;
- Ao Departamento de Farmacologia do ICBS;
- Ao PPG Neurociências;
- A CAPES;

- Ao CREAL;
- Aos amigos e colegas Badi, Jô, Claudia, Afonso, Lu e Perla por todas as risadas;
- À minha co-orientadora Professora Iraci Lucena da Silva Torres, sem a qual teria sido muito difícil terminar. Obrigada por tudo mesmo, eu nem sei como agradecer direito, mas podes ter certeza que eu sempre vou lembrar de ti.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| Índice de figuras..... | IX |
| Índice de abreviaturas..... | XI |
| Divulgações..... | XIII |
| Resumo..... | XVI |
| Abstract..... | XVII |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Dor..... | 1 |
| 1.2. Nocicepção..... | 3 |
| 1.3. Glutamato e seus receptores..... | 6 |
| 1.4. Modulação da dor..... | 11 |
| 1.5. Dor pós-operatória..... | 16 |
| 1.6. Dor em organismos imaturos..... | 18 |
| 1.7. Dores agudas em pediatria..... | 20 |
| 1.8. Hipótese de trabalho..... | 23 |
| 2. Objetivos..... | 24 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 24 |
| 2.2. objetivos específicos..... | 24 |
| 3. Materiais e Métodos..... | 26 |
| 3.1. Animais experimentais..... | 26 |
| 3.1.1. Grupos experimentais..... | 26 |
| 3.2. Procedimento anestésico e cirúrgico..... | 26 |
| 3.3. Medida de latência de retirada da cauda..... | 28 |

| | |
|---|----|
| 3.4. Avaliação da locomoção em campo aberto..... | 29 |
| 3.5. Avaliação da resposta inflamatória | 29 |
| 3.6. Tratamentos farmacológicos..... | 30 |
| 3.7. Análise estatística..... | 32 |
| 3.8. Aspectos éticos..... | 32 |
| 3.9. Desenhos experimentais..... | 33 |
| 3.9.1. Experimento 1: Escolha e padronização do procedimento anestésico..... | 33 |
| 3.9.2. Experimento 2: Efeito da manipulação cirúrgica sobre a medida de TFL..... | 35 |
| 3.9.3. Experimento 3: Estudo do efeito da administração de três diferentes doses de morfina imediatamente após a cirurgia na nocicepção de ratos juvenis..... | 35 |
| 3.9.4. Experimento 4: Estudo do efeito da administração prolongada de morfina sobre a nocicepção de ratos juvenis submetidos a modelo de cirurgia..... | 36 |
| 3.9.5. Experimento 5: Estudo do efeito da administração de morfina 60 dias após a cirurgia..... | 37 |
| 3.9.6. Experimento 6: Estudo do efeito da naloxona e da picrotoxina previamente à cirurgia sobre a nocicepção de ratos juvenis..... | 38 |
| 3.9.7. Experimento 7: Estudo do efeito da exposição a cirurgia em ratos juvenis sobre a locomoção em campo aberto..... | 39 |

| | |
|---|----|
| 3.9.8. Experimento 8: Efeito da exposição prévia a cirurgia sobre a resposta inflamatória produzida pela formalina em ratos juvenis..... | 39 |
| 3.9.9. Experimento 9: Efeito de uma segunda manipulação cirúrgica sobre a medida de TFL e locomoção em ratos de 45 dias..... | 40 |
| 4. Resultados..... | 42 |
| 4.1. Escolha e padronização do procedimento anestésico..... | 42 |
| 4.2. Efeito da manipulação cirúrgica sobre a medida de TFL de ratos juvenis..... | 47 |
| 4.3. Efeito da exposição de ratos juvenis à cirurgia sobre a locomoção em campo aberto..... | 51 |
| 4.4. Efeito da exposição prévia à cirurgia sobre a resposta inflamatória produzida pela formalina em ratos juvenis..... | 54 |
| 4.5. Efeito de uma segunda manipulação cirúrgica sobre a medida de TFL e avaliação da atividade locomotora em campo aberto, em ratos de 45 dias..... | 59 |
| 4.6. Efeito da administração de três diferentes doses de morfina sobre a nocicepção de ratos juvenis..... | 67 |
| 4.7. Efeito da administração de morfina por sete dias sobre a nocicepção de ratos juvenis submetidos a modelo de cirurgia Efeito da administração de morfina por sete dias sobre a nocicepção de ratos juvenis submetidos a modelo de cirurgia..... | 71 |

| | |
|--|-----|
| 4.8. Efeito da administração de morfina sobre a nocicepção, sessenta dias após a realização de cirurgia..... | 77 |
| 4.9. Efeito da administração de naloxona ou picrotoxina previamente à cirurgia sobre a nocicepção de ratos juvenis..... | 80 |
| 5. Discussão..... | 85 |
| 5.1. Procedimento anestésico..... | 85 |
| 5.2. Resposta nociceptiva em modelo de cirurgia aplicado a ratos juvenis..... | 88 |
| 5.3. Papel de sistemas opióide e GABAérgico sobre a resposta nociceptiva a modelo de cirurgia em ratos juvenis..... | 89 |
| 5.4. Resposta nociceptiva a analgésico opióide em modelo de cirurgia, em ratos juvenis..... | 91 |
| 5.5. Desenvolvimento de tolerância à morfina em ratos juvenis submetidos a modelo de cirurgia..... | 94 |
| 5.6. Efeito da exposição ao modelo de cirurgia proposto sobre a atividade locomotora de ratos juvenis..... | 95 |
| 5.7. Efeito da exposição ao modelo de cirurgia proposto sobre a resposta inflamatória produzida pela formalina em ratos juvenis..... | 96 |
| 5.8. Efeito de uma segunda manipulação cirúrgica sobre a medida de TFL e locomoção..... | 97 |
| 5.9. Discussão geral..... | 100 |
| 6. Conclusões..... | 102 |
| 7. Referências..... | 104 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura1: Padronização do procedimento anestésico: tiopental..... | 45 |
| Figura 2A: Padronização do procedimento anestésico: halotano..... | 46 |
| Figura 2B: Padronização do procedimento anestésico: halotano..... | 46 |
| Figura 3: Efeito da manipulação cirúrgica sobre a nocicepção..... | 50 |
| Figura 4: Campo aberto: latência para saída do primeiro quadrante..... | 52 |
| Figura 5: Campo aberto: número de cruzamentos..... | 53 |
| Figura 6A: Formalina: 1ª fase..... | 56 |
| Figura 6B: Formalina: 2ª fase..... | 56 |
| Figura 6C: Formalina: edema..... | 57 |
| Figura 7: Segunda manipulação cirúrgica..... | 62 |
| Figura 8A: TFL segunda exposição à cirurgia: basal..... | 63 |
| Figura 8B: TFL segunda exposição à cirurgia: TFL 30 min..... | 63 |
| Figura 9A: Atividade locomotora: latência para saída do 1º quadrante..... | 65 |
| Figura 9B: Atividade locomotora: número de cruzamentos..... | 65 |
| Figura 10 A: Administração de morfina após a cirurgia: TFL basal..... | 70 |
| Figura 10B: Administração de morfina após a cirurgia: TFL 30 min..... | 70 |
| Figura 10C: Administração de morfina após a cirurgia: TFL 60 min..... | 71 |
| Figura 10D: Administração de morfina após a cirurgia: TFL 90 min..... | 71 |
| Figura 11A: 7º dia de administração de morfina: TFL basal..... | 74 |
| Figura 11B: 7º dia de administração de morfina: TFL 30 min..... | 74 |
| Figura 11C: 7º dia de administração de morfina: TFL 60 min..... | 75 |
| Figura 11D: 7º dia de administração de morfina: TFL 90 min..... | 75 |
| Figura 12: Administração de morfina 60 dias após a cirurgia..... | 79 |

| | |
|---|----|
| Figura 13: Naloxona prévia à cirurgia | 83 |
| Figura 14: Picrotoxina prévia à cirurgia..... | 84 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

5HT: serotonina

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazoleproprionico

ANOVA: Análise de Variância (do Inglês: Analyses of Variance)

CAM-cinase: cálcio-calmodulina cinase

CGRP: peptídeo relacionado ao gen da calcitonina

CIOMS: Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas (do Inglês: Council for International Organizations of Medical Sciences)

Cl⁻: íon cloreto

COBEA/BRASIL: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DAG: diacilglicerol

EPM: erro padrão da média

GABA: ácido γ -aminobutírico

i.p: intraperitoneal

IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor (do Inglês: International Association for the Study of Pain)

ILAR/EUA: Instituto de Recursos Animais de Laboratório (do Inglês: Institute of Laboratory Animal Resources)

IP₃: inositol trifosfato

K⁺: íon potássio

LTP: Potencialização de longa duração (do Inglês: Long Term Potentiation)

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

P10: dia pós natal 10 (referente ao rato)

P5: dia pós-natal 5

P6: dia pós-natal 6

P12; dia pós-natal 12

P22: dia pós-natal 22

P24: dia pós-natal 24

P27: dia pós-natal 27

PIP₂: fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato

PKA: proteína cinase A

PKC: proteína cinase C

TFL: latência de retirada da cauda (do Inglês: tail flick latency)

UNESCO: Organização das nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (do Inglês: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization)

VIP: peptídeo vaso-ativo intestinal

WDR: neurônio de faixa ampla (do Inglês: Wide Dynamic Range)

DIVULGAÇÃO

Os resultados obtidos nessa tese foram parcialmente divulgados em:

Publicação em forma de resumo:

Afonso dos Reis Medeiros, **Giovana Dantas**, Alexandre Perla, Joanna Rozisky, Iraci, Lucena da Silva Torres. PAPEL DOS SISTEMAS OPIÓIDE E GABAÉRGICO SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA POR CIRURGIA EM RATOS JUVENIS. Revista HCPA 25 (supl 1):1-251, 2005.

Dallegrave, GJ, **Dantas, G**, Dallegrave, E, Rossi, G, Torres, ILS, Ferreira, MBC. EFEITOS DE PROCEDIMENTO ANESTÉSICO-CIRÚRGICO SOBRE A NOCICEPÇÃO EM RATOS. Revista HCPA 23 (supl1), 2003.

Apresentação em evento:

Dantas G, Rossi G, Dallegrave E, Torres ILS, Ferreira MBC. EFEITO DE LONGA DURAÇÃO DA CIRURGIA EM RATOS JUVENIS SOBRE A ANALGESIA OPIÓIDE. XXI Reunião Anual da Fesbe. 23-26 de Agosto de 2006. Águas de Lindóia, SP.

Rozisky JR, **Dantas G**, Rossi G, Dallegrave E, Torres ILS, Ferrira MBC. USO COMPARATIVO DO TIOPENTAL E DO HALOTANO PARA EXPERIMENTO DE DOR INCISIONAL. XXI Reunião Anual da Fesbe. 23-26 de Agosto de 2006. Águas de Lindóia, SP

Medeiros AR, **Dantas G**, Perla A, Rozisky J, Vieira LC, Torres ILS, Ferreira MBC. PAPEL DOS SISTEMAS OPIÓIDE E GABAÉRGICO SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA POR CIRURGIA EM RATOS JUVENIS. XXI Reunião Anual da Fesbe. 23-26 de Agosto de 2006. Águas de Lindóia, SP

Medeiros AR, **Dantas G**, Perla A, Rozisky J, Vieira LC, Torres ILS, Ferreira MBC. PAPEL DOS SISTEMAS OPIÓIDE E GABAÉRGICO SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA POR CIRURGIA EM RATOS JUVENIS. XVII Salão de Iniciação Científica. Porto Alegre. 17-21 de Outubro de 2005.

Medeiros AR, **Dantas G**, Perla A, Rosisky J, Torres ILS, Ferreira MBC. PAPEL DOS SISTEMAS OPIÓIDE E GABAÉRGICO SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA POR CIRURGIA EM RATOS JUVENIS. 25ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 12-16 de Setembro de 2005.

Dantas G, Stenzel B, Rossi G, Moehlecke M, Rozisky J, Dallegrave GJ, Dallegrave E, Torres ILS, Ferreira MBC. ANALGESIA E TOLERÂNCIA EM RATOS JUVENIS SUBMETIDOS À CIRURGIA. XX Reunião Anual da Fesbe. Águas de Lindóia, SP. 24-27 de Agosto de 2005.

Rossi, G. ; **Dantas, G.** ; Stenzel, B. *et al.* EFEITOS DA MORFINA EM RATOS SUBMETIDOS À CIRURGIA. In: XVI Salão de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre. XVI Salão de Iniciação Científica, 2004.

Stenzel, B. ; **Dantas, G.** ; Rossi, G. et al. ANALGESIA EM RATOS WISTAR JUVENIS FRENTE À DIFERENTES DOSES DE MORFINA. In: XVI Salão de Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre. XVI Salão de Iniciação Científica, 2004.

Dantas G, Stenzel B, Rossi G, Dallegrave GJ, Torres ILS, Dallegrave E, Ferreira MBC. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA EM RATOS JUVENIS SUBMETIDOS À CIRURGIA. XIX Reunião Anual da FeSBE. Águas de Lindóia, SP. 25-28 de Agosto de 2004.

Dallegrave, GJ, **Dantas, G,** Dallegrave, E, Rossi, G, Torres, ILS, Ferreira, MBC. EFEITOS DE PROCEDIMENTO ANESTÉSICO-CIRÚRGICO SOBRE A NOCICEPÇÃO EM RATOS. 23ª Semana Científica do HCPA. 1º- 5 de Setembro de 2003. Porto Alegre, RS.

Dantas G, Dallegrave E, Rossi G, Torres, ILS, Ferreira, MBC. EFEITOS DA MANIPULAÇÃO CIRÚRGICA E DO TIOPENTAL SOBRE A NOCICEPÇÃO EM RATOS. XVIII Reunião Anual da Fesbe 27-30 de Agosto de 2003. Curitiba, PR

RESUMO

Neonatos, bebês e crianças são freqüentemente expostos a estímulos nocivos repetidos, incluindo vacinações e cirurgias. Tem sido relatado que pacientes submetidos a cirurgias no início da vida apresentam mais dor pós-operatória quando estão na faixa etária entre 7 e 13 anos, em comparação com crianças submetidas a cirurgias na mesma faixa etária, mas que não foram operadas quando bebês. Foi demonstrado que bebês que foram operados até os três meses de idade e que sofreram cirurgia subsequente no mesmo dermatomo até os três anos de idade precisaram de mais fentanil intraoperatório, mais morfina no pós-operatório e tiveram maior concentração de norepinefrina plasmática que crianças da mesma idade que estavam sendo operadas pela primeira vez. O grupo de Brennan desenvolveu um modelo de dor pós-operatória em roedores que consiste na realização de incisão na face plantar do membro posterior sob anestesia geral com halotano. Nesse modelo foi demonstrada hiperalgesia mecânica, que persistiu por vários dias, sendo essa uma das similaridades com o estado pós-operatório em seres humanos. Trabalhos posteriores mostraram liberação de aminoácidos excitatórios, ativação das células do corno dorsal e sensibilização central, e redução do comportamento de dor por injeção intratecal de antagonista não-NMDA. Observou-se que as fibras A δ e C continuavam sensibilizadas um dia após a incisão, contribuindo para a hiperalgesia mecânica e para a amplificação da resposta central. A morfina inibiu os comportamentos de dor, tanto administrada subcutaneamente quanto via intratecal. Assim, sugere-se que esse seja um excelente modelo de estudo de dor pós-operatória, bem como de sua modulação. Essa tese teve como objetivo realizar estudos sobre modulação da dor, analgesia pós-operatória, resposta inflamatória e nova exposição à cirurgia em modelo animal, utilizando ratos 21 dias de idade. Pela facilidade técnica e resultados prévios, foi selecionado e adaptado o modelo descrito por Brennan e colaboradores (Brennan et al., 1996). Observou-se aumento de TFL 30 minutos após a cirurgia em ratos de 21 dias de idade, sugerindo recrutamento de sistemas moduladores da dor. Esse aumento foi totalmente revertido por picrotoxina e parcialmente revertido por naloxona, evidenciando papéis gabaérgico e opióide na modulação da dor pós-operatória. Houve também aumento da duração da analgesia da morfina, sugerindo somatório de efeitos: do analgésico exógeno e dos neurotransmissores liberados. A administração de morfina por 7 dias produziu tolerância, independentemente da cirurgia. Houve diminuição da duração do efeito da morfina quando administrada 60 dias após a cirurgia, sugerindo conseqüências de longa duração decorrentes da cirurgia. Além disso, observou-se que, 30 min após a cirurgia, os animais realizaram menos cruzamentos em campo aberto sendo esse efeito independente da anestesia e da ansiedade, o que foi interpretado como hiperalgesia mecânica. Houve também exacerbação da resposta inflamatória à formalina, na pata contra-lateral, 3 dias após a cirurgia sugerindo sensibilização sistêmica desses animais. Quando expostos à segunda cirurgia, aos 45 dias de idade, os animais não apresentaram aumento de TFL verificado na primeira cirurgia aos 21 dias, sugerindo novamente sugerindo conseqüências de longa duração decorrentes da cirurgia. Não houve diferença quanto ao número de cruzamentos realizados em campo aberto por animais exposto a segunda cirurgia em relação animais da mesma idade exposto pela primeira vez. Esses resultados sugerem que animais de 21 dias submetidos à cirurgia apresentam conseqüências de longa duração no que se refere nocicepção posterior.

ABSTRACT

Neonates, infants and children are often exposed to repetitive noxious stimuli including vaccinations and surgeries. It has been described that patients submitted to surgery early in life show more postoperative pain at age between 7 and 13 years when compared with children at the same age submitted to surgery for the first time. It was shown that babies submitted to surgery until 3 months of age and to a subsequent surgery at the same dermatome until 3 years of age needed more fentanyl intraoperative and morphine postoperative, and showed more plasmatic norepinephrine than children at the same age suffering surgery for the first time. Brennan and col. (1996) developed a postoperative pain model to rodents which consists in hind paw plantar incision under halothane general anesthesia. It was described in this model mechanic hiperalgesia, which is one of the similarities with postoperative state in humans. Other works in same model showed release of excitatory amino acids, dorsal horn cells activation and central sensitization, and reduction of pain behavior after intrathecal injection of non-NMDA antagonist. It was observed that A δ and C fibers continued sensitized one day after incision contributing to mechanical hiperalgesia and amplification of central responses. Subcutaneous or intrathecal morphine inhibited pain behaviors in this model. Thus, it suggests that this is a good model to study postoperative pain and its modulation. The objectives of this thesis were to carry out studies about pain modulation, postoperative analgesia, inflammatory response and new exposition to surgery in 21-days old rats. Because of the facility of the model and previous results, it was chosen and adapted the model of Brennan (Brennan et al, 1996). It was observed an increase in TFL 30 min after surgery in 21-days old rats, suggesting recruiting of modulation systems. This increase was totally reverted by picrotoxine and partially reverted by naloxone, showing the gabaergic and opioid roles in postoperative pain modulation. There was an increase in duration of morphine analgesia, suggesting a summation of effects: from exogenous analgesic and neurotransmitters release. Morphine administration for 7 days produced tolerance and this does not depend on surgery. There was a decrease in duration of morphine effect when administered 60 days after surgery, suggesting surgery long-term effects. Beyond this, it was observed that 30 min after surgery, animals performed less crossing in open field and this effect does not depend on anesthesia and anxiety, which was interpreted as mechanical hiperalgesia. There was also exacerbation of inflammatory response to formalin, in contralateral hind paw, 3 days after surgery, suggesting systemic sensitization of these animals. When exposed to second surgery, at 45-days of age, animals did not show the increase in TFL that was observed in first surgery, suggesting, once more, surgery long-term effects. There was not difference number of crossings performed between animals submitted to second surgery at 45-days of age and animals at the same age submitted to surgery for the first time. These results suggest that 21-days old rats submitted to surgery display long-term consequences in later nociception.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor

Dor, sintoma comum a várias condições, é a razão mais freqüente de procura de auxílio médico. Em quase 50 milhões de pessoas, a dor determina incapacitação total ou parcial (revisado por Loeser et al, 2001).

Embora seja fenômeno difícil de ser definido, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a conceitua "como uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada com lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos deste tipo de dano" (Baumann e Lehman, 1989; Linton e Skevington, 1999). Existem, assim, dois componentes a serem considerados: a sensação dolorosa propriamente dita ou nocicepção e a reatividade à dor.

A nocicepção é a resposta neural a estímulos traumáticos ou lesivos. Refere-se à atividade do sistema nervoso aferente induzida por estímulos nocivos, tanto exógenos (mecânicos, químicos, físicos e biológicos), quanto endógenos (inflamação, aumento de peristaltismo, isquemia tecidual). Compreende a recepção dos estímulos por estruturas periféricas específicas, sua condução até o sistema nervoso central, através de vias nervosas sensitivas, e a integração da sensação dolorosa em níveis talâmico e cortical (revisado por Loeser *et al*, 2001).

A nocicepção não leva necessariamente à experiência de dor. A percepção do estímulo nocivo depende de fatores periféricos e centrais. Assim, por exemplo, o limiar de dor para estimulação mecânica diminui muito em uma área de inflamação, cujas aferências primárias estão sensibilizadas. Aumentos de longa duração na excitabilidade dos neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula

espinhal também contribuem para a diminuição do limiar de dor. Além disso, a plasticidade das vias aferentes, modulada por estímulos nocivos prolongados ou repetidos, pode alterar profundamente a percepção de dor (Fields e Basbaum, 1994).

A reação à dor compreende uma série de comportamentos defensivos - desde a retirada reflexa da área afetada, para longe do fator agressor, até as respostas emocionais complexas, expressas por padrões de comportamento inatos e aprendidos e sensações subjetivas de desconforto e sofrimento. A reatividade emocional corresponde à interpretação afetiva da dor, de caráter individual e influenciada por estados ou traços psicológicos, experiências prévias e fatores culturais, sociais e ambientais (Taenzer *et al*, 1986; Jones, 1993; Wall e Melzack, 1994). Esses fatores são capazes de filtrar, modular ou distorcer a sensação dolorosa, de modo que a resposta à dor pode variar marcadamente de um indivíduo para o outro, assim como em um mesmo indivíduo, em momentos diferentes, apesar da nocicepção ser igual (revisado por Loeser *et al*, 2001).

A dor aguda é causada por traumas, doenças subjacentes ou alterações funcionais musculares e viscerais. Constitui, na maioria das vezes, uma resposta nociceptiva à agressão. Tem importante objetivo fisiológico - alertar o indivíduo sobre algo que está errado, de modo que o organismo possa reagir a uma eventual agressão. Na maioria dos casos, cessa em poucos dias ou semanas, com a resolução do quadro básico ou a administração de analgésicos. Quando persiste, devido às características da doença de base ou ao tratamento inadequado, diz que a dor tornou-se crônica (Morgan e Mikhail, 1996; revisado por Loeser *et al*, 2001). Dor crônica causada por injúria ou doença é uma das

principais causas de sofrimento humano (Ko e Zuo, 2004). Postula-se que mudanças de longa duração nas sinapses sensoriais, em vários níveis do sistema nervoso central, estejam envolvidas na gênese da dor crônica (Ko e Zuo, 2004).

1.2. Nocicepção

A percepção de estímulos nocivos acontece pela ativação de receptores sensoriais especializados - os nociceptores - localizados em quase todo o organismo (Basbaum e Jessell, 2000). Os nociceptores constituem a porção terminal periférica de fibras que conduzem os potenciais de ação propagados até a medula espinhal. Tais fibras são os axônios de células sensoriais primárias, conhecidas como neurônios aferentes primários, localizadas no gânglio dorsal da medula espinhal. Cada neurônio tem um único axônio que se bifurca, de modo que uma extremidade termina em tecidos periféricos e a outra, dentro do corno posterior (dorsal) da medula espinhal. Assim, o impulso doloroso captado na periferia dirige-se inicialmente para o corpo celular e, após, vai ao corno dorsal da medula espinhal (Morgan e Mikhail, 1996; Basbaum e Jessell, 2000; revisado por Loeser *et al*, 2001).

As fibras que transmitem o estímulo nocivo são de dois tipos - A δ e C. As primeiras, mielinizadas e com maior velocidade de condução, contribuem para a percepção da dor de forma rápida, enquanto as fibras C, não-mielinizadas e com menor velocidade de condução, relacionam-se principalmente com a dor de caráter dolente. No entanto, como descrito a seguir, este não é o único fator

envolvido na percepção de dores com características diferentes (Morgan e Mikhail, 1996; Basbaum e Jessell, 2000; revisado por Loeser *et al*, 2001).

No corno dorsal da medula espinhal, as fibras nervosas dos neurônios aferentes primários fazem sinapse com neurônios secundários, que dão origem às vias ascendentes de condução da dor. Os axônios dos neurônios secundários cruzam a linha média e ascendem pelo trato espinotalâmico contralateral. Além das sinapses com neurônios de segunda ordem, os neurônios aferentes primários podem fazer sinapse com interneurônios, neurônios simpáticos e neurônios do corno ventral motor (Morgan e Mikhail, 1996; revisado por Loeser *et al*, 2001).

Os neurônios secundários podem ser de dois tipos - especificamente nociceptivos ou de faixa ampla (*wide dynamic range* ou WDR em inglês). Os primeiros relacionam-se apenas a estímulos nocivos, enquanto os segundos também recebem aferência não-nociceptiva de fibras A β , A δ e C. Os neurônios especificamente nociceptivos estão arranjados somatotopicamente na lâmina I do corno dorsal, são normalmente silentes e respondem apenas à estimulação nociva de alto limiar. Os neurônios de faixa ampla constituem o tipo celular predominante no corno dorsal, sendo mais abundantes na lâmina V. Em condições de injúria severa ou persistente as fibras C disparam repetidamente e a resposta dos neurônios do corno dorsal aumenta progressivamente, de forma gradual, em um fenômeno conhecido como *wind-up* (Morgan e Mikhail, 1996; revisado por Loeser *et al*, 2001).

Há duas vias principais de condução da dor. Contidas no trato espinotalâmico, ambas partem da medula espinhal, cruzam a linha média (ao nível

da comissura anterior) e chegam ao tálamo. O trato espinotalâmico lateral ou via neoespinotalâmica, de aparecimento mais recente no curso da evolução biológica, tem poucas estações sinápticas e se projeta no núcleo ventral póstero-lateral do tálamo, cujos neurônios recebem o nome de terciários. Daí partem projeções para o córtex somatossensorial primário, onde ocorre a percepção da dor. Este trato relaciona-se com os aspectos discriminativos da dor, como localização, intensidade e duração. Observa-se estreita relação topográfica entre a área estimulada na periferia e as regiões talâmicas e corticais ativadas, ou seja, há somatotopia. Isto contribui para que o indivíduo saiba precisar com exatidão o ponto de origem da dor em um trauma (Morgan e Mikhail, 1996; Bear *et al.* 1996; revisado por Loeser *et al.*, 2001).

O trato espinotalâmico medial (ou via paleoespinotalâmica) é mais antigo na escala de evolução. Ao contrário do trato lateral, tem várias estações sinápticas. A partir da medula espinhal, projeta-se para o tálamo medial e daí difusamente para o córtex cerebral de ambos os hemisférios cerebrais. Perde-se, assim, a somatotopia dos estímulos percebidos. Projeta-se também para a substância cinzenta periaquedutal, o que pode representar uma importante ligação entre vias ascendentes e descendentes da dor. Fibras colaterais do trato medial alcançam o sistema reticular ativador e hipotálamo, sendo responsáveis pela resposta de alerta observada em associação à presença de dor. Sua projeção para estruturas do chamado sistema límbico explica o aparecimento das respostas emocionais desagradáveis (Morgan e Mikhail, 1996; Bear *et al.* 1996; revisado por Loeser *et al.*, 2001). Devido às múltiplas estações sinápticas, a via paleoespinotalâmica é a

que mais se presta à influência moduladora de outros sistemas centrais (Bear *et al.* 1996; revisado por Loeser *et al.*, 2001).

1.3. Glutamato e seus receptores

O aminoácido excitatório glutamato é considerado um dos principais neurotransmissores de sinapses excitatórias do sistema nervoso. Suas ações são mediadas por vários tipos de receptores, que podem ser classificados como ionotrópicos (ligados a canais iônicos) ou metabotrópicos (acoplados a proteínas Gs) (Waxham, 1999).

O glutamato e o aspartato exercem importante papel no mecanismo de *wind-up*, por meio da ativação de receptores glutamatérgicos NMDA e não-NMDA. São considerados os principais responsáveis pela indução e manutenção de um fenômeno denominado sensibilização central (Ferreira, 2004), que se caracteriza por ser uma mudança de longa duração e por produzir hiper excitabilidade nos neurônios do corno dorsal decorrente da ativação de receptores NMDA

Quando estimuladas, as fibras C liberam substância P e glutamato, que coexistem nos mesmos neurônios. Uma vez liberado, o glutamato atua sobre receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA e metabotrópicos, levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio em neurônios medulares e à ativação de fosfolipases C e A₂. A primeira catalisa a hidrólise de fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP₂), gerando inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O diacilglicerol atua como segundo mensageiro e ativa proteína quinase C (PKC). A fosfolipase A₂ catalisa a conversão de fosfatidilcolina em ácido araquidônico e induz a formação de prostaglandinas. A ativação de receptores NMDA também induz a enzima óxido nítrico sintetase (NOS), levando à formação de óxido nítrico (NO). Tanto

este quanto as prostaglandinas facilitam a liberação de aminoácidos excitatórios na medula espinhal, contribuindo para a manutenção da sensação dolorosa, mesmo quando os impulsos nociceptivos estão declinando na periferia (Ferreira, 2004).

No corno dorsal da medula espinhal, o receptor NMDA é pós-sináptico a um interneurônio mediador de excitação polissináptica. Este é responsável pelo processamento nociceptivo espinhal e sua ativação resulta em um estado facilitatório central, induzido por sinais de entrada constantes das fibras C (Nishiyama, 2000). A ativação de receptores NMDA leva ao aumento no influxo de cálcio, poderoso o suficiente para provocar mudanças de longa duração dentro e em volta da célula, denominado sensibilização central, que é semelhante a potenciação de longa duração ou LTP em inglês (*Long Term Potentiation*) no hipocampo (para revisão ver Kandel *et al.*, 2000). Além disso, a ativação dos receptores NMDA também é tida como responsável por eventos excitotóxicos neuronais (Carpenter e Dickenson, 2001).

Existem evidências da participação de receptores NMDA no estabelecimento de dores inflamatórias, neuropáticas, isquêmicas e alodinia, todos processos em que os receptores alteram a relação normal entre estímulo e resposta. Nessas situações de dor persistente, o receptor NMDA é crucial para estabelecer o estado de dor aumentada e mantê-lo. Por isso, tem sido possível estabelecer um paralelo entre os estados de dor crônica e hiperalgesia e o fenômeno de LTP (Liu e Sandkühler, 1998; Rygh *et al.*, 1999; Sandkühler, 2000; Carpenter e Dickenson, 2001; Gjerstad *et al.*, 2001).

Os receptores glutamatérgicos não-NMDA são mediadores da transmissão monossináptica excitatória rápida entre as aferências primárias e os neurônios de projeção do corno dorsal da medula espinhal. Sua atividade relaciona-se tanto a estímulos nociceptivos agudos quanto a estímulos não-nocivos (Nishiyama, 2000). Na vigência de inflamação, os receptores não-NMDA têm grande contribuição no mecanismo espinhal de amplificação central mediado por receptores NMDA e potencialização progressiva das respostas evocadas pelas fibras C durante uma seqüência de estímulos (*wind-up*). Uma possível explicação é a de que haveria mudança na composição das subunidades dos receptores após a inflamação, o que os tornariam permeáveis ao cálcio (Carpenter e Dickenson, 2001).

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos são aqueles acoplados a proteínas G, gerando maior diversidade na transmissão excitatória (Carpenter e Dickenson, 2001). Existem evidências de que receptores metabotrópicos estabelecem integração com receptores ionotrópicos em neurônios do corno dorsal da medula, estando envolvidos na potencialização dependente de frequência das respostas das fibras C. Têm, assim, um importante papel na plasticidade sináptica, na sensibilização central durante a hiperalgesia mecânica e na nocicepção induzida por formalina em modelos animais (Budai e Larson, 1998; Maione *et al.*, 2000). No entanto, alguns subtipos de receptores glutamatérgicos metabotrópicos são inibitórios (Maione *et al.*, 2000; Carpenter e Dickenson, 2001) e diminuem o influxo de cálcio no corno dorsal (Carpenter e Dickenson, 2001), apresentando função moduladora da transmissão excitatória.

Os dois fenômenos - *wind-up* e LTP - apresentam diferenças. O primeiro é gerado por uma frequência muito baixa de impulsos e manifesta-se apenas

enquanto esta seqüência repetitiva (“trem” de impulsos) está sendo aplicada. Já a LTP requer uma breve seqüência de impulsos de alta freqüência e manifesta-se pelo aparecimento de uma resposta potencializada aos impulsos subseqüentes, durante um período longo de tempo após a estimulação inicial (Ferreira, 2004).

Também deve ser feita diferenciação entre sensibilização central e *wind-up*. Este último ocorre apenas em situações específicas, artificiais, em resposta a estímulos repetidos, aplicados de forma lenta e que, sincronicamente, ativam muitas fibras C. A sensibilização central é um fenômeno mais geral, que pode ser desencadeado pela ativação assincrônica de fibras aferentes em pele, articulações, músculos ou vísceras, tanto diretamente por substâncias químicas irritantes, quanto por meio de resposta inflamatória. Propõe-se que o fenômeno de *wind-up* seja um “gatilho” da sensibilização central (Ferreira, 2004). Breve período de impulsos de baixa freqüência ativaria mecanismos dependentes de receptores glutamatérgicos NMDA, aumentando o nível intracelular de cálcio, o que, por sua vez, desencadearia um período prolongado de aumento de excitabilidade dos neurônios. A presença de *wind-up* provavelmente leva ao desenvolvimento de sensibilização central, mas esta pode ocorrer na ausência daquele. Desde que haja aumento da concentração intracelular de cálcio, sem qualquer alteração associada no disparo do potencial de ação, a sensibilização poderá ocorrer. Esta elevação de cálcio intracelular poderia ser induzida por outras vias (somação de potenciais de ação sub-limíares, ativação de receptores metabotrópicos, tanto associados a aminoácidos excitatórios, quanto a neuropeptídeos). Uma vez instalada, a sensibilização se manifesta em nível celular como uma alteração nas propriedades dos campos receptivos - redução de limiar, aumento de

responsividade e de extensão espacial e recrutamento de impulsos novos. Em termos clínicos, observa-se sensibilidade anormal ou aumentada a diferentes estímulos, que se manifesta sob a forma de hiperalgesia secundária, alodinia ou dor crônica (Ferreira, 2004).

Tem-se postulado que a sensibilização central seria decorrente da formação de LTP em neurônios do corno dorsal da medula (Liu e Sandkühler, 1998; Rygh *et al.*, 1999; Sandkühler, 2000; Carpenter e Dickenson, 2001; Gjerstad *et al.*, 2001). Sugere-se que haja aumento da sensibilidade dos neurônios do corno dorsal, especialmente dos neurônios nociceptivos, a estímulos sensoriais associados a impulsos nociceptivos em fibras A δ e C. Um forte estímulo nocivo natural, bem como estímulos nocivos não tão fortes, mas repetidos, poderiam desencadear essa sensibilização e induzir LTP na superfície do corno dorsal (Sandkühler, 2000; Rygh *et al.*, 1999). Estímulos condicionantes que induzem LTP na aferência primária são semelhantes aos que induzem hiperalgesia. Ainda, LTP espinhal e hiperalgesia induzida por injúria compartilham vias de transdução de sinal, tempo de duração e perfil farmacológico similares. Isto faz da LTP um interessante modelo celular para o fenômeno da sensibilização central.

O papel dos receptores NMDA fica claro quando se faz seu bloqueio com antagonistas e observa-se inibição da formação de LTP em medula espinhal (Liu e Sandkühler, 1998). Também foi demonstrado que a indução de LTP é inibida por vias descendentes modulatórias da dor (Gjerstad *et al.*, 2001).

Outro dado interessante é que a estimulação nociva, assim como a injeção de formalina subcutânea, aumentam a liberação de glutamato e óxido nítrico em

dialisados obtidos de substância cinzenta periaquedutal (Silva *et al.*, 2000) e também de medula espinhal (Okuda *et al.*, 2001), sendo esse aumento dependente de cálcio. Também foi demonstrado comportamento de dor após ativação de receptores NMDA na medula espinhal (Kawamata e Omote, 1999), com aumento do glutamato liberado em dialisados obtidos naquela estrutura. Em animais submetidos ao modelo de Brennan de dor pós-operatória (Brennan *et al.*, 1996), caracterizado por diminuição no limiar de retirada da pata para um estímulo mecânico puntual, após incisão plantar, foi demonstrada liberação dos aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato (Zahn *et al.*, 2002). Observou-se, nesse mesmo modelo, ativação das células do corno dorsal e sensibilização central (Vandermeulen e Brennan, 2000). A injeção intratecal de antagonista não-NMDA reduziu o comportamento de dor (Zahn *et al.*, 1998; Pogatzki *et al.*, 2000), mas antagonistas NMDA e metabotrópicos não apresentaram esse efeito (Pogatzki *et al.*, 2000). Foi demonstrado que as fibras A δ e C continuam sensibilizadas um dia após a incisão e que a atividade espontânea dessas fibras tem papel no comportamento de dor, contribuindo para a hiperalgesia mecânica e para a amplificação da resposta centralmente (Pogatzki *et al.*, 2002).

1.4. Modulação da dor

A transmissão de estímulos nocivos desde a periferia até os centros cerebrais não é um processo linear. Circuitos em diferentes níveis têm a capacidade de alterar marcadamente a passagem dos impulsos e, portanto, a resposta à estimulação nociva. O balanço da atividade entre circuitos excitatórios

e inibitórios determinará quais serão as informações que chegarão ao cérebro. A modulação da dor pode ocorrer periféricamente, na medula espinhal e em estruturas supra-espinhais. Esta modulação pode ser inibitória ou facilitatória (Morgan e Mikhail, 1996; revisado por Loeser *et al*, 2001; Millan, 2002).

A modulação periférica se expressa por meio do fenômeno de sensibilização. Após estimulação repetida, os nociceptores podem apresentar uma resposta aumentada a estímulos nocivos ou adquirir uma responsividade maior a quaisquer estímulos, incluindo os não-nocivos.

A diminuição do limiar de dor, chamada de hiperalgesia, pode ser gerada por sensibilização periférica, com ativação de nociceptores (Levine *et al.*, 1986, 1984, 1993; Markenson, 1996; Basbaum e Jessell, 2000) ou de segundos mensageiros (Taiwo e Levine, 1989, 1991). Os mediadores liberados pelo tecido lesado, tais como prostaglandina E₂, prostaciclina, adenosina, bradicinina, potássio (K⁺) e serotonina (5HT), podem atuar diretamente no nociceptor, ativando-o e produzindo hiperalgesia primária (Cesare e McNaughton, 1997; Basbaum e Jessell, 2000).

O nociceptor produz substância P e CGRP (peptídeo relacionado com o gene da calcitonina). A substância P liberada age nos mastócitos, liberando histamina. Esta, por sua vez, excita diretamente o nociceptor e provoca extravasamento de CGRP para o plasma. Há vasodilatação, edema e liberação adicional de bradicinina, sensibilizando ainda mais o nociceptor. Isto caracteriza a hiperalgesia secundária (Cesare e McNaughton, 1997; Basbaum e Jessell, 2000).

Após estimulação prolongada, a hiperalgesia pode persistir, mesmo quando cessam a resposta inflamatória e a dor. Neste caso, diante de um estímulo,

mesmo leve, se restabelece o estado hiperalgésico anterior, fenômeno denominado de “memória periférica da dor” (revisado por Loeser *et al*, 2001). Estados hiperalgésicos também podem ser causados por sensibilização central, fenômeno em que os neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal têm sua sensibilidade aumentada à estimulação sensorial (Moore *et al.*, 2000).

No que se refere à modulação central, diversos mecanismos contribuem para o fenômeno de sensibilização em medula espinhal, sendo, portanto, facilitadores da dor. Estudos têm demonstrado que dano tecidual pode causar expansão dos campos receptivos e diminuição no limiar de excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula, fazendo com que pequenos estímulos passem a desencadear respostas exageradas (alodinia), dor com estímulos subliminares (hiperalgesia) ou até mesmo dor espontânea (revisado por Loeser *et al*, 2001). Tal mecanismo contribuiria para dores crônicas, como a do membro fantasma, em que, mesmo após amputação, o paciente se queixa de dor com localização e intensidade similares às apresentadas antes da cirurgia (Marbach, 1996; revisado por Loeser *et al*, 2001). Os mediadores neuroquímicos de sensibilização central incluem substância P, VIP, colecistocinina, angiotensina, galanina, glutamato e aspartato.

A modulação central inibitória da dor pode se dar por meio de mecanismos existentes no próprio segmento medular que recebe os impulsos ou da atividade de vias descendentes (com origem supra-espinhal). O sistema modulador supra-espinhal provavelmente mais conhecido tem origem na substância cinzenta periaquedutal (região ventro-lateral), onde mecanismos inibitórios encefalinérgicos e adrenérgicos contribuem para a modulação central da dor. A estimulação

elétrica e a administração local de morfina naquela estrutura produzem marcada analgesia, tanto em animais quanto em seres humanos (revisado por Loeser *et al*, 2001; Pleuvry e Lauretti, 1996). Da substância cinzenta periaquedutal partem fibras para o bulbo, especificamente para o núcleo magno da rafe e a formação reticular bulbar, e daí originam-se fibras descendentes que percorrem o funículo dorsolateral da medula, terminando na substância gelatinosa do corno dorsal da medula (revisado por Loeser *et al*, 2001). As vias inibitórias adrenérgicas partem primariamente de substância cinzenta periaquedutal e formação reticular. As vias serotoninérgicas partem do núcleo magno da rafe e dirigem-se para o corno dorsal através do funículo dorsolateral. O sistema opióide endógeno tem origem primariamente em formação reticular e núcleo magno da rafe, com liberação de encefalinas, que atuam pré-sinápticamente, hiperpolarizando neurônios aferentes primários na medula espinhal e inibindo a liberação de substância P. Também parece haver inibição pós-sináptica por opióides (revisado por Loeser *et al*, 2001).

A inibição segmentar de estímulos nociceptivos teve como base a teoria do portão de Melzack e Wall (1965). Estes autores propuseram a existência de um sistema de controle em medula espinhal que modularia os impulsos vindos da pele, antes que houvesse percepção e resposta à dor. Nesse contexto, os neurônios encefalinérgicos encontrados na substância gelatinosa da medula espinhal (interneurônios) seriam o equivalente neuro-humoral do conceito neurofisiológico da comporta espinhal da dor proposto por aqueles autores (revisado por Loeser *et al*, 2001).

Neurônios encefalinérgicos exercem papel fisiológico inibitório, modulando a informação em nível de primeira sinapse central. A inibição da atividade de

neurônios medulares de segunda ordem e do trato espinotalâmico, por meio da ativação de fibras aferentes de maior diâmetro relacionadas à sensação epicrítica, segue o modelo da teoria do portão e explica como a estimulação mecânica pode aliviar a dor. Friccionar, por exemplo, o cotovelo imediatamente após um traumatismo leve reduz a dor. De forma similar, a estimulação nociva em áreas não contíguas do organismo inibe neurônios de segunda ordem em vários níveis da medula, de modo que a presença de dor em uma região do organismo tende a inibir o seu aparecimento em outras regiões (revisado por Loeser *et al*, 2001).

Os aminoácidos glicina e ácido gama-aminobutírico (GABA), que atuam como neurotransmissores inibitórios, parecem exercer importante papel na inibição segmentar da dor. O GABA é considerado o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. Em nível de medula espinhal, sua atuação se faz por meio de receptores GABA_A e GABA_B. O canal iônico associado ao receptor GABA_A é seletivo ao Cl⁻. Quando o GABA se liga ao seu receptor, o influxo de Cl⁻ faz com que a célula se hiperpolarize (Waxham, 1999). A picrotoxina, um potente antagonista GABA_A, parece se ligar dentro do canal, impedindo o fluxo de Cl⁻ para dentro da célula (Waxham, 1999). O receptor GABA_A pode ser fosforilado por PKA, PKC, CAM-cinase e outras proteínas cinases, o que resulta em mudança na sua afinidade. Foi determinado que pelo menos a PKA diminui as correntes de Cl⁻ em neurônios espinhais de camundongo (Porter *et al*, 1990). Quanto aos receptores metabotrópicos GABA_B, sua ativação aumenta a condutância da membrana celular ao potássio, tornando a despolarização mais difícil (Bormann, 1988). A ativação de receptores de glicina, por sua vez, aumenta a condutância da

membrana ao cloro. A ação da glicina é mais complexa que a do GABA por também ter efeito facilitatório sobre receptores NMDA (Betz *et al.*, 2006).

Outro importante sistema de neurotransmissores envolvido na modulação inibitória da dor é o sistema opióide. Os opióides endógenos, que compreendem as endorfinas, as dinorfinas e as encefalinas, se ligam com grande afinidade a receptores específicos. Estes podem ser de três tipos: mu, delta e kappa. Em neurônios da medula espinhal, seu efeito predominante é diminuir o disparo neuronal (Marsh *et al.*, 1997). A ligação em receptores pré-sinápticos faz com que a liberação de neurotransmissores envolvidos nas vias da dor seja reduzida (Marsh *et al.*, 1997). A estimulação de receptores pós-sinápticos inibe a neurotransmissão por produzir hiperpolarização e reduzir, assim, a atividade evocada (Marsh *et al.*, 1997). Um terceiro mecanismo envolve a inibição de determinado neurônio, que, por sua vez, inibe um neurônio inibitório. Uma vez que a inibição do neurônio inibitório não está ocorrendo, este pode ser ativado e exercer seu papel na circuitaria neuronal (Marsh *et al.*, 1997).

1.5. Dor pós-operatória

A dor pós-operatória é uma forma comum de dor aguda. Em geral, ocorre em repouso e é exacerbada por tosse, deambulação (Mögensen *et al.*, 1992) e estímulos mecânicos (Tverskoy *et al.*, 1994). Analgesia adequada para esse tipo de dor aumenta a satisfação do paciente com o tratamento recebido e diminui a morbidade e a mortalidade decorrentes da cirurgia (Sjostrom *et al.*, 1994).

Importante pela sua prevalência e por ser fator de risco para diversas complicações, a dor aguda pós-operatória atrai o interesse de pesquisadores de áreas básicas e clínicas.

O grupo de Brennan e colaboradores (Brennan *et al.*, 1996) desenvolveu trabalho interessante, empregando procedimento cirúrgico específico para uso em roedores, que consiste na realização de incisão na face plantar do membro posterior, sob anestesia geral com halotano. Nesse modelo, os animais submetidos à incisão apresentaram hiperalgesia mecânica, que persistiu por vários dias, sendo essa uma das similaridades com o estado pós-operatório em seres humanos (Brennan *et al.*, 1996). Trabalhos posteriores desse grupo demonstraram liberação dos aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato (Zahn *et al.*, 2002), ativação das células do corno dorsal e sensibilização central (Vandermeulen e Brennan, 2000), além de redução do comportamento de dor por injeção intratecal de antagonista não-NMDA (Zahn *et al.*, 1998; Pogatzki *et al.*, 2000). Observou-se que as fibras A δ e C continuavam sensibilizadas um dia após a incisão, sendo que a atividade espontânea dessas fibras tem papel nos comportamento de dor, contribuindo para a hiperalgesia mecânica e para a amplificação da resposta central (Pogatzki *et al.*, 2002). Nesse mesmo modelo a morfina inibiu os comportamentos de dores estudados, tanto administrada subcutaneamente quanto via intratecal (Zahn *et al.*, 1997). Assim, todos os achados aqui descritos sugerem que esse seja um excelente modelo de estudo de dor pós-operatória, bem como de sua modulação.

1.6. Dor em organismos imaturos

Tanto crianças quanto animais de menor faixa etária respondem a estímulos nocivos com comportamentos que são indicativos de dor (Guinsburg *et al.*, 2000; Falcon *et al.*, 1996). Anand e Craig (1998) sugeriram ampliação do conceito de dor considerando-a “qualidade inerente a vida que surge precocemente no desenvolvimento do indivíduo, serve como sinalizador de lesão tecidual e sua percepção não depende de experiência prévia”. Muitos estudos de neurobiologia do desenvolvimento da dor têm demonstrado considerável maturação das vias ascendentes periféricas, espinhais e supra-espinhais já a partir da 26ª semana de gestação em neonatos humanos. Estes respondem à lesão tecidual com comportamento específico de dor e sinais hormonais, autonômicos e metabólicos de estresse (revisado por Berde e Sethna, 2002 *et al.*, 2002). No entanto, os neonatos desenvolvem as vias inibitórias descendentes mais tarde que as aferências excitatórias (revisado por Berde e Sethna, 2002 *et al.*, 2002). Adicionalmente, respostas neuronais e comportamentais a estímulos nocivos e não-nocivos não estão sob o mesmo controle que é observado em um organismo adulto, e a razão disso é a imaturidade da circuitaria.

A dor aguda é iniciada por intenso *input* em aferências nociceptivas primárias, que ativam neurônios do corno dorsal da medula espinhal. A maior parte da transmissão excitatória no corno dorsal é mediada por glutamato, que age em receptores ionotrópicos pós-sinápticos. No período perinatal, correntes de glutamato são evidentes no corno dorsal de ratos, observando-se liberação daquele neurotransmissor dos terminais de aferências primárias. Essas correntes aumentam com a idade, no período pós-natal, especialmente entre os dias pós-

natais 5 (P5) e 10 (P10) (para revisão sobre o assunto, ver Pattinson e Fitzgerald, 2004).

No início do desenvolvimento, o rato apresenta uma super-expressão de receptores AMPA e cainato, que diminui quando alcança a idade adulta (Jakowec *et al*, 1995; Stegenga e Kalb, 2001). Já o receptor NMDA media mudanças de longa duração no corno dorsal do rato jovem, depois de estimulação de alta frequência (Randic *et al*, 1993). Na medula espinhal, este receptor parece ser mais sensível no rato jovem do que no adulto (Monyer *et al*, 1994). A subunidade NR2B do receptor NMDA é amplamente expressa por toda a medula espinhal no período neonatal, em comparação com o adulto, refletindo um papel na plasticidade sináptica e na reorganização das sinapses durante o crescimento (Loftis e Janowsky, 2003).

A transmissão inibitória rápida no corno dorsal da medula é mediada pelos receptores GABA_A e glicina. Ao longo do desenvolvimento do animal, os receptores GABA apresentam mudanças na expressão das suas subunidades e respondem de diferentes maneiras, de acordo com o estímulo. Há aumento da atividade GABAérgica de forma dependente da idade, assim como na frequência das correntes inibitórias espontâneas. No neonato, o sistema GABAérgico parece ser responsável pela maior parte da atividade das sinapses inibitórias (Baccei e Fitzgerald, 2004).

Em ratos, os opióides têm importante papel na transmissão da dor. Atuam no controle inibitório descendente do tronco sobre a medula espinhal e reduzem a atividade resultante da ativação das fibras C e A δ na substância gelatinosa.

Embora a maior parte dos receptores opióides no adulto seja de tipos mu e delta, no início do período pós-natal, em P6, os receptores mu e kappa predominam (Marsh *et al.* 1997). Embora anatomicamente intacto no nascimento, não existe controle descendente até os dias P10-P12, e os níveis de controle semelhantes aos do adulto são atingidos somente entre os dias P22-P24 (Marsh *et al.* 1997).

1.7. Dores agudas em pediatria

Neonatos, bebês e crianças são freqüentemente expostos a estímulos nocivos repetidos, incluindo vacinações e cirurgias (Ririe, 2003). No entanto, dores decorrentes de procedimentos invasivos realizados em unidades de cuidado intensivo, de doenças ou traumas e dores pós-operatórias ainda são inadequadamente tratadas em bebês e crianças. Quando são prescritos analgésicos, existem poucos dados sobre sua eficácia ou efetividade (Pattinson e Fitzgerald, 2004). Em trabalho recente (Stamer *et al.*, 2005) foi demonstrado que na Alemanha, país bastante desenvolvido, até hoje o manejo da dor em pediatria não atingiu os critérios e padrões observados para tratamento de dor em adultos. Os autores sugerem que educação médica continuada, principalmente no que tange à técnicas anestésicas e de medidas de dor, seria de vital importância. Paralelamente, pouco se conhece sobre a modulação de dores agudas, como as observadas em período pós-operatório, em crianças ou em animais jovens.

Vários fatores dificultam a avaliação da dor em pacientes pediátricos, como sua limitada habilidade em entender as questões relativas a essa queixa, o vocabulário reduzido, a pequena experiência prévia de dor, as limitadas

expressões comportamentais em crianças muito jovens e a limitada pesquisa relacionada à fisiologia da dor e ao comportamento em pacientes pediátricos.

O desenvolvimento da percepção da dor pode ser artificialmente dividido em dois estágios: (1) desenvolvimento fisiológico do sistema relacionado à dor durante o período neonatal e a infância e (2) desenvolvimento de aspectos psicológicos da dor durante a infância, infância tardia e adolescência (Berde *et al.*, 1989).

Dificuldades técnicas de modelagem experimental e de aferição de dor geraram o estabelecimento de crenças em relação às experiências dolorosas vivenciadas pelas crianças, tais como as de que (Berde *et al.*, 1989):

- recém-nascidos e lactentes não têm dor, devido à imaturidade do sistema nervoso (mielinização incompleta, imaturidade do córtex cerebral, sinaptogênese incompleta das vias envolvidas com a sensação dolorosa);
- recém-nascidos e lactentes não apresentam memória da dor;
- recém-nascidos e lactentes até experimentam dor, porém esta manifestação não é deletéria para o seu organismo;
- mesmo que experimentem dor e esta leve a danos orgânicos, é muito perigoso administrar agentes anestésicos ou analgésicos nessa faixa etária.

Hoje, cada vez mais esses conceitos têm sido contestados, uma vez que um grande corpo de evidências aponta em sentido contrário ao que se pensava até então (revisado por Fitzgerald e Beggs, 2001). As alterações fisiológicas determinadas por dores não tratadas podem ser, sim, deletérias para as crianças e adolescentes (Berardi *et al.*, 2000), e há meios seguros disponíveis para prover

anestesia e analgesia adequadas para esses pacientes (Berde, 1998). Além disso, tem sido relatado que pacientes submetidos a cirurgias no início da vida apresentam mais dor pós-operatória quando estão na faixa etária entre 7 e 13 anos, em comparação com crianças submetidas a cirurgias na mesma faixa etária, mas que não foram operadas quando bebês (Caumo, 2000; Caumo *et al.*, submetido a *Journal Clinical of Pain*). Em um outro estudo (Peters *et al.*, 2005) foi demonstrado que bebês operados até os três meses de idade e que sofreram cirurgia subsequente no mesmo dermatomo até os três anos de idade precisaram de mais fentanil intraoperatório, mais morfina no pós-operatório e tiveram maior concentração de norepinefrina plasmática que crianças da mesma idade que estavam sendo operadas pela primeira vez, e crianças com cirurgia subsequente, porém em outro dermatomo necessitaram de mais morfina em relação aquelas da mesma idade sofrendo cirurgia pela primeira vez. Esse efeito da cirurgia no início do desenvolvimento pode ser decorrente de sensibilização central (Eich *et al.*, 1985) ou formação de LTP no corno dorsal da medula espinhal (Pockett, 1995; Woolf, 1996), bem como de imaturidade dos sistemas e vias inibitórias da dor, sugerindo que ocorram mudanças espinhais e supra-espinhais de longa duração em consequência da exposição à cirurgia.

Assim, o estudo da dor em pediatria permanece um campo relativamente inexplorado clínica e experimentalmente. Pouco é conhecido sobre a experiência da dor em crianças. Um dos motivos é a limitada pesquisa em área básica direcionada para essa faixa etária que forneça suporte sobre os reais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor e sua modulação em tenra idade.

1.8 HIPÓTESE DE TRABALHO

- Considerando que a exposição à dor pós-operatória pode promover alterações de longa duração em animais de menor faixa etária, investigou-se o efeito da mesma em ratos de 21 dias de idade sobre a nocicepção, a locomoção, a resposta inflamatória e a analgesia opióide.
- Considerando que existem evidências de que animais submetidos à dor pós-operatória em menor faixa etária podem apresentar diferente comportamento em resposta à cirurgia posterior, investigou-se o efeito de uma segunda exposição à cirurgia.
- Considerando que estimulação nociva pode evocar sistemas de modulação da dor, investigou-se o papel desses sistemas na dor pós-operatória.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Essa tese teve como objetivo realizar estudos sobre modulação da dor, analgesia pós-operatória, resposta inflamatória e locomoção em modelo animal, envolvendo ratos em idade correlacionável com a infância em seres humanos. Pela facilidade técnica e resultados prévios, foi selecionado e adaptado o modelo de dor pós-operatória descrito por Brennan e colaboradores (Brennan *et al.*, 1996) para emprego na presente tese de Doutorado.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a resposta nociceptiva em animais de 21 dias de idade submetidos à cirurgia, por meio das medidas de latência de retirada da cauda, obtidas imediatamente antes (basal), trinta, sessenta e noventa minutos após o procedimento cirúrgico.
- Avaliar o efeito da exposição à cirurgia sobre a locomoção dos animais em campo aberto.
- Avaliar a resposta inflamatória à injeção de formalina no membro posterior não-operado, três dias após a cirurgia.
- Avaliar o efeito de uma segunda exposição à cirurgia em animais com 45 dias de idade, por meio das medidas de latência de retirada da cauda, obtidas imediatamente antes (basal) e trinta minutos após o procedimento cirúrgico.

- Avaliar o efeito da segunda cirurgia sobre a locomoção dos animais em campo aberto.
- Avaliar o efeito da administração imediatamente após a cirurgia de agonista opióide – morfina – sobre a resposta nociceptiva de animais de 21 dias de idade, por meio da medida de latência de retirada da cauda, obtidas imediatamente antes (basal), trinta, sessenta e noventa minutos após o procedimento cirúrgico.
- Avaliar o efeito da administração prolongada (por 7 dias, a contar do dia da cirurgia) de morfina sobre a resposta nociceptiva imediatamente antes (basal), trinta, sessenta e noventa minutos após a injeção no sétimo dia de tratamento nos animais do experimento anterior.
- Avaliar o efeito da administração de morfina sessenta dias após a cirurgia por meio da medida de latência de retirada da cauda obtidas imediatamente antes (basal), trinta e sessenta minutos após a injeção.
- Avaliar o efeito da administração, 30 minutos antes da cirurgia, de antagonista opióide - naloxona - e antagonista GABAérgico – picrotoxina – sobre a resposta nociceptiva de animais de 21 dias de idade, por meio da medida de latência de retirada da cauda, obtidas imediatamente antes (basal), trinta e sessenta minutos após a cirurgia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar (machos n=266, fêmeas n=275) com idade de 21 dias ao início do experimento, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Eles foram alocados em grupos de cinco animais por caixa-moradia, confeccionadas em *plexiglass*, medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de serragem. Foram submetidos a ciclo normal claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 7 às 19 h), a temperatura ambiente ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com livre acesso a ração padronizada e água.

Foi escolhida a idade de 21 dias devido ao fato de, neste momento, os ratos apresentarem desenvolvimento neurológico similar ao de uma criança de um ano de idade (Fitzgerald e Anand, 1993), sendo considerados como estando ainda em estado fisiológico imaturo (Pattinson e Fitzgerald, 2004).

3.1.1. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos:

- (1) controle total, não submetido a qualquer manipulação (CONTROLE);
- (2) controle submetido somente à anestesia com halotano (ANESTESIA);
- (3) submetido a anestesia com halotano e posterior cirurgia (CIRURGIA).

3.2. Procedimentos anestésico e cirúrgico

Os animais dos grupos CIRURGIA e ANESTESIA foram inicialmente anestesiados com halotano a 2% (Brennan *et al.*, 1996) (Halothano[®], Laboratório

Cristália) liberado por meio de cone nasal. Após a perda de reflexo de endireitamento, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, e a anestesia foi mantida com halotano a 2%, liberado por meio de cone nasal.

Os animais do grupo ANESTESIA foram anestesiados por 2 min, sem sofrer qualquer manipulação adicional. Esse era o tempo suficiente para que pudesse ser verificado efeito anestésico do halotano. O efeito anestésico foi constatado pela perda dos reflexos de endireitamento e de retirada do membro posterior. Após, foram colocados em caixas-moradia específicas, durante o período de recuperação pós-anestésica. Quando se observaram recuperação do reflexo de endireitamento e comportamento de locomoção dentro da caixa, os animais foram transferidos para suas caixas-moradia originais. Esse grupo foi retirado dos experimentos com antagonistas porque apresentou o mesmo comportamento que os animais do grupo controle, como será apresentado nos resultados dessa tese.

Os animais do grupo CIRURGIA foram submetidos ao modelo de cirurgia experimental proposto. Para tal, foi utilizado o modelo de Brennan (Brennan *et al.*, 1996), com modificações, já que este foi originalmente estudado em ratos adultos. Assim, depois da indução da anestesia, a pele glabra da superfície plantar do membro posterior direito do animal foi preparada com iodo povidine. Uma incisão de 0,5 cm foi feita com lâmina de bisturi número 15, através de pele, fáscia e músculo, iniciando a 0,5 cm do calcanhar e se estendendo em direção aos dedos. A seguir, a incisão foi suturada com fio de sutura de *Nylon* 5.0, acoplado a agulha AT 20 mm (Med-Goldman®). Nitrofurazona líquida (Furanew Spray®, Vetnil) foi aplicada nesse local. Após a cirurgia, os animais foram colocados em caixas-

moradia específicas, durante o período de recuperação pós-anestésica. Quando se observaram recuperação do reflexo de endireitamento e comportamento de locomoção dentro da caixa, os animais foram transferidos para suas caixas-moradia originais. A sutura foi removida 24 h após a cirurgia. O tempo total de duração da cirurgia foi de 3 minutos.

Após a realização da anestesia, cada animal do grupo CIRURGIA recebeu injeção única da associação de penicilina G procaína e penicilina G cristalina (Despasilina® 400.000 UI, Bristol-Myers Squibb), por via intramuscular, com o objetivo de prevenir infecção pós-operatória.

3.3. Medida de latência de retirada da cauda

A resposta nociceptiva foi avaliada por meio do aparelho de *tail-flick*, conforme técnica descrita por D'Amour e Smith (1941). Os animais foram contidos, utilizando-se toalha de pano, e colocados no aparelho, com a cauda imobilizada sobre uma fenda delimitada por duas chapas de metal. Uma fonte de luz fixa foi posicionada 2-3 cm rostral à ponta da cauda de cada animal. O acionamento da fonte luminosa disparava automaticamente um cronômetro digital. A deflexão da cauda, motivada pelo calor irradiado pela lâmpada, desobstruía o feixe de luz, ativando uma fotocélula, o que, por sua vez, encerrava automaticamente a contagem do tempo no cronômetro do aparelho. A intensidade da luz foi ajustada para que se obtivessem medidas basais de 4 a 5 s (0,8 mA). Tempo limite (teto) de 10 s foi utilizado, para prevenir dano tecidual (D'Amour e Smith, 1941; Siegfried *et al*, 1987; Netto *et al*, 1987).

A latência para retirada da cauda representa o período de tempo (em segundos) que se estendeu desde o início da contagem até a deflexão da cauda. Os animais foram expostos três vezes ao aparato a cada medida, sendo que a medida final é a média das três exposições

Vinte e quatro horas antes da medida basal, os animais foram expostos ao aparelho de *tail-flick*, para se familiarizar com o procedimento, uma vez que a novidade pode induzir antinocicepção (Netto *et al*, 1987).

Optou-se pela realização desse teste por mostrar ativação supra-espinhal (Tseng e Tang, 1990) e ser capaz de expressar respostas analgésicas sistêmicas (Cepeda *et al*, 2004)

3.4. Avaliação da locomoção em campo aberto

Foi realizada em uma caixa de madeira envernizada, medindo 50 x 60 x 40 cm, com a face anterior de vidro e o assoalho recoberto com linóleo, dividido em 12 retângulos de 15,0 x 13,3 cm, com linhas escuras. O animal foi gentilmente colocado no canto posterior esquerdo da caixa e deixado livre para explorar o ambiente por 5 min (Bianchin *et al.*, 1993). Foram avaliados o número de cruzamentos como medida de atividade locomotora. A medida da latência para saída do primeiro quadrado foi tomada como uma medida de ansiedade (Lister, 1990; Britton e Britton, 1981). A atividade locomotora será considerada uma medida nociceptiva.

3.5. Avaliação da resposta inflamatória

A injeção de formalina 1,25% (Tai *et al.*, 2006) subcutânea foi feita no membro posterior esquerdo na superfície plantar no volume de 50 μ l. Foi demonstrado que essa concentração evoca o comportamento bifásico, em que na primeira fase ocorre ativação das fibras C e A δ (fase neuropática, até 5 minutos após a injeção), seguida por uma fase silente (5-15 minutos após a injeção), onde o animal não apresenta comportamento nociceptivo, e pela segunda fase quando ocorre a reação inflamatória no tecido periférico (fase neurogênica, 15-30 minutos após a injeção). Os comportamentos observados foram lambidas no membro posterior, pulos, membro posterior levantado e sacudidas do membro posterior. Foi cronometrado o tempo gasto pelo animal realizando esses comportamentos e esse tempo foi considerado medida nociceptiva. Foi escolhida a concentração mais baixa (1,25%) em detrimento da concentração de 5%, que é utilizada em experimentos com animais adultos, em função da idade dos animais empregados e de seu menor tamanho em relação a animais adultos. Optou-se por fazer o teste utilizando o membro posterior não-operado para que, se houvesse efeito da cirurgia sobre a resposta inflamatória, essa não fosse mascarada pelo processo inflamatório decorrente da própria cirurgia.

3.6. Tratamentos farmacológicos

Foram administradas as soluções descritas a seguir

(1) Tiopental sódico (Thiopental®, Laboratório Cristália, diluído em solução salina 0,9%) na dose de 35 mg/Kg, administrado via i.p.

(2) Halotano (Halothano®, Laboratório Cristália) liberado por cone nasal na dose de 2% (Brennan *et al.*, 1996).

(3) Solução salina (NaCl 0,9%).

(4) Sulfato de morfina (Dimorf 10 mg/mL do laboratório Cristália, diluído em solução salina 0,9%) nas doses de 2,5 mg/Kg, 5,0 mg/Kg e 7,5 mg/Kg administrado via i.p.

(5) Naloxona (cloridrato de naloxona, Narcan 0,4 mg/mL do laboratório Cristália, diluído em solução salina 0,9%) na dose de 1 mg/Kg administrada via i.p. 30 minutos antes da cirurgia.

(6) Picrotoxina (pó, Picrotoxin® do laboratório Sigma, diluído em solução salina 0,9%), na dose de 1 mg/Kg administrada via i.p. 30 minuto antes da cirurgia.

(7) Formalina 1,25%, diluída em solução salina 0,9%, administrada intraplantar no volume de 50 µl, três dias após a cirurgia

As soluções foram preparadas de modo a injetar-se um volume de 1 ml/kg por animal, por via i.p., exceto a formalina que foi administrada intraplantar em volume de 50 µl. Foi utilizada solução salina para a diluição dos fármacos, de modo a se obter a concentração desejada.

As doses empregadas tiveram por base estudos prévios da literatura (D'Amato *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2005; Godlevskii e Kobolev, 2005, Tai *et al.*, 2006).

3.7. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. ANOVA de Uma Via foi realizada, para sexo, grupo nas medidas basais de TFL, para o teste da formalina e a exposição ao campo aberto, seguida de teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. Para a comparação do TFL nos diferentes tempos de medição foi realizada ANOVA de Medidas Repetidas seguida de teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls para os grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes se $P < 0,05$.

3.8. Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a legislação vigente no Brasil, Lei 6.638 (Diário Oficial da União - 08/05/1979), que estabelece normas para práticas didático-científicas da vivisseção de animais, assim como regulamenta o registro dos Biotérios e Centros de Experimentação.

Todos os procedimentos operacionais realizados foram embasados no *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* - ILAR/EUA (1996) e no Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA/Brasil, 1996), estando em acordo com *Ethical Guideline for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals*, como indicado por *International Association for the Study of Pain* (IASP). Tais procedimentos são de uso habitual por pesquisadores que trabalham e publicam na área e obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for*

International Organizations of Medical Sciences - CIOMS) (Goldim e Raymundo, 1997).

Todos os procedimentos foram planejados para minimizar dor e desconforto.

O projeto de Tese foi previamente aprovado pela Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.9. Desenhos experimentais

3.9.1. Experimento 1: Escolha e padronização do procedimento anestésico

O objetivo desse experimento foi determinar qual o procedimento anestésico mais adequado para realização dos estudos propostos nessa tese. Para tanto utilizou-se a comparação entre dois anestésico gerais - tiopental sódico (Thiopental®, Laboratório Cristália), administrado via i.p. e o anestésico inalatório halotano.

No experimento com tiopental sódico, os animais foram divididos em dois grupos, grupo controle (CONT, n=19) e grupo tiopental (TIOP, n=18). Os animais do grupo controle não foram submetidos a nenhum tipo de manipulação, a não ser o teste de latência de retirada da cauda (TFL). Os animais do grupo tiopental foram submetidos à anestesia geral por meio de injeção intraperitoneal do fármaco na concentração de 35 mg/Kg. Após, foram colocados em caixas-moradia específicas, durante o período de recuperação pós-anestésica. O efeito anestésico foi constatado pela perda dos reflexos de endireitamento e de retirada do membro posterior. Quando se observaram recuperação do reflexo de endireitamento e comportamento de locomoção dentro da caixa, os animais foram transferidos para

suas caixas-moradia originais. Para verificar a nocicepção os animais foram habituados ao aparato de TFL no dia anterior ao experimento. No dia do experimento foram tomadas medidas basais e, depois, durante as sete semanas seguintes, uma vez por semana, tendo o cuidado de habituar os animais ao aparato no dia anterior ao da medida.

Para o experimento com halotano, os animais foram divididos em dois grupos, grupo controle (CONT, n= 9) e grupo halotano (HALT, n=10). Os animais do grupo controle não foram submetidos a nenhum tipo de manipulação, a não ser o TFL. Os animais do grupo halotano foram anestesiados com halotano a 2% (Halothano®, Laboratório Cristália) liberado por meio de cone nasal por 2 min. Após, foram colocados em caixas-moradia específicas, durante o período de recuperação pós-anestésica. O efeito anestésico foi constatado pela perda dos reflexos de endireitamento e de retirada do membro posterior. Quando se observaram recuperação do reflexo de endireitamento e comportamento de locomoção dentro da caixa, os animais foram transferidos para suas caixas-moradia originais. Para verificar a nocicepção os animais foram habituados ao aparato de TFL no dia anterior ao experimento, no dia do experimento foram tomadas medidas basais, trinta, sessenta e noventa minutos após a anestesia, uma vez que os animais se recuperavam rapidamente desse procedimento anestésico, e nas quatro semanas seguintes, uma vez que os resultados observados com o tiopental mostraram diferenças entre os grupos nas primeiras quatro semanas após a realização do procedimento anestésico.

3.9.2. Experimento 2: Efeito da manipulação cirúrgica sobre a medida de TFL de ratos juvenis

O objetivo desse experimento foi avaliar a resposta nociceptiva em animais de 21 dias de idade, submetidos a procedimento cirúrgico, por meio das medidas de latência de retirada da cauda (TFL) imediatamente antes (basal) da cirurgia, trinta, sessenta e noventa minutos após a cirurgia. Para tal, os animais foram alocados nos três grupos experimentais (CONTROLE n=8, ANESTESIA n=8, CIRURGIA n=9). Os mesmos foram habituados ao aparato de TFL 24 horas antes do experimento para evitar o efeito da exposição à novidade. No dia do experimento foram tomadas medidas basais de TFL de todos os animais, e a anestesia e a cirurgia foram realizadas em seguida, conforme descrito anteriormente, de acordo com os grupos experimentais. Foram tomadas medidas de TFL trinta, sessenta e noventa minutos após a cirurgia. Isto permitiu verificar a eficiência dos sistemas de modulação de dor nestes animais.

3.9.3. Experimento 3: Estudo do efeito da administração de três diferentes doses de morfina imediatamente após a cirurgia na nocicepção de ratos juvenis

Esse experimento teve como objetivo avaliar o efeito da administração de agonista opióide - morfina, sobre a resposta nociceptiva de animais de 21 dias de idade, submetidos a procedimento cirúrgico, por meio da medida de TFL imediatamente antes (basal), trinta, sessenta e noventa minutos após a cirurgia. Para tal, os animais foram alocados nos três grupos experimentais (CONTROLE n=46, ANESTESIA n=70, CIRURGIA n=63). Os mesmos foram habituados ao

aparato de TFL 24 horas antes do experimento para evitar o efeito da exposição à novidade. No dia do experimento foram tomadas medidas basais de TFL de todos os animais e a anestesia e a cirurgia foram realizadas em seguida, conforme descrito anteriormente, de acordo com os grupos experimentais. Imediatamente após a cirurgia foi administrado via i.p. solução salina ou morfina nas doses de 2,5 mg/Kg, 5,0 mg/Kg ou 7,5 mg/Kg para os animais dos três grupos experimentais. Foram tomadas medidas de TFL trinta, sessenta e noventa minutos após a cirurgia. Isso permitiu verificar se ratos de 21 dias respondem a administração de agonista opióide com analgesia e se existe diferença entre as doses administradas.

3.9.4. Experimento 4: Estudo do efeito da administração de morfina por sete dias sobre a nocicepção de ratos juvenis submetidos a modelo de cirurgia.

Esse experimento teve como objetivo avaliar o efeito da administração prolongada (por 7 dias) de morfina, sobre a resposta nociceptiva de animais de 21 dias de idade, submetidos a procedimento cirúrgico, por meio das medidas de TFL imediatamente antes (basal), trinta, sessenta e noventa minutos após a cirurgia e no sétimo dia de administração do fármaco, imediatamente antes (basal), trinta, sessenta e noventa minutos após a injeção. Para tal, foram utilizados os animais do experimento anterior, alocados nos três grupos experimentais (CONTROLE n=46, ANESTESIA n=70, CIRURGIA n=63). Os mesmos foram habituados ao aparato de TFL 24 horas antes do experimento para evitar o efeito da exposição à novidade. No dia do experimento foram tomadas medidas basais de TFL de todos os animais e a anestesia e a cirurgia foram realizadas em seguida, conforme

descrito anteriormente, de acordo com os grupos experimentais. Imediatamente após a cirurgia foi administrado via i.p. solução salina ou morfina, nas doses de 2,5 mg/Kg, 5,0 mg/Kg ou 7,5 mg/Kg nos animais dos três grupos experimentais. Foram tomadas medidas de TFL trinta, sessenta e noventa minutos após a cirurgia. Nos dias seguintes, até o sétimo dia, os animais dos três diferentes grupos experimentais receberam solução salina ou as doses de morfina, via i.p, acima descritas. No sexto dia os animais foram novamente habituados ao aparato de medida de TFL. No sétimo dia foram tomadas medidas basais de todos os animais, trinta e sessenta minutos após a administração do fármaco. Com isso foi possível verificar se animais nessa idade submetidos à cirurgia desenvolvem tolerância à morfina decorrente do uso prolongado do fármaco.

3.9.5. Experimento 5: Efeito da administração de morfina sobre a nocicepção 60 dias após a cirurgia

Esse experimento teve como objetivo avaliar o efeito da administração de agonista opióide - morfina, 60 dias após a cirurgia em animais submetidos ao modelo de dor pós-operatória, para verificar se havia alguma alteração de longa duração produzida pela cirurgia na analgesia opióide. Para tal, os animais foram alocados nos três grupos experimentais (CONTROLE n=14, ANESTESIA n=13, CIRURGIA n=16). Os mesmos foram habituados ao aparato de TFL 24 horas antes do experimento para evitar o efeito da exposição à novidade. No dia do experimento foram tomadas medidas basais de TFL de todos os animais, e a anestesia e a cirurgia foram realizadas em seguida, conforme descrito anteriormente, de acordo com os grupos experimentais. Foram tomadas medidas

de TFL trinta, sessenta e noventa minutos após a cirurgia. Sessenta dias após a cirurgia os animais receberam solução salina ou morfina (5 mg/Kg) via i.p. medidas basais (antes da administração do fármaco) de TFL foram tomadas e 30 e 60 minutos após a administração. Os animais foram habituados ao aparato no dia anterior para evitar efeito da exposição à novidade.

3.9.6. Experimento 6: Estudo do efeito da naloxona e da picrotoxina previamente à cirurgia sobre a nocicepção de ratos juvenis

Esse experimento teve como objetivo avaliar o efeito da administração de antagonista opióide - naloxona - e antagonista GABAérgico - picrotoxina, sobre a resposta nociceptiva de animais de 21 dias de idade, submetidos a procedimento cirúrgico, por meio da medida de TFL imediatamente antes (basal), trinta e sessenta minutos após a cirurgia. Para tal, os animais foram alocados em dois grupos experimentais (CONTROLE n=41, CIRURGIA n= 41, para naloxona; CONTROLE n=14, CIRURGIA n=16, para picrotoxina). Os mesmos foram habituados ao aparato de TFL 24 horas antes do experimento para evitar o efeito da exposição à novidade. No dia do experimento foram tomadas medidas basais de TFL de todos os animais. Em seguida, os grupos experimentais receberam solução salina ou naloxona, e solução salina ou picrotoxina, que foram administradas via i.p., na dose de 1 mg/Kg, trinta minutos antes da cirurgia. A anestesia e a cirurgia foram realizadas conforme descrito anteriormente no grupo CIRURGIA. Foram tomadas medidas de TFL trinta e sessenta minutos após a cirurgia. Isto permitiu verificar o envolvimento dos sistemas opióides e

GABAérgicos na modulação da dor pós-operatória em ratos de 21 dias submetidos ao procedimento cirúrgico.

3.9.7. Experimento 7: Estudo do efeito da exposição a cirurgia em ratos juvenis sobre a locomoção em campo aberto.

Esse experimento teve como objetivo avaliar a locomoção dos animais submetidos a cirurgia. Os animais dos três grupos experimentais (CONTROLE n=20, CIRURGIA n=20, ANESTESIA n=20) foram colocados no campo aberto 30 minutos após a cirurgia. Foi medido o tempo que o animal levou para sair do primeiro quadrante (latência de saída do primeiro quadrante, em segundos) e o número de cruzamentos que o animal realizou durante 5 minutos. A latência para saída do primeiro quadrante foi utilizada como medida de ansiedade e o número de cruzamentos foi utilizado como medida de nocicepção, uma vez que animais com dor deveriam realizar menor número de cruzamentos que animais sem dor.

3.9.8. Experimento 8: Efeito da exposição prévia a cirurgia sobre a resposta inflamatória produzida pela formalina em ratos juvenis.

Esse experimento teve como objetivo avaliar o efeito da exposição prévia a cirurgia sobre a resposta inflamatória produzida pela formalina em ratos juvenis três dias após a cirurgia. Os animais dos três grupos experimentais (CONTROLE n=15, ANESTESIA n=16, CIRURGIA n=16) receberam injeção intraplantar de 50 µl de solução salina 0,9% ou de formalina 1,25% no membro posterior esquerdo (não-operado) e imediatamente colocados no campo aberto para observação da

resposta inflamatória por 30 minutos. Durante os primeiros 5 minutos foi cronometrado o tempo que o animal utilizou realizando comportamentos específicos em resposta a formalina (primeira fase, conforme descrito acima). Nos 15 minutos finais também foi cronometrado o tempo que o animal utilizou realizando comportamentos específicos em resposta a formalina (segunda fase, conforme descrito acima). Ao final dos 30 minutos de observação o animal foi retirado do campo aberto e o tamanho do edema produzido pela injeção de formalina 1,25% foi medido com paquímetro.

3.9.9. Experimento 9: Efeito de uma segunda manipulação cirúrgica sobre a medida de TFL e locomoção em ratos de 45 dias

O objetivo desse experimento foi verificar a resposta nociceptiva, ao aparelho de medida de latência de retirada da cauda em animais que foram submetidos a cirurgia aos 21 e aos 45 dias de idade e a atividade locomotora dos mesmos. A idade de 45 dias foi escolhida por se tratar de um animal que ainda não atingiu a plena maturidade (Pattinson e Fitzgerald, 2004). Para tal, os animais dos grupos experimentais CONTROLE e CIRURGIA foram divididos nos seguintes grupos CONTROLE/CONTROLE (n=5), que não sofreu nenhum tipo de manipulação exceto as medidas de TFL; CONTROLE/CIRURGIA (n=5) que não foi operado aos 21 dias, mas foi aos 45 dias de idade, CIRURGIA/CONTROLE (n=5) que foi operado aos 21 dias de idade mas não aos 45 dias e CIRURGIA/CIRURGIA (n=6) que foi operado aos 21 e aos 45 dias de idade. Os animais foram habituados ao aparato de medida de latência de retirada da cauda 24 horas antes do experimento. No dia do experimento foram tomadas medidas

basais de TFL (antes da cirurgia) e 30 minutos após a cirurgia. Aos 45 dias de idade os animais foram subdivididos nos grupos acima e operados conforme descrito anteriormente. Foram tomadas medidas de TFL basal (antes da cirurgia) e 30 minutos após a cirurgia. No dia anterior os animais foram habituados ao aparato para evitar efeito da novidade. A cirurgia foi realizada no membro posterior direito, o mesmo da cirurgia aos 21 dias.

Após a aferição do TFL os animais foram expostos ao campo aberto. Foi medido o tempo que o animal levou para sair do primeiro quadrante (latência de saída do primeiro quadrante, em segundos) e o número de cruzamentos que o animal realizou durante 5 minutos.

4. RESULTADOS

4.1. Escolha e padronização do procedimento anestésico

Nesse experimento, animais com 21 dias de idade foram habituados ao aparelho de TFL 24 horas antes do início das medidas. No dia do experimento propriamente dito, foram obtidas as medidas basais de TFL. Logo após, os animais foram expostos a dois diferentes anestésicos gerais – tiopental 35 mg/kg, administrado por via intraperitoneal (i.p.), ou halotano a 2%, administrado por via inalatória, durante dois minutos. O efeito anestésico foi constatado pela perda dos reflexos de endireitamento e de retirada do membro posterior.

Observou-se o tempo de recuperação dos animais submetidos às duas técnicas anestésicas. Para os animais anestesiados com halotano, esse tempo variou de 5 a 10 minutos. Já para o grupo que recebeu tiopental sódico, foi de 2 horas.

Para a avaliação dos efeitos tardios do anestésico administrado por via i.p., foram feitas medidas de TFL nas sete semanas seguintes à administração do fármaco (Figura 1). Não foram obtidas medidas 30, 60 e 90 minutos após o procedimento anestésico, porque os animais demoraram mais tempo para se recuperar.

Não foram observadas diferenças significativas entre TFL basais, na comparação dos grupos CONTROLE (média±EPM: 5,15±0,44) e TIOPENTAL (4,49±0,43) (Teste *t* de Student, $P>0,05$).

Houve diferença entre os grupos na primeira, na segunda e na terceira medidas semanais de TFL após a administração de tiopental ($F=23,22$; ANOVA de

medidas repetidas, seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$). Nas medidas seguintes, não houve diferença entre os grupos. Observaram-se diferença entre os tempos e interação entre tempo x grupo ($F=120,17$ para tempo, $P < 0,05$; $F=5,86$, para interação, $P < 0,05$; ANOVA de medidas repetidas, seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

Detectou-se aqui efeito prolongado sobre a resposta nociceptiva, induzido pela administração intraperitoneal de tiopental. Dados sugerem o estabelecimento de resposta hiperalgésica, que perdurou por, pelo menos, 3 semanas.

Para a avaliação dos efeitos do halotano, foram feitas medidas de TFL 30, 60 e 90 minutos após o procedimento anestésico e nas quatro semanas seguintes (Figura 2). Foi selecionado o tempo de seguimento de 4 semanas por ter sido este o período no qual se observaram efeitos significativos do fármaco no experimento com tiopental.

Não foram observadas diferenças significativas entre TFL basais, na comparação dos grupos CONTROLE (média \pm EPM: $5,28 \pm 0,34$) e HALOTANO ($4,51 \pm 0,43$) (Teste t de Student, $P > 0,05$).

Nas medidas de TFL 30, 60 e 90 min após a administração do fármaco (Figura 2, Painel A), por meio de ANOVA de medidas repetidas, não se observaram diferenças significativas das latências de retirada da cauda entre os grupos, entre os tempos e nem interação grupo x tempo ($F= 0,11$ para grupos, $P > 0,05$; $F=3,16$ para tempo, $P > 0,05$; $F=0,032$ para interação tempo x grupo, $P > 0,05$).

Nas medidas semanais (Figura 2, Painel B), por meio de ANOVA de medidas repetidas, observou-se diferença entre os tempos ($F=48,72$, $P < 0,05$).

Porém, não houve diferença significativa das latências de retirada da cauda entre os grupos ($F=0,000$, $P>0,05$) ou interação grupo x tempo ($F=1,07$, $P>0,05$).

Não houve diferença entre os grupos controle e halotano tanto nas medidas obtidas logo após a anestesia, quanto nas medidas semanais (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls, $P<0,05$).

Com base nesses dados, o anestésico geral inalatório halotano foi escolhido para todos os experimentos realizados nessa tese. Seu emprego permitiu que medidas de TFL fossem tomadas logo após o término do procedimento anestésico, uma vez que os animais estavam recuperados em poucos minutos. Além disso, não houve diferença entre os grupos nas medidas semanais, sugerindo que esse fármaco não interfere com o limiar nociceptivo após o término de sua ação, ao contrário do tiopental.

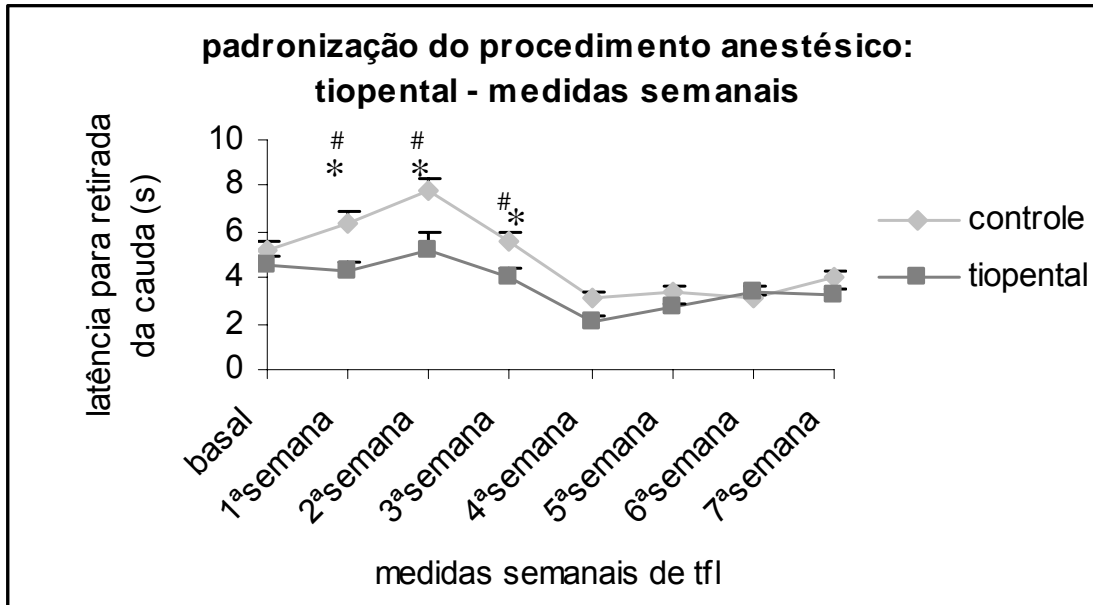
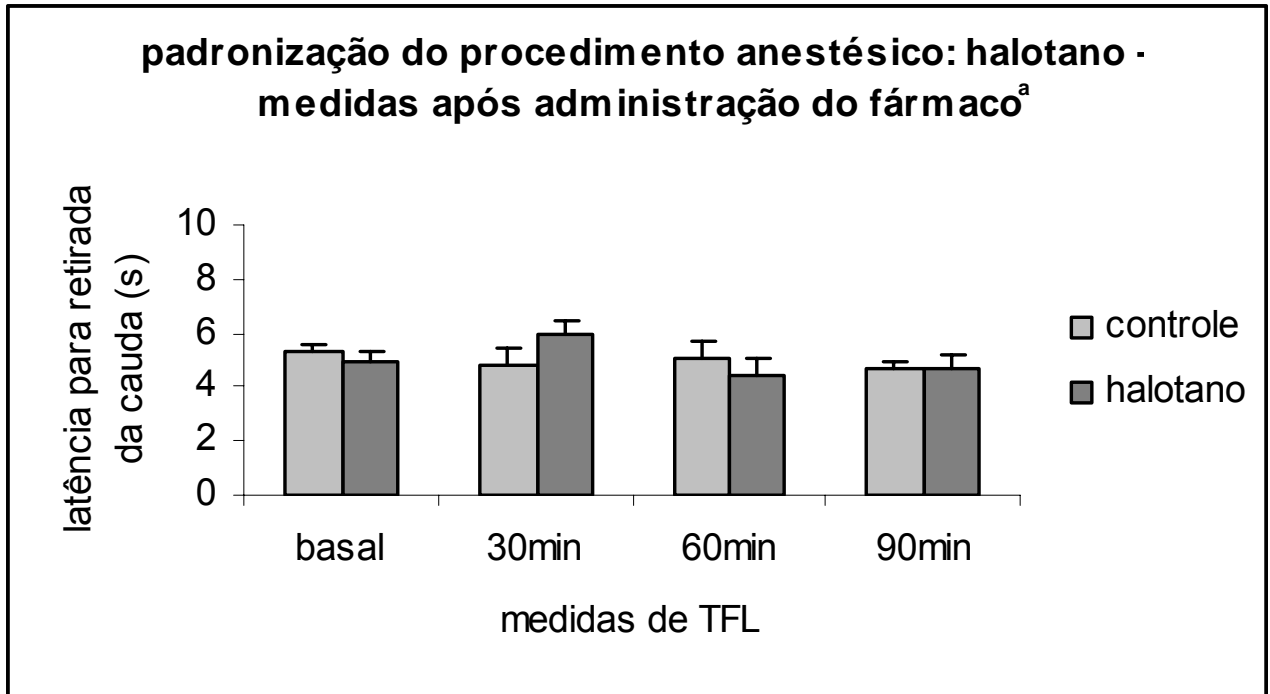


Figura 1: Efeito da administração de anestésico intraperitoneal sobre a resposta nociceptiva em ratos de 21 dias de idade. Latências de retirada da cauda obtidas após a administração, por via i.p., de tiopental sódico (35 mg/kg) (n=18) ou salina (controle) (n=19). Dados expressos como média±EPM.

Diferença significativa de TFL nos tempos assinalados em relação às medidas BASAL, TFL4, TFL5, TFL6 e TFL7 no grupo Tiopental (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

* Diferença significativa entre os grupos nas medidas semanais TFL1, TFL2 e TFL3 (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

A



B

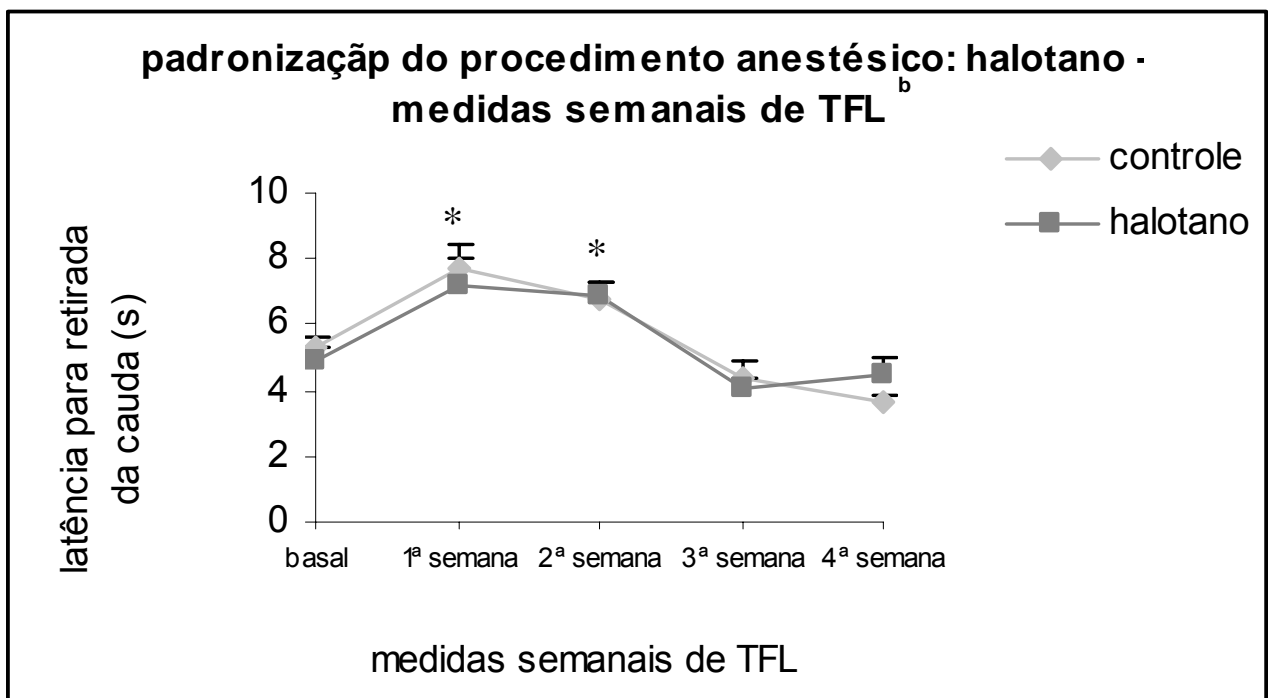


Figura 2: Efeito da administração de anestésico geral inalatório sobre a resposta nociceptiva em ratos de 21 dias de idade. Determinação das latências de retirada da cauda (TFL) após a administração de halotano a 2%, por via inalatória, durante 2 minutos. Dados expressos como média±EPM. Halotano: n=10; controle: n=9.

^a Ausência de diferença entre os grupos, nos diversos tempos avaliados (ANOVA de medidas repetidas; $P>0,05$).

^b Ausência de diferença entre os grupos nas medidas semanais; diferença significativa entre os tempos, em ambos os grupos (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P<0,05$).

* Diferença significativa em relação às medidas BASAL, TFL3 e TFL4 (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P<0,05$).

4.2. Efeito da manipulação cirúrgica sobre a medida de TFL de ratos juvenis.

Os animais dos grupos cirurgia foram anestesiados e operados e os do grupo anestesia foram somente anestesiados. Os animais do grupo controle não sofreram qualquer tipo de manipulação, a não ser aquela relacionada à obtenção das medidas de TFL, conforme descrito em Materiais e Métodos (Item 3.2). Foram obtidas as medidas de TFL basal (antes dos procedimentos), 30, 60 e 90 minutos após a cirurgia.

Não houve diferença entre os grupos na medida basal (média±EPM) – CONTROLE: 5,13±0,40, n=8; ANESTESIA: 4,67±0,36, n=9; CIRURGIA: 5,16±0,51, n=8 (ANOVA de uma via, $F=0,259$; $P>0,05$) (Figura 3). Da mesma forma, não se observou diferença significativa nas latências de retirada da cauda basais, ao se compararem animais de diferentes gêneros (ANOVA de uma via, $F=1,528$; $P>0,05$). Com base nesse resultado, nos experimentos posteriores, dados de machos e fêmeas foram analisados em conjunto.

Ao se compararem TFL obtidas nos diferentes tempos, nos 3 grupos experimentais propostos, por meio de ANOVA de medidas repetidas, observou-se diferença significativa das latências de retirada da cauda entre os grupos, mas não entre os tempos e nem interação grupo x tempo ($F=620,464$ para grupos, $P<0,05$; $F=1,789$ para tempo, $P>0,05$; $F=0,221$ para interação grupos x tempo, $P>0,05$).

Trinta minutos após a manipulação anestésico-cirúrgica, as latências de retirada da cauda do grupo CIRURGIA (média±EPM: 7,84±0,71) foram diferentes daquelas observadas nos grupos CONTROLE (4,13±0,44) e ANESTESIA (4,71±0,39) ($F=620,464$; ANOVA de medidas repetidas, seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $P<0,05$) (Figura 3). Não houve diferença entre os grupos

nas medidas realizadas sessenta e noventa minutos após a cirurgia (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P > 0,05$).

Os resultados desse experimento demonstraram efeito analgésico relacionado à realização de procedimento cirúrgico em animais com 21 dias de vida. Tal resposta apresentou rápido início e curta duração, aparecendo 30 min após a cirurgia e mostrando-se ausente após ter decorrido período de 60 min da mesma.

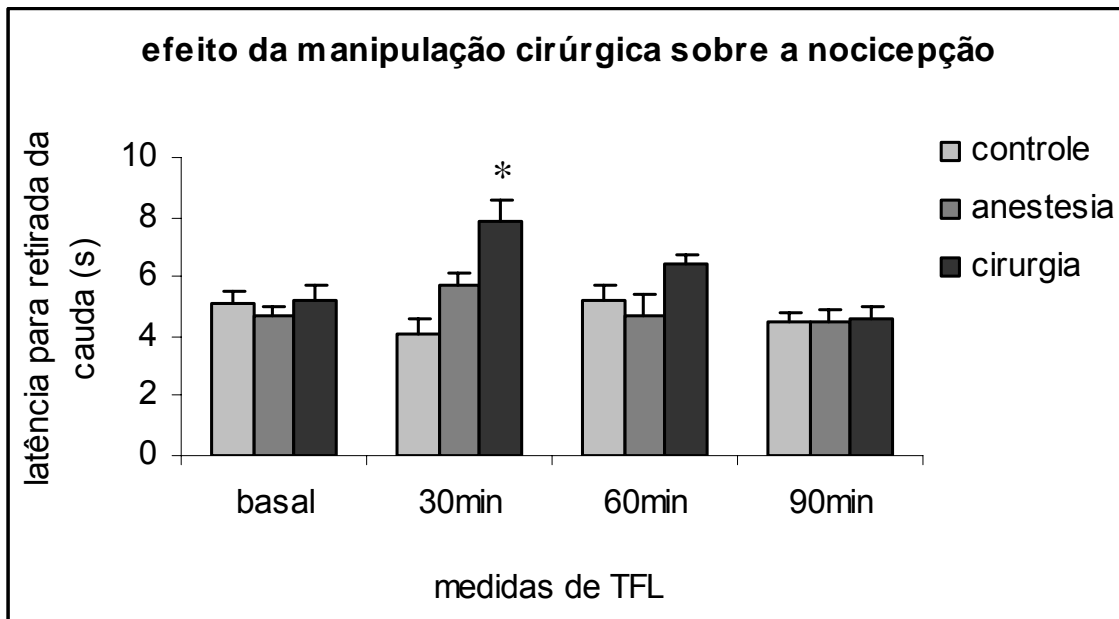


Figura 3: Efeitos de procedimento cirúrgico realizado em ratos de 21 dias de idade sobre a resposta nociceptiva. Latências de retirada da cauda (TFL) obtidas antes (basal), 30, 60 e 90 min após a cirurgia. Dados expressos como média±EPM. Controle: n=14; Anestesia: n=18; Cirurgia: n=16.

* Diferença significativa em relação aos grupos controle e anestesia, no tempo assinalado (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

4.3. Efeito da exposição de ratos juvenis à cirurgia sobre a locomoção em campo aberto.

Os animais do grupo cirurgia foram anestesiados e operados; os do grupo anestesia foram somente anestesiados e os do grupo controle não sofreram qualquer tipo de manipulação, a não ser aquela necessária para a realização das medidas de TFL, conforme descrito em Materiais e Métodos (Item 3.2).

Trinta minutos após a cirurgia, os animais foram colocados no campo aberto para avaliação da atividade locomotora por cinco minutos. Foram medidos latência para saída do primeiro quadrante e número de cruzamentos realizados.

Não houve diferença entre os grupos quanto à latência para saída do primeiro quadrante (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $F=2,35$, $P>0,05$) (Figura 4).

Quanto ao número de cruzamentos, observou-se diferença significativa entre os grupos ($F=6,44$; ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P<0,05$). Animais alocados no grupo CIRURGIA (média±EPM: $43\pm 4,15$ n=20) realizaram menos cruzamentos que os dos grupos CONTROLE ($69,05\pm 6,47$ n=20) e ANESTESIA ($59,50\pm 4,74$ n=20) (Figura 5) (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P<0,05$).

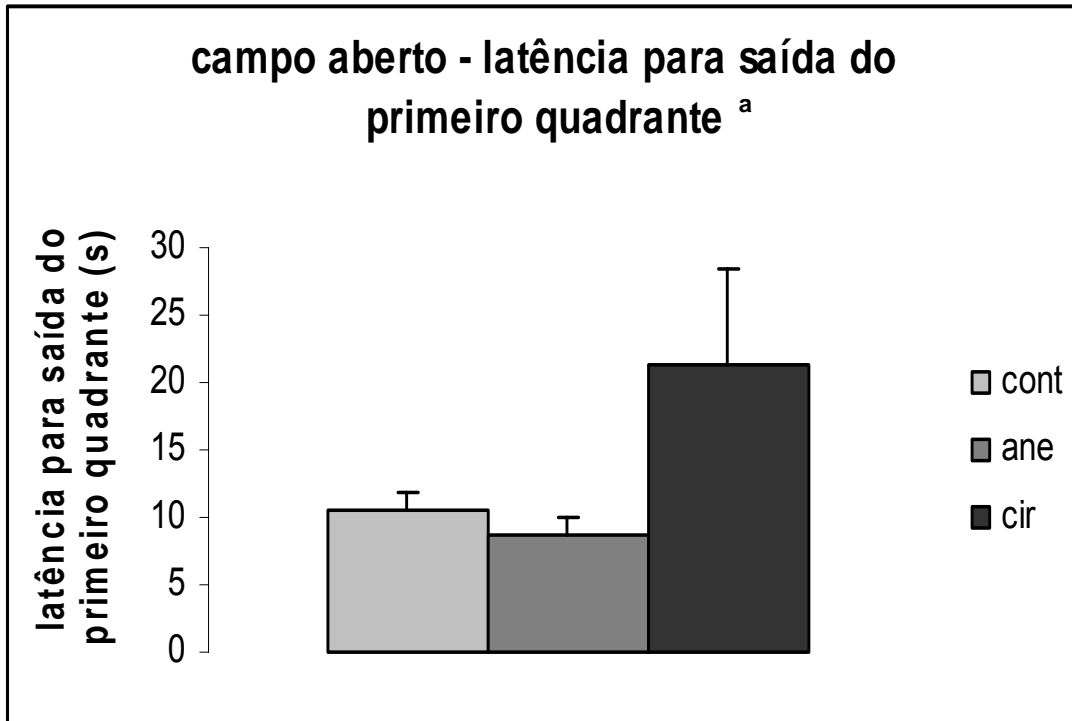


Figura 4: Latência para saída do primeiro quadrante, em campo aberto, de animais de 21 dias, submetidos ou não a procedimentos anestésico e cirúrgico. Dados expressos como média±EPM. Cont: controle (n=20); Ane: anestesia (n=20); Cir: cirurgia (n=20).

^aAusência de diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P>0,05$).

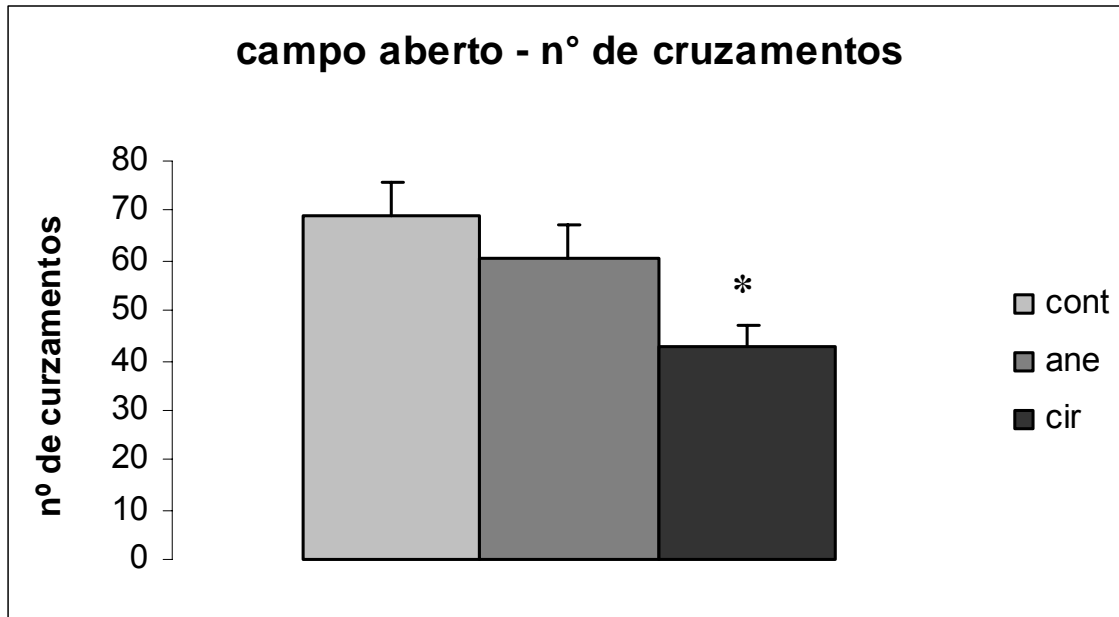


Figura 5: Número de cruzamentos realizados em campo aberto por animais de 21 dias, submetidos ou não a procedimentos anestésico e cirúrgico. Dados expressos como média±EPM. Cont: controle (n=20); Ane: anestesia (n=20); Cir: cirurgia (n=20).

*Diferença significativa em relação aos demais grupos (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

4.4. Efeito da exposição prévia à cirurgia sobre a resposta inflamatória produzida pela formalina em ratos juvenis.

Os animais do grupo cirurgia foram anestesiados e operados; os do grupo anestesia foram somente anestesiados e os do grupo controle não sofreram qualquer tipo de manipulação, a não ser aquela necessária à obtenção das medidas de TFL, conforme descrito em Materiais e Métodos (Item 3.2).

Três dias após, foi feita a administração intraplantar de solução salina ou de formalina a 1,25%. Nessa avaliação, foram observados os comportamentos de lambidas no membro posterior, pulos, levantamento de membro posterior e realização de movimentos de sacudir do membro posterior. Foi cronometrado o tempo (em segundos) gasto pelo animal nesses comportamentos, tanto na primeira fase (5 minutos), quanto na segunda fase (15 minutos), sendo que esses tempos foram considerados como medidas de nocicepção em cada fase.

Por meio de ANOVA de uma via, observou-se diferença significativa entre os grupos quanto à medida de resposta inflamatória, tanto na primeira fase ($F=17,00$; $P<0,05$), como na segunda fase da exposição à formalina ($F=6,73$; $P<0,05$). Também houve diferença no tamanho do edema (em centímetros) produzido pela injeção de formalina, em comparação à injeção de salina ($F=33,08$; $P<0,05$).

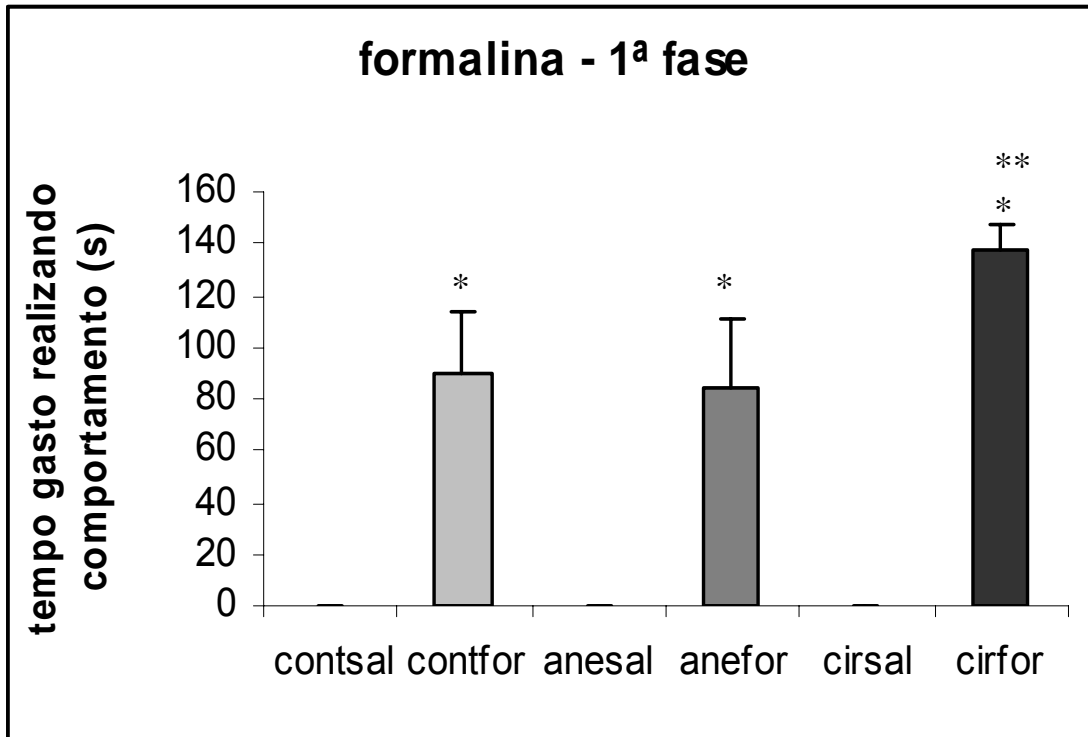
Na primeira fase da resposta inflamatória, houve efeito da formalina em todos os grupos aos quais essa substância foi administrada, em comparação com os grupos que receberam salina (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P<0,05$). O grupo CIRURGIA/FORMALINA (média \pm EPM: $137,87\pm 9,56$ n=8) apresentou maior resposta inflamatória, quando comparado aos

grupos CONTROLE/FORMALINA ($90,42 \pm 23,73$ n=7) e ANESTESIA/FORMALINA ($83,87 \pm 26,63$ n=8) (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$) (Figura 6, painel A).

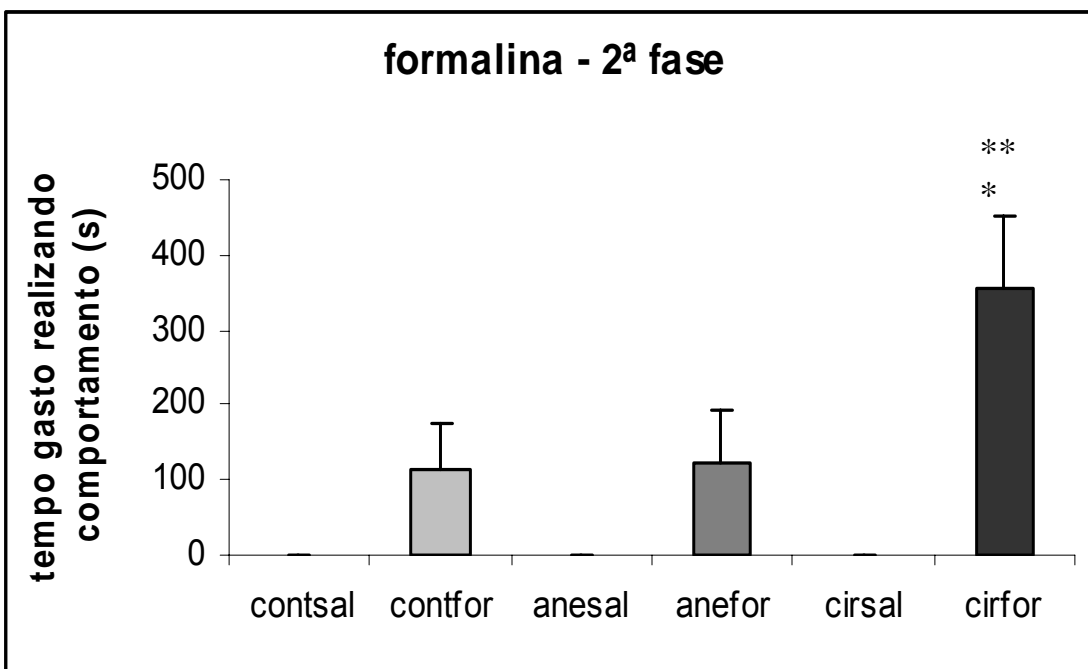
Na segunda fase, o grupo CIRURGIA/FORMALINA (média \pm EPM: $356,62 \pm 93,26$) também apresentou maior resposta inflamatória que os grupos CONTROLE/FORMALINA ($115,28 \pm 62,19$) e ANESTESIA/FORMALINA ($120,87 \pm 72,05$) (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$,) (Figura 6, painel B). Não houve diferença entre os grupos que receberam solução salina e os grupos CONTROLE/FORMALINA e ANESTESIA/FORMALINA (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P > 0,05$).

Tamanho do edema foi significativamente maior em todos os grupos que receberam formalina, em comparação àqueles que receberam salina (ANOVA de uma via seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$) (Figura 6, painel C).

A



B



C

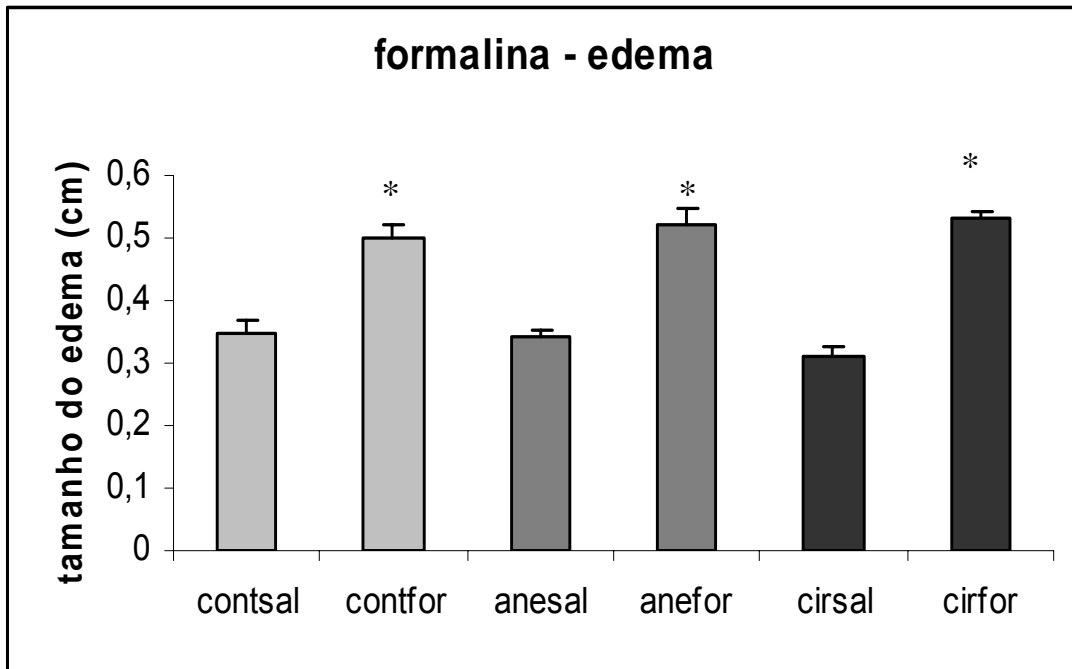


Figura 6: Efeito da exposição prévia à cirurgia sobre a resposta à formalina. Contsal: controle/salina (n=8); Contfor: controle/formalina (n=7); Anesal: anestesia/salina (n=8); Anefor: anestesia/formalina (n=8); Cirsal: cirurgia/salina (n=8); Cirfor: cirurgia/formalina (n=8).

Painel A (Primeira fase da reação inflamatória) e **Painel B** (Segunda fase da reação inflamatória).

*Diferença significativa em relação aos grupos que receberam salina (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

**Diferença significativa em relação aos outros dois grupos que receberam formalina (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

Painel C. Edema.

*Diferença significativa em relação aos grupos que receberam salina (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

4.5. Efeito de uma segunda manipulação cirúrgica sobre a medida de TFL e avaliação da atividade locomotora em campo aberto, em ratos de 45 dias.

Aos 21 dias de idade, os animais do grupo CIRURGIA foram anestesiados e operados, e os do grupo CONTROLE não sofreram qualquer tipo de manipulação, a não ser aquelas necessárias à realização das medidas de TFL, conforme descrito em Materiais e Métodos (Item 3.2). Foram obtidas as medidas de TFL antes (basais) e trinta minutos após essa primeira cirurgia, apenas para confirmar resultados anteriores.

Aos 45 dias de idade, esses animais foram divididos em subgrupos:

- (a) controle total (CONT/CONT), em que os animais não foram submetidos a qualquer manipulação aos 21 e aos 45 dias;
- (b) cirurgia aos 21 dias de vida (CIR/CONT), em que os animais foram submetidos a apenas um procedimento cirúrgico, realizado nessa idade; aos 45 dias, não foram expostos a qualquer manipulação;
- (c) cirurgia aos 45 dias de vida (CONT/CIR), em que os animais foram submetidos à primeira cirurgia nessa idade; aos 21 dias, não foram expostos a qualquer manipulação;
- (d) cirurgias aos 21 e aos 45 dias (CIR/CIR), em que os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico por duas vezes.

Trinta minutos após o último procedimento cirúrgico proposto (de acordo com o grupo considerado), os animais foram expostos, seqüencialmente, ao aparelho de TFL e ao campo aberto.

Na Figura 7, é apresentado desenho experimental referente à realização desses procedimentos.

O grupo ANESTESIA não foi incluído nesse experimento por ter apresentado comportamento similar ao do grupo CONTROLE nos experimentos prévios.

Por meio de ANOVA de medidas repetidas, observou-se diferença significativa das latências de retirada da cauda entre os grupos, entre os tempos e interação grupo x tempo ($F=13,33$ para grupos, $P<0,05$; $F=22,22$ para tempo, $P<0,05$; $F=5,84$ para interação grupos x tempo, $P<0,05$).

Não houve diferença entre os grupos quanto às medidas basais de latência de retirada da cauda (ANOVA de medidas repetidas; $P>0,05$) (Figura 8, painel A).

Aos trinta minutos, foi observada diferença significativa ao se comparar as latências de retirada da cauda dos diferentes grupos avaliados (Figura 8, painel B). Houve aumento de TFL no grupo controle submetido à primeira cirurgia aos 45 dias (CONT/CIR) (média±EPM: $9,92\pm 0,051$ n=5) (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P<0,05$). Esse resultado sugere que realização de procedimento cirúrgico induz efeito analgésico em ratos, independentemente de terem 21 ou 45 dias de idade.

Já no grupo que foi submetido a procedimento cirúrgico por duas vezes, aos 21 e aos 45 dias de idade (CIR/CIR) (média±EPM: $4,63\pm 0,46$ n=6), não foi observada alteração da resposta nociceptiva 30 min após a segunda cirurgia (ANOVA de medidas repetidas; $P>0,05$) (Figura 8, painel B).

Observou-se, ainda, que, no grupo operado apenas aos 21 dias de idade (CIR/CONT média±EPM:5,84±0,84), as medidas de latência de retirada da cauda obtidas posteriormente (aos 45 dias de vida) são similares às do grupo controle total (CONT/CONT 6,33±0,25) (ANOVA de medidas repetidas; $P>0,05$) (Figura 8, painel B).

Quanto ao comportamento no campo aberto, não houve diferença entre os grupos no que se referiu à latência para a saída do primeiro quadrante (ANOVA de uma via; $F=2,69$; $P>0,05$) (Figura 9, painel A). Os grupos CONTROLE/CIRURGIA (40,20±7,55) e CIRURGIA/CIRURGIA (51,14±6,12) mostraram-se diferentes do grupo CONTROLE/CONTROLE, no que se referiu ao número de cruzamentos realizados (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $F=4,65$; $P<0,05$) (Figura 9, painel B).

Os dados sugerem que a realização de cirurgia sempre reduz a atividade locomotora no campo aberto, medida após o procedimento.

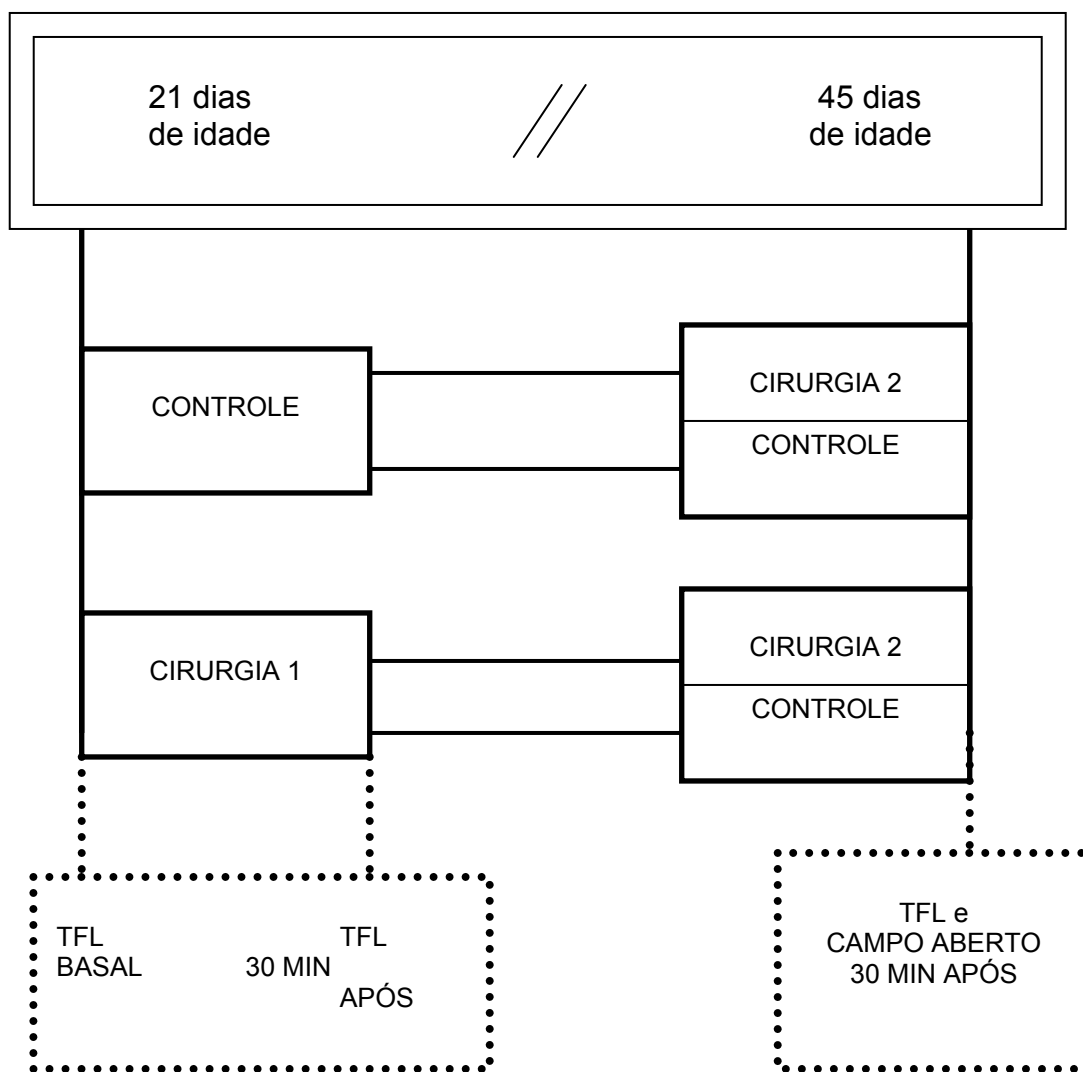
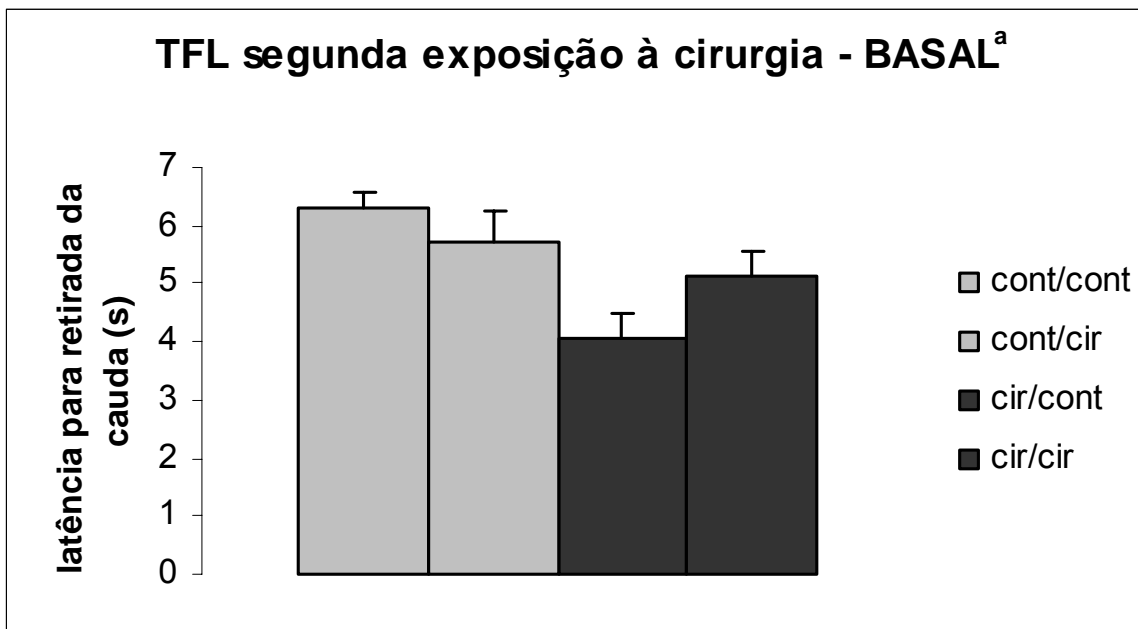


Figura 7. Representação esquemática do experimento em que se avaliou efeito de uma segunda manipulação cirúrgica sobre a medida de latência de retirada da cauda (TFL) e a atividade locomotora em campo aberto.

A



B

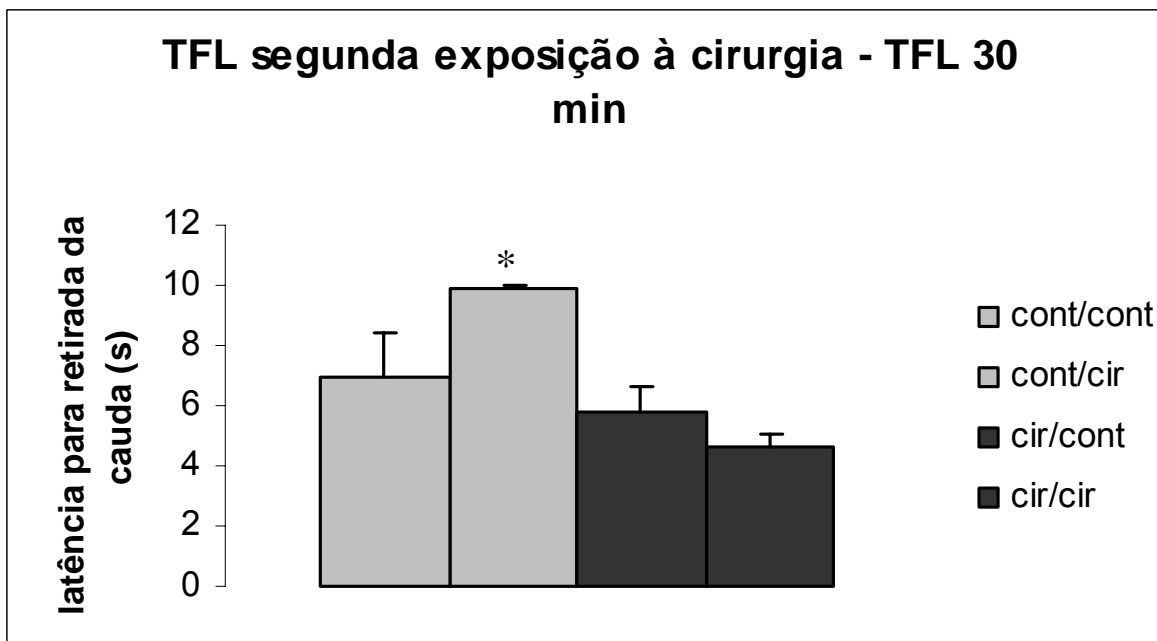


Figura 8: Avaliação da resposta nociceptiva (TFL) em ratos submetidos a procedimentos anestésico-cirúrgicos em dois momentos da vida – aos 21 e aos 45 dias de idade. Latências de retirada da cauda (TFL) obtidas antes (basal) e 30 min após a segunda exposição à cirurgia. Dados expressos como média±EPM. Cont/cont: controle total (n=5); Cont/Cir: cirurgia realizada aos 45 dias de idade (n=5); Cir/Cont: cirurgia realizada aos 21 dias de idade (n=5); Cir/cir: cirurgia realizada por duas vezes, aos 21 e aos 45 dias (n=6).

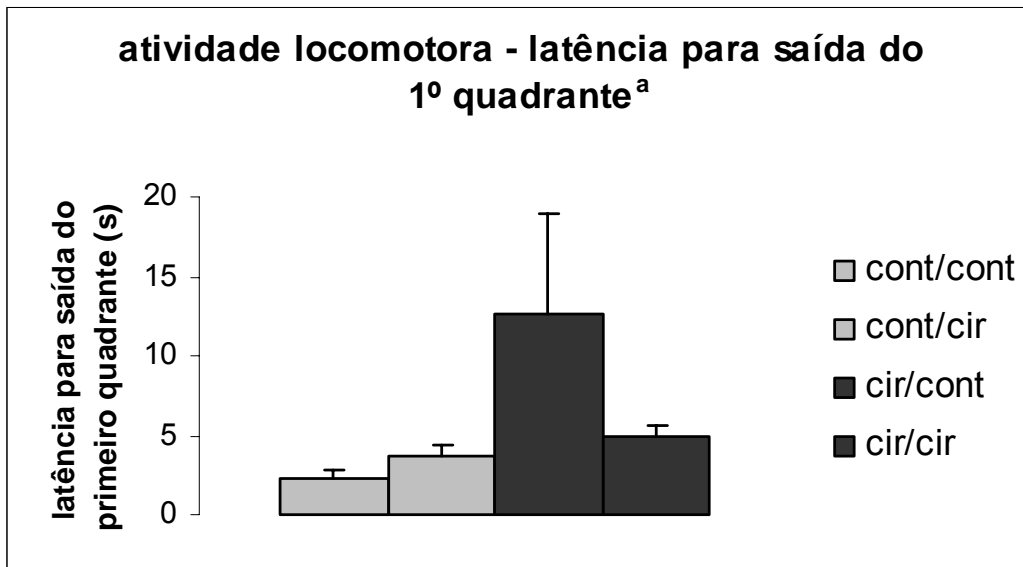
Painel A

^aAusência de diferença entre os grupos (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P>0,05$).

Painel B

*Diferença significativa em relação aos demais grupos (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P<0,05$).

A



B

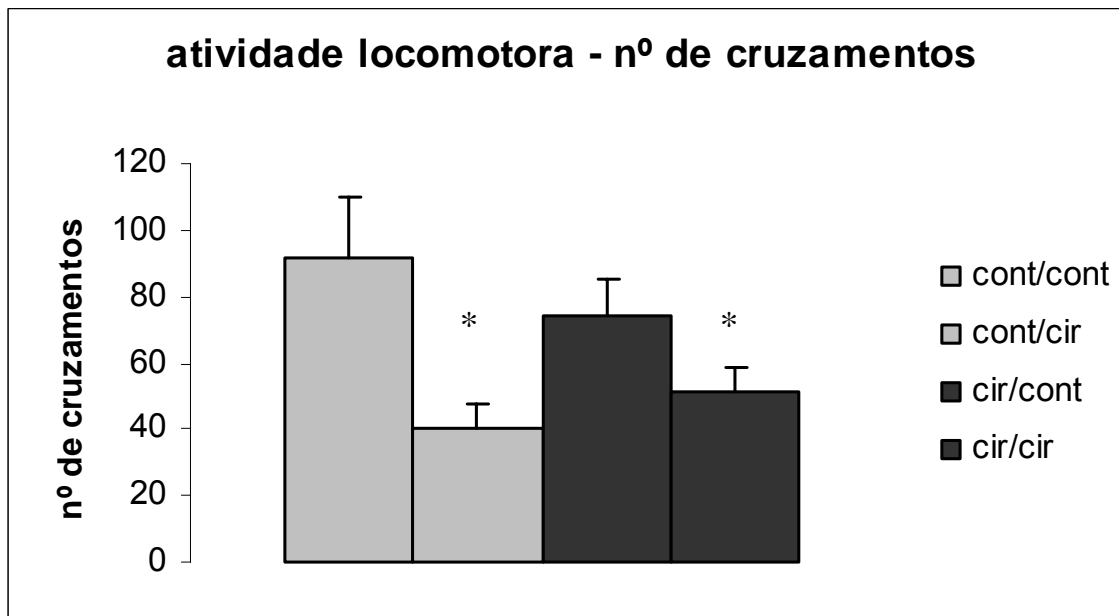


Figura 9: Avaliação da atividade locomotora em campo aberto - latência para saída do primeiro quadrante (Painel A) e número de cruzamentos (Painel B) - em animais submetidos a procedimentos anestésico-cirúrgicos em dois momentos da vida - aos 21 e aos 45 dias de idade. Medidas obtidas após realização da segunda cirurgia. Dados expressos como média±EPM. Cont/cont: controle total (n=5); Cont/Cir: cirurgia realizada aos 45 dias de idade (n=5); Cir/Cont: cirurgia realizada aos 21 dias de idade (n=5); Cir/cir: cirurgia realizada por duas vezes, aos 21 e aos 45 dias (n=5).

Painel A

^aAusência de diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, $P>0,05$).

Painel B

*Diferença significativa em relação aos grupos CONTROLE/CONTROLE e CIRURGIA/CONTROLE (ANOVA de uma via, $P<0,05$).

4.6. Efeito da administração de três diferentes doses de morfina sobre a nocicepção de ratos juvenis.

Os animais do grupo cirurgia foram anestesiados e operados; os do grupo anestesia foram somente anestesiados, e os do grupo controle não sofreram qualquer tipo de manipulação, a não ser aquelas relacionadas à obtenção das medidas de TFL, conforme descrito em Materiais e Métodos (Item 3.2).

Imediatamente após a cirurgia, foi realizada a administração de solução salina ou morfina (2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg ou 7,5 mg/kg) nos três grupos experimentais propostos – CONTROLE, ANESTESIA E CIRURGIA. Foram obtidas as medidas de TFL antes (basal), 30, 60 e 90 minutos após a cirurgia.

Não houve diferença entre os grupos quanto às medidas basais ($F=1,017$; ANOVA de uma via; $P>0,05$) (Figura 10, Painel A).

Ao se compararem as latências de retirada da cauda obtidas nos diferentes grupos experimentais, nos diversos tempos propostos, por meio de ANOVA de medidas repetidas, observou-se diferença significativa entre os grupos, mas não entre os tempos, nem interação grupo x tempo ($F=4665,181$ para grupos, $P<0,05$; $F=0,90$ para tempo, $P>0,05$; $F=1,312$ para interação grupos x tempo, $P>0,05$).

Aos 30 minutos, foi observada diferença significativa entre as latências de retirada da cauda dos diferentes grupos avaliados (Figura 10, Painel B). TFL do grupo CIRURGIA/SALINA (média \pm EPM: $8,12\pm 0,46$ $n=15$) mostrou-se significativamente diferente daquelas obtidas nos grupos CONTROLE/SALINA ($3,91\pm 0,22$ $n=11$) e ANESTESIA/SALINA ($5,33\pm 0,32$ $n=18$). Esse resultado confirma aquele anteriormente obtido no experimento 2. Da mesma forma, houve

aumento na latência de retirada da cauda, interpretado como efeito analgésico, nos animais do grupo CONTROLE que receberam as três doses de morfina – CONTROLE/MORFINA2,5 (média±EPM): 6,84±0,74 n=10; CONTROLE/MORFINA5,0: 7,20±0,57 n=13; CONTROLE/MORFINA7,5: 7,39±0,75 n=12. O mesmo efeito foi observado no grupo ANESTESIA – ANESTESIA/MORFINA2,5 (média±EPM): 7,39±0,52 n=20; ANESTESIA/MORFINA5,0: 7,60±0,50 n=17; ANESTESIA/MORFINA7,5: 7,50±0,64 n=15. O aumento de TFL observado no grupo CIRURGIA/SALINA foi similar ao observado após a administração de morfina, nas três doses estudadas, nos grupos CONTROLE e ANESTESIA.

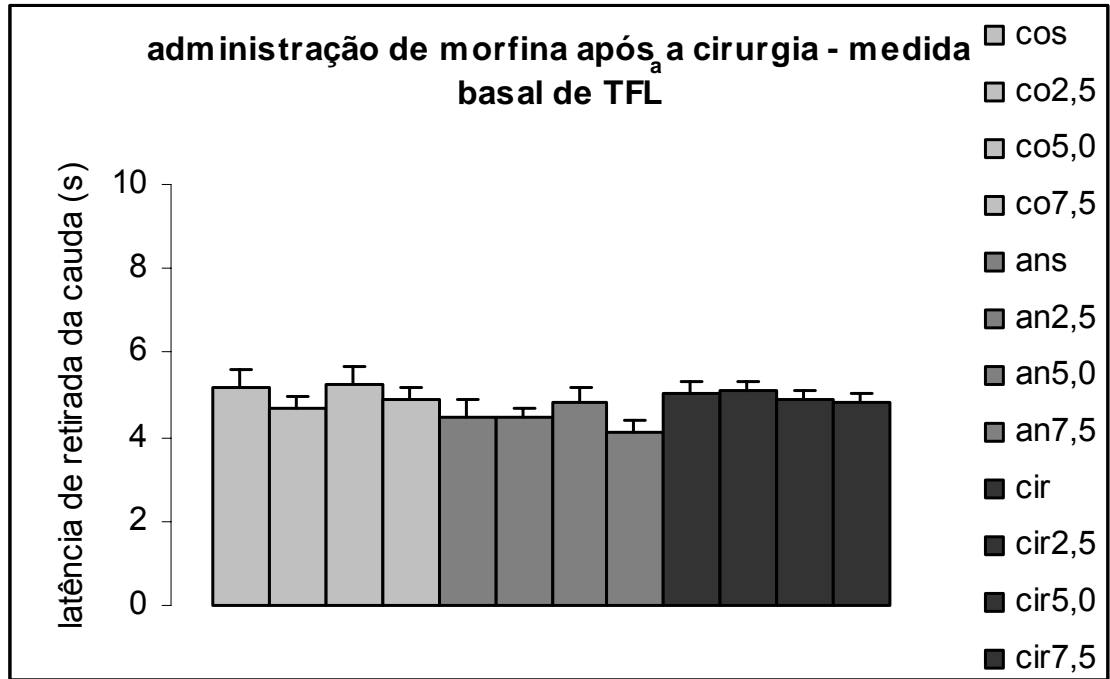
Os animais do grupo CIRURGIA que receberam morfina, nas três doses propostas (CIRURGIA/MORFINA2,5 [média±EPM] 8,50±0,54 n=14; CIRURGIA/MORFINA5,0: 9,69±0,19 n=17; CIRURGIA/MORFINA7,5: 9,93±0,04 n=17), apresentaram latências de retirada da cauda similares às do grupo CIRURGIA/SALINA. Observou-se, assim, ausência de analgesia à administração de analgésico opióide em animais de 21 dias submetidos a procedimento cirúrgico, no período de 30 min.

Aos 60 minutos, as latências de retirada da cauda dos grupos CIRURGIA/MORFINA2,5, CIRURGIA/MORFINA5,0 e CIRURGIA/MORFINA7,5 mostraram-se diferentes daquelas obtidas nos demais grupos (Figura 10, Painel C). Observou-se, assim, que a resposta analgésica induzida pela cirurgia bem como aquela induzida pelas três doses de morfina, nos grupos CONTROLE e ANESTESIA, desapareceu nesse período de tempo. Entretanto, no grupo

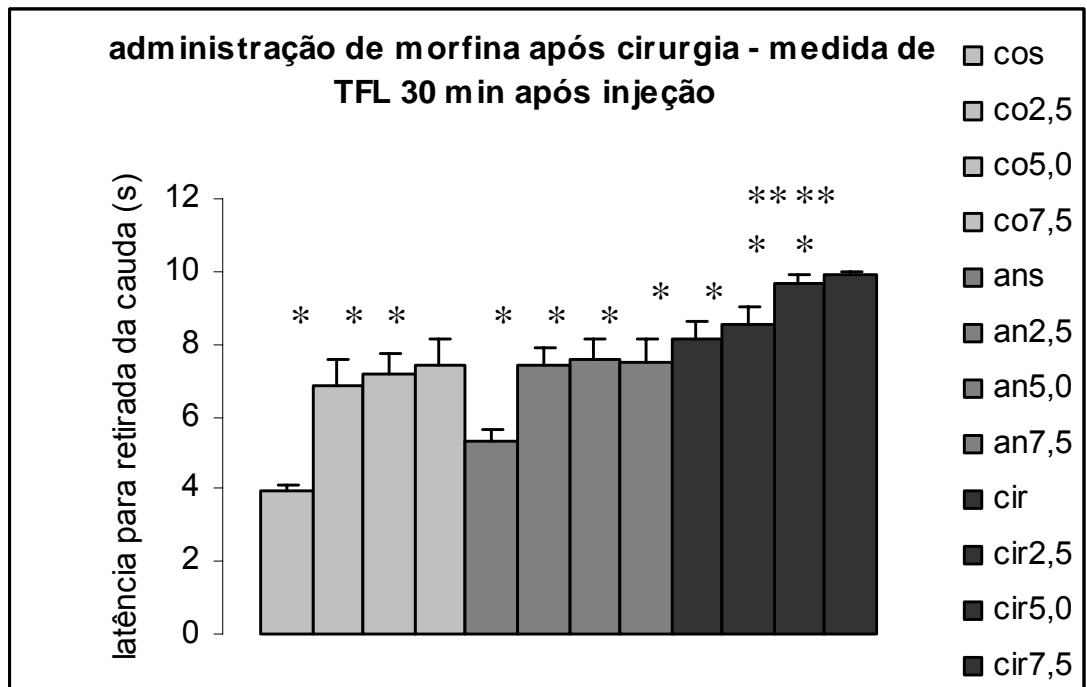
CIRURGIA, a analgesia produzida pelas três doses de morfina foi mantida – CIRURGIA/MORFINA2,5 [média±EPM] 7,72±0,59; CIRURGIA/MORFINA5,0: 8,48±0,49; CIRURGIA/MORFINA7,5: 8,32±0,63. Observou-se, assim, que, embora a administração de morfina não tenha aparentemente alterado TFL aos 30 min, esse fármaco determinou resposta analgésica em animais operados aos 21 dias de vida. Esta resposta foi observada aos 60 min (e não aos 30 min) após a cirurgia porque, provavelmente, a analgesia induzida pelo procedimento já havia desaparecido nesse momento. Isso permitiu a visualização do efeito do fármaco. Paralelamente, observou-se também que a morfina apresenta padrão de duração de ação diferente em animais operados, com o efeito analgésico perdurando por mais tempo, em comparação aos grupos controle e anestesia.

Aos noventa minutos, não se observaram diferenças significativas entre os grupos, de modo que as medidas de TFL já se assemelhavam às medidas basais (teste de Student-Newman-Keuls; $P > 0,05$) (Figura 10, painel D).

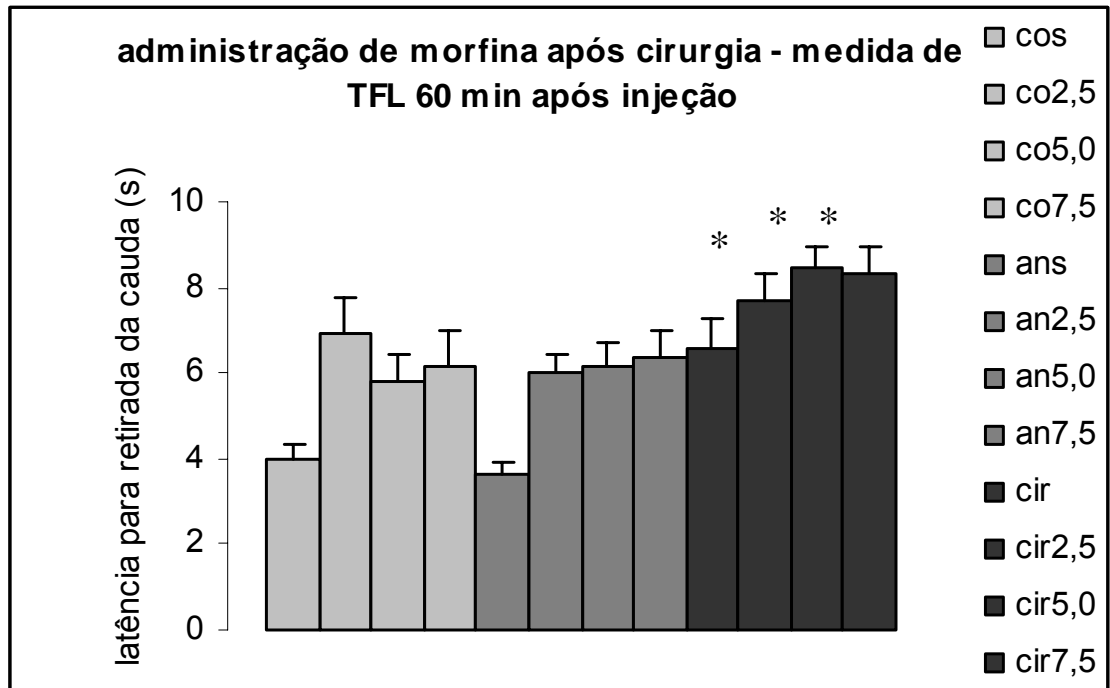
A



B



C



D

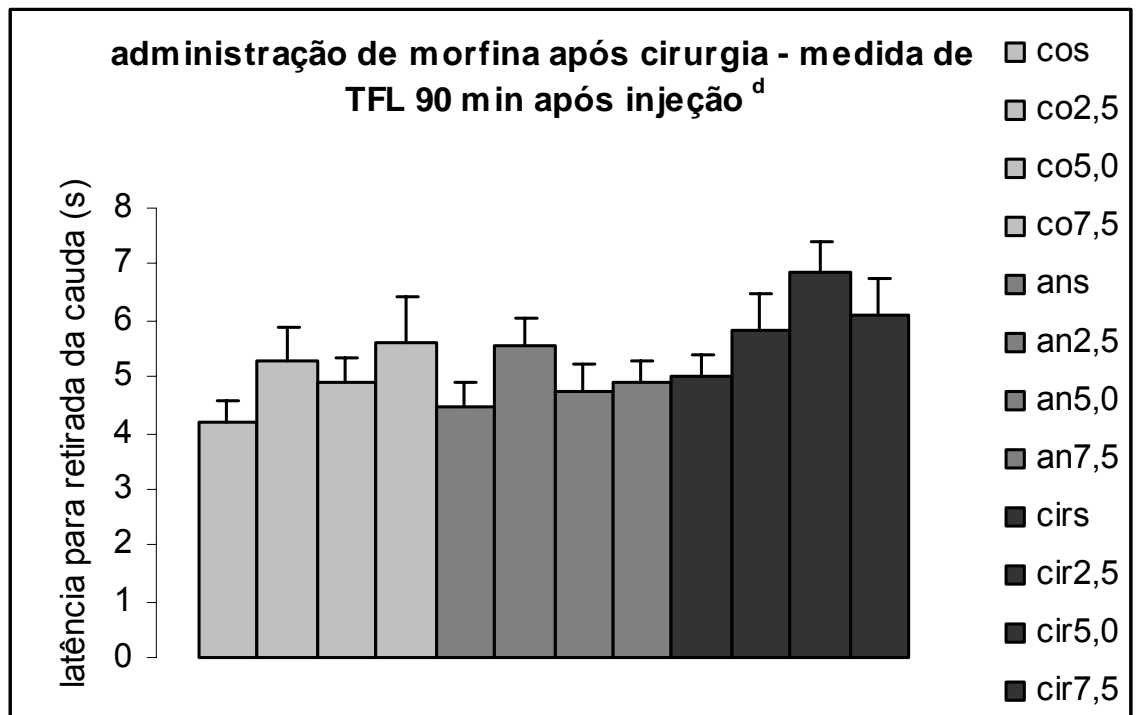


Figura 10: Efeitos da administração de analgésico opióide sobre a resposta nociceptiva, em ratos de 21 dias de idade, submetidos a procedimento cirúrgico. As latências de retirada da cauda (TFL) foram obtidas antes (basal) (Painel A), 30 min (Painel B), 60 min (Painel C) e 90 min (Painel D) após a realização da cirurgia. Dados expressos como média±EPM. Co: controle (n=46; An: anestesia (n=70); Cir: cirurgia (n=63); S: salina (n=44); 2,5: Morfina 2,5 mg/kg (n=44); 5,0: Morfina 5,0 mg/kg (n=47); 7,5: Morfina 7,5 mg/kg (n=44).

Painel A.

^a Ausência de diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newmann-Keuls; $P > 0,05$).

Painel B.

*Diferença significativa em relação aos grupos CONTROLE/SALINA e ANESTESIA/SALINA (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman Keuls; $P < 0,05$).

**Diferença significativa em relação aos grupos CONTROLE/2,5, CONTROLE/5,0 e CONTROLE/7,5 (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman Keuls; $P < 0,05$).

Painel C.

*Diferença significativa em relação aos grupos controle/salina e anestesia/salina (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman Keuls; $P < 0,05$).

Painel D.

^dAusência de diferença significativa entre os grupos (ANOVA de medidas repetidas; $P > 0,05$).

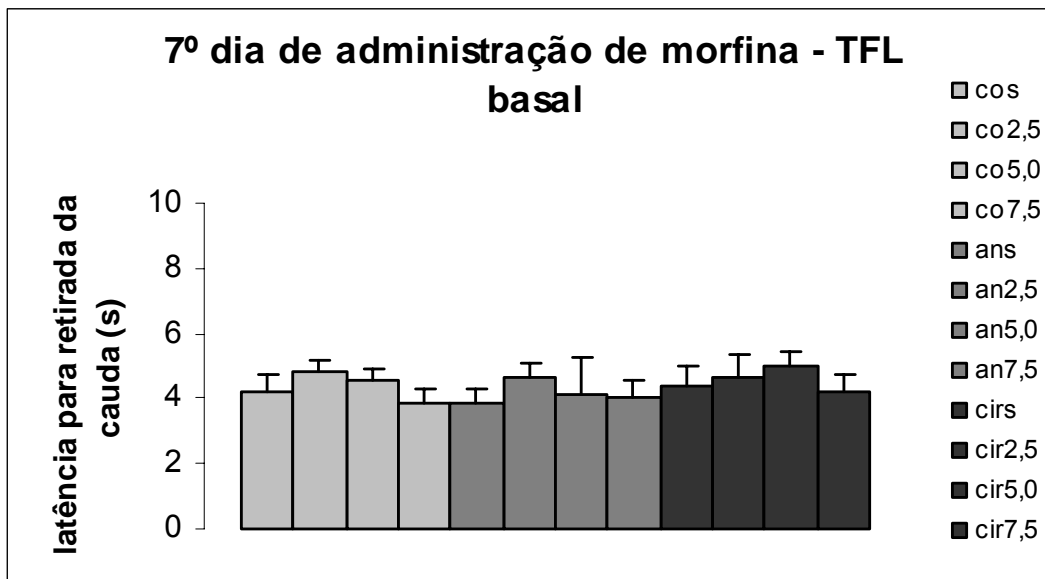
4.7. Efeito da administração de morfina por sete dias sobre a nocicepção de ratos juvenis submetidos a modelo de cirurgia.

A morfina foi administrada por via intraperitoneal durante 7 dias, em três doses distintas (2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg ou 7,5 mg/kg), aos mesmos animais dos três grupos experimentais propostos (CONTROLE, CIRURGIA e ANESTESIA) do experimento anterior. No sexto dia, os animais foram habituados ao aparelho de TFL. No sétimo dia, foram feitas as medidas das latências de retirada da cauda antes (basais), 30, 60 e 90 minutos após a administração do fármaco.

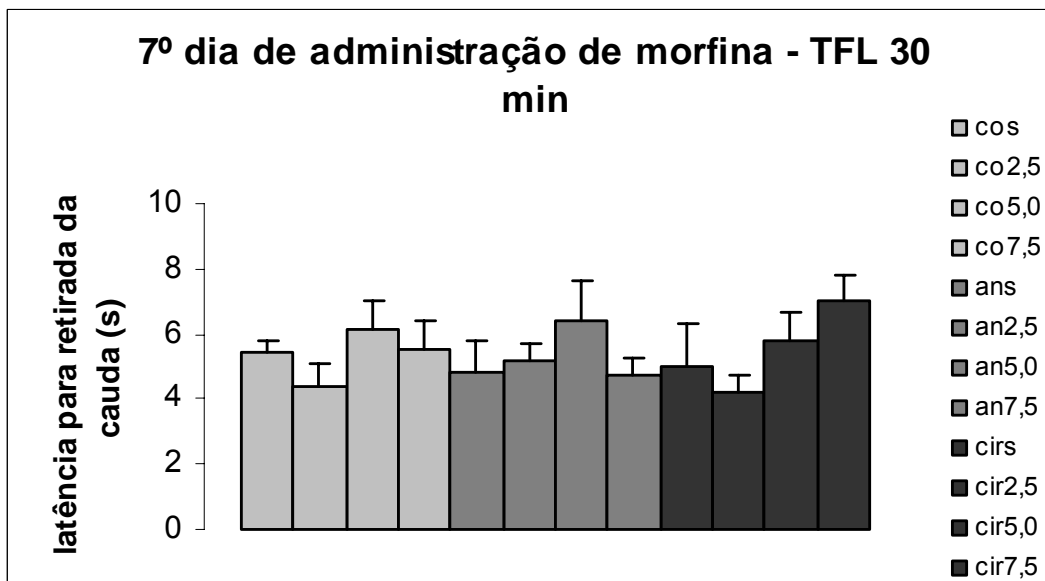
Não se observaram diferenças de TFL entre os grupos, em quaisquer dos tempos aferidos ($F=1,53$ para grupos, $P>0,05$; $F=0,77$ para tempo, $P>0,05$; $F=0,29$ para interação grupos x tempo, $P>0,05$; ANOVA de medidas repetidas) (Figura 11, Painéis de A a D).

Os dados sugerem que o uso prolongado de morfina determina tolerância analgésica em ratos de 21 dias, independentemente de terem sido submetidos a procedimentos anestésico-cirúrgicos ou não, embora tenham apresentado analgesia agudamente, conforme resultado do experimento anterior. Esse efeito foi expresso, nesse experimento, por meio do desaparecimento do aumento de TFL após 7 dias de tratamento medicamentoso.

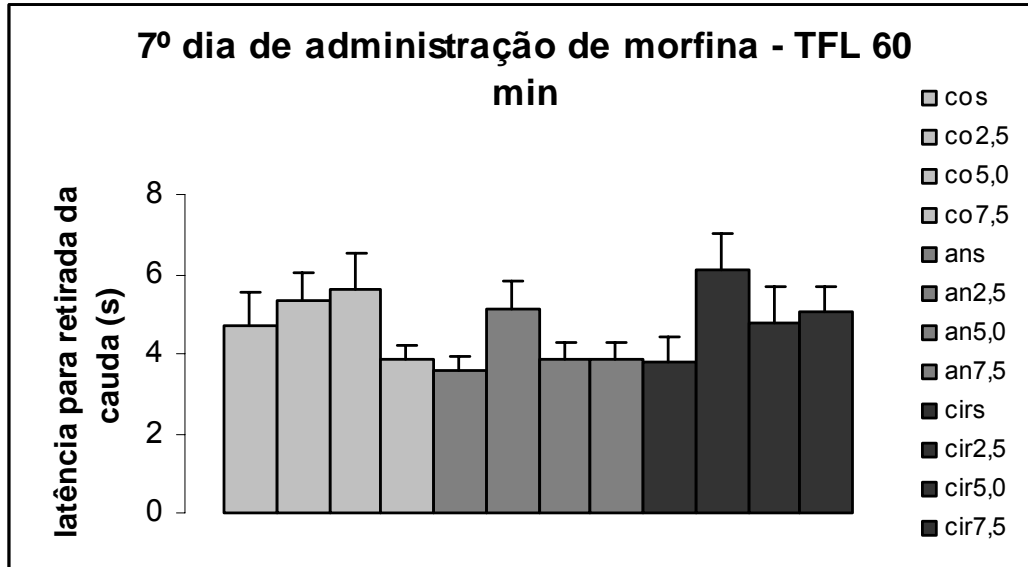
A



B



C



D

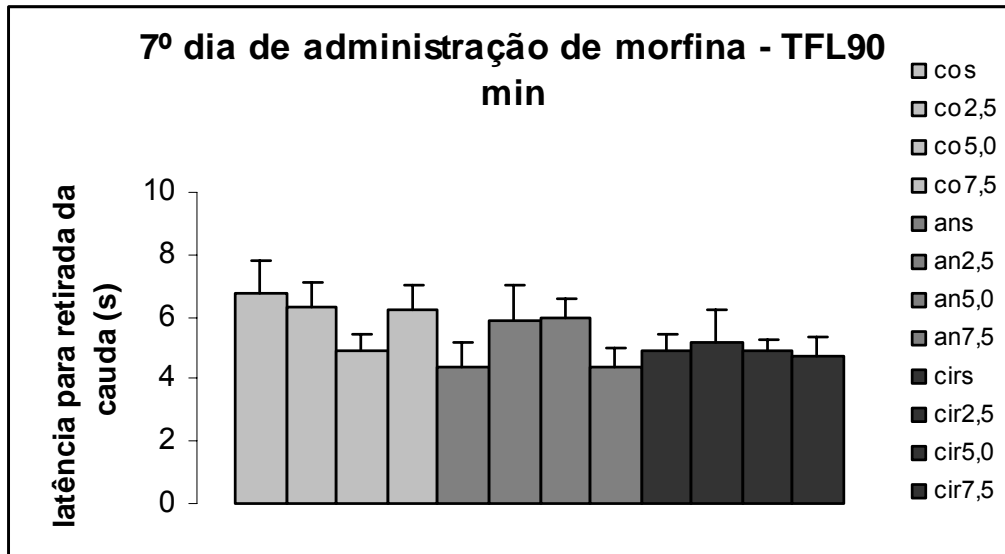


Figura11: Efeitos da administração intraperitoneal de analgésico opióide por 7 dias sobre a resposta nociceptiva, em ratos de 21 dias de idade, submetidos a procedimento cirúrgico. Latências de retirada da cauda (TFL) obtidas no sétimo dia de tratamento, antes (basal, painel A), 30 min (painel B), 60 min (painel C) e 90 min (painel D) após a última injeção de morfina. Dados expressos como média±EPM. Co: controle (n=46); An: anestesia (n=70); Cir: cirurgia (n=63); S: salina (n=44); 2,5: Morfina 2,5 mg/kg (n=44); 5,0: Morfina 5,0 mg/kg (n=47); 7,5: Morfina 7,5 mg/kg (n=44).

Ausência de diferença entre os grupos, em todos os tempos avaliados (ANOVA de medidas; $P>0,05$).

4.8. Efeito da administração de morfina sobre a nocicepção, sessenta dias após a realização de cirurgia.

Os animais do grupo cirurgia foram anestesiados e operados; os do grupo anestesia foram somente anestesiados, e os do grupo controle não sofreram qualquer tipo de manipulação, a não ser aquelas realizadas para obtenção das medidas de TFL, conforme descrito em Materiais e Métodos (Item 3.2).

Sessenta dias após a cirurgia, os animais dos três grupos receberam solução salina ou morfina, na dose de 5 mg/kg, por via i.p. Foram obtidas as medidas de TFL antes (basal), trinta e sessenta minutos após a administração de morfina.

Não houve diferença entre os grupos nas medidas basais ($F= 0,755$; ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P>0,05$) (Figura 12).

Na comparação de TFL obtidas em diferentes tempos, nos grupos experimentais propostos, realizada por meio de ANOVA de medidas repetidas, observou-se diferença significativa das latências de retirada da cauda entre os grupos, entre os tempos e interação grupo x tempo ($F= 8,999$ para grupos, $P<0,05$; $F= 5,796$ para tempo, $P<0,05$; $F= 6,428$ para interação grupos x tempo, $P<0,05$).

Aos trinta minutos, observou-se diferença significativa de TFL na comparação dos grupos que receberam morfina (CONTROLE/MORFINA [média±EPM: $8,95\pm0,53$ n=8], ANESTESIA/MORFINA [$8,36\pm0,61$ n=7] e

CIRURGIA/MORFINA [$8,01 \pm 0,64$ n=8]) em relação àqueles que receberam salina (CONTROLE/SALINA [média±EPM: $4,67 \pm 0,62$ n=6], ANESTESIA/SALINA [$5,07 \pm 0,45$ n=6] e CIRURGIA/SALINA [$5,40 \pm 0,59$ n=8]), demonstrando o esperado efeito analgésico do fármaco (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$) (Figura 12).

Aos sessenta minutos, houve diferença significativa entre os grupos CONTROLE/MORFINA (média±EPM: $7,69 \pm 0,55$) e ANESTESIA/MORFINA ($8,57 \pm 0,73$) em relação aos grupos CONTROLE/SALINA ($4,31 \pm 0,26$) e ANESTESIA/SALINA ($5,13 \pm 0,88$), sugerindo persistência do efeito analgésico da morfina nesse período de tempo. No grupo CIRURGIA/MORFINA ($5,69 \pm 0,75$), as medidas de TFL mostraram-se similares às medidas basais e àquelas obtidas no grupo CIRURGIA/SALINA ($4,36 \pm 0,53$) (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$) (Figura 12).

Dados sugerem que, 60 dias após a cirurgia, morfina determina analgesia de rápido início (após 30 min), mas curta duração (ausente aos 60 min), em animais submetidos a procedimento cirúrgico em menor idade (aos 21 dias de vida). Tal padrão de resposta é distinto daquele observado em animais submetidos, quando jovens, apenas a procedimento anestésico ou simples manipulação. Nestes, morfina determinou analgesia de mais longa duração (presente ainda aos 60 min).

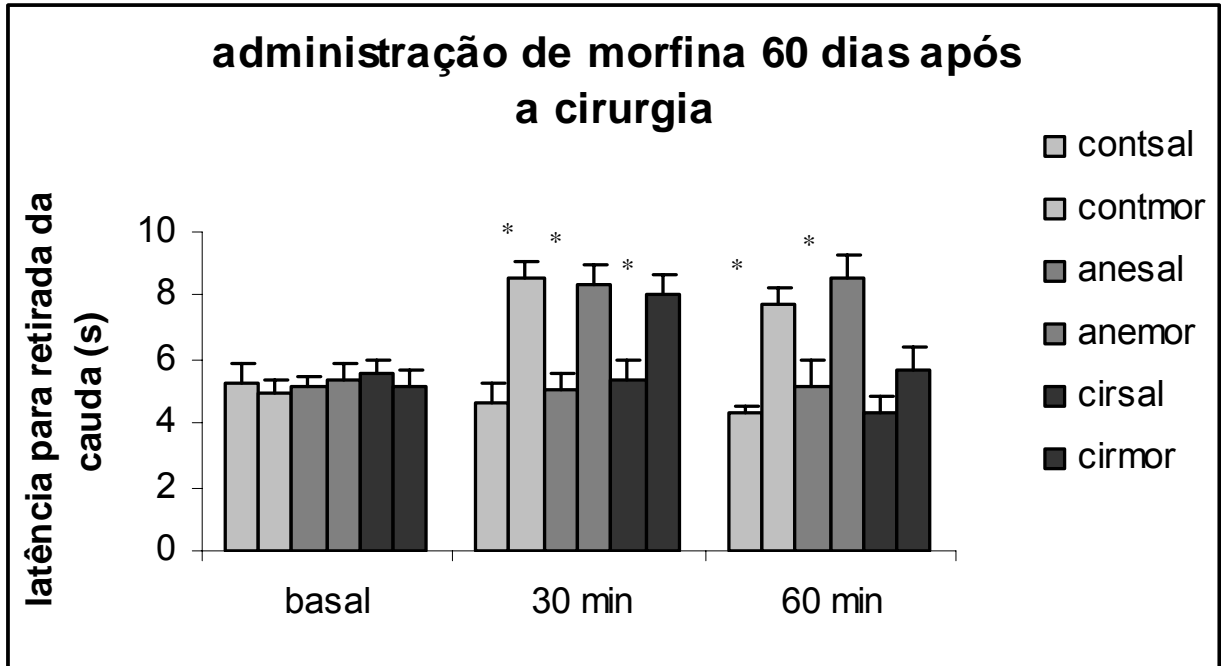


Figura 12: Efeitos da administração de morfina (5 mg/kg) sobre a resposta nociceptiva, 60 dias após a realização de procedimento cirúrgico em ratos de 21 dias de idade. Latências de retirada da cauda (TFL) obtidas antes (basal), 30, 60 e 90 min após a injeção de morfina. Dados expressos como média±EPM. Cont: controle (n=14); Ane: anestesia (n=13); Cir: cirurgia (n=16); Sal: salina (n=20); Mor: Morfina 5,0 mg/kg (n=23).

* Diferença significativa em relação ao grupo CONTROLE/SALINA, nos tempos assinalados (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

4.9. Efeito da administração de naloxona ou picrotoxina previamente à cirurgia sobre a nocicepção de ratos juvenis.

Para a avaliação dos efeitos da naloxona, os animais dos grupos CONTROLE e CIRURGIA receberam, por via i.p., solução salina ou naloxona (1 mg/kg), 30 minutos antes da cirurgia. Medidas de TFL foram obtidas antes (basal), 30 e 60 minutos após a cirurgia.

O grupo ANESTESIA não foi incluído nesse experimento por ter apresentado comportamento similar ao do grupo CONTROLE nos experimentos prévios.

Não houve diferença nas medidas basais de TFL (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P > 0,05$) (Figura 13).

Por meio de ANOVA de medidas repetidas, observou-se diferença significativa das latências de retirada da cauda entre os grupos, mas não entre os tempos ou interação grupo x tempo ($F = 3,21$ para grupos, $P < 0,05$; $F = 1,74$; para tempo, $P > 0,05$; $F = 2,42$ para interação grupos x tempo, $P > 0,05$).

Aos trinta minutos, o grupo CIRURGIA/SALINA (média \pm EPM: 6,08 \pm 0,49) mostrou-se significativamente diferente dos grupos CONTROLE/SALINA e CONTROLE/NALOXONA, apresentando aumento de TFL (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$) (Figura 13).

Naloxona, na dose administrada, não apresentou efeito por si só sobre a resposta nociceptiva, na medida em que as latências de retirada da cauda no grupo CONTROLE/NALOXONA não diferiram daquelas obtidas no grupo CONTROLE/SALINA (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P > 0,05$). No entanto, sua administração reverteu parcialmente o

efeito analgésico da cirurgia, uma vez que as latências de retirada da cauda observadas no grupo CIRURGIA/NALOXONA (média±EPM: 5,31±0,59 n=21) não foram diferentes daquelas obtidas nos grupos CONTROLE/SALINA (3,72±0,19 n=19), CONTROLE/NALOXONA (4,30±0,23 n=22) e CIRURGIA/SALINA (6,08±0,49 n=20).

Aos sessenta minutos, não houve diferença entre os grupos (ANOVA de medidas repetidas; $P>0,05$) (Figura 13).

Para a avaliação dos efeitos de picrotoxina, os animais dos grupos CONTROLE e CIRURGIA receberam, por via i.p., solução salina ou picrotoxina (1 mg/kg), 30 minutos antes da cirurgia. Medidas de TFL foram obtidas antes (basal), 30 e 60 minutos após a cirurgia.

Por meio de ANOVA de medidas repetidas, observou-se diferença significativa das latências de retirada da cauda entre os grupos, mas não entre os tempos ou interação grupo x tempo ($F=9,15$ para grupos, $P<0,05$; $F=0,95$ para tempo, $P>0,05$; $F=1,32$ para interação grupos x tempo, $P>0,05$) (Figura 14).

Não houve diferença nas medidas basais de TFL (ANOVA de uma via, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P>0,05$).

Aos trinta minutos, o grupo CIRURGIA/SALINA (média±EPM: 7,30±0,80) mostrou-se significativamente diferente dos demais, apresentando aumento de TFL (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P<0,05$) (Figura 14).

Picrotoxina, na dose administrada, não apresentou efeito por si só sobre a resposta nociceptiva, na medida em que as latências de retirada da cauda no

grupo CONTROLE/PICROTOXINA não diferiram daquelas obtidas no grupo CONTROLE/SALINA (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P>0,05$). No entanto, sua administração reverteu totalmente o efeito analgésico da cirurgia (CIRURGIA/SALINA média±EPM:7,30±0,80 n=8), uma vez que as latências de retirada da cauda observadas no grupo CIRURGIA/PICROTOXINA (3,80±0,26 n=8) não foram diferentes daquelas obtidas nos grupos CONTROLE/SALINA (4,41±0,28 n=6) e CONTROLE/PICROTOXINA (3,92±0,23 n=8).

Aos sessenta minutos, não houve diferença entre os grupos (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P>0,05$) (Figura 14).

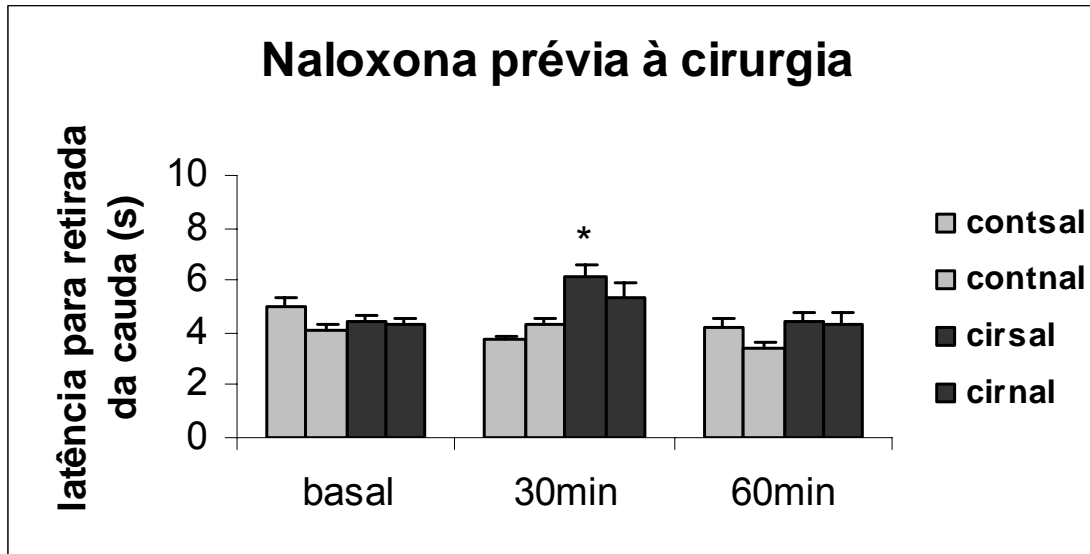


Figura 13: Efeito da administração de naloxona sobre a analgesia induzida pela cirurgia, em ratos de 21 dias de idade. Latências de retirada da cauda (TFL) obtidas antes (basal), 30 e 60 min após o procedimento cirúrgico. Dados expressos como média±EPM. Cont: controle (n=41); Cir: cirurgia (n=41); Sal: salina (n=39); Nal: naloxona (n=43).

*Diferença significativa em relação aos grupos CONTROLE/SALINA e CONTROLE/NALOXONA, no tempo assinalado (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

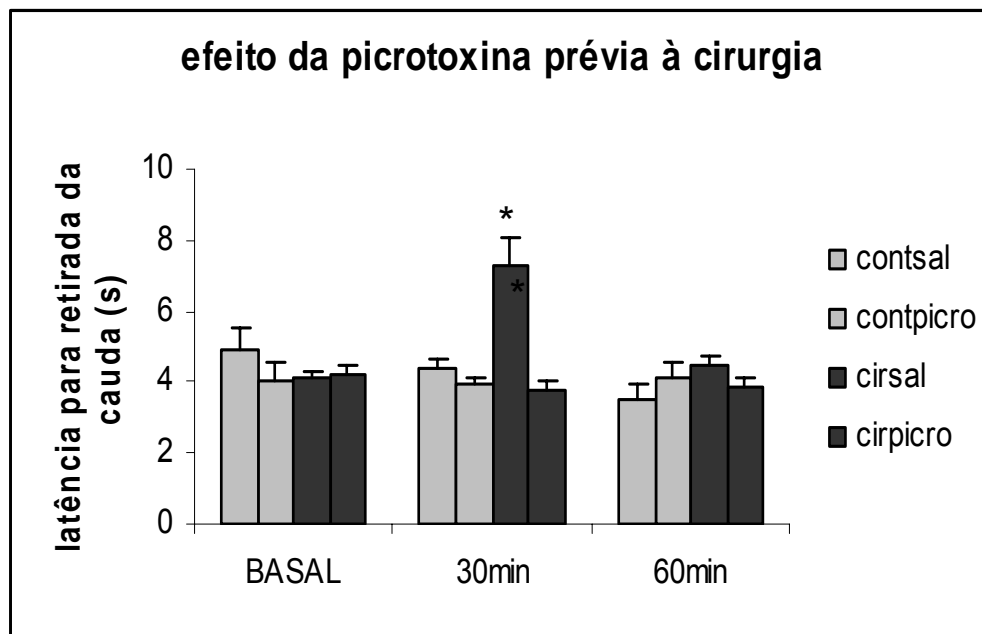


Figura 14: Efeito da administração prévia de picrotoxina sobre a analgesia induzida pela cirurgia, em ratos de 21 dias de idade. Latências de retirada da cauda (TFL) obtidas antes (basal), 30 e 60 min após o procedimento cirúrgico. Dados expressos como média±EPM. Cont: controle (n=14); Cir: cirurgia (n=16); Sal: salina (n=14); Picro: picrotoxina (n=16).

*Diferença significativa em relação aos demais grupos, no tempo assinalado (ANOVA de medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Procedimento anestésico

Foram testados os efeitos de dois anestésicos gerais: um inalatório – o halotano, e outro classicamente denominado de intravenoso, mas empregado nessa tese por via intraperitoneal – o tiopental sódico. Ambos produziram anestesia geral, que pode ser definida como depressão global, mas reversível, do SNC, resultando em perda de resposta e percepção a todos estímulos externos (revisado por Evers *et al*, 2006). Nos animais desse experimento, tal depressão foi expressa pela perda dos reflexo de endireitamento e de retirada do membro posterior.

Observou-se que, uma semana após o procedimento anestésico, os animais anestesiados com tiopental sódico apresentaram diminuição da latência de retirada da cauda. Esse efeito hiperalgésico persistiu até a terceira semana. O mesmo não foi observado em animais para os quais se administrou halotano, por via inalatória. Estes apresentaram medidas de TFL semelhantes àquelas de seus controles, tanto logo após o procedimento anestésico (30, 60 e 90 minutos depois), quanto nas avaliações semanais. Nos dois grupos, observou-se o mesmo padrão de resposta nociceptiva ao longo do tempo. As latências de retirada da cauda mostraram-se significativamente mais elevadas entre a primeira e a terceira semana. A partir da quarta semana, retornaram aos níveis basais.

O tiopental sódico é barbitúrico que atua em SNC, suprimindo respostas polissinápticas. A facilitação é diminuída e a inibição é aumentada (revisado por Charney *et al.*, 2006). Os sítios de inibição são pós-sinápticos em córtex, cerebelo

e tálamo e pré-sinápticos em medula espinhal. O aumento da inibição ocorre primariamente em sinapses onde a neurotransmissão é mediada por GABA, atuando especificamente em receptores GABA_A. A ativação desses receptores leva ao aumento da condutância ao Cl⁻ e diminuição das correntes de Ca²⁺. Os barbitúricos são, portanto, agonistas GABAérgicos, que levam à diminuição da atividade cerebral e de seu metabolismo. Seus efeitos adversos incluem depressão respiratória e hipotermia (revisado por Evers *et al.*, 2006).

A hiperalgesia associada ao uso de tiopental sódico está descrita para a administração de baixas doses do fármaco. Esse efeito é descrito logo após a sua administração por via intravenosa (Tatsuo *et al.*, 1997, Archer *et al.*, 1994). Não há relato na literatura de persistência da hiperalgesia por semanas, como foi observado nesse trabalho de tese.

A redução da latência de retirada da cauda observada com a administração de tiopental não tem causa estabelecida. Pode-se supor que seja, pelo menos em parte, conseqüência do estresse provocado pela hipotermia determinada pelo barbitúrico. Sabe-se que a exposição a estressores pode alterar o limiar nociceptivo, aumentando-o e produzindo analgesia induzida por estresse (*stress-induced analgesia* ou SAI, em inglês) (Menendez *et al.*, 1993; Amir e Amit, 1978), ou diminuindo-o e provocando hiperalgesia (Torres *et al.*, 2003; Quintero *et al.*, 2000; Gamaro *et al.*, 1998). A ocorrência de um ou de outro efeito depende de tipo de estressor e duração do tratamento (Torres *et al.*, 2002; López *et al.*, 1999). Exposição ao frio pode, por exemplo, alterar o limiar nociceptivo, elevando-o ou diminuindo-o (Imbe *et al.*, 2006). Nesse experimento, embora os animais tenham sido expostos uma única vez ao tiopental sódico, eles demoraram duas horas para

se recuperar. A hipotermia produzida pela anestesia poderia ter sido suficiente para produzir hiperalgesia, mesmo utilizando-se colchão aquecido durante o período de recuperação.

Outra explicação para o fenômeno observado pode estar relacionada à ação do tiopental sódico sobre sistemas neurotransmissores centrais, principalmente GABAérgico. Em estudo sobre efeito de ativação GABAérgica sobre redução do limiar de dor, observou-se que doses não-hipnóticas de fenobarbital, pentobarbital e tiopental induziram hiperalgesia, verificada por meio de teste de latência de retirada da cauda e revertida por injeção prévia de dose não-convulsivante do antagonista picrotoxina, evidenciando o papel do receptor GABA_A nesse fenômeno (Tatsuo *et al.*, 1997) No entanto, efeitos de longo prazo relacionados a barbitúrico necessitam de experimentos adicionais. Os resultados dessa tese trouxeram à tona essa nova hipótese para futuros trabalhos.

O aumento das latências de retirada da cauda ao longo do tempo, observado em animais dos grupos controle de ambos os experimentos, pode ser decorrente da maturação funcional das vias descendentes de modulação inibitória, que não são funcionais até P21 no rato (revisado por Fitzgerald 2005), assim como à maturação do circuito local de interneurônios inibitórios no corno dorsal.

As vias inibitórias descendentes, que vêm do tronco cerebral, só estabelecem sinapses no corno dorsal algumas semanas após o nascimento (revisado por Morton, 1998). Foi demonstrado que estimulação elétrica da PAG só produz analgesia em ratos a partir de P21 (van Praag e Frenk, 1991). Os neurônios da PAG projetam para os núcleos da rafe, que liberam 5-HT no corno dorsal, inibindo diretamente os neurônios de projeção ou excitando interneurônios

inibitórios encefalinérgicos (revisado por Millan, 2002). Além disso, foi demonstrado que a geração de neurônios de projeção da lâmina I está completa antes que o circuito local de interneurônio inibitórios, o que implica na transmissão direta da atividade nociceptiva antes que haja inibição local por interneurônio. Até P27 as correntes excitatórias pós-sinápticas em miniatura são cinco vezes maiores que as dos interneurônios inibitórios (Dahlhaus *et al.*, 2005). Outra explicação talvez esteja relacionada ao fato de que, à medida que os animais envelhecem, suas caudas ganham mais queratina e tornam-se mais espessas. Assim, se é mantida a mesma intensidade de luz, a retirada da cauda ocorre mais rapidamente em menor idade. Por outro lado, será mais lenta em maior idade, quando o revestimento da cauda é mais grosso.

5.2. Resposta nociceptiva em modelo de cirurgia aplicado a ratos juvenis

Nesse trabalho de tese, ratos de 21 dias de idade foram submetidos a modelo de cirurgia para avaliação da resposta nociceptiva pós-operatória. Observou-se que os animais submetidos à incisão plantar apresentaram aumento na medida de TFL trinta minutos após a realização do procedimento cirúrgico. Aos sessenta minutos, esse efeito já havia desaparecido.

Uma possível explicação para tal padrão de resposta é a de que a exposição ao procedimento cirúrgico determinou analgesia induzida pelo estresse (Vacarino e Kastin, 2000). Também é possível que esse aumento no TFL seja resultante de ativação de vias descendentes de modulação inibitória e interneurônios inibitórios na própria medula espinhal, uma vez que estímulos nocivos são capazes de ativar esses mecanismos de modulação (Millan, 2002).

A simples exposição ao procedimento anestésico não foi capaz de determinar tal alteração, uma vez que os animais somente anestesiados apresentaram medidas de TFL similares às daquelas do grupo controle.

Embora a analgesia induzida por estresse cirúrgico não tenha sido descrita na literatura, foi observada ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal em decorrência da cirurgia (laparotomia, Shavit *et al.*, 2005). A ativação do eixo poderia produzir a analgesia induzida por estresse. Esse tipo de fenômeno pode ser categorizado como opióide ou não-opióide (Watkins e Mayer, 1986). Estudos descritos a seguir propuseram-se, então, a esclarecer esse ponto.

5.3. Papel de sistemas opióide e GABAérgico sobre a resposta nociceptiva a modelo de cirurgia em ratos juvenis.

No primeiro experimento, os animais receberam solução salina ou naloxona (1 mg/kg), por via i.p., 30 minutos antes de serem submetidos a procedimento anestésico e/ou cirúrgico. Como observado previamente, a cirurgia levou ao aumento da latência de retirada da cauda. Com a administração de naloxona, aquele efeito foi parcialmente revertido.

Embora a naloxona tenha produzido apenas reversão parcial da analgesia induzida pela cirurgia, não se pode descartar o papel do sistema opióide nesse modelo. Sabe-se que alguns tipos de manipulações em neonatos e bebês, tais como circuncisão e outros tipos de cirurgia, produzem resposta ao estresse relacionada com liberação de opióides endógenos (Southwick *et al.*, 1995, citado em Lönnqvistand e Morton, 2005). Talvez a utilização de antagonista específico

para cada tipo de receptor opióide seja necessária em experimentos futuros, para avaliar o real papel do sistema opióide na analgesia induzida pela cirurgia. A naloxona, antagonista utilizado nesse experimento, bloqueia os três tipos de receptores opióides – μ , δ e κ .

No segundo experimento, os animais receberam solução salina ou picrotoxina (1 mg/kg), por via i.p., 30 minutos antes de serem submetidos a procedimento anestésico e/ou cirúrgico. Observou-se que o efeito analgésico da cirurgia foi completamente revertido pela picrotoxina. Com base nesse resultado, propõe-se importante papel gabaérgico na analgesia induzida pela cirurgia, no modelo experimental estudado. Esse achado corrobora a robusta desinibição do corno dorsal da medula espinhal provocada por antagonistas GABA_A, quando aplicados topicamente em medula espinhal em experimentos *in vivo* com ratos neonatos (revisado por Fitzgerald, 2005). Isso sugere que os receptores já podem ser ativados em animais neonatos e que, então aos 21 dias, esse sistema já teria atividade. É possível que a incisão tenha recrutado vias de modulação descendentes, fazendo com que interneurônios inibitórios gabaérgicos liberem GABA, o que, por sua vez, hiperpolariza as células do corno dorsal. Com isto, há inibição da transmissão do potencial de ação, refletindo-se, assim, em aumento de TFL, o que foi observado nos animais submetidos à cirurgia.

Tendo como base esses dois experimentos, pode-se sugerir que a analgesia induzida pela cirurgia aqui avaliada é predominantemente de tipo não-opiíde, com participação gabaérgica e parcialmente opiíde.

5.4. Resposta nociceptiva a analgésico opióide em modelo de cirurgia, em ratos juvenis.

Os animais dos três grupos experimentais propostos (controle, anestesia e cirurgia) foram tratados com solução salina ou três diferentes doses de morfina (2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg ou 7,5 mg/kg), imediatamente após a cirurgia. As medidas de TFL foram obtidas antes (basal), trinta, sessenta e noventa minutos após o procedimento.

Observou-se que a morfina, nas três doses avaliadas, determinou a esperada resposta analgésica 30 min após a administração, em todos os grupos estudados. Mesmo nos grupos submetidos à cirurgia, nos quais já havia aumento da latência de retirada da cauda, observou-se efeito analgésico adicional com morfina. Assim, as latências de retirada da cauda em animais do grupo cirurgia que receberam 5,0 e 7,5 mg/kg de morfina foram significativamente diferentes daquelas obtidas nos grupos controle que receberam as mesmas doses do fármaco.

Observou-se que, aos 30 min, o aumento de TFL no grupo submetido à cirurgia e que recebeu salina foi similar àquele produzido pela administração de morfina nas três doses, no grupo cirurgia. Aos sessenta minutos, apenas os animais do grupo cirurgia que receberam as três diferentes doses de morfina apresentavam ainda TFL diferente do grupo controle/salina, sem haver diferença entre as três doses administradas. Aos 90 minutos, não havia diferença entre os grupos.

A semelhança entre as medidas de TFL dos animais do grupo cirurgia que receberam solução salina ou uma das diferentes doses de morfina pode se dever

à liberação de neurotransmissores provocada pela cirurgia, tais como o GABA e os opióides endógenos. Estes neurotransmissores são capazes, por si só, de produzir analgesia, uma vez que eventos nocivos e estressantes produzem liberação dos mesmos (Millan 2002, Watkins e Mayer, 1986). Ao ocuparem os receptores disponíveis, eles fazem com que a morfina seja incapaz de aumentar a analgesia. Também é possível que o tempo máximo de exposição ao aparelho de TFL (10 segundos) tenha sido insuficiente para que se aferir se existe diferença entre os grupos, mascarando o efeito da morfina. Essa última hipótese é razoável, uma vez que, aos trinta minutos, houve diferença entre os animais do grupo cirurgia que receberam as duas doses maiores de morfina (5,0 e 7,5 mg/kg) e os do grupo controle que receberam as três doses. Paralelamente, aos sessenta minutos, os animais do grupo cirurgia que receberam as três doses de morfina foram diferentes do controle/salina, sugerindo que tenha ocorrido um somatório de efeitos. Assim, a analgesia induzida pela cirurgia pode ter sido aumentada, pelo menos na duração do seu efeito, pela morfina.

Pretendeu-se avaliar, então, o efeito da administração da morfina após um período de tempo mais prolongado ter decorrido, depois da realização do procedimento cirúrgico. Nesse experimento, os animais foram submetidos a procedimentos anestésico e cirúrgico aos 21 dias de idade e, depois, permaneceram sem ser manipulados por 60 dias. Ao final desse período, foi administrada solução salina ou morfina (5 mg/kg). Observou-se que a resposta analgésica à morfina manteve-se preservada nesses animais. Trinta minutos após a administração do fármaco, houve aumento da latência de retirada da cauda nos

três grupos estudados. Após sessenta minutos, o efeito da morfina persistiu nos grupos controle e anestesia; porém, desapareceu no grupo submetido à cirurgia. Supõe-se que dois fenômenos possam estar relacionados a esses resultados: o desacoplamento da proteína G do receptor e a ativação de receptores NMDA no corno dorsal da medula espinhal.

Desacoplamento de receptores opióides de proteínas G, após estimulação dolorosa aguda cirúrgica (Liu *et al.*, 2004, citado em Peters *et al.*, 2005), pode ser uma das razões para a diminuição no efeito da morfina verificada nesse experimento. O desacoplamento se deve à alteração conformacional no receptor, após a ligação do agonista. Ocorre fosforilação dos resíduos serina/treonina em terceira alça intracelular e terminal carboxil do receptor. Então, a proteína celular arrestina, que possui alta afinidade pelo receptor fosforilado, move-se do citoplasma, ligando-se ao receptor e promovendo o desacoplamento da proteína G. Isto faz com que o receptor se torne incapaz de traduzir o sinal (revisado por Nunes *et al.*, 2005). Porém, não está claro se o efeito de opióides endógenos, possivelmente liberados em consequência da injúria, seria suficiente para promover tal desacoplamento.

Outra possibilidade é a de que a injúria cirúrgica possa ter determinado sensibilização central. Tal injúria poderia levar à grande liberação de glutamato e, conseqüentemente, à despolarização, removendo o bloqueio de Mg^{2+} ao qual os receptores glutamatérgicos NMDA estão submetidos. A ativação desses receptores leva ao aumento de Ca^{2+} intracelular, o que, por sua vez, ativa proteínas cinases dependentes de cálcio, entre as quais proteína cinase C (PKC), necessária para

ativação da enzima óxido nítrico sintase, enzima que sintetiza óxido nítrico (NO). O NO se difunde para o terminal pré-sináptico, estimulando o fechamento permanente dos canais de K^+ , via ativação da guanilil sintase. Uma vez que os opióides inibem a liberação de glutamato, por promover abertura daqueles canais, estando estes fechados permanentemente, a eficácia da morfina se torna prejudicada (revisado por Brookoff, 2000). A ativação sustentada de receptores NMDA, tendo papel sobre a dessensibilização dos animais submetidos à cirurgia e à morfina, parece ser uma possibilidade mais adequada, uma vez que a ativação das fibras C e A delta em consequência da incisão persistem por pelo menos 24 horas e a atividade espontânea dessas fibras tem papel na amplificação da resposta central (Pogatzki *et al.*, 2002).

5.5. Desenvolvimento de tolerância à morfina em ratos juvenis submetidos a modelo de cirurgia.

Os animais dos três grupos – CONTROLE, ANESTESIA e CIRURGIA - receberam no dia da cirurgia e por mais seis dias solução salina ou morfina (2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg ou 7,5 mg/kg). Nos sétimo dia de administração, foram feitas as medidas de TFL antes (basais), trinta, sessenta e 90 minutos após a injeção. Não houve diferença entre os grupos em quaisquer das medidas aferidas, sugerindo desenvolvimento de tolerância à morfina após a administração repetida do fármaco.

Esse resultado corrobora dados de estudo anterior (Wang *et al.*, 2005), no qual animais de 21 dias de idade apresentaram tolerância a opióide no quarto dia de administração. Naquele estudo, foi verificado que animais jovens (P21)

desenvolvem tolerância mais rapidamente que animais adultos (3, 6 e 12 meses de idade) e que isso não parece ser decorrente de metabolismo ou depuração (*clearance*) do fármaco. Os autores sugerem que a idade tenha impacto no processo molecular de desenvolvimento de tolerância. Mecanismos de dessensibilização, tais como *down-regulation* do receptor, internalização e desacoplamento da proteína G inibitória, são bem conhecidos e têm papel no surgimento da tolerância. Também atua *up-regulation* da via do AMPc, que produz supersensibilização da adenilato ciclase e acoplamento dos receptores opióides com proteína G estimulatória (para revisão ver Suresh e Anand, 2001).

Mecanismos envolvidos em analgesia induzida pela cirurgia e sensibilização à morfina, efeitos observados nos experimentos dessa tese, não evitam o surgimento de tolerância, bem como não parecem propiciar o seu desenvolvimento, uma vez que os animais dos grupos controle e cirurgia que receberam as três doses de morfina, por sete dias, apresentaram medidas de TFL semelhantes ao final do tratamento.

5.6. Efeito da exposição ao modelo de cirurgia proposto sobre a atividade locomotora de ratos juvenis.

Avaliou-se a atividade locomotora dos animais dos três grupos propostos (controle, anestesia e cirurgia) em campo aberto. Não se observou diferença entre os grupos na saída do primeiro quadrante. Entretanto, o grupo submetido à cirurgia realizou menor número de cruzamentos que os grupos controle e anestesia.

A latência para saída do primeiro quadrante no campo aberto tem sido utilizada como medida de ansiedade (Lister, 1990; Britton e Britton, 1981). Nesse experimento, os dados sugerem que a exposição aos procedimentos anestésicos e cirúrgicos não alteraram a ansiedade.

Por outro lado, houve diferença entre os grupos quanto ao número de cruzamentos. Observou-se redução da atividade locomotora no grupo submetido à cirurgia, o que pode ser decorrente da hiperalgesia mecânica gerada pela incisão plantar.

No modelo descrito originalmente por Brennan e colaboradores, os animais adultos submetidos à incisão cirúrgica apresentaram hiperalgesia mecânica, que persistiu por vários dias (Brennan *et al.*, 1996). Foi verificado que a ativação das fibras C e A delta, em decorrência da incisão, persistiu por 24 horas, sendo que a atividade espontânea dessas fibras tem papel no comportamento de dor, contribuindo para hiperalgesia mecânica e amplificação da resposta central (Pogatzki *et al.*, 2002). É possível que os animais do grupo cirurgia tenham realizado menos atividade locomotora que os animais dos outros grupos em função dessa hiperalgesia.

5.7. Efeito da exposição ao modelo de cirurgia proposto sobre a resposta inflamatória produzida pela formalina em ratos juvenis.

Os animais foram operados aos 21 dias de idade. A sutura foi removida 24 horas após, e, três dias depois, foi feita a administração de salina ou formalina 1,25% nos animais dos três grupos, no membro posterior não-operado.

Houve aumento de volume nas patas injetadas com formalina, não havendo diferença entre os três grupos. Na primeira fase da resposta inflamatória houve efeito da formalina em todos os grupos, porém no grupo cirurgia a resposta foi exacerbada. Na segunda fase da resposta inflamatória apenas o grupo cirurgia apresentou resposta à formalina, enquanto os grupos controle e anestesia que receberam formalina tiveram resposta semelhantes àqueles animais que receberam salina.

Os dados sugerem que os animais submetidos ao procedimento cirúrgico foram mais sensíveis à inflamação que os controles. Alterações centrais decorrentes da ativação das fibras C e A δ podem ter ocorrido, de forma que a sensibilidade sistêmica tenha aumentado. Uma vez que as fibras C e A δ apresentam atividade persistente por 24 horas após a cirurgia, produzindo amplificação da resposta centrais (Pogatzki *et al.*, 2002), este pode ser o mecanismo responsável pela reação inflamatória contralateral exacerbada que foi aqui detectada.

5.8. Efeito de uma segunda manipulação cirúrgica sobre a medida de TFL e locomoção.

Nesse experimento, os animais foram operados aos 21 dias. Aos 45 dias de idade, foram subdivididos, de forma que metade dos animais de cada grupo fosse submetida à cirurgia. Sendo assim, um grupo de animais foi operado aos 21 dias de idade e, novamente, aos 45 dias. Foram feitas as medidas de TFL antes (basal) e trinta minutos após a cirurgia.

Observou-se resposta analgésica induzida pela primeira cirurgia, quer tenha sido realizada aos 21 dias de idade, quer tenha sido realizada aos 45 dias de idade. Porém, esse efeito não apareceu no grupo que foi submetido à segunda cirurgia.

A falta de efeito da cirurgia no grupo operado duas vezes provavelmente reflete a presença de fenômeno de longa duração induzido pela primeira incisão plantar. Isso corrobora resultados observados em estudos com seres humanos (Caumo, 2000; Caumo *et al.*, submetido a *Journal Clinical of Pain*, Peters *et al.*, 2005). No estudo de Caumo e colaboradores (2001), verificou-se que crianças submetidas a cirurgias quando bebês e, novamente, na idade entre 7 e 13 anos apresentavam mais dor pós-operatória que crianças da mesma idade submetidas à cirurgia pela primeira vez. No estudo de Peters e colaboradores (2005), foi verificada maior necessidade de fentanila no período intra-operatório e de morfina no período pós-operatório, em crianças de 3 anos que haviam sido submetidas a cirurgias antes dos 3 meses de idade no mesmo dermatomo, quando comparadas com crianças da mesma idade operadas pela primeira vez.

Alterações centrais podem ter ocorrido com os animais expostos à cirurgia aos 21 dias. Estas podem fazer com que, após a segunda cirurgia, não se consiga recrutar certos mecanismos de modulação. É possível que tenha ocorrido sensibilização central em consequência da exposição à dor pós-cirúrgica. Esse fenômeno, produzido por ativação de receptores glutamatérgicos NMDA no corno dorsal da medula espinhal, além de diminuir a eficácia de analgésicos opióides, por mecanismo já descrito anteriormente, também faz com que as células do corno dorsal se tornem mais responsivas aos estímulos, um fenômeno semelhante

à LTP (Ji *et al.*, 2003) que ocorre no hipocampo (Bliss e Collingridge, 1993; Bliss e Lomo, 1973).

Na sensibilização central, a despolarização é suficiente para remover o bloqueio de Mg²⁺ dos receptores NMDA, permitindo a entrada de Ca²⁺ na célula. Esta, por sua vez, ativa cascatas de segundos mensageiros, que, em última análise, promovem maior permeabilidade da célula ao Ca²⁺, fazendo com que a célula fique mais excitável. Talvez tenha ocorrido liberação de opióides endógenos decorrentes da cirurgia; porém, esses não foram capazes de ativar seus receptores ou de promover entrada de K⁺, o que faz com que o glutamato seja continuamente liberado. Para verificar essa possibilidade, mais estudos são necessários.

Quanto ao comportamento em campo aberto, não houve alteração nas latências para saída do primeiro quadrante. Isto sugere que os procedimentos anestésicos e cirúrgicos não determinaram maior ansiedade, mesmo sendo realizados por duas vezes nos mesmos animais. Por outro lado, os animais submetidos à cirurgia, seja por uma única vez, seja por duas vezes, apresentaram menor número de cruzamentos no campo aberto, sugerindo que o procedimento cirúrgico interfere com a atividade locomotora.

Existem dados na literatura mostrando alterações periféricas de longa duração após insultos nocivos. Exemplo que pode ser citado é profundo brotamento dos terminais sensoriais em local de lesão, levando à hiper-inervação, por efeito de injúria cutânea em rato neonato (Álvares *et al.*, 2000; Reynolds e Fitzgerald, 1995). Este efeito está associado a hipersensibilidade e diminuição de limiares mecânicos (*et al.*, 1999; Reynolds e Fitzgerald, 1995).

Também foi descrito efeito de longa duração da exposição à inflamação em animais neonatos (Ruda *et al.*, 2000; Tachibana *et al.*, 2001). Quando estes eram expostos a novo evento inflamatório na fase adulta, respondiam com hiperalgesia térmica exacerbada e com maior expressão de C-fos no lado ipsilateral do corno dorsal à re-inflamação. No experimento realizado nessa tese com o intuito de avaliar a atividade exploratória, não foi possível verificar se existia efeito de longa duração da exposição à cirurgia, sendo necessário para tanto mais estudos, apesar de os animais operados tanto aos 21 dias quanto aos 45 dias apresentarem menor locomoção, provavelmente em decorrência da dor determinada pela lesão plantar.

5.9. Discussão geral

Nesse trabalho de tese foi utilizado o modelo de dor pós-operatória de Brennan (1996) adaptado para ratos de 21 dias de idade.

Os animais utilizados nesse estudo recrutaram sistemas moduladores da dor e/ou desenvolveram analgesia induzida por estresse pós-cirúrgico, com papel predominante do sistema gabaérgico e parcial do sistema opióide. Porém, apresentaram hiperlagesia mecânica, uma das principais características da dor pós-operatória, em decorrência da ativação persistente das fibras C e A δ , que no modelo original (Brennan *et al.*, 1996) persistiu por vários dias. Além disso, os animais submetidos ao procedimento cirúrgico foram mais sensíveis ao insulto inflamatório. Essa maior sensibilidade pode ter sido determinada por modificações centrais, induzidas pela ativação das fibras C e A δ , que por sua vez tiveram

repercussões sistêmicas, já que o membro posterior inflamado não foi o mesmo da cirurgia.

A duração do efeito antinociceptivo, observado 30 minutos após a cirurgia, pode ser aumentada com administração de analgésico opióide morfina, porém se o mesmo fármaco é administrado 60 dias após a cirurgia a duração do efeito é menor, sugerindo alteração de longa duração produzida pela cirurgia no sistema opióide. Também foi observado surgimento de tolerância após sete dias de administração do fármaco, a contar do dia da cirurgia, independente dos animais terem sido submetidos ao procedimento.

Animais que foram expostos à cirurgia pela segunda vez não recrutaram o aumento de TFL observado na primeira exposição, sugerindo então efeito de longa duração da cirurgia sobre os sistemas moduladores da dor. Esse resultado corrobora o resultado anterior, onde se observa menor duração do efeito da morfina 60 dias após a cirurgia. Esses mesmos animais também apresentam hiperalgesia mecânica, porém não foi possível determinar se existe diferença entre animais expostos uma única vez ao procedimento e animais operados duas vezes.

De um modo geral, a exposição à cirurgia em ratos de 21 dias de idade produz alterações de longa duração na nocicepção e na analgesia opióide, sendo necessários mais estudos para elucidar a natureza dessas alterações.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. O modelo de cirurgia produziu aumento de latência de retirada da cauda em ratos de 21 dias, sugerindo que o procedimento cirúrgico pode desencadear os mecanismos de modulação da nocicepção e a analgesia induzida por estresse cirúrgico. Tal fenômeno apresentou rápido início (presente 30 minutos após a incisão) e curta duração (ausente após 60 min).
- 6.2. A administração de morfina não produziu analgesia adicional 30 min após a cirurgia, porém após 60 min o efeito analgésico persistiu apenas nos animais operados, sugerindo um somatório de efeitos: a ativação dos sistemas de neurotransmissores, desencadeados pela cirurgia, e o efeito analgésico próprio da morfina.
- 6.3. Animais submetidos à cirurgia, aos 21 dias desenvolvem tolerância à morfina após sete dias de administração, a contar do dia da cirurgia. Esse efeito não foi dependente da exposição prévia ao procedimento.
- 6.4. A duração do efeito da morfina, administrada agudamente 60 dias após a cirurgia, é menor em animais submetidos previamente a procedimento cirúrgico, em relação a animais controle, sugerindo efeito de longa duração da exposição à cirurgia sobre o sistema opióide.
- 6.5. Naloxona reverteu parcialmente o efeito analgésico da cirurgia. Já a picrotoxina reverteu completamente aquele efeito, sugerindo papel relevante para sistemas opióides e GABAérgico na analgesia observada em animais de 21 dias de vida submetidos à cirurgia.

- 6.6. Exposição à cirurgia alterou a atividade locomotora em campo aberto, em animais de 21 dias, sendo que essa repercussão provavelmente se deve à presença de lesão no membro posterior operado do animal.
- 6.7. Exposição prévia à cirurgia modificou a resposta inflamatória de ratos de 21 dias de idade, exacerbando-a.
- 6.8. A resposta nociceptiva à cirurgia é alterada pela exposição prévia ao mesmo procedimento cirúrgico, com intervalo de 24 dias (entre os dias 21 e 45 dias de vida). Analgesia induzida pela cirurgia, verificada por meio de teste de latência de retirada da cauda, não ocorre após o segundo procedimento.
- 6.9. Efeito de uma segunda exposição à cirurgia sobre a atividade locomotora em campo aberto foi similar ao observado após exposição única a procedimento cirúrgico.

7. REFERÊNCIAS

ALVARES D, TORSNEY C, BELAND B, REYNOLDS M, FITZGERALD M. Modelling the prolonged effects of neonatal pain. *Prog Brain Res* 129:365-73, 2000.

AMIR S, AMIT Z. Endogenous opioid ligands may mediate stress-induced changes in the affective properties of pain related behavior in rats. *Life Sci.* 23, 1143-1152, 1978.

ANAND KJS, CRAIG KD. New perspectives on definition of pain. *Pain* 67:3-6, 1998.

ARCHER DP, EWEN A, ROTH SH, SAMANANI N. Plasma, brain and spinal cord concentration of thiopental associated with hyperalgesia in th rat. *Anesthesiol* 80(1):168-176, 1994.

BACCEI ML, FITZGERALD M. Development of GABAergic and glycinergic transmission in the neonatal rat dorsal horn. *J Neurosci* 24(20):4749-4757, 2004.

BASBAUM AI, JESSELL TM. The perception of pain. In: KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM. , eds. *Principles of Neural Science*. Fourth Edition McGraw-Hill, p. 472-491. New York, 2000.

BAUMANN TJ, LEHMAN ME. Pain management. In: DIPIRO JT, TALBERT L, HAYES PE, YEE GC, POSEY LM, eds. Pharmacotherapy. A Pathophysiologic Approach. New York: Elsevier, 1989. p. 642-659.

BEAR MF, CONNORS BW, PARADISO MA. Neuroscience, Exploring The Brain. New York: Williams & Wilkins Publishers, p. 340-345, 1996.

BERARDI N, PIZZORUSSO T, MAFFEI L. Critical periods during sensory development. Curr Opin Neurobiol 10:138-145, 2000.

BERDE C. Anesthesia and analgesia. In: CLOHERTY JP, STARK AR , eds. Manual of neonatal care. Lippincott-Raven p.667-676. Philadelphia, 1998.

BERDE CB, ANAND KS, SETHNA NF. Pediatric pain management. In: GREGORY GA. Pediatric anesthesia. 2 ed. New York: Churchill Livingstone, vol. 2 p. 679-727, 1989.

BERDE CB, SETHNA NF. Drug therapy: analgesics for the treatment of pain in children. N Engl J Med 347:1094-1103, 2002.

BETZ H, GOMEZA J, ARMESEN W, SCHOLZE P, EULENBURG V. Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. Biochem Soc Trans 34(Pt1):55-58, 2006.

BIANCHIN M, WALZ R, RUCHEL AC, ZANATTA MS, DA SILVA RC, BUENO E SILVA M, PACKO N, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into hippocampus and/or amygdala several days after training. *Behav Neural Biol* 59:83-86, 1993.

BLISS TV, LOMO T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356, 1973.

BLISS TVP, COLLINGRIDGE L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39, 1993.

BRENNAN TJ, VANDERMEULEN EP, GEBHART GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* 64:493-501, 1996.

BRITTON DR, BRITTON KT. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. *Pharmacol. Biochem Behav* 15:577-582, 1981.

BROOKOFF D. Chronic pain: 2. The case for opioids. *Hosp Pract (Minneap)*. 15;35(9):69-72, 75-6, 81-4, 2000.

BUDAI D, LARSON AA. The involvement of metabotropic glutamate receptors in sensory transmission in dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci* 83: 571-580, 1998.

CARPENTER KJ, DICKENSON AH. Amino acids are still as exciting as ever? *Curr Opin Pharmacol* 1: 57-61, 2001.

CAUMO W, BROENSTRUB JC, FIALHO L, PETRY SMG, BRATHWAIT O, BANDEIRA D, LOGUERCIO A, FERREIRA MBC. Previous surgery as a risk factor for postoperative pain. Submetido à publicação em *Journal Clinical of Pain*.

CAUMO W, BROENSTRUB JC, FIALHO L, PETRY SMG, BRATHWAIT O, BANDEIRA D, LOGUERCIO A, FERREIRA MBC. Risk factors for postoperative anxiety in children. *Acta Anaesthesiol Scand* 44: 782-789, 2000.

CEPEDA MS, BONNEY I, MOYANO J, CARR DB. Corticotropin-releasing hormone (CRH) produces analgesia in a thermal injury model independent of its effect on a systemic beta-endorphin and corticosterone. *Reg Peptides* 118:39-43, 2004.

CESARE P, MCNAUGHTON A. Peripheral pain mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 7: 493-499, 1997.

CHARNEY DS, MIHIC JS, HARRIS RA. Hypnotics and sedatives. In: BRUNTON LL, LAZO JS, PARKER KL. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Eleventh Edition. New York, McGraw-Hill p.401-428, 2006.

COBEA - COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. São Paulo: H.A. Rothschild,. 259p., 1996.

D'AMATO FRD, MAZZACANE E, CAPONE F, PAVONE F. Effects of postnatal manipulation on nociception and morphine sensitivity in adult mice. *Dev Brain Res* 117:15-20, 1999.

D'AMOUR FE, SMITH DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72:74-79, 1941.

DAHLHAUS A, RUSCHEWEYH R, SANDKUHLER J. Synaptic input of rat spinal lamina I projection and unidentified neurons *in vitro*. *J Physiol* 566(Pt2):355-368, 2005.

DE LIMA, ALVARES D, HATCH DJ, FITZGERALD M. Sensory hyperinnervation following skin wounding: the effect os bupivacaine sciatic nerve blockade. *Br J Anaesth* 83:662-664, 1999.

EICH E, REEVES JL, JAEGER B, GRAFF-RADFORD SB. Memory for pain: relation between past and present pain intensity. *Pain* 23: 375-380,1985.

EVERS AS, CROWDER CM, BALSER JR. General anesthetics. In: BRUNTON LL, LAZO JS, PARKER KL. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Eleventh Edition. New York, McGraw-Hill p.341-368, 2006.

FALCON M, GUENDELLMAN D, STOLBERG A, FRENK H, URCA G.
Development of thermal nociception in rats. *Pain* 67:203-208, 1996.

FERREIRA MBC. Dor crônica. In: KAPCZINSKI F, QUEVEDO J, IZQUIERDO I.
Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos. Porto Alegre: Artes Médicas Sul,
p. 181-200, 2004.

FIELDS HL, BASBAUM AI. Central nervous system mechanisms of pain
modulation. In: WALL PD, MELZACK R, eds. *Textbook of Pain*. 3 ed. Edinburg:
Churchill Livingstone, 1994.

FITZGERALD M, ANAND KJS. Developmental neuroanatomy and
neurophysiology of pain. IN: Schechter NL, Berde CB, Yaster M (Eds): *Pain in
infants, children and adolescents*. Baltimore: Williams and Wilkins, 11-31, 1993.

FITZGERALD M, BEGGS S. The neurobiology of pain: developmental aspects.
Neuroscientist 7:246-257, 2001.

FITZGERALD M. The development of nociceptive circuits. *Nature Rev Neurosci*
6:507-520, 2005.

GAMARO GD, XAVIER MH, DENARDIN JD, PILGER JA, ELY DR, FERREIRA
MBC, DALMAZ C. The effects of acute and repeated restraint stress on the
nociceptive response in rats. *Physiol. Behav.* 63, 693-697, 1998.

GJERSTAD J, TJØLSEN A, HOLE K. Induction of long-term potentiation of single wide dynamic range neurones in the dorsal horn is inhibited by descending pathways. *Pain* 91: 263-268, 2001.

GODLEVSKII LS, KOBOLEV EV. The effect of L-DOPA and transcranial magnetic stimulation on behavioral reactions in kindled rats. *Neurosci Behav Physiol* 35(3):313-317, 2005.

GOLDIM JR, RAYMUNDO MM. *Pesquisa em saúde e direitos dos animais*. 2 ed. Porto Alegre: Hospital de Clínicas/Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação 30p, 1997.

GROSSBLATT N (ed): *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals*. Institute for Laboratory Animals Resources (ILAR). National Academy Press, Washington DC, 1996.

GUINSBURG R, PERES CA, ALMEIDA MFB, BALDA RC, BERENGUEL RC, TONELOTTO J, KOPELMAN BI. Differences in pain expression between male and female newborn infants. *Pain* 85:127-133, 2000.

IMBE H, IWAI-LIAO Y, SENBA E. Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. *Front Biosci* 11:2172-2192, 2006.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR STUDY OF PAIN (IASP): *Consensus*

development conference statement: the integrated approach to the management of pain. *J Accid Emerg Med* 6(3) document number 491-292, 1994.

JAKOWEC MW, FOX AJ, MARTIN LJ, KALB RG. Quantitative and qualitative changes in AMPA receptor expression during spinal cord development. *Neurosci* 67:893-907, 1995.

JI RR, KOHNO T, MOORE KA, WOOLF CJ. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 26(12):696-705, 2003.

JONES SE. Effect of psychological processes on chronic pain. *Brit J Nurs* 2: 463-467, 1993.

KANDEL ER, KUPFERMANN I, IVERSEN S. Learning and memory. IN: KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM, eds. *Principles of Neural Science*. Fourth Edition. McGraw-Hill, p. 1227-1246. New York, 2000.

KAWAMATA T, OMOTE K. Activation of spinal N-methyl-D-aspartate receptors stimulates a nitric oxide/cyclic guanosine 3,5-monophosphate/glutamate release cascade in nociceptive signaling. *Anesthesiology*; 91 1415-1424, 1999.

KO S, ZHUO M. Central plasticity and persistent pain. *Drug Discovery Today, Disease Models* 1:101-106.

LEVINE JD, FIELDS HD, BASBAUM AI. Peptides and the primary afferent nociceptor. *J Neurosc* 13: 2273-2286, 1993.

LEVINE JD, LAU W, KWIAT G, GOLETZ EJ. Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leucocytes. *Science* 225: 743-745, 1984.

LEVINE JD, TAIWO YO, COLLINS SD, TAM JK. Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals. *Nature* 323: 158-160, 1986.

LINTON SJ, SKEVINGTON SM. Psychological factors. In: CROMBIE IK, CROFT PR, LINTON SJ, LERESCHE L, KORFF MV, eds. *Epidemiology of Pain*. New York: IASP Press p. 25-42, 1999.

LISTER RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmac Ther* 46:321-340, 1990.

LIU JG, ROVNAGHI CR, GARG S, ANAND KJS: Hyperalgesia in young rats associated with opioid receptor desensitization in the forebrain. *Eur J Pharmacol* 491:127-136, 2004.

LIU XG, SANDKÜHLER J. Activation of spinal N-methyl-D-aspartate or neurokinin receptors induces long-term potentiation of spinal C-fibre-evoked potentials, *Neuroscience* 86: 1209-1216, 1998.

LOESER JD, BUTLER SH, CHAPMAN CR, TURK DC, eds. *Bonica's Management of Pain*. 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

LOFTIS JM, JANOWSKY A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation and clinical implications. *Pharmacol Ther* 97:55-85, 2003.

LÖNNQVIST PA, MORTON NS. Postoperative analgesia in infant and children. *BJA* 95(1):59-68, 2005.

LÓPEZ JF, AKIL H, WATSON S. Neural circuits mediating stress. *Biol Psychiatry* 86:1461-1471, 1999.

MAIONE S, OLIVA P, MARABESE I, PALAZZO E, ROSSI F, BERRINO L, FILIPPELLI A. Periaqueductal gray matter metabotropic glutamate receptors modulate formalin-induced nociception. *Pain* 85: 183-189, 2000.

MARBACH JJ. Orofacial phantom pain: theory and phenomenology. *JADA* 127: 221-229, 1996.

MARKENSON JA. Mechanisms of chronic pain. *Amer J Med* 101: 06-18, 1996.

MARSH, DF, HATCH, DJ, FITZGERALD, M. Opioid systems and the newborn. *Br J Anesth* 79:787-795, 1997.

MELZACK R, WALL PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150: 971-978, 1965.

MENENDEZ L, TRELLES FA, HIDALGO A, BAAMONDE A. Opioid footshock-induced analgesia in mice acutely falls by stress prolongation. *Physiol Behav* 53:1115-1119, 1993.

MILLAN MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 66(6):355-474, 2002.

MÖGENSEN T, VEGGER P, JONSSON T, MATZKE AE LUND C, KEHLET. Systemic piroxicam as adjunct to combined epidural bupivacaine and morphine for postoperative pain relief: a double-blind study. *Anesth Analg*, 74:366-370, 1992.

MONYER H, BURNASHEV N, LAURIE DJ, SAKMANN B, SEEBURG PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540, 1994.

MORGAN GE, MIKHAIL MS. Pain management. In: MORGAN GE, MIKHAIL MS, eds. *Clinical Anesthesiology*. 2ed. Stamford: Appleton & Lange, . p. 274-316, 1996.

MORTON NS. Development of paediatric pain perception. In: MORTON NS,. *Acute Pediatric pain Management: a practical guide*. London, WB Saunders p.13-31, 1998.

NETTO CA, SIEGFRIED B, IZQUIERDO I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of a concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol* 48:304-309, 1987.

NISHIYAMA T. Interaction between intrathecal morphine and glutamate receptor antagonists in formalin test. *Eur J Pharmacol* 395: 203-210, 2000.

NUNES I, SANTOS C, FORTUNATO MS. Bases moleculares da tolerância aos opióides. *Revista Portuguesa de Psicossomática*,7(1,2):163-178, 2005.

OKUDA K, SAKURADA C, TAKAHASHI M, YAMADA T, SAKURADA T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. *Pain* 92:107-115, 2001.

PATTINSON D, FITZGERALD M. The neurobiology of infant pain: development of excitatory and inhibitory neurotransmission in the spinal dorsal horn. *Reg Anesth Pain Med* 29 (1):36-44, 2004.

PETERS JW, SCHOUW R, ANAND KJ, VAN DIJK M, DUIVENVOORDEN HJ, TIBBOEL D. Does neonatal surgery lead to increased pain sensitivity in later childhood? *Pain* 114(3):444-54, 2005.

PLEUVRY BJ, LAURETTI GR. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacol Ther* 71: 313-324, 1996.

POCKETT S. Spinal cord synaptic plasticity and chronic pain. *Anesth Analg* 80: 173-179, 1995.

POGATZKI EM, GEBHART GF, BRENNAN TJ. Characterization of Ad and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. *J Neurophysiol* 87:721-731, 2002.

POGATZKI EM, ZAHN PK, BRENNAN TJ. Effect of pretreatment with intrathecal excitatory amino acid receptor antagonist on the development of pain behavior caused by plantar incision. *Anesthesiol* 93:489-496, 2000.

PORTER NM, TWIMAN RE, UHLER MD, MACDONALD RL. Cyclic AMP-dependent kinase decreases GABAA receptor current in mouse spinal neurons. *Neuron* 5:789-796, 1990.

QUINTERO L, MORENO M, AVILA C, ARCAYA J, MAIXNER W, SUAREZ-ROCA H. Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. *Pharmacol Biochem. Behav.* 67, 449-458, 2000.

RANDIC M, JIANG MC, CERNE R. Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci*

13:5528-5241, 1993.

REYNOLDS ML, FITZGERALD M. Long-term sensory hyperinnervation following neonatal skin wounds. *J Comp Neurol.* 7, 358(4):487-98, 1995.

RIRIE DG, VERNON LT, TOBIN JR, EISENACH JC. Age-dependent responses to thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in a rat model of acute postoperative pain. *Anesthesiol* 99:443-448, 2003

RUDA MA, LING QDHOHMAN AG, PENG YB TACHIBANA T. Altered nociceptive neuronal circuits after neonatal peripheral inflammation. *Science* 289:628-630.

RYGH LJ, SVENDSEN F, HOLE K, TJØLSEN A. Natural noxious stimulation can induce long-term increase of spinal nociceptive responses. *Pain* 82: 305-310, 1999.

SANDKÜHLER J. Learning and memory in pain pathways. *Pain* 88:113-118, 2000.

SHAVIT Y, WEIDENFELD J, DeKEYSER FG, FISH G, MAYBURD E, MEERSON Y, BEILIN B. Effects of surgical stress on brain prostaglandin E2 production and on the pituitary-adrenal axis: attenuation by preemptive analgesia and by central amygdala lesion. *Brain Res* 1047:10-17, 2005.

SIEGFRIED B, NETTO CA, IZQUIERDO I. Exposure to novelty induces

naltrexone-reversible analgesia in rats. *Behav. Neurosci.* 101, 436-438, 1987.

SILVA E, HERNANDEZ L, CONTRERAS Q, GUERRERO F, ALBA G. Noxious stimulation increases glutamate and arginine in the periaqueductal gray matter in rats: a microdialysis study. *Pain* 87: 131-135, 2000.

SJOSTROM B, DAHLGREN LO, HALJAMAE L. Strategies used in postoperative pain assessment and their clinical accuracy. *J Clin Nurs* 9:111-118, 2000.

SOUTHWICK SM, YEHUDA R, MORGAN CA. Clinical Studies of neurotransmitters alterations in pos-traumatic stress disorder. IN: Friedman MJ, Charney DS (eds): *Neurobiological and cinical consequences of stress: from normal adaptation to PTSD*. New York: Lippincott-raven Publishers 335-349, 1995.

STAMER UM, MPASIOS N, MAIER C, STUBER F. Postoperative analgesia in children--current practice in Germany. *Eur J Pain* 9(5):555-60, 2005.

STEGENGA SL, KALB RG. Developmental regulation of N-methyl-D-aspartate- and kaynate-type glutamate receptor expression in the rat spinal cord. *Neurosci* 105:499-507, 2001.

SURESH S, ANAD KJS. Opioid tolerance in neonates: a state-of-the-art review. *Paed Aanaesth* 11:511-521, 2001.

TACHIBANA T, LING QD, RUDA MA. Increased Fos induction in adult rats that experienced peripheral inflammation. *Neuroreport* 12:925-927, 2001.

TAENZER P, MELZACK R, JEANS ME. Influence of psychological factors on postoperative pain, mood, and analgesic requirements. *Pain* 24: 331-342, 1986.

TAI SK, HUANG FD, MOOCHHALA S, KHANNA S. Hippocampal state in relation to formalin nociception. *Pain* 121:29-42, 2006.

TAIWO YO, LEVINE JD. Contribution of guanine nucleotide regulatory proteins to prostaglandin hyperalgesia in the rat. *Brain Res* 492: 397-399, 1989.

TAIWO YO, LEVINE JD. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. *Neuroscience* 48: 485-490, 1991.

TATSUO MA, YOKORO CM, SALGADO JV, PESQUERO SM, SANTANA MA, FRANCISCH JN. Hyperalgesic effect induced by barbiturates, midazolam and ethanol: pharmacological evidence for GABA_A receptor involvement. *Braz J Med Biol Res* 30(2):251-256, 1997.

TORRES ILS, CUCCO SNS, BASSANI M, DUARTE MS, SILVEIRA PP, VASCONCELLOS AP, TABAJARA AS, DANTAS G, FONTELLA FU, DALMAZ C, FERREIRA MBC: Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats: effect of morphine administration. *Neurosci Res* 45:277-283, 2003.

TSENG LF, TANG R. Different mechanisms mediate beta-endorphin- and morphine-induced inhibition of the tail flick response. *J Pharmacol Exp Ther* 252(2):546-551, 1990.

TVESRKOY M, OZ Y, ISAKSON A, FINGER J, BRADLEY EL, KISSIN I. Preemptive effect of fentanyl and ketamine on postoperative pain and wound hyperalgesia. *Anesth Analg* 78:205-209, 1994.

VACARINO AL, KASTIN AJ. Endogenous opiates. *Peptides* 22:2257-2328, 2000.

VAN PRAAG H, FRENK H. The development of stimulation-produced analgesia (SPA) in the rat. *Dev Brain Res* 64:71-76, 1991.

VANDERMEULEN EP, BRENNAN TJ. Alterations in ascending dorsal horn neurons by a surgical incision in the rat foot. *Anesthesiol* 93:1294-1302, 2000.

WALL PD, MELZACK R. *Textbook of pain*. 3ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 1524 p. 1994.

WANG Y, MITCHELL J, MORIYAMA K, KIM KJ, SHARMA M, XIE GX, PALMER PP. Age-dependent morphine tolerance development in the rat.. *Anesth Analg*. 2005 100:1733-1739.

WATKINS LR, MAYER DJ. Multiple endogenous opiate and non-opiate analgesia

systems: evidence of their existence and clinical implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 467, 273-299, 1986.

WAXHAM NM. Neurotransmitter receptor. In: ZIGMOND MJ, BLOMM FL, LANDIS SC, ROBERTS JL, SQUIRE LR, eds. *Fundamental Neuroscience*. New York: McGraw-Hill p. 235-268, 1999.

WOOLF CJ. Windup and central sensitization are not equivalent. *Pain* 66: 105-108, 1996.

YAMAMOTO T, SAITO O, SHONO K, TANABE S. Effects of intrathecal and i.c.v. administration of neuropeptide W-23 and neuropeptide B on the mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve ligation in rats. *Neurosci* 2005 Nov 10 (Epub ahead of print).

ZAHN PK, GYSBERS D, BRENNAN TJ. Effect of systemic and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiol* 86:1066-1077, 1997.

ZAHN PK, SLUKA KA, BRENNAN TJ. Excitatory amino acid release in the spinal cord caused by plantar incision in the rat. *Pain* 100:65-76, 2002.

ZAHN PK, UMALI E, BRENNAN TJ. Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonist inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. *Pain* 74:213-223, 1998.