

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

**ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE MORFINA EM RATOS INFANTES: EFEITOS EM  
CURTO, MÉDIO E LONGO PRAZOS NAS ATIVIDADES NOCICEPTIVA,  
COMPORTAMENTAL E ECTONUCLEOTIDÁSICAS.**

**JOANNA RIPOLL ROZISKY**

ORIENTADORA

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Iraci Lucena da Silva Torres

CO-ORIENTADOR

Prof<sup>o</sup> Dr. João José Freitas Sarkis

*In Memorium*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2008

Àqueles que são tudo em minha vida:  
meus pais e minha irmã,  
que mesmo distante me apoiaram em todos os momentos.  
Obrigada por me fazerem tão feliz!

*Concedei-me Senhor,  
Serenidade necessária para aceitar as coisas que  
não posso modificar,  
Coragem para modificar aquelas que posso e  
Sabedoria para distinguir umas das outras.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre, por colocar as oportunidades em meu caminho e me dar capacidade para transpor as dificuldades.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Iraci Lucena da Silva Torres, meu especial agradecimento, pelo constante apoio, confiança, paciência, e principalmente por acreditar em minha capacidade.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr João José Freitas Sarkis, que não está mais presente... Obrigada pela oportunidade, confiança, respeito e pelos conhecimentos que compartilhou comigo. Nunca vou esquecer.

Ao meu pai, Gilson, que sempre abdicou de seus sonhos para realizar os meus. Obrigada pela educação, apoio, amor, fundamentais para minha formação moral.

À minha mãe, Sandra Helena, pela intensa preocupação e dedicação. Obrigada pelo seu infinito amor e carinho. E principalmente, obrigada por ser sua filha!

À minha irmã, Renata, que mesmo distante sempre acreditou em mim e me incentivou em todas as horas.

Ao meu namorado, Douglas, pelo amor, amizade e companheirismo. Obrigada por existires em minha vida.

À minha tia Maria Alice, por ser a primeira pessoa a me acolher em Porto Alegre, e por sempre acreditar e torcer por mim.

Aos alunos de iniciação científica Janaína, Viviane, Luciana e Alberto, pela boa convivência, entusiasmo e colaboração. Em especial a Lauren (Japa), que esteve presente em todos os momentos deste trabalho, obrigada pela amizade e dedicação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial à Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Beatriz Cardoso Ferreira, pela amizade, por me adotar no laboratório e acreditar em mim.

Aos amigos Cláudia Bruscatto, Alexandre Perla e Luciane Vieira, pelos bons momentos de descontração e risadas no laboratório de Neuropsicofarmacologia da Ufrgs.

À amiga-irmã Giovana Dantas, por me dar oportunidade de te acompanhar e de te ajudar nos experimentos do teu doutorado. Aprendi muito contigo!

Aos colegas do lab. 24 do Departamento de Bioquímica em especial à Denise, por me ajudar em todos os experimentos com as enzimas, à Cristina, Dani, Bárbara e Vanessinha pela amizade.

Às Prof<sup>as</sup> Dra. Rosane Silva, Dra. Carla Denise Bonan, da PUCRS, pela amizade, incentivo, oportunidade e por me ajudarem em todos os momentos, mesmo antes do mestrado.

Aos funcionários do Biotério Dona Geni (CREAL), Valeri, Tina e Taís do Biotério do Departamento de Bioquímica.

A todos os professores, colegas e funcionários do PPG, em especial às secretárias Simone e Cléia.

Ao CNPq pela bolsa e pelo financiamento do projeto.

A Fapergs e Propesq pelas bolsas de iniciação científica às alunas que participaram deste trabalho.

A todos que de alguma maneira direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	1
1. RESUMO.....	2
2. ABSTRACT.....	3
3. LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
4. INTRODUÇÃO.....	6
4.1. DOR.....	6
4.1.1 Contexto Histórico.....	6
4.1.2 Dor e Nocicepção.....	8
4.1.3 Transmissão do Estímulo Nociceptivo.....	10
4.1.4 Desenvolvimento Neurobiológico da Dor.....	12
4.2. SISTEMA OPIÓIDE.....	14
4.2.1 Sistema Opióide Endógeno e Receptores.....	14
4.2.2 Dor e Morfina em Neonato.....	16
4.3. SISTEMA PURINÉRGICO.....	19
4.3.1 O papel das Purinas e dos Purinoceptores no Sistema Nociceptivo.....	19
4.3.2 Morfina e adenosina.....	20
4.3.3 Ectonucleotidasas.....	21
5. OBJETIVOS.....	25

<b>PARTE II.....</b>	<b>26</b>
1. CAPÍTULO I.....	27
<p>Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life. Artigo submetido para publicação na revista <i>International Journal of Developmental Neuroscience</i>.</p>	
2. CAPÍTULO II.....	47
<p>Neonatal morphine exposure alters the behavior and nociception in young and adult rats. Artigo submetido para publicação na revista <i>Behavioural Brain Research</i>.</p>	
3. CAPÍTULO III.....	77
<p>Neonatal morphine exposure alters the ectonucleotidase activities from spinal cord and cerebral cortex synaptosomes of rats. Artigo a ser submetido para publicação na revista <i>Pharmacology Biochemistry and Behavior</i>.</p>	
<b>PARTE III.....</b>	<b>98</b>
1. DISCUSSÃO.....	99
2. CONCLUSÕES.....	110
3. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	112
REFERÊNCIAS.....	113
DIVULGAÇÃO.....	133

## **PARTE I**



## 1. RESUMO

O estudo do sistema opióide no neonato tem sido freqüentemente pesquisado. Os neonatos rotineiramente experimentam dor aguda e crônica causada por procedimentos invasivos em UTI pediátrica e freqüentemente não recebem analgesia adequada. Entretanto, o uso da analgesia opióide vem aumentando nas últimas décadas em consequência das mudanças e avanços na compreensão, na identificação e no tratamento da dor em crianças. Entretanto, ainda existe uma carência em estudos de seus efeitos específicos sobre uma administração em longo prazo nestes pacientes. Adicionalmente, alguns estudos têm demonstrado que a exposição às drogas logo após o nascimento pode ter implicações duradouras no sistema nervoso, e que a exposição à morfina pode influenciar no desenvolvimento e na função de alguns sistemas do neurotransmissores. Existem múltiplos sistemas espinhais que modulam a neurotransmissão nociceptiva no corno dorsal. Propõe-se que a adenosina extracelular esteja envolvida no controle fisiológico da dor a nível espinal e na ação antinociceptiva opióide. Por outro lado, o ATP é um neurotransmissor liberado dos terminais nervosos sensoriais aferentes para atuar na circuitaria central da dor. Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por E-NTPDase e por 5' nucleotidase. Esta cascata enzimática apresenta dupla função: remover o sinal do ATP e gerar um segundo, adenosina. Esta dissertação teve como objetivos: investigar o efeito da administração repetida da morfina de P8 até P14 nas respostas nociceptiva, inflamatória, comportamental e na atividade das ectonucleotidasas em medula espinhal e córtex de ratos em P16, P30 e P60. Além disso, avaliar o efeito de uma segunda exposição repetida de morfina por 7 dias em P80 na resposta nociceptiva, inflamatória e comportamental. Os animais que receberam a morfina por sete dias em P14 não desenvolveram tolerância, porém, quando avaliados em P80, demonstraram maior analgesia da morfina (administração aguda), e após 7 dias de administração diária de morfina (P86), desenvolveram o clássico fenômeno da tolerância. No teste da formalina, observou-se aumento na resposta nociceptiva em P30 e em P60, mas não em P16. No desempenho no campo aberto os animais apresentaram alteração de alguns comportamentos, tais como aumento de *grooming* em P16, e aumento de *rearing* e locomoção em P30. Em P88, o grupo que recebeu a morfina diariamente (de P80 até P86) apresentou aumento de *rearing*. Nas atividades das E-NTPDases, observou-se em P16 um aumento na atividade de hidrólise do ATP em sinaptossomas de córtex cerebral, e uma diminuição na atividade de hidrólise do ADP em sinaptossomas de medula espinhal. Nas demais idades avaliadas (P30 e P60) não foram observadas diferenças nas atividades de hidrólises dos nucleotídeos de ambas as estruturas analisadas. O limiar nociceptivo mais elevado observado no teste da formalina pode ser devido a neuroplasticidade na circuitaria nociceptiva, tais como em neurotransmissores excitatórios em nível espinal. As alterações comportamentais observadas sugerem que a exposição à morfina, logo após o nascimento, pode desencadear, a curto e longo prazo, fenômenos tais como sensibilização comportamental. Em conclusão, estes resultados indicam que a exposição à morfina durante a segunda semana de vida pode promover aumento na resposta nociceptiva e alterações comportamentais que perderam ao longo da vida. Os efeitos observados após exposição repetida à morfina em animais podem colaborar com o entendimento de conseqüências clínicas decorrentes da administração em longo prazo de opióides. Adicionalmente, estes resultados sugerem a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que abordem diferentes sistemas de neurotransmissores objetivando neutralizar tais adaptações comportamentais induzidas pela morfina. Os resultados nas atividades de E-NTPDases destacam a importância do sistema purinérgico de ratos infantis submetidos à exposição repetida da morfina. Essas alterações enzimáticas podem constituir um dos mecanismos responsáveis pelos efeitos secundários da retirada opióide.

## 2. ABSTRACT

The study of the opioid system in the newborn has been frequently researched. The newborns routinely experiencing acute and chronic pain caused by invasive procedures in pediatric ICU and often do not receive adequate analgesia. However, the use of opioid analgesia has been increasing in recent decades as a consequence of changes and advances in the understanding, in the identification, and treatment of pain in children. However, there is still a lack of knowledge on their specific effects in a long-term administration for this population of patients. Additionally, some studies have shown that exposure to drugs soon after birth may have lasting implications in the nervous system, and that exposure to morphine can influence the development and function of some systems of neurotransmitters. There are multiple systems that modulate the spinal nociceptive neurotransmission in the dorsal horn. It has been proposed that the extracellular adenosine is involved in the physiological control of pain in spinal and action antinociceptiva opioid. Moreover, the ATP is a neurotransmitter released from sensory afferent nerve terminals to act in the central circuitaria of pain. The extracellular nucleotides can be hydrolysed by E-NTPDase and by 5' nucleotidase. This enzyme cascade presents dual function: remove the signal from the ATP and generating a second, adenosine. This dissertation had the following objectives: to investigate the effect of repeated administration of morphine from P8 to P14 in nociceptive responses, inflammatory, and behavioral activity ectonucleotidases in the cortex and spinal cord of rats in P16, P30, P60. Moreover, to evaluate the effect of one second repeated morphine exposition per 7 days in P80 in the nociceptive, inflammatory and behaviour response. Animals that received the morphine for seven days in P14 did not develop tolerance, but when evaluated in P80, showed greater the morphine analgesia (acute administration), and after 7 days of daily administration of morphine (P86), developed the classic phenomenon of tolerance. In the formalin test, it was observed increase in response to nociceptive P30 and P60 but not on P16. In performing in the open field the animals showed some change in behavior, such as increased grooming in P16, and increase of rearing and locomotion in P30. At P88, the group that received the morphine daily (from P80 to P86) showed increase of rearing. On the E-NTPDases activities were observed at P16 increase in the activity of hydrolysis of ATP in sinaptossomas of cerebral cortex, and a decrease in the activity of ADP in the hydrolysis of sinaptossomas spinal cord. In other ages evaluated (P30 and P60) it was not observed differences on nucleotides hydrolysis activity from both structures.analyzed. The higher threshold nociception observed in the test of formalin can be due to neuroplasticidade in circuitaria nociceptive, such as neurotransmitters in excitatórios in spinal level. The behavioural changes suggest that exposure to morphine, soon after birth, can trigger in the short and long term, phenomena such as behavioral sensitization. In conclusion, these results indicate that exposure to morphine during the second week of life may promote increase in response nociceptive and behavioural changes that have lost their lifetime. These behavioural changes indicate the need for the evaluation of the clinical consequences of long-term opioid administration. Additionally, these results suggest the need for development of research that address different systems of neurotransmitters aiming neutralize the behavioral changes induced by opioid. AThe findings on the E-NTPDases activities highlight the importance of purinergic system of young rats submitted to the repeated morphine exposure. These alterations activities may constitute one of the mechanisms that mediate the development of some of the side effects, such as opioid withdrawal, associated with repeated morphine exposure in early life.

### 3. LISTA DE ABREVIATURAS

ADP = adenosina 5' difosfato

AMP = adenosina 5' monofosfato

ATP = adenosina 5' trifosfato

AMPA = ácido  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

ANOVA = Análise de Variância (*Analysis of Variance*, em inglês)

ATP = adenosina trifosfato

E-NPP = Ecto-nucleotídeo pirofosfato/fosfodiesterase

E-NTPDase = Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

GABA = ácido- $\gamma$ -aminobutírico

i.p. = intraperitoneal

LTP = Potenciação de longa duração (*Long-term Potentiation*, em inglês)

NAP = neurônio aferente primário

NAS = neurônio aferente secundário

NMDA = N-metil-D-aspartato

P0 = dia do nascimento

P7 = 7º dia pós-natal

P8 = 8º dia pós-natal

P10 = 10º dia pós-natal

P14 = 14º dia pós-natal

P16 = 16º dia pós-natal

P30 = 30º dia pós-natal

P60 = 60º dia pós-natal

P79 = 79° dia pós-natal

P80 = 80° dia pós-natal

P86 = 86 ° dia pós-natal

P88 = 88° dia pós-natal

RN = recém nascido

s.c. = subcutânea

SEM = erro padrão da média (*standard error of the mean*, em inglês)

SN = sistema nervoso

SNC = sistema nervoso central

SNP = sistema nervoso periférico

TFL = latência para retirada da cauda (*Tail Flick Latency*, em inglês)

UDP = uridina 5' difosfato

UTIs = Unidades de Terapia Intensiva

## 4. INTRODUÇÃO

### 4.1 DOR

#### 4.1.1 Contexto Histórico

A dor é estudada desde o início da humanidade e continua sendo objeto de esforço onipresente no que se refere ao seu entendimento e controle. Existem evidências de que os humanos sofrem com esse mal há milhares de anos (Bonica e Loeser, 2001). A descoberta de esqueletos pré-históricos demonstra os sinais de enfermidades dolorosas, nos fornecendo evidências do “começo da via dolorosa” humana (Bonica e Loeser, 2001). Aparentemente, os humanos primitivos tiveram pouca dificuldade em entender a dor associada com injúria accidental. Eles a tratavam por meio de massagem na região dolorosa ou expondo-a a água de rios e após ao calor do sol, e por último ao calor do fogo (Keele, 1957). Pressões também eram feitas para adormecer a parte dolorosa e assim diminuir a dor. Provavelmente, nesta época, os humanos aprenderam que a pressão sobre certas regiões (nervos e artérias) tem um efeito mais pronunciado, embora eles não soubessem como (Fulop-Mueller, 1938; Keele, 1957). A causa de enfermidades dolorosas estava relacionada com a intrusão de magias e maus espíritos no corpo. O tratamento consistia em afugentar os espíritos com amuletos e feitiços similares. Em algumas sociedades a pele era tatuada com sinais de exorcismo para manter estes maus espíritos longe do corpo (Bonica e Loeser, 2001). Ainda em tempos primitivos, ervas que serviam como alimentos também eram utilizadas para o alívio da dor. Alguns arquivos relatam o uso de plantas analgésicas como a papoula, mandágora e cânhamo (maconha). As primeiras descobertas deste uso ocorreram na Babilônia em 2.250 anos antes de Cristo. Papiro de Ebres escreveu em

aproximadamente 1.550 anos antes de Cristo a Farmacopéia Egípcia, com muitas prescrições para o uso do ópio, principalmente para o alívio da dor de cabeça. Harvey, em 1628, descobriu a corrente sangüínea e acreditava que o coração era o sítio da sensação de dor. Mas em 1664 foi publicado um livro de Descartes, *L'Homme* (Homem), no qual ele considera o cérebro como o local de sensação e função motora. Este conceito ficou conhecido como a Teoria da Especificidade (Bonica e Loeser, 2001). Na mesma época surgiu a Teoria Intensiva, sugerida por Darwin: “a dor resulta do estímulo excessivo através do toque”. Em 1894, Goldscheider desenvolveu uma teoria em que relaciona as determinantes críticas da dor: a intensidade do estímulo e o somatório central. A última teoria descrita e, portanto, a mais utilizada é a Teoria da Comporta por Melzack e Wall. Eles sugerem que a dor não é causada pela atividade neural que reside em trajetórias nociceptivas consideradas específicas para a dor, mas é o resultado da atividade de várias ações dos sistemas neurais, cada um com sua própria função especializada (Melzack e Wall, 1965). Em 1982, eles modificaram sua teoria para incluir as informações adquiridas desde a proposta original (Melzack e Wall, 1982). Esta teoria tem demonstrado ser a mais importante no campo de pesquisa da dor.

Durante o século XIX significantes avanços ocorreram no campo da terapia da dor. O mais importante foi o isolamento da morfina a partir do ópio por Seturner em 1806. Após, outras técnicas foram desenvolvidas para o isolamento de outros alcalóides do ópio, como por exemplo, a codeína em 1832. Em 1846, Rynd e Wood desenvolveram a agulha e a seringa, o que possibilitou o uso de injeções de analgésicos. Em 1884, Karl Koller demonstrou a potência analgésica da cocaína, a qual começou a ser utilizada para procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos. Ainda, durante o século XIX, outras terapias para o alívio da dor foram desenvolvidas como, por exemplo, a eletroterapia, hidroterapia, termoterapia, as quais são amplamente utilizadas até os dias de hoje (Bonica e Loeser, 2001).

#### 4.1.2 Dor e Nociceção

A dor é comum a muitos quadros clínicos, sendo provavelmente a razão mais freqüente de procura de auxílio médico. Segundo estatísticas americanas, um terço da população experimenta dor que requer atenção médica e, em quase 50 milhões de pessoas, determina incapacitação total ou parcial. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for Study of Pain – IASP*, 1983) 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). A partir deste conceito distinguem-se dois componentes envolvidos na dor: a sensação dolorosa propriamente dita ou nociceção, e a reatividade emocional à dor. Esta definição bem conhecida abrange a natureza multidimensional da dor, a qual é constituída pelos componentes: motivacional, cognitivo, afetivo e discriminativo (Curro, 1987). O componente motivacional corresponde à manifestação de fuga, sendo uma reação reflexa do indivíduo. O componente cognitivo envolve a memória da experiência dolorosa pessoal, e exemplos do componente afetivo são: medo, ansiedade e estresse. O componente discriminativo representa a resposta do Sistema Nervoso Central (SNC) ao estímulo nocivo, e inclui início, duração, intensidade, qualidade e localização da dor. A reatividade emocional à dor corresponde a interpretação afetiva da dor, de caráter individual e influenciada por estados ou traços psicológicos, experiências prévias e fatores sociais, culturais e ambientais (Taenzer *et al.*, 1986; Jones, 1993; Wall e Melzack, 1994).

O termo nociceção, derivado de *noci* (dano ou lesão em latim), é usado para descrever a resposta neural aos estímulos nocivos. Refere-se à atividade do sistema nervoso aferente induzida por tais estímulos, que podem ser exógenos (mecânicos, químicos, físicos e biológicos) ou endógenos (inflamação, aumento do peristaltismo, isquemia cerebral).

Compreende recepção dos estímulos por receptores específicos, condução até o SNC através das vias sensoriais e a integração da sensação dolorosa em níveis talâmico e cortical (Loeser *et al.*, 2001; Ferreira e Torres, 2004). A dor é sempre uma manifestação subjetiva. Em experimentos com animais fala-se de nocicepção. Em termos clínicos toda nocicepção produz dor, mas nem toda dor resulta de nocicepção. Alguns pacientes apresentam o sintoma na ausência de estímulos nocivos. A intensidade da dor não necessariamente corresponderá à extensão da lesão. Há pessoas que suportam grandes lesões sem praticamente se queixarem de dor e há aqueles que reagem exageradamente mesmo a pequenos ferimentos (Basbaum e Jessel, 2000).

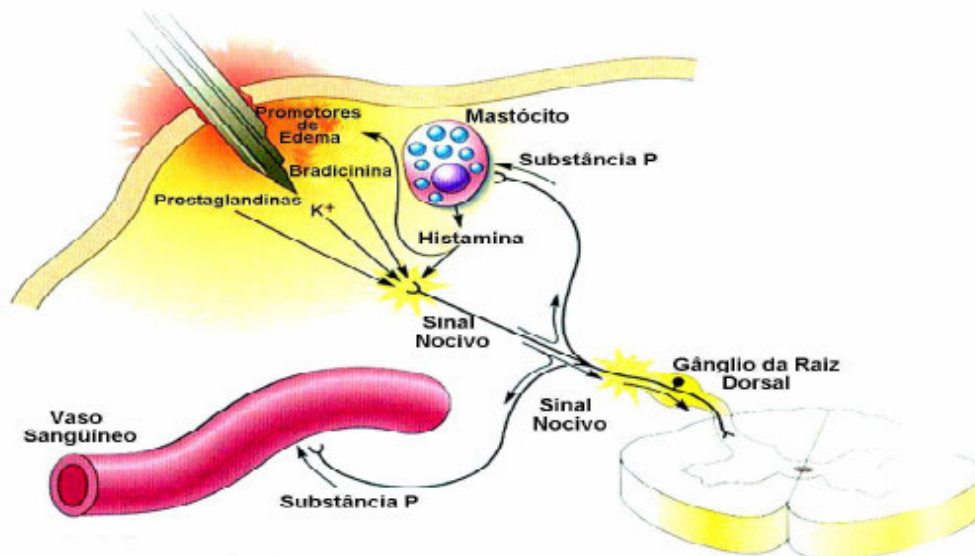
Os estímulos nociceptivos, juntos à experiência subjetiva da dor, servem pra proteger os tecidos lesionados. Sob diferentes circunstâncias, os tecidos são protegidos por reflexos de retirada da região afetada para longe do fator agressor. Esta relação com os comportamentos de injúria – fuga permite pensar que a dor é uma correlação perceptiva das respostas provocadas pelos estímulos dolorosos (Fields e Basbaum, 1994).

A dor pode ser classificada em aguda ou crônica. A dor aguda representa uma resposta nociceptiva à agressão, e pode ser causada por traumas, doenças subjacentes ou alterações funcionais musculares ou viscerais. Na maioria dos casos, cessa em alguns dias ou semanas, com a administração de analgésicos. Mas, se persistir diz-se que a dor é crônica. Conforme alguns autores, a dor crônica pode variar de um a seis meses (Loeser *et al.*, 2001; Morgan e Mikhail, 1996) e pode resultar desde a excitabilidade das fibras nervosas aferentes até mudanças no fenótipo celular, como a expressão de novas moléculas, incluindo enzimas, neurotransmissores e receptores (Loeser *et al.*, 2001). A dor crônica associada a disfunções do SNC e Sistema Nervoso Periférico (SNP) é chamada de dor neuropática. Ocorre após lesão de nervo periférico ou lesão ou perda de neurônios medulares podendo estar associada a doenças neurodegenerativas.



### 4.1.3 Transmissão do Estímulo Nociceptivo

A percepção de estímulos nocivos ocorre por meio da ativação de receptores sensoriais especializados – os nociceptores, terminações nervosas periféricas de fibras nervosas sensoriais que conduzem impulsos elétricos até a medula espinhal. Tais fibras são os axônios de neurônios aferentes primários (NAP), localizados no corno dorsal da medula espinhal (Loeser *et al.*, 2001). Os nociceptores são classificados em 3 tipos, de acordo com o estímulo doloroso recebido: a) térmicos: são ativados por temperaturas extremas (maiores que 45°C e menores que 5°C) e formados por fibras A $\delta$  (A delta), as quais conduzem o impulso elétrico rapidamente; b) mecânicos: são ativados por pressão intensa e formados por fibras A $\delta$ ; c) polimodais: são ativados por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos de alta intensidade, e formados por fibras C, as quais conduzem o impulso elétrico lentamente. Estas 3 classes estão amplamente distribuídas na pele e tecidos mais profundos e frequentemente trabalham em conjunto. Além dos nociceptores descritos, existem os nociceptores silentes, os quais estão presentes em vísceras e geralmente são ativados quando há inflamação ou dano químico (Basbaum e Jessel, 2000).



**Figura 1.** Via ascendente da nocicepção - primeira conexão. Os axônios das fibras aferentes primárias transmitem o impulso nervoso até as lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal. Adaptado de Bear *et al.*, 1996.

Cada NAP tem um único axônio que se bifurca em “T”, de modo que uma extremidade termina em tecidos periféricos e a outra, dentro do corno dorsal da medula espinhal. Assim, o impulso doloroso captado na periferia dirige-se inicialmente ao corpo celular e, após, ao corno dorsal (substância cinzenta ou “H” medular) (Figura 1). No corno dorsal os NAP fazem sinapse com neurônios aferentes secundários (NAS), com interneurônios e neurônios do corno ventral motor (Basbaum e Jessel, 2000; Morgan e Mikhail, 1996; Loeser *et al.*, 2001). As projeções dos NAP entram no corno dorsal, ascendem alguns segmentos pelo trato pósterolateral (trato de Lissauer) e terminam nas lâminas superficiais do corno dorsal (Cervero e Iggo, 1980).

O corno dorsal é subdividido em várias camadas (lâminas) que podem variar de 6 a 10, de acordo com as características citológicas de seus neurônios. A lâmina I (lâmina marginal) recebe somente aferências nociceptivas. A lâmina II (substância gelatinosa) é formada quase exclusivamente por interneurônios excitatórios e inibitórios, os quais respondem à estimulação nociva e não nociva (Basbaum e Jessel, 2000). Os NAS são de 2 tipos: nociceptivo, relacionado à estimulação nociva, ou de amplo espectro dinâmico (*Wyde dynamic range* ou *WDR* em inglês), relacionado à estimulação nociva e não nociva (Morgan e Mikhail, 1996; Loeser *et al.*, 2001).

O trato espinotalâmico representa a principal via de condução da dor da medula espinhal ao encéfalo. As fibras aferentes se projetam para o lado contralateral da medula espinhal, ascendem na substância branca ântero-lateral, terminando no tálamo. Há 2 tipos de vias espinotalâmicas: Neoespinotalâmica e Paleoespinotalâmica (Basbaum e Jessel, 2000; Loeser *et al.*, 2001). A via Neoespinotalâmica tem poucas estações sinápticas e se projeta no núcleo ventral pósterolateral do tálamo, cujos neurônios recebem o nome de terciários. Daí partem projeções para o córtex somatossensorial, onde ocorre a percepção da dor. É o trato responsável pela percepção da qualidade da dor (ardor ou queimação) e de sua localização, intensidade e

duração (Morgan e Mikhail, 1996; Bear *et al.*, 1996). A via Paleoespinalâmica é possui várias estações sinápticas e se projeta no tálamo medial e, daí, difusamente para o córtex de ambos os hemisférios cerebrais. Algumas fibras alcançam o sistema límbico, o qual é responsável pela resposta de alerta e fuga, e respostas emocionais desagradáveis ao estímulo doloroso (Morgan e Mikhail, 1996; Bear *et al.*, 1996; Loeser *et al.*, 2001; Basbaum e Jessel, 2000). Devido às múltiplas estações sinápticas, a via Paleoespinalâmica é a de maior influência moduladora de outros sistemas centrais (Loeser *et al.*, 2001).

#### 4.1.4 Desenvolvimento Neurobiológico da Dor

Embora seja difícil de correlacionar desenvolvimento do sistema nervoso entre ratos e humanos, os animais recém-nascidos possuem um desenvolvimento neurológico similar a um humano de 24 semanas de gestação (Marsh *et al.*, 1997), com uma semana de vida equivalem a um humano recém-nascido a termo, e com 3 semanas equivalem a uma criança de um ano de idade (Fitzgerald e Anand, 1993).

Vários estudos com humanos hipotetizam a idéia de que neonato, até mesmo pré-maturo, são capazes de sentir dor (Simons e Tibboel, 2006). Embora mudanças nas trajetórias nociceptivas são estabelecidas de acordo com a idade gestacional, neonatos e pré-maturos são capazes de demonstrar comportamentos e reações fisiológicas ao estímulo doloroso (Fisk *et al.*, 2001). Estudos de neurobiologia do desenvolvimento das vias nociceptivas demonstram considerável maturação das vias ascendentes periféricas, espinhais e supra-espinhais já na 26<sup>a</sup> semana de gestação em humanos. No dia do nascimento, as vias nociceptivas aferentes e suas conexões já estão bem estabelecidas. Porém, o estabelecimento das vias inibitórias descendentes ocorre mais tarde que as excitatórias (Berde e Sethna, 2002).

Há alguns anos atrás, o sistema nociceptivo era considerado totalmente imaturo em humanos neonatos. Estimava-se que eles não sentiam dor por serem incapazes de descrevê-la ou demonstrar os fenômenos subjetivos relacionados. Porém, estudos histológicos demonstram que a densidade e as propriedades neurofisiológicas dos nociceptores no neonato são semelhantes as do adulto. Os nociceptores se localizam perto da superfície da pele e gradualmente descem para as camadas mais profundas, de acordo com o desenvolvimento epitelial (Anand e Hickey, 1987; Anand e Carr, 1989; Fitzgerald, 1991). As fibras densas e mielinizadas, A $\beta$  (A Beta) e A $\delta$ , são as primeiras a se desenvolverem e formarem as primeiras conexões com as lâminas do corno dorsal. O estímulo nociceptivo na vida fetal é conduzido pelas fibras A $\beta$  e A $\delta$  até a maturação das fibras C não mielinizadas. Aos poucos as fibras A $\beta$  degeneram-se para o desenvolvimento das fibras C (Deshpande e Anand, 1996). Em estudos eletrofisiológicos com ratos neonatos expostos ao estímulo nocivo, as fibras nociceptivas demonstram baixo limiar de impulso e descargas mais prolongadas quando comparados com ratos adultos. Funcionalmente, neonatos podem apresentar sensibilização dos nociceptores, ou seja, os estímulos nocivos passam a apresentar mais dor que o normal. Estas respostas comportamentais diminuem com a idade (Reynolds e Fitzgerald, 1995).

O desenvolvimento do corno dorsal e dos vários tipos de neurônios, junto com seu arranjo laminar e conexões interneurais, começa no 1º trimestre de gestação e está completo até a 32ª semana em humanos. Inicialmente, os campos receptivos dos neurônios do corno dorsal são grandes e com extensa sobreposição entre os campos receptivos dos neurônios adjacentes. Com a maturação, os campos receptivos individuais diminuem progressivamente e podem ser mais precisamente definidos (Anand e Hickey, 1987; Anand e Carr, 1989; Fitzgerald, 1991).

A maior parte da neurotransmissão nociceptiva ocorre pela liberação do Glutamato, o qual aparece entre a 8ª e 16ª semanas de gestação (Anand e Hickey, 1987; Fitzgerald, 1992). As

correntes deste neurotransmissor aumentam com a idade, especialmente entre os dias pós-natais 5 (P5) e 10 (P10) (Pattinson e Fitzgerald, 2004). No início do desenvolvimento, há uma maior expressão de receptores glutamatérgicos AMPA e Cainato, que diminuem com o avanço da idade (Stegenga e Kab, 2001). Estes receptores são responsáveis pela transmissão excitatória rápida entre as aferências primárias e neurônios de projeção do corno dorsal da medula espinhal. O receptor glutamatérgico NMDA é responsável por mudanças de longa duração no corno dorsal do rato jovem, após estimulação de alta frequência (Randic *et al.*, 1993). Isto reflete o seu importante papel na reorganização das sinapses e na plasticidade sináptica durante o crescimento (Loftis e Janowsky, 2003). A transmissão inibitória descendente ocorre através da liberação dos neurotransmissores GABA e glicina. No neonato, o sistema GABAérgico parece ser responsável pela maior parte da neurotransmissão inibitória (Baccei e Fitzgerald, 2004).

## 4.2 SISTEMA OPIÓIDE

### 4.2.1 Sistema Opióide Endógeno e Receptores

*“Entre os remédios que o Todo-Poderoso achou conveniente dar ao homem para aliviar seus sofrimentos, nenhum é tão difundido e eficaz quanto o ópio” - Sydenham, 1680.*

As preparações do suco da papoula (*Papaver somniferum*) (Figura 2), também conhecido como ópio, foram usadas por milhares de anos no alívio da dor e isto prevalece ainda hoje. A primeira referência do uso de ópio foi encontrada nos escritos de Teofrasto datados do século III antes de Cristo. Os médicos árabes conheciam bem as utilidades do ópio e os comerciantes árabes o introduziram no Oriente, onde era usado principalmente para controlar as

disenterias (Howard and Huda, 2001). Mas foi em 1803 que Sertürner isolou uma amostra cristalina do alcalóide do ópio, a morfina. Este nome foi dado em homenagem ao Deus Grego do Sonho, Morfeu (Howard and Huda, 2001). Em 1973 os receptores opióides foram primeiramente descritos (Pert e Snyder, 1973). A descoberta dos receptores opióides,  $\mu$  (mu),  $\delta$  (delta) e  $\kappa$  (kappa) foi obtida por meio de experimentos farmacológicos com agonistas e antagonistas (Martin *et al.*, 1976). Em 1975, Hughes e colaboradores, verificaram a existência de substâncias cerebrais que eram capazes de imitar o efeito da morfina em outras preparações teciduais (Loeser *et al.*, 2001). A partir daí, foram identificados e estruturalmente determinados os opióides endógenos: encefalinas, endorfinas e dinorfinas. Estes opióides se ligam aos 3 receptores, mas com afinidades diferentes (Kosterlitz, 1985).



**Figura 2.** Papoula, *Papaver somniferum*.

Os efeitos dos opióides são mediados por alguns mecanismos em todas as áreas do SNC. Pela estimulação dos receptores opióides situados pré-sinápticamente, eles reduzem a liberação de neurotransmissores excitatórios envolvidos na nocicepção (Hori *et al.*, 1992). A estimulação dos receptores opióides localizados pós-sinápticamente inibe a neurotransmissão por promover a hiperpolarização e assim reduzindo a atividade neuronal evocada pelas fibras A $\delta$  e C (Lombard e Beesson, 1989).

A morfina, opióide semi-sintético, atua através da ligação nos receptores  $\mu$ , com maior afinidade e promovendo a ação analgésica esperada, e  $\kappa$ ; com menor afinidade e promovendo sinais autonômicos, como depressão respiratória (Howard and Huda, 2001).

Os receptores opióides já estão presentes no 1º dia pós-natal em várias áreas do SNC. No período neonatal em ratos,  $\mu$  e  $\kappa$  são os receptores predominantes. O receptor  $\delta$  está presente

em pouca densidade no nascimento e seu pico de ligação ocorre somente na terceira semana pós-natal. O pico de ligação do receptor  $\mu$  ocorre no 7º dia pós-natal, e declina gradualmente até a terceira semana, quando então estabelece os níveis de adulto (Kar e Quirion, 1995).

#### 4.2.2 Dor e Morfina em Neonato

Embora o alívio da dor seja um dos princípios básicos da medicina, na prática, a analgesia em pacientes com dificuldades de verbalizar sensações e sentimentos é frequentemente ignorada. Neonatos rotineiramente experimentam dor aguda e até mesmo crônica por meio de procedimentos invasivos em UTIs pediátrica em todo o mundo (Porter *et al.*, 1999; Anand, 2007) e numerosos estudos indicam que não recebem analgesia adequada (Johnston *et al.*, 1997; Kahn *et al.*, 1998). A dificuldade para reconhecer e avaliar a dor no período neonatal constitui um dos maiores obstáculos ao seu tratamento. Isso se associa ao fato do profissional de saúde, muitas vezes, subestimar as queixas, ao desconhecimento do embasamento farmacológico, da prescrição analgésica e ao temor dos riscos da terapêutica (Wanmacher e Ferreira, 2004). Historicamente, estes profissionais acreditavam que os recém-nascidos não sentiam dor. Porém, nos últimos 20 anos esse conceito tem mudado. Vários pesquisadores vêm esclarecendo os mecanismos da dor nesta faixa etária. Eles sugerem que estes pacientes não somente experimentam dor e estresse da mesma maneira que crianças e adultos, mas que suas respostas à estimulação dolorosa podem comprometer sua condição clínica e fisiológica (Miura e Procianoy, 1997).

A eficácia da morfina em promover analgesia em ratos neonatos já tem sido demonstrada. Alguns autores sugerem que a sua potência analgésica é maior no neonato e declina com a idade (Nandi e Fitzgerald, 2005). Outros demonstram que aumenta com a idade devido à: a) proliferação dos receptores opióides (Auguy-Valette *et al.*, 1978; Zhang e Pasternak,

1981) e b) maturação dos mecanismos de modulação inibitória após 3 semanas pós-natal (Nandi e Fitzgerald, 2005). Além disso, fatores como regime de dosagem e testes comportamentais refletem as diferenças da eficácia analgésica da morfina nestes animais. Vários estudos sugerem que a morfina produz antinocicepção relacionada com o aumento da dose em ratos de todas as idades. Porém, animais mais jovens demonstram uma maior sensibilidade ao opióide (Marsh *et al.*, 1997). Isto pode ser decorrente da regulação dos receptores opióides nos neurônios sensoriais durante as primeiras semanas pós-natal.

Em relação à analgesia opióide em humanos, várias pesquisas têm relatado que neonatologistas ainda estão relutantes quanto ao seu uso (Johnston *et al.*, 1997). Yaster e colaboradores, em 1988, estudaram o manejo da dor pediátrica com opióides e constataram que, mesmo quando as manifestações de dor são óbvias, estas não são tratadas adequadamente. O grande entrave ao uso adequado destes analgésicos é a excessiva preocupação com seus efeitos adversos (Anand, 1998; Yaster e Desphande, 1988).

O uso de opióides vem crescendo na última década em UTI pediátricas, principalmente devido ao avanço na identificação da dor e seu manejo nestes pacientes (De Lima *et al.*, 1996; Suresh e Anand, 2001, El Sayed *et al.*, 2007). O ambiente de UTI está associado a estresse crônico devido a uma variedade de circunstâncias, incluindo a entubação e a ventilação. Os analgésicos opióides têm sido amplamente usados na tentativa de diminuir a dor e o estresse nesses recém-nascidos (RN) e na sedação e analgesia em RN pré-termos ventilados. Estudos de Anand e colaboradores (Anand *et al.*, 1999) reforçam a hipótese que esses RN apresentam melhor prognóstico clínico. Os RN que utilizaram morfina apresentaram menor risco de morte e menor morbidade neurológica, comparado com os RN que receberam outro fármaco potente, o midazolam. Os autores acreditam que o efeito benéfico da morfina seja devido à diminuição do estresse, estabilidade da pressão arterial em sincronia com o ventilador (pela diminuição da



respiração espontânea auxiliando a sincronização da respiração durante a ventilação mecânica) e melhora da oxigenação. No entanto, outros autores, como Quinn e colaboradores (Quinn *et al.*, 1993) não observaram diferenças no prognóstico em longo prazo, quando o tratamento com morfina foi comparado a placebo. Esses estudos não incluíram número suficiente de RN que possibilitem a exclusão de efeitos positivos ou negativos em longo prazo e, portanto estudos são necessários para uma conclusão definitiva.

Estudos de efeitos de longo prazo de crianças que receberam analgesia opióide durante o período neonatal em UTI pediátrica demonstram que elas apresentaram uma melhor resposta cognitiva em comparação ao grupo controle (Grunau *et al.*, 2001). MacGregor e colaboradores realizaram um estudo com crianças entre 5 e 6 anos de idade utilizando alguns testes de aprendizagem, memória e raciocínio. Eles relataram que as crianças que receberam morfina em seguida ao nascimento apresentaram melhor desempenho nestes testes que as outras que não receberam esta analgesia (MacGregor *et al.*, 1998).

Outros estudos têm demonstrado que o uso prolongado de opióide em animais neonatos pode levar à tolerância e a comportamentos característicos de dependência (Arnold *et al.*, 1990). A tolerância é definida como a resposta fisiológica ou celular à exposição repetida aos opióides, e a dependência representa a manifestação dos sintomas físicos que ocorrem após a retirada opióide (Richardson *et al.*, 2006). Alguns autores dizem que a tolerância depende da idade e do regime de dosagem em que o opióide está sendo administrado. Hovav e Weinstock sugerem que o desenvolvimento da tolerância depende do grau de ligação do fármaco no receptor (Hovav e Weinstock, 1987). Em animais adultos, a exposição continuada de opióide por 4 horas dá início ao processo de tolerância; visto que em animais mais jovens é difícil notar os efeitos antes de 72 horas de infusão contínua (Anand *et al.*, 1999; Thorton *et al.*, 1997). Os sintomas de dependência são vistos como sintomas de adição às drogas de abuso, também

chamados de sensibilização comportamental. Em animais adultos estes sintomas são freqüentemente expressos como aumento da atividade locomotora (Wise e Bozarth, 1987). Entretanto, em animais neonatos há dificuldades em demonstrar este fenômeno de sensibilização, principalmente em longo tempo após a exposição repetida opióide (Suresh e Anand, 2001).

#### 4.3 SISTEMA PURINÉRGICO E DOR

##### 4.3.1 O papel das Purinas e dos Purinoceptores no Sistema Nociceptivo

Os nucleotídeos extracelulares modulam diversas funções em nosso organismo, como no desenvolvimento, sistema cardiovascular, secreção, inflamação e sistema imune (Zimmermann, 2000). Uma importante modulação ocorre no sistema nervoso, modulando a atividade nociceptiva. Estes nucleotídeos são capazes de atuar tanto como pró-nociceptivos como antinociceptivos em nível de SNC e SNP (Hayashida *et al.*, 2005). Adenosina 5' trifosfato (ATP), adenosina 5' difosfato (ADP), adenosina 5' monofosfato (AMP) e adenosina, são nucleotídeos e nucleosídeo da adenina, respectivamente. Após serem liberados do terminal neuronal ou serem hidrolisados por enzimas específicas atuam através da ligação em receptores localizados na membrana celular (Burnstock e Wood, 1996) (Figura 3). A adenosina se liga em receptores metabotrópicos (acoplados à proteína G inibitória ou estimulatória) do tipo P1, o qual é subdividido em A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (Ralevic e Burnstock, 1998), enquanto o ATP e ADP se ligam em receptores do tipo P2, o qual é subdividido em P2X e P2Y. Os receptores P2X são ionotrópicos, ou seja, canais iônicos abertos por ligantes, e são subdivididos em 7 tipos: P2X<sub>1-7</sub>. Os receptores P2Y são metabotrópicos, ou seja, acoplados à proteína G inibitória ou estimulatória, e são de vários tipos: P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub>. Alguns receptores P2Y são ativados

principalmente pelo ADP (P2Y<sub>1,6,12,13</sub>) enquanto outros são ativados pelo ATP (P2Y<sub>2,4</sub>) (Burnstock, 2006).

A adenosina parece exercer ação inibitória sobre a transmissão sináptica nociceptiva em medula espinhal e cérebro de rato (Sollevi, 1997). O efeito antinociceptivo ocorre via ativação dos receptores A<sub>1</sub> e resulta primariamente de hiperpolarização pós-sináptica por aumento da condutância de potássio e secundariamente por inibição pré-sináptica da liberação da substância P e de outros neurotransmissores excitatórios por meio da inibição da entrada de cálcio nesses terminais (Ferreira e Torres, 2004). Por outro lado, o ATP está envolvido em mecanismos centrais e periféricos da nocicepção. O ATP é um neurotransmissor liberado dos NAP na medula espinhal para atuar no mecanismo central da dor (Burnstock, 2001, 2006). Além da existência em tecidos periféricos (Burnstock, 1997), o receptor P2X é encontrado nos neurônios sensoriais de pequeno diâmetro do gânglio da raiz dorsal e nos terminais pré-sinápticos de NAP no corno dorsal da medula espinhal. Os testes electrofisiológicos mostraram que o ATP aplicado periféricamente causou um aumento marcado na descarga dos neurônios sensoriais (Burnstock e Wood, 1996; Burnstock, 2001) e a ativação do receptor P2X pelo ATP provocou a liberação espontânea de glutamato. A ação nociceptiva do ATP ocorre principalmente através da ligação aos receptores P2X<sub>3</sub> e P2X<sub>2/3</sub>, os quais estão amplamente expressos nos NAP (Burnstock, 2001).

#### 4.3.2 Morfina e Adenosina

Tanto a morfina como a adenosina, quando administradas sozinhas por via intratecal, são capazes de induzir analgesia em humanos (Wang *et al.*, 1979; Rane *et al.*, 1998). Estudos em animais relatam que existe uma ligação entre os receptores opióides e adenosinérgicos, uma vez

que a ativação do receptor opióide induz liberação de adenosina endógena, contribuindo para a ação analgésica opióide. Isto foi demonstrado através de estudos prévios com sinaptossomas de medula espinhal que foram incubados com morfina, promovendo uma liberação de adenosina de forma dependente da concentração de morfina (Sweeney *et al.*, 1987; Cahill *et al.*, 1995). A ação analgésica da morfina também pode ser antagonizada com a administração de antagonistas adenosinérgicos (Sawynok *et al.*, 1989). Pode-se dizer, então, que a liberação de adenosina no corno dorsal contribui para a eficácia de analgésicos opióides (Loeser *et al.*, 2001, Pleuvry e Lauretti, 1996). Outros estudos relatam que os agonistas de receptor opióide  $\mu$  e de adenosinérgico  $A_1$  quando administrados juntos periféricamente produzem poderosa antinocicepção (Aley *et al.*, 1995). Embora quando administrados sozinhos promovam efeito analgésico, os receptores  $\mu$  e  $A_1$  parecem não atuar independentes para produzir esse efeito (Aley e Levine, 1997). Porém, alguns estudos demonstram que administração sistêmica de 5mg/kg de morfina não é alterada em ratos *knockout* para o receptor  $A_1$  adenosinérgico, demonstrando que a potência analgésica deste opióide não necessita da ligação de adenosina endógena neste receptor específico (Johansson *et al.*, 2001).

#### 4.3.3 Ectonucleotidasas

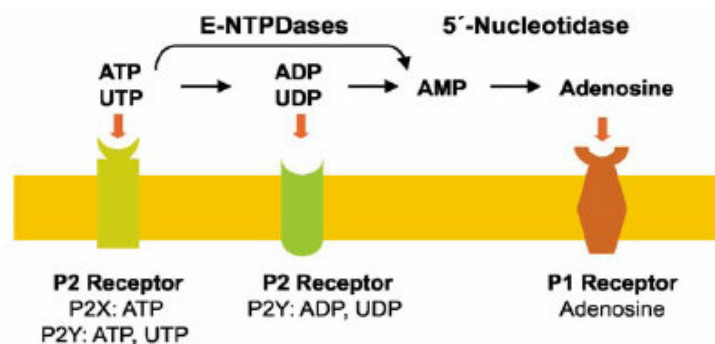
Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas localizadas na membrana celular, com seu sítio catalítico voltado ao meio extracelular ou solúveis no meio intersticial e fluidos biológicos (Zimmermann, 2001). Trabalhos têm demonstrado que membros de várias famílias de ectonucleotidasas podem contribuir para a hidrólise dos nucleotídeos. Nucleosídeos tri e difosfatados (NTP e DDP) podem ser hidrolisados por membros das famílias de E-NTPDase (Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase, EC

3.6.1.5), E-NPP (Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase, EC 3.1.4.1) e fosfatases alcalinas. Os nucleosídeos monofosfatos (NMP) estão sujeitos à hidrólise pela Ecto-5'nucleotidase e pelas fosfatases alcalinas (Zimmermann, 2001). Estas enzimas controlam a disponibilidade de ligantes (ATP, ADP, AMP e adenosina) para receptores de nucleotídeo e nucleosídeo e, conseqüentemente, a duração e a extensão da ativação do receptor (Chen e Guidotti, 2001). Portanto, a cascata de ectonucleotidasas é uma via enzimática que tem a dupla função de remover o sinal (ATP) e gerar um segundo (adenosina). Essas enzimas podem também ter uma função de proteção pela manutenção dos níveis extracelulares de ATP/ADP e adenosina dentro de limites fisiológicos (Agteresch *et al.*, 1999).

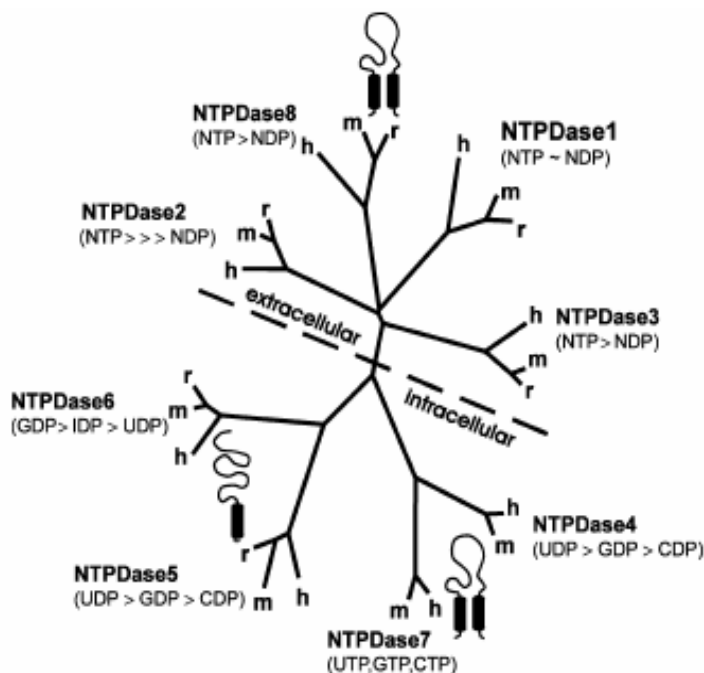
As E-NTPDases representam uma família de enzimas que hidrolisam os fosfatos dos nucleosídeos tri e difosfatados, porém com especificidades diferentes a cada um. Os membros desta família estão presentes em vários organismos vertebrados, invertebrados, plantas e até protozoários (Zimmermann e Braun, 1999). Elas são representadas por 8 membros. As E-NTPDases 1, 2, 3 e 8 são proteínas transmembrana, localizadas na superfície celular, com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular. As E-NTPDases 4, 5, 6 e 7 estão localizadas intracelularmente, ancoradas nas membranas de organelas intracelulares, com o sítio catalítico voltado para o lúmen do citoplasma (Robson *et al.*, 2006). A atividade catalítica máxima requer a presença dos cátions divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , sendo inativas na ausência destes íons (Kukulski *et al.*, 2005). Estas enzimas hidrolisam os nucleotídeos com diferentes velocidades. A E-NTPDase 1, também conhecida como apirase, hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, enquanto que a E-NTPDase 2 prefere os nucleosídeos trifosfatados, em proporção de 30:1 (ATP/ADP), por esta razão também é chamada de Ecto-ATPase (Zimmermann, 2001). As E-NTPDases 3 e 8 preferem o ATP ao ADP, em proporções de 3:1 e 2:1, respectivamente (Lavoie *et al.*, 2004). A E-NTPDase 4 prefere UDP e está ancorada à membrana do aparelho de Golgi. As E-NTPDases 5

e 6 têm preferência pelos nucleosídeos difosfatados e possuem um único domínio transmembrana próximo ao N-terminal. A forma 5 está ancorada ao retículo endoplasmático e a 6 está ancorada à membrana do aparelho de Golgi. Além disso, estas duas enzimas podem sofrer clivagem proteolítica e serem secretadas em uma forma solúvel (Lavoie *et al.*, 2004). A E-NTPDase 7 se localiza ancorada em vesículas intracelulares, e tem preferência pelos nucleosídeos trifosfatados (Figura 4).

A Ecto-5'-nucleotidase é outra enzima importante que participa do metabolismo extracelular dos nucleotídeos juntamente com as outras ectonucleotidases. Ela hidrolisa o AMP ao respectivo nucleosídeo adenosina (Zimmermann, 1992). Também é amplamente distribuída em vários organismos, assim como as E-NTPDases. É classificada em 4 grupos de acordo com sua localização celular e propriedades bioquímicas: uma ecto-5'-nucleotidase ancorada à membrana plasmática, uma forma solúvel, e duas formas citoplasmáticas (Kawashima *et al.*, 2000). Esta enzima é de grande importância porque ela catalisa o passo final da degradação dos nucleotídeos extracelulares, gerando a adenosina, que tem sido amplamente relacionada aos processos antinociceptivos (Rane *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Catabolismo extracelular dos nucleotídeos e potencial de ativação dos nucleotídeos para os receptores P2 e adenosina para o receptor P1. As E-NTPDases sequencialmente convertem ATP em ADP + Pi (fosfato inorgânico) e ADP em AMP + Pi. A hidrólise do AMP é catalisada pela ecto-5'-nucleotidase. O ATP pode ativar ambos receptores P2X e P2Y. Após a degradação, o ADP pode ativar subtipos adicionais de receptores P2Y. A adenosina formada é capaz de ativar os quatro subtipos de receptores P1 e pode ser convertida em inosina por desaminação ou ser diretamente reciclada via transportadores de nucleosídeos. Adaptado de Robson *et al.*, 2006.



**Figura 4.** Árvore filogenética hipotética derivada dos 22 membros selecionados da família das E-NTPDases (E-NTPDase 1 a E-NTPDase 8) de rato (*r*), humano (*h*) e camundongo (*m*), seguindo o alinhamento da seqüência de aminoácidos. O tamanho das linhas indica as diferenças entre as seqüências de aminoácidos. A linha tracejada indica os tipos de E-NTPDases que apresentam o sítio catalítico voltado ao meio extra ou intracelular. Em adição, a preferência aos substratos de cada enzima e a topografia de membrana para cada grupo de enzimas (um ou dois domínios transmembrana, indicados com barras). Adaptado de Robson *et al.*, 2006.

## 6. OBJETIVOS

O objetivo desta dissertação foi avaliar os efeitos em curto, médio e longo prazos da administração repetida de morfina em ratos infantis nas atividades nociceptiva, comportamental e ectonucleotidásicas.

### **Objetivos específicos:**

- Avaliar a resposta analgésica da administração repetida de morfina durante a segunda semana de vida (do P8 ao P14), e de uma segunda exposição repetida na idade adulta (P80).
- Avaliar os efeitos em curto, médio e longo prazo da administração repetida de morfina durante a segunda semana de vida (do P8 ao P14) sobre a dor neurogênica e inflamatória, e sobre atividade comportamental.
- Avaliar o efeito em curto e médio prazo da administração repetida de morfina durante a segunda semana de vida (do P8 ao P14) sobre as atividades de hidrólises das E-NTPDases e de Ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas de medula espinhal e córtex cerebral de ratos.



## **PARTE II**

## 1. CAPÍTULO 1

### **LONG-TERM EFFECT OF MORPHINE ADMINISTRATION IN YOUNG RATS ON THE ANALGESIC OPIOID RESPONSE IN ADULT LIFE**

Artigo aceito para publicação na revista *International Journal of Developmental  
Neuroscience*

----- Forwarded message -----

From: **International Journal of Developmental Neuroscience** <dmasters@utmb.edu>

Date: 10 May 2008 21:50:58 +0100

Subject: Your Submission

To: iracitorres@gmail.com

Ms. Ref. No.: DN-D-08-00024R1

Title: Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life

International Journal of Developmental Neuroscience

Dear Torres ILS,

I am pleased to confirm that your paper "Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life" has been accepted for publication in International Journal of Developmental Neuroscience.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

J. Regino Perez-Polo

Editor-in-Chief

International Journal of Developmental Neuroscience

Comments from the Editors and Reviewers:

Long-term effect of morphine administration in young rats on the  
analgesic opioid response in adult life

JOANNA RIPOLL ROZISKY<sup>1</sup>, GIOVANA DANTAS<sup>2</sup>, LAUREN SPEZIA ADACHI<sup>2</sup>,  
VIVIANE SOARES ALVES<sup>2</sup>, MARIA BEATRIZ CARDOSO FERREIRA<sup>2</sup>, JOÃO JOSÉ  
FREITAS SARKIS<sup>1</sup>, IRACI LUCENA DA SILVA TORRES<sup>2</sup>

Departamentos de Bioquímica<sup>1</sup> e Farmacologia<sup>2</sup> – Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
- UFRGS, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

CORRESPONDENCE ADDRESS:

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 0055-51 3316 3183; FAX: 0055-51 3316 3121.

E-mail: [iracitorres@gmail.com](mailto:iracitorres@gmail.com)

**Running head:** Effect of morphine administration in young rats

## **Abstract**

Neonates, infants and children are often exposed to pain from invasive procedures during intensive care and during the post-operative period. Opioid anesthesia and post-operative opioid analgesia have been used in infants and result in clinical benefits. The objectives of this study were to verify the effect of repeated 5 $\mu$ g-morphine administration (subcutaneous), once a day for seven days in 8-day-old rats, at P8 until P14. To verify the long-term effect of morphine, the animals were submitted a second exposure of 5mg/kg (intraperitoneal) of morphine at P80 until P86. Animals that received morphine for seven days, at P14 did not develop tolerance, however at P80, rats demonstrated greater morphine analgesia. At P86, after seven days of morphine administration, animals showed classical tolerance. These findings may have important implications for the human neonate, suggesting a possible explanation for the differences in the requirements of morphine observed in the youngest patients.

**Keywords: analgesia, morphine, tail-flick, tolerance, young rats**

## **Abbreviations**

**P** = Post-natal day

**LTP** = Long-term of Potentiation

**TFL** = Tail-Flick Latency

**i.p.** = intraperitoneal

## Introduction

Evidence suggests that exposure to acute pain in early life leads to long-term consequences. Neonates undergo considerable maturation of peripheral, spinal and supra-spinal afferent pain transmission during the early post-natal period and are able to respond to tissue injury with specific behaviors and with autonomic, hormonal and metabolic signs of stress and distress (Nandi and Fitzgerald, 2005). Neonates, infants and children are often exposed to pain from invasive procedures during intensive care and during the postoperative period (Pattinson and Fitzgerald, 2004). The use of opioid analgesia has increased in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) in the last decades as a consequence of the changes and advances in the understanding, identification, and treatment of pain in children (El Sayed *et al.*, 2007). However, there is still a lack of knowledge on their specific effects in a long-term administration for this population of patients (Marsh *et al.*, 1997). Previous studies provide evidence that morphine requirements may be low in the youngest patients. The efficacy of morphine in reducing pain behaviour in neonatal animals has already been demonstrated. Nociceptive threshold testing in rat pups has shown that the analgesic potency of systemic morphine to mechanical stimulation is significantly greater in the neonate and declines with post-natal age (for review see Nandi and Fitzgerald, 2005). In contrast, there are studies that demonstrate that the analgesic potency of morphine in rat pups increases with maturation, due to (a) the proliferation of opiate receptors (Auguy-Valette *et al.*, 1978; Zhang *et al.*, 1981) and (b), the maturation of supra-spinal descending inhibition, which becomes functional at 3 weeks post-natal (Nandi and Fitzgerald, 2005). Although descending inhibitory mechanisms are not still completely formed until the third week of life (Nandi and Fitzgerald, 2005), morphine and other opiate agonists are effective analgesics during the early neonatal period due to the presence of spinal opiate receptors at birth

(Rahman and Dickenson, 1999). The density of  $\mu$ -opioid receptor binding is seen during the first three post-natal weeks, with peak binding at P7 that falls to adult levels by P21 (Rahman *et al.*, 1998).

A review (Lidow, 2002) showed long-term effects in young rats with inflammatory pain, tissue damage, repeated noxious insults, colonic irritation, nerve sectioning or ligation and neonatal surgery (Sternberg *et al.*, 2005). Most of these experiments presented results in these animals between post-natal day 0 (P0) and P7. Although it is difficult to make direct correlations between humans and rodents, at birth rats have a similar neurological development to a 24-week fetus (Marsh *et al.*, 1997), and there are no studies about long-term analgesic opioid response with older animals, when the neurological development is similar that of a newborn.

The objectives of this study were to evaluate the effect of repeated morphine administration at P8 until P14 upon analgesic opioid response. For the study of the long-term effects of this exposure in early life, the rats were submitted to a second treatment at P80 until P86.

## **Materials and methods**

### *1. Animals*

Male Wistar rats were utilized. Rats were aged 8 days (P8) at the beginning of the treatment, according to the experiment. Experimentally-naïve animals were housed in home cages made of Plexiglas material (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust. Animals were maintained on a standard 12-h dark/light cycle (lights on between 7.00h – 19.00h) at room temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). The animals had free access to food and water. Litters were culled to eight pups per dam, and rat pups were randomly cross-fostered on the day of birth. At 21 days of



age the animals were separated from their mothers. The Institutional Research Committee approved all animal procedures, and measures were taken to minimize pain and discomfort.

### *2. Tail-flick measurement*

Nociception was assessed, for both experiments, with the tail-flick apparatus (D'Amour and Smith, 1941). Tail flick latency (TFL) is a spinal response and, therefore, TFL is a measurement of pain threshold at the spinal level. Rats were wrapped in a towel and placed on the apparatus. The light source positioned below the tail was focused on a point 2 - 3 cm rostral to the tip of the tail. Deflection of the tail activated a photocell and automatically terminated the trial. The tail-flick latency represented the period of time (seconds) from the beginning of the trial to the tail deflection. A cut-off time of 10 s was used to prevent tissue damage. Shortly after the last session of treatment (40 days) and twenty-four hours before the first measurement, the animals were exposed to the tail-flick apparatus to familiarize them with the procedure, since the novelty of the apparatus can itself induce antinociception (Netto *et al.*, 2004). This test was chosen because it has been related to supra-spinal activation (Tseng and Tang, 1990), and can detect systemic analgesia (Cepeda *et al.*, 2004). Latency scores were converted to percent maximum possible effect scores [%MPE = ((latency-BL2)/(cutoff-BL2))\* 100].

### *3. Morphine administration*

Wistar rats aged 8-days old at the beginning of the experiment were used. The rats were divided into two groups: saline-control (n=9) and morphine-treated (n=7). Rats on P8 were chosen because it is accepted that animals of this age have a similar neurological development to that of a newborn (Fitzgerald and Anand, 1993), and that they are in a physiologically-immature state (Pattinson and Fitzgerald, 2004), since this period is characterized by major developmental

changes in the brain and plasticity of the developing pain system (Bishop, 1982; Kim *et al.*, 1996; Rabinowicz *et al.*, 1996). Twenty-four hours before the test (P7), the animals were exposed to the TFL apparatus to avoid novelty. Each animal received saline or morphine (5  $\mu$ g s.c. in the mid-scapular area) at P8, once a day for seven days (Bhutta *et al.*, 2001). The administration occurred at the same time each day (11:00 a.m). Morphine sulfate 1 ml (Dimorf® 10 mg/mL, Cristália) was dissolved in 9 ml of 0.9% saline. TFL was measured before (basal), immediately 30, 60, 90 and 120 minutes after the first dose (P8), and on the seventh day (P14), at basal, 30, 60, 90 and 120 minutes after morphine injection. Between each measurement (basal, 30, 60, 90 and 120 minutes) the animal was placed with its mother.

For the long-term effect experiment, animals of both groups were subdivided at P80 into control saline/saline (n=7), control morphine/saline (n=10), saline/morphine (n=10) and morphine/morphine (n=11). At P79, the animals were exposed to TFL apparatus to avoid novelty, and received saline or morphine (5 mg/kg, i.p.) at P80 once a day for seven days. TFL was measured immediately before injection (basal), 30, 60 and 90 minutes after. This dose was administered because all the animals demonstrated analgesia. Other minor doses were tested (data not shown), but the animals did not present analgesia in the tail-flick test. Indeed, doses for children are extremely different to those of adults for many drugs, including opiates. The administration routes (s.c. at P8, and i.p. at P80) were chosen to prevent discomfort and stress in the animals, at a time when the adult animals possess denser epithelial layers in the mid-scapular region and, thus, become difficult to manage.

#### *4. Statistical analysis*

Data were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean. For the evaluation of basal measurements, one-way ANOVA was performed, followed by multiple comparisons test

(Bonferroni) or Student's *t* test, according to the experiment, when indicated. For the comparison of the tail-flick latency at the different periods of time, repeated measures ANOVA was performed followed by multiple comparisons test (Bonferroni) when indicated. Differences were considered to be statistically significant if  $P < 0.05$ .

## Results

### *1. Effect of repeated morphine administration between P8-P14 on nociceptive response at P14:*

After seven days of daily morphine administration the animals did not demonstrate any development of tolerance. In the first (P8) and last days (P14) of treatment there was no difference among groups for basal (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ; data not shown). At P8 (Figure 1: horizontal line A1) the morphine effect was observed after 30 minutes of administration in comparison with the control group. At P14 (Figure 1: horizontal line A2) the duration of the morphine effect was higher on the seventh day of administration than on the first day (P8). The analgesic effect was observed until 90 minutes after morphine administration. There was a significant drug x time interaction ( $F_{(1,14)} = 37.294$ ,  $P < 0.05$ ).

-----  
insert Figure 1 about here

---

### *2. Effect of a second repeated morphine administration between P80-P86 on nociceptive response at P86:*

In the first (P80) and last days (P86) of treatment, there was no difference among groups for the basal measurement (one-way ANOVA,  $P > 0.05$ ; data not shown). At P80 (Figure 2: horizontal line A1) the morphine effect was observed after 30 minutes of administration in

both groups that received morphine (morphine/morphine and control/morphine). However, at 60 min only the morphine/morphine group remained analgesic. There was a significant drug x time interaction ( $F_{(3,47)} = 8.209, P < 0.05$ ). However, at P86 (Figure 2: horizontal line A2), after seven days of daily morphine administration, the morphine analgesic effect was not observed in either of the groups.

---

insert Figure 2 about here

---

## Discussion

In this study, 8-day-old rats that received the administration of morphine for seven days did not develop classic tolerance to morphine. In fact, after seven days of morphine administration, these animals presented a longer duration of analgesia in comparison to the control group. When these animals were analyzed at P80, both groups (control/morphine and morphine/morphine) presented analgesia after morphine administration. However, the animal group that was previously treated with morphine at P8-P14 (morphine/morphine), displayed analgesia for a longer time in comparison with the control/morphine group. At P86, the groups that received morphine daily for seven days, showed the classical tolerance effect. It is important to accentuate that all these data were obtained utilizing the tail-flick test, a measure of pain threshold at the spinal level; this test is classically utilized for detection of the degree of analgesia and tolerance to analgesic drugs (D'Amour and Smith, 1941; Levine *et al.*, 1980; Van Praag and Frenk, 1991; Carstens and Wilson *et al.*, 1993).

These results corroborate other studies that have shown that tolerance to repeated injections of morphine in pups is less pronounced than in adults, since this tolerance could be

masked by several processes (Praag and Frenk, 1991). In addition, these results also agree with studies that suggest that the development of opioid occurs within the first two weeks of life (Nandi and Fitzgerald, 2005).

In rats, the spinal  $\mu$ -opioid receptors are limited to the dorsal horn at P14, whereas receptors appear everywhere in spinal grey matter at P7 (Marsh *et al.*, 1997) and the density of binding is seen in the first three post-natal weeks, with peak binding at P7 that falls to adult levels by P21 (Rahman *et al.*, 1998). This abundance of opioid receptors could explain why the morphine group displayed analgesia instead of tolerance at P14. Rather than a change in  $\mu$  opioid receptor function or number, this prolongation is likely to be due to a change in pharmacokinetics, a time at which there is no evidence of that the effectiveness of morphine changes between the first and last days of treatment. It is possible that the dose of 5  $\mu$ g, administered for seven days, was not enough to produce tolerance, probably due to the higher number of binding sites present in the rat spinal cord and the unsaturation of the receptors.

The analgesic effectiveness of the opioid agonist is likely to be different in neonates, compared to adults (Rahman and Dickenson, 1999). There is evidence that morphine requirements may be lower in the youngest patients (Bouwmeester *et al.*, 2003). Nociceptive threshold testing in rat pups has shown that the analgesic potency of systemic morphine to mechanical stimulation is significantly greater in the neonate and declines with post-natal age (Nandi *et al.*, 2004). However, other studies showed that the analgesic potency of morphine in rat pups increases with maturation, due to (a) the proliferation of opiate receptors (Auguy-Valette *et al.*, 1978; Zhang *et al.*, 1981) and (b), the maturation of supra-spinal descending inhibition, which becomes functional at 3 weeks post-natal (Beland and Fitzgerald, 2001). The changing morphine sensitivity in the post-natal period may be part of a general reorganization in the structure and function of primary afferent synapses, neurotransmitter/receptor expression and

function and excitatory and inhibitory modulation from higher brain centers (Fitzgerald and Beggs, 2001; Fitzgerald and Howard, 2003; Pattinson and Fitzgerald, 2004). Our results agree with studies that showed potentiation of the morphine effect in rat pups. It may be suggested that the longer duration of opioid analgesia in P14 animals occurs because the opioid system is under the maturation process during the treatment period and that the administration of this drug produced alterations in this response. The potentiation of the morphine effect remained at P80 (only on the 1st day of administration). Previous studies have shown that chronic opiate exposure during infancy may affect the developing central nervous system, altering the opioid receptor number and sensibility and, thus, desensitizing animals to opiate analgesia throughout life (Thornton and Smith, 1998). On the other hand, our data suggest that the administration of morphine during the period of development of opioid receptor function, seen in the first weeks of life, may play an important role in the sensitivity of adult rats to  $\mu$  receptor agonists, such as the higher analgesia observed in these animals. Therefore, repeated morphine exposure in early life could leave a long-term alteration in opioid response.

In conclusion, animals in the second week of life showed a different response to prolonged morphine administration, without development of tolerance. However, this response did not present a longer duration, since these animals present this phenomenon at P80. In addition, the animals that received morphine administration (P8-P14) showed a longer duration of morphine analgesia at the same age (P80). These results show that the analgesic response of repeated morphine exposure may change according to the age studied. As such, these studies challenge the view that early exposure to opiate results in the subsequent development of altered analgesic opioid response that can be expressed until adulthood. Additionally, these findings could provide important information for pain modulation in human neonates and also suggest

possible explanations for the differences in the requirements of morphine observed in the youngest patients.

**Acknowledgments:** This work was supported by the National Research Council of Brazil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Pró-Reitoria de Pesquisa - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS). We thank Dr. Wolnei Caumo for helpful suggestions.

## References

- Auguy-Valette A, Cross J, Gouarderes C, Gout R, Pontonnier G, (1978) Morphine analgesia and cerebral opiate receptors: a developmental study. *Br J Pharmacol* 63:303-8.
- Beland B, Fitzgerald M., (2001) Mu- and delta opioid receptors are down-regulated in large primary sensory neurons during postnatal development in rats. *Pain* 90:143-50.
- Bhutta AT, Rovnaghi C, Simpson PM, Gossett JM, Scalzo FM, Anand KJ, (2001) Interactions of inflammatory pain and morphine in infant rats. Long-term behavioral effects. *Physiol Behav* 73(1-2):51-8.
- Bishop B, (1982) Neural plasticity: Part 2. Postnatal maturation and function-induced plasticity. *Phys Ther* 62(8):1132-43.
- Bouwmeester NJ, van den Anker JN, Hop WC, Anand KJ, Tibboel D, (2003) Age- and therapy-related effects on morphine requirements and plasma concentrations of morphine and its metabolites in postoperative infants. *Br J Anaesth* 90:642-52.
- Carstens E, Wilson C. (1993) Rat tail-flick reflex: magnitude measurement of stimulus-response function, suppression by morphine and habituation. *J Neurophysiol.*70:630-9.
- Cepeda MS, Bonney I, Moyano J, Carr DB, (2004) Corticotropin-releasing factor 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.
- D'Amour FE, Smith DL, (1941) A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72:74-79.
- El Sayed MF, Taddio A, Fallah S, De Silva N, Moore AM (2007). Safety profile of morphine following surgery in neonates. *J Perinatol* 27(7):444-7.



Fitzgerald M, Anand KJ, (1993). Developmental neuroanatomy and neurophysiology of pain. *IN*: Schechter NL, Berde CB, Yaster M (eds): Pain in infant, children, and adolescents. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 11-31.

Fitzgerald M, Beggs S, (2001) The neurobiology of pain: developmental aspects, *Neuroscientist* 7:246-57.

Fitzgerald M, Howard R, (2003). The neurobiological basis of pediatric pain. *IN*: Schechter NL, Berde CB, Yaster M, (eds): Pain in children and adolescents. 2nd ed. Lippincott: Williams & Wilkins, pp. 19-42.

Kim JJ, Foy MR, Thompson RF, (1996). Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(10):4750-3.

Levine JD, Murphy DT, Seidenwurm D, Cortez A, Fields HL. (1980) A study of the quantal (all-or-none) change in reflex latency produced by opiate analgesics. *Brain Res.*201:129-41.

Lidow MS, (2002) Long-term effects of neonatal pain on nociceptive systems. *Pain* 99:377-383.

Marsh DF, Hatch DJ, Fitzgerald M, (1997) Opioid system and the newborn. *Br J Anaesth* 79(6):787-95.

Nandi R, Beacham D, Middleton J, Koltzenburg M, Howard RF, Fitzgerald M , (2004) The functional expression of mu opioid receptors on sensory neurons is developmentally regulated; morphine analgesia is less selective in the neonate. *Pain* 111(1-2):38-50.

Nandi R, Fitzgerald M, (2005) Opioid analgesia in the newborn. *Eur J Pain* 9(2):105-8.

Netto CA, Siegfried B, Izquierdo I, (2004) 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.

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

Praag HV, Frenk H, (1991). Evidence for opiate tolerance en newborn rats. *Dev Brain Res* 60:99-102.

Rabinowicz T, de Courten-Myers GM, Petetot JM, Xi G, de los Reyes E, (1996). Human cortex development: estimates of neural numbers indicate major loss late during gestation. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(3):320-8.

Rahman W, Dashwood MR, Fitzgerald M, Aynsley-Green A, Dickenson AH, (1998) Postnatal development of multiple opioid receptors in the spinal cord and development of spinal morphine analgesia. *Dev Brain Res* 108 (1-2): 239-254.

Rahman W, Dickenson AH, (1999) Development of spinal opioid systems. *Reg Anesth Pain Med.* 24(5):383-5.

Sternberg WF, Scorr L, Smith LD, Ridgway CG, Stout M, (2005) Long-term effects of neonatal surgery on adulthood pain behavior. *Pain* 113:347-353.

Suresh S, Anand KJ, (2001) Opioid tolerance in neonates: a state-of-the-art review. *Pediatric Anaesth* 11:511-251.

Tseng LF, Tang R, (1990) Different mechanisms mediate beta-endorphin- and morphine-induced inhibition of the tail-flick response in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 252(1):546-551.

Van Praag H, Frenk H (1991) Evidence for opiate tolerance in newborn rats. *Dev Brain Res* 60: 99-102.

Wang Y, Mitchell J, Moriyama K, Kim KJ, Sharma M, Xie GX, Palmer PP, (2005) Age-dependent morphine tolerance development in the rat. *Anesth Analog* 100(6):1733-1739.

Zhang AZ, Pasternak GW, (1981) Ontogeny of opioid pharmacology and receptors: high and low affinity site differences. *Eur J Pharmacol* 73:29-40.

## LEGENDS

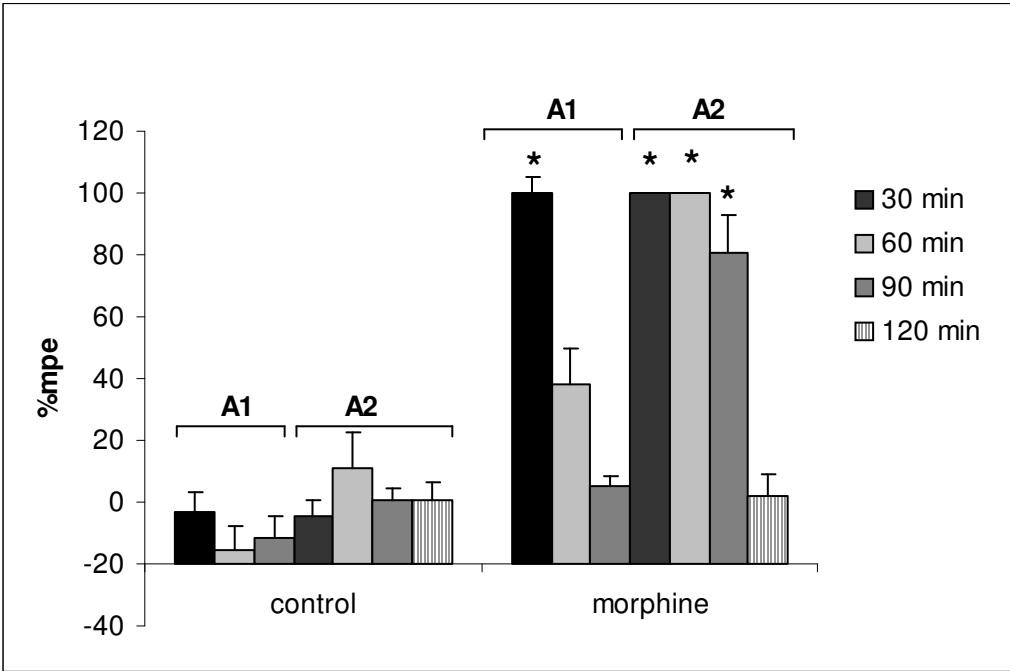
**FIGURE 1:** *Effect of repeated morphine administration between P8-14 on nociceptive response at P14:*

Percent maximum possible effect (%MPE) on the first day (P8) - horizontal line A1 - and on the seventh day (P14) - horizontal line A2 - of morphine or saline administration (5  $\mu$ g subcutaneous per rat). There was no difference among groups in basal measurement at P8 and P14 (Student's *t* test,  $P>0.05$ ; data not shown). On the first day of treatment (P8) the morphine effect was observed after 30 minutes of administration in comparison with the control group (repeated measures ANOVA, Bonferroni test, \*  $P<0.05$ ). On the seventh day (P14) of treatment, the morphine effect was observed by up to 90 minutes after the administration in comparison with the control group (repeated measures ANOVA, Bonferroni test, \*  $P<0.05$ ).

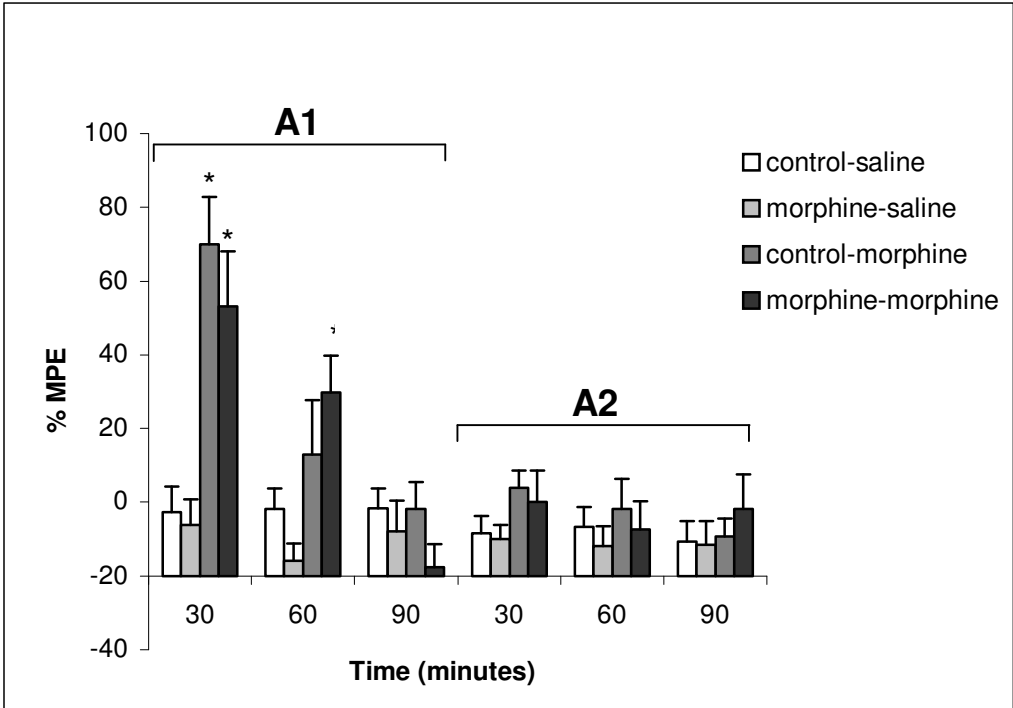
**FIGURE 2:** *Effect of a second repeated morphine administration between P80-86 on nociceptive response at P86:*

Percent maximum possible effect (%MPE) on the first day (P80) - horizontal line A1 - and on the seventh day (P86) - horizontal line A2 - of second treatment with morphine or saline (5 mg/kg intraperitoneal). There was no difference among groups in basal measurement at P80 and P86 (one way ANOVA,  $P>0.05$ ; data not shown). The morphine effect was observed until 30 minutes after administration in both groups that received morphine (morphine/morphine and control/morphine), but at 60 minutes only the morphine/morphine group remained analgesic unlike the other groups (repeated measures ANOVA, Bonferroni test, \*  $P<0.05$ ). On the seventh day (P86) of morphine administration the analgesic effect of morphine was not observed in either of the groups (repeated measures ANOVA, Bonferroni test,  $P>0.05$ ).

**FIGURE 1**



**FIGURE 2**



## 2. CAPÍTULO 2

### **NEONATAL MORPHINE EXPOSURE ALTERS THE BEHAVIOUR AND NOCICEPTION IN YOUNG AND ADULT RATS**

Artigo submetido para publicação na revista *Behavioural Brain Research*.

----- Forwarded message -----

From: **behav.br.res@umich.edu** <behav.br.res@umich.edu>

Date: 9 Mar 2008 17:05:01 +0000

Subject: Submission Confirmation

To: [iracitorres@gmail.com](mailto:iracitorres@gmail.com)

Dear Torres,

Your submission entitled "Neonatal morphine exposure alters the behaviour and nociception in young and adult rats" has been received by Behavioural Brain Research.

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

Your username is: Torres ILS

Your password is: torres336

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Behavioural Brain Research

# Neonatal morphine exposure alters the behaviour and nociception in young and adult rats

JOANNA RIPOLL ROZISKY<sup>1</sup>, LAUREN SPEZIA ADACHI<sup>2</sup>, JANAÍNA ESPINOSA  
TEIXEIRA<sup>2</sup>, LUCIANA MARIA BRANCHER<sup>2</sup>, VIVIANE SOARES ALVES<sup>2</sup>, ALBERTO  
SETTE NETO<sup>2</sup>, MARIA BEATRIZ CARDOSO FERREIRA<sup>2</sup>, CARLA DENISE BONAN<sup>3</sup>,  
JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS<sup>1†</sup>, IRACI LUCENA DA SILVA TORRES<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamentos de Bioquímica e de <sup>2</sup>Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde –  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia – Departamento de Biologia Celular e  
Molecular – Faculdade de Biociências - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul –  
Porto Alegre – Brazil.

\*CORRESPONDENCE ADDRESS:

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 0055-51 3316 3183; FAX: 0055-51 3316 3121.

E-mail: iracitorres@gmail.com

**Running head:** Morphine administration in pup rats



## **Abstract**

Neonates routinely experience acute pain caused by procedures in the Neonatal Intensive Care Unit and frequently do not receive adequate analgesia. Morphine exposure can have short- and long-lasting implications on the development and function of some neurotransmitter systems. The aim of this study was to investigate whether repeated morphine exposure in early life (P8 to P14) alters the nociceptive and behaviour responses at short- and long-term. From the formalin test, the morphine group showed an increase in the nociceptive response at P30 and P60, but not at P16. It is probable that this higher threshold nociception is due to neuroplastic changes in nociceptive circuits, such as neurotransmitter excitatory in spinal level. During the performance in the open field apparatus, we observed different behavioural responses, such as increased grooming at P16, and increased rearing and crossing at P30. At P88, the group that received morphine daily (P80 to P86) showed a higher rearing. We suggest that morphine exposure during early life could leave short- and long-term alterations in the opioid system, such as behavioural sensitization. In conclusion, these studies challenge the view that early exposure to opiate results in the subsequent development of altered nociceptive and behavioural responses, which may be expressed until adulthood. These behavioural changes indicate the need for the evaluation of the clinical consequences of long-term opioid administration. Additionally, these findings suggest a need for novel studies involving the design of agents that may counteract opiate-induced behavioural adaptations.

**Keywords: morphine, formalin test, behaviour, nociception, analgesic response, pup rats**

## **Introduction**

The study of pediatric pain is an area of increasing importance. Neonates routinely experience acute pain caused by multiple invasive procedures in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) [39] and frequently do not receive adequate analgesia [27, 28]. Historically, the belief that newborns could not feel pain may have accounted, in part, for the low usage of analgesics. There are data reporting that neonatologists are still reluctant to use opioid analgesics in newborns [27], and that opioids are underutilized [1, 24, 25]. The use of opioid analgesia has increased in the NICU over the last decades as a consequence of the changes and advances in the understanding, identification, and treatment of pain in children [17, 22, 47]. However, there is still a lack of knowledge on their specific effects during long-term administration for this population of patients [33].

The efficacy of morphine in reducing pain behaviour in neonatal animals has already been demonstrated. Although descending inhibitory mechanisms are not still completely formed until the third week of life [35], morphine and other opiate agonists are effective analgesics during the early neonatal period, due to the presence of spinal opiate receptors at birth [41]. However, the exposure to analgesic opioids during early life can have short- and long-lasting implications in the development and function of some neurotransmitter systems in the CNS, such as glutamatergic and dopaminergic systems [50, 51, 53]. These effects on the developing nervous system are different from those on the mature system [46]. It well established that neonates have shown symptoms of opiate withdrawal, also known as neonatal abstinence syndrome (NAS), but there is difficulty in demonstrating characteristic behavioural symptoms resulting in animals [6, 47]. Although these effects are described in the literature, the long-term

behavioural consequences of chronic opioid treatment in neonatal period have not been well studied.

The formalin test, which evaluates nociception caused by injection of dilute formalin solution into the hindpaw, has been widely used and is considered one of the standard animal models of nociception [as described 49]. Injection of formalin into the rat hindpaw produces two distinct phases of nociceptive behaviour: an early transient phase (phase I; until five minutes after the injection) and a late persistent phase (phase II; until fifteen-thirty minutes after the injection). Phase I has been considered to reflect direct stimulation of primary afferent fibers, predominantly C-fibers (neurogenic phase) [34] whereas phase II is dependent on peripheral inflammation (inflammatory pain) [20, 43, 49]. Thus, the formalin test is considered to be of greater relevance for clinical situations, since formalin evokes a continuous nociceptive response generated by tissue damage.

The aim of this study was to investigate whether repeated morphine exposure during early life alters the neurogenic and inflammatory nociception and short- and long-term behavioural responses.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Animals**

Neonate male Wistar rats, aged 8-days-old at the beginning of the experiment were used. Animals were housed in home cages with their mothers and maintained on a standard 12-h dark/light cycle (lights on 7:00 a.m.) at room temperature ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). The animals had free access to food and water. Litters were culled to eight pups per dam, and rat pups were randomly

cross-fostered on the day of birth. Pups were divided into two groups: Control (C) and Morphine (M). The Institutional Research Committee approved all animal procedures that were planned to minimize pain and discomfort. 8-Day-old rats were chosen because it is accepted that animals with this age have a similar neurological development to that of a newborn child [23], and that they are in a physiologically immature state [38].

## **2.2. Morphine administration:**

The animals began to receive saline (C) or morphine (M), 5 µg subcutaneous (s.c.), at P8 once a day for seven days [9]. Morphine sulfate (1 ml Dimorf<sup>®</sup> 10 mg/mL, obtained from CRISTÁLIA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil) was dissolved in 9 ml of 0.9% saline. The behavioural procedures were performed in 16 (C: n=6; M: n=7), 30 (C: n=11; M: n=17), and 60-day-old rats (C: n=9; M: n=15). For a better data gathering on the long-term effects on adults, the animals at P80 were exposed again to the repeated exposure of morphine intraperitoneal (5mg/kg) or saline once a day for seven days. Both groups (control and morphine) were subdivided into control saline/saline (n=8), control saline/morphine (n=4) and morphine/saline (n=6) and morphine/morphine (n=6). Two days after termination of repeated morphine administration, the animals were submitted to behavioural procedures (P88).

## **2.3. Formalin test**

The procedure used for the formalin test was performed, as described previously [48, 49] with minor modifications. Twenty-four hours before the first test, each animal was placed in the chamber for observation for ten minutes to avoid novelty. The animals were injected s.c. into

the plantar surface of the left hindpaw with 0.17 ml/kg of a 2% formalin solution (Formaldehyde P.A.®, was obtained from SIGMA-ALDRICH, São Paulo, São Paulo, Brazil) diluted in 0.9% saline. This dose was utilized because the weight is different for each age. Each animal was observed in the cage (the same as for the open field test described below) and the nociceptive response was recorded for a period of thirty minutes. The summation of time (seconds) spent in licking, biting and flicking of the formalin-injected hindpaw was recorded in two phases: during the first five minutes (phase I) and fifteen to thirty minutes (phase II) after the formalin injection. The formalin test was performed once in each rat.

#### **2.4. Evaluation of behaviour in open field**

The evaluation of behaviour was performed in a varnished wood cage, measuring 60 x 40 x 50 cm, with an anterior face of glass. The floor was recovered with linoleum divided into 12 rectangles of 13.0 x 13.0 cm, with dark lines. The animal was gently placed in the left posterior corner and left free to explore the surroundings for 5 minutes [10, 16]. The following behavioural components were measured: locomotion (the number of line crossings), rearing (standing upright on the hind legs), latency and grooming. The number of crossings performed by each animal was taken as locomotion activity. The latency in leaving the first quadrant was taken as the anxiety measurement [12, 30]. Rearing was evaluated as exploratory activity [44]. Grooming is a biological function of caring for the body surface [45]. The evaluation of behaviour in open field test was performed once in each rat.

#### **2.5. Statistical analysis**

Data were expressed as means + standard error of mean (SEM). For the evaluation of the formalin test and the open field response Student's *t* test or one-way ANOVA were performed, depending on the experiment, followed by a multiple comparisons test (Student's-Newman-Keuls), when indicated. Differences were considered statistically significant if  $P < 0.05$ .

### 3. Results

3.1. Effects on the formalin-induced nociceptive behaviour and inflammatory pain after repeated morphine administration in pup rats:

The subcutaneous injection of 2% formalin into the plantar region of the hindpaw resulted in behaviours of biphasic licking, biting, and flicking of the injected paw, in all ages and groups. At P16, two days after morphine repeated administration, the animals did not demonstrate differences between the groups for both phases (**phase I**: Control =  $197.67 \pm 26.13$ ; Morphine =  $172.29 \pm 41.31$ , Student's *t* test,  $P > 0.05$ ; **phase II**: Control =  $382.33 \pm 39.4$ ; Morphine =  $370.57 \pm 41.3$ , Student's *t* test,  $P > 0.05$ ; FIGURE 1 - Panel A).

At P30, the morphine group showed higher nociceptive response in phase II (**phase I**: Control =  $145.2 \pm 17.40$ ; Morphine =  $173.76 \pm 15.86$ ; Student's *t* test,  $P > 0.05$ ; **phase II**: Control =  $446.1 \pm 46.37$ ; Morphine =  $650.29 \pm 54.62$ ; Student's *t* test,  $P < 0.05$ ; FIGURE 1 - Panel B). At P60, the morphine group has presented higher nociceptive response during **phase I** and **phase II** (phase I: Control =  $116.77 \pm 17.68$ ; Morphine =  $201.75 \pm 12.66$ ; **phase II**: Control =  $339.1 \pm 85.1$ ; Morphine =  $554.8 \pm 61.5$ ; Student's *t* test,  $P < 0.05$  for both phases; FIGURE 1 - Panel C). At P88, the animals did not show any differences between the groups in both phases (**phase I**: Control-saline =  $224.13 \pm 29.6$ ; Morphine-saline =  $205.8 \pm 15.5$ ; Control-morphine =  $253.7 \pm 7.4$ ; Morphine-morphine =  $209 \pm 17.8$ ; one-way ANOVA,  $P > 0.05$ ; **phase II**: Control-saline =

625.5  $\pm$  89.1; Morphine-saline = 549.8  $\pm$  94.0; Control-morphine = 589.0  $\pm$  88.2; Morphine-morphine = 768.5  $\pm$  26.7; one-way ANOVA;  $P > 0.05$  FIGURE 1 - Panel D).

---

insert Figure-1 about here

---

3.2. Effects of repeated morphine administration on the behaviour of pup rats in the open field:

Seven days after repeated morphine administration, the animals showed alterations in their behaviour in the open field at P16 and P30. At P16, two days after repeated morphine administration, the animals demonstrated differences in groups in the time of grooming behaviour (grooming: Control = 19.72  $\pm$  2.06; Morphine = 22.82  $\pm$  2.54; Student's *t* Test,  $P < 0.05$ ; latency for leaving the first quadrant: Control = 28.11  $\pm$  4.32; Morphine = 34.09  $\pm$  4.76; Student's *t* Test,  $P > 0.05$ ; FIGURE 2 - Panel A; and rearing: Control = 13.05  $\pm$  1.26; Morphine = 14.32  $\pm$  1.14; crossings: Control = 32.83  $\pm$  3.92; Morphine = 34.14  $\pm$  4.07; Student's *t* Test,  $P > 0.05$  for both behaviours; FIGURE 2 - Panel B).

At P30, the morphine group showed significant differences in the time of grooming (Control = 16.4  $\pm$  2.6; Morphine = 7  $\pm$  1.4; Student's *t* Test,  $P < 0.05$ ; FIGURE 2 – Panel C), and in the number of crossings and rearings (crossings: Control = 75.8  $\pm$  4.79; Morphine = 97.87  $\pm$  5.83; and rearing: Control = 34.33  $\pm$  2.44; Morphine = 47.28  $\pm$  3.79; Student's *t* Test,  $P < 0.05$  for both behaviours analyzed; FIGURE 2 – Panel D). There were no significant differences in the latency in leaving the first quadrant (Control = 4.8  $\pm$  1.02; Morphine = 4.5  $\pm$  0.98; Student's *t* Test,  $P > 0.05$ ; FIGURE 2 – Panel C).

At P60, no differences were observed between groups for any behaviour analysed (grooming: Control =  $15.82 \pm 3.33$ ; Morphine =  $16.76 \pm 2.88$ ; latency in leaving the first quadrant: Control =  $5.9 \pm 0.634$ ; Morphine =  $5.2 \pm 0.53$ ; rearing: Control =  $35.41 \pm 3.39$ ; Morphine =  $28.44 \pm 2.212$ ; crossing: Control =  $69.36 \pm 4.62$ ; Morphine =  $60.8 \pm 3.97$ ; Student's *t* test,  $P > 0.05$  for all behaviours analysed; FIGURE 2 – Panels E and F, respectively).

At P88, the control-morphine group demonstrated a difference in rearing, however the groups did not present any difference in other behaviours (latency in leaving the first quadrant: Control-saline =  $3.37 \pm 0.59$ ; Morphine-saline =  $3.29 \pm 0.93$ ; Control-morphine =  $3.5 \pm 0.42$ ; Morphine-morphine =  $3.63 \pm 0.49$ ; grooming: Control-saline =  $4.37 \pm 0.56$ ; Morphine-saline =  $4.18 \pm 0.67$ ; Control-morphine =  $3.0 \pm 0.45$ ; Morphine-morphine =  $4.18 \pm 0.67$ ; one-way ANOVA,  $P > 0.05$  for both behaviours – FIGURE 3 Panel A; rearing: Control-saline =  $36.5 \pm 4.69$ ; Morphine-saline =  $33.71 \pm 5.25$ ; Control-morphine =  $53.17 \pm 6.53$ ; Morphine-morphine =  $30.36 \pm 3.5$ ; crossing: Control-saline =  $70.13 \pm 8.79$ ; Morphine-saline =  $74.43 \pm 10.23$ ; Control-morphine =  $75.17 \pm 5.90$ ; Morphine-morphine =  $60.27 \pm 4.33$ ; one-way ANOVA,  $P < 0.05$  for rearing and  $P > 0.05$  for crossing; FIGURE 3 - Panel B).

---

insert Figure-2 and Figure-3 about here

---

#### 4. Discussion

In the present study, we observed that 8-day-old rats that received morphine administration for seven days (P8 to P14) did not present changes in their response to the formalin test at P16. Conversely, the morphine group at P30 and at P60 showed an increase in inflammatory response (phase II) and, at P60, this group demonstrated also an increased



neurogenic response (phase I). In addition, a new treatment with morphine at P80 until P86 did not alter the nociceptive and inflammatory response at P88. These results suggest that repeated morphine exposure during early life promoted a higher nociceptive response for 60 days.

An increase in phase II formalin-induced nociceptive behaviour suggests that changes may be in the spinal cord where central sensitization contributes to phase II behaviours [34]. The neonatal nervous system is both structurally and functionally immature and significant changes in opioid analgesic mechanisms occur before and after birth [7, 33, 40]. Previous studies have shown that exposure to drugs in early life can have long-lasting implications on the developing nervous system, such as permanent alterations in pharmacological responses and cell signaling [46]. Other studies have investigated that repeated opioid exposure could lead to spinal cord neuroplasticity [for review see 32] and these adaptations may involve changes in supraspinal pain modulatory circuits [37]. The formalin test, utilized in this study, produces persistent pain in animals by supraspinal structures activate. It has been clearly demonstrated that the mechanisms involved in morphine analgesia in the formalin test are subject to the same problems of tolerance with chronic opioid administration [18]. Although previous studies have shown that chronic exposure to opioids induces a latent sensitization in spinal cord neurons that can be manifested as neuronal hyperactivity during opiate withdrawal [42], other studies have shown that opiate administration can paradoxically induce hyperalgesia [26]. On the other hand, a number of studies have recorded several effects of glutamatergic system activation on opioid-mediated nociception, tolerance, and dependence. Although our laboratory has shown that 8 day old rats, which receive daily morphine administration during seven days, do not develop classic tolerance to morphine (Dantas and Rozisky *et al.*, submitted paper). It is probable that this higher threshold nociceptive at P30 and P60, during the formalin test, is due to neuroplastic changes in

nociceptive circuits. Other studies have observed that the descending facilitatory pathway plays a critical role in the sustained morphine-induced hyperalgesia [26, 52].

Consistent with these results, we could suggest that the repeated morphine exposure during early life promotes neuroplastic changes in excitatory systems, seen in the neurogenic phase, and central desensitization during the inflammatory phase. Although the animals at P30 are not capable of demonstrating the increase response in phase I, this was probably due to the fact that the animals are still considered to be juveniles and do not present total maturation in other physiological systems. Therefore, we suggest that other systems could mask the increased response during the neurogenic phase. Phase II is considered as an inflammatory phase, which was observed to increase at both ages. An involvement of excitatory neurotransmitters in inflammatory nociception is supported by the increase in these neurotransmitter levels in the dorsal root ganglion and dorsal horn, elicited by chronic inflammation [31, 37, 56]. Thus, interactions between opioid and excitatory receptors play a significant role in neuroplastic changes following repeated opioid exposure. Clinical experiences that show that opioids are less effective and often unreliable for treating neuropathic pain are common; such neuroplastic changes may underlie the development of pain syndromes and result in the reduction of the antinociceptive effects of opiates [32].

In addition, after two days of morphine withdrawal (P16), the animals showed increased grooming in the open-field apparatus. In contrast, at P30, these animals showed an increase in crossing and rearing and a decrease in grooming. There were no differences in these behaviours at P60 when compared to controls. When those animals that received a further treatment with morphine at P80 were analyzed, we observed that the group that received morphine only at P80 until P86 (control-morphine group) showed an increase in rearing when compared to the other groups. These results suggest that repeated morphine administration during early life promotes

alterations in behaviour responses in short- and medium-term periods, whereas there are no changes in the long-term responses.

The animals treated with repeated morphine exposure (P8 to P14) showed some opioid-withdrawal behaviour symptoms, at P16 and P30, but not at P60. Over recent years, many studies have described the effects of drug addiction on social behaviour [2, 11, 15]. It well established that repeated and intermittent exposure to abuse drugs such as cocaine, amphetamine, and morphine [14] causes sensitization to their stimulant properties in rats. Alterations in gene and protein expression in several brain regions have been observed after repeated administration of drugs of abuse [14, 36]. The molecular consequences of exposure to opiates have been studied most extensively within the mesocorticolimbic system and its neural inputs. Morphine is known to stimulate dopaminergic transmission, particularly in two areas, the dorsolateral caudate-putamen and nucleus accumbens [13], and this property is regarded as the substrate for their motor stimulant effects [5, 19, 29, 57]. This phenomenon is known as a behavioural sensitization for drugs [29]. Thus, our results, with young animals, corroborate previous studies that have demonstrated that repeated morphine exposure during early life could lead to behavioural sensitization in adult animals [13]. This study has shown that animals, during early life, develop this behaviour two days after morphine withdrawal and that these remain until at least 30-days-old. Although we observed different behaviours, such as higher grooming at P16, and higher rearing and crossing at P30, it is probable that these animals develop behavioural sensitization according to age. It is well known that animals of 16-days-old present immature nervous systems and are not capable of showing other exploratory behaviours [3], such as rearing and crossing. Although the use of a grooming paradigm has proved quite useful in the investigation of neural abnormalities resulting from pharmacological manipulations in animals [4], grooming is also involved in the exploratory behaviours [45]. Modulation of spontaneous

grooming was shown to involve the dopaminergic system. Systemic administration of dopaminergic receptor (D1) agonists enhances the grooming in rats [8, 21, 54, 55], whereas systemic administration of D1 antagonists suppresses this behaviour [54]. Thus, the grooming paradigm offers an alternative more discriminating method than locomotion, in the assessment of behavioural sensitization to morphine in early life. At P88, the group that received morphine only at P80 until P86 (control-morphine group) showed symptoms of opioid withdrawal. The group that received a further treatment of morphine in P80 until P86 (morphine-morphine group) did not present these symptoms. However, these animals, during adult life, were not capable of showing behavioural sensitization, at least until the second day after morphine withdrawal. We may suggest that morphine exposure during early life and a second exposure during adult life could induce an alteration in the dopaminergic system, thus not inducing the symptoms of behavioural sensitization.

In conclusion, these results showed that the nociceptive and behavioural responses of repeated morphine exposure can change according to the age studied. Nevertheless, these studies challenge the view that early exposure to opiate results in the subsequent development of altered nociceptive and behavioural responses, which may be expressed until adulthood. Taken together, such studies show that opioids elicit system-level adaptations. These behavioural changes in response to sustained exposure to morphine during early life indicate the need for the evaluation of the clinical consequences of long-term opioid administration. Additionally, these findings suggest a need for novel studies involving the design of agents that may counteract opiate-induced behavioural adaptations.

**Acknowledgments:** This work was supported National Research Council of Brazil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Pró-Reitoria de Pesquisa - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS).

## References

- [1] Anand KJ. Clinical importance of pain and stress in preterm neonates. *Biol Neonate* 1998; 73(1):1-9.
- [2] Andersen SL, Arvanitogiannis A, Pliakas AM, LeBlanc C, Carlezon WA Jr. Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. *Nat Neurosci* 2002; 5(1):13-4.
- [3] Arakawa H. Interaction between isolation rearing and social development on exploratory behavior in male rats. *Behav Processes* 2005; 70(3):223-34.
- [4] Aude MC, Goulet S, Doré FY. Repeated subchronic exposure to phencyclidine elicits excessive atypical grooming in rats. *Behav Brain Res* 2006; 167:103–11.
- [5] Babbini M, Davis WM. Time-dose relationships for locomotor activity effects of morphine after acute or repeated treatment. *Br J Pharmacol* 1972; 46(2):213-24.
- [6] Barr RG. Reflections on measuring pain in infants: dissociation in responsive systems and "honest signalling". *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998; 79(2):F152-6.
- [7] Beland B, Fitzgerald M. Mu- and delta opioid receptors are down-regulated in large primary sensory neurons during postnatal development in rats. *Pain* 2001; 90:143-50.
- [8] Berridge KC, Aldridge JW. Super-stereotypy I: enhancement of a complex movement sequence by systemic dopamine D1 agonists. *Synapse* 2000; 37:194–204.
- [9] Bhutta AT, Rovnaghi C, Simpson PM, Gossett JM, Scalzo FM, Anand KJ. Interactions of inflammatory pain and morphine in infant rats. Lon-term behavioral effects. *Physiol Behav* 2001; 73(1-2):51-8.
- [10] Bianchin M, Walz R, Ruschel AC, Zanatta MS, Da Silva RC, Bueno e Silva M, et al. I. Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the

- amygdala up to 20 days after training. *Behav Neural Biol* 1993; 59(2):83-6.
- [11] Bolaños CA, Barrot M, Berton O, Wallace-Black D, Nestler EJ. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. *Biol Psychiatry* 2003; 54(12):1317-29.
- [12] Britton DR, Britton KT. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. *Pharmacol Biochem Behav* 1981; 15(4):577-82.
- [13] Cadoni C, Di Chiara G. Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine. *Neuroscience* 1999; 90(2):447-55.
- [14] Carlezon WA Jr., Nestler EJ. Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends Neurosci* 2002; 25(12):610-5.
- [15] Carlezon WA Jr, Mague SD, Andersen SL. Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biol Psychiatry* 2003; 54(12):1330-7.
- [16] Carlini VP, Monzón ME, Varas MM, Cragolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN, et al. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299(5):739-43.
- [17] De Lima J, Lloyd-Thomas AR, Howard RF, Sumner E, Quinn TM. Infant and neonatal pain: anaesthetists' perceptions and prescribing patterns. *BMJ* 1996; 313(7060):787.
- [18] Detweiler DJ, Rohde DS, Basbaum AI. The development of opioid tolerance in the formalin test in the rat. *Pain* 1996; 67(1):220-5.
- [19] Di Chiara G, Imperato A. Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244(3):1067-80.
- [20] Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects

of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4(2):161-74.

- [21] Eilam D, Talangbayan H, Canaran G, Szechtman H. Dopaminergic control of locomotion, mouthing, snout contact, and grooming: opposing roles of D1 and D2 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 1992; 106:447–54.
- [22] El Sayed MF, Taddio A, Fallah S, De Silva N, Moore AM. Safety profile of morphine following surgery in neonates. *J Perinatol* 2007; 27(7):444-7.
- [23] Fitzgerald M, Anand KJ. Developmental neuroanatomy and neurophysiology of pain. In: Schechter NL, Berde CB, Yaster M, editors. *Pain in infant, children, and adolescents*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p. 11-31.
- [24] Franck LS, Vilardi J, Durand D, Powers R. Opioid withdrawal in neonates after continuous infusions of morphine or fentanyl during extracorporeal membrane oxygenation. *Am J Crit Care* 1998; 7(5):364-9.
- [25] Franck LS, Bernal H, Gale G. Infant holding policies and practices in neonatal units. *Neonatal Netw* 2002; 21(2):13-20.
- [26] Gardell LR, King T, Ossipov MH, Rice KC, Lai J, Vanderah TW, Porreca F. Opioid receptor-mediated hyperalgesia and antinociceptive tolerance induced by sustained opiate delivery. *Neurosci Lett* 2006; 396(1):44-9.
- [27] Johnston CC, Collinge JM, Henderson SJ, Anand KJ. A cross-sectional survey of pain and pharmacological analgesia in Canadian neonatal intensive care units. *Clin J Pain* 1997; 13(4):308-12.
- [28] Kahn DJ, Richardson DK, Gray JE, Bednarek F, Rubin LP, Shah B, et al. Variation among neonatal intensive care units in narcotic administration. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998; 152(9):844-51.



- [29] Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13(5):177-84.
- [30] Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 1990; 46(3):321-40.
- [31] Löfgren O, Yu LC, Theodorsson E, Hansson P, Lundeberg T. Intrathecal CGRP (8-37) results in a bilateral increase in hindpaw withdrawal latency in rats with a unilateral thermal injury. *Neuropeptides* 1997; 31(6):601-7.
- [32] Mao J, Mayer DJ. Spinal cord neuroplasticity following repeated opioid exposure and its relation to pathological pain. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 933:175-84.
- [33] Marsh DF, Hatch DJ, Fitzgerald M. Opioid system and the newborn. *Br J Anaesth* 1997; 79(6):787-95.
- [34] Martindale J, Bland-Ward PA, Chessell IP. Inhibition of C-fibre mediated sensory transmission in the rat following intraplantar formalin. *Neurosci Lett* 2001; 316(1):33-6.
- [35] Nandi R, Fitzgerald M. Opioid analgesia in the newborn. *Eur J Pain* 2005; 9(2):105-8.
- [36] Nestler EJ. Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* 2001; 10(3):201-17.
- [37] Ossipov MH, Lai J, King T, Vanderah TW, Porreca F. Underling mechanisms of pronociceptive consequences of prolonged morphine exposure. *Pept Sci* 2005; 80:319-325.
- [38] Pattinson D, Fitzgerald M. The neurobiology of infant pain: Development of excitatory and inhibitory neurotransmission in the spinal dorsal horn. *Reg Anesth Pain Med* 2004; 29(1):36-44.
- [39] Porter FL, Grunau RE, Anand KJ. Long-term effects of pain in infants. *J Dev Behav Pediatr* 1999; 20(4):253-61.
- [40] Rahman W, Dashwood MR, Fitzgerald M, Aynsley-Green A, Dickenson AH. Postnatal development of multiple opioid receptors in the spinal cord and development of spinal

- morphine analgesia. *Dev Brain Res* 1998; 108:239-254.
- [41] Rahman W, Dickenson AH. Development of spinal opioid systems. *Reg Anesth Pain Med* 1999; 24(5):383-5.
- [42] Rohde DS, McKay WR, Abbadie C, Basbaum AI. Contribution of sacral spinal cord neurons to the autonomic and somatic consequences of withdrawal from morphine in the rat. *Brain Res* 1997; 745(1-2):83-95.
- [43] Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38(3):347-52.
- [44] Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23(1):93-9.
- [45] Spruijt BM, van Hoof JA, Gispen W.H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev* 1992; 72:825-52.
- [46] Stanwood GD, Levitt P. Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4(1):65-71.
- [47] Suresh S, Anand KJ. Opioid tolerance in neonates: a state-of-the-art review. *Pediatric Anaesth* 2001; 11:511-251.
- [48] Tai YH, Wang YH, Wang JJ, Tao PL, Tung CS, Wong CS. Amitriptyline suppresses neuroinflammation and up-regulates glutamate transporters in morphine-tolerant rats. *Pain* 2006; 124(1-2):77-86.
- [49] Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51(1):5-17.
- [50] Vacarino AL, Kastin AJ. Endogenous opiates: 1999. *Peptides* 2000; 21: 1975-2034.

- [51] Vacarino AL, Kastin AJ. Endogenous opiates: 2000. *Peptides* 2001; 22: 2257-2328.
- [52] Vanderah TW, Suenaga NM, Ossipov MH, Malan TP Jr., Lai J, Porreca F. Tonic descending facilitation from the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced abnormal pain and antinociceptive tolerance. *J Neurosci* 2001; 21:279-86.
- [53] Van Ree JM, Gerrits MA, Vanderschuren LJ. Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine. *Pharmacol Rev* 1999; 51:341-396.
- [54] Van Wimersma Greidanus TB, Maigret C, Torn M, Ronner E, Van der Kracht S, Van der Wee NJ, et al. Dopamine D-1 and D-2 receptor agonists and antagonists and neuropeptide-induced excessive grooming. *Eur J Pharmacol* 1989;173:227-31.
- [55] Wachtel SR, Brooderson RJ, White FJ. Parametric and pharmacological analyses of the enhanced grooming response elicited by the D1 dopamine receptor agonist SKF 38393 in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1992;109:41-8.
- [56] Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev* 1996; 17(5):533-85.
- [57] Wise RA, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 1987; 94(4):469-92.

## Legends

### FIGURE 1

**A:** Formalin Test at P16, two days after termination of repeated morphine administration. The animals did not show differences between groups in either phase (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ).

**B:** Formalin Test at P30. The animals did not show differences between the groups in phase II (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ), but during the second phase presented significant difference (Student's *t* test,  $P < 0.05$ ).

**C:** Formalin Test at P60. The animals present difference between groups in Phase I and Phase II (Student's *t* test,  $P < 0.05$ , for both phases).

**D:** Formalin Test at P88, after the second treatment with repeated morphine administration (P80 until P86). The animals did not show differences in any of the groups during either phase (one way ANOVA,  $P > 0.05$ ).

### FIGURE 2

**A:** Time spent on grooming and latency in leaving the first quadrant in the Open Field at P16, two days after termination of repeated morphine administration. The animals showed differences between groups in the time of grooming behaviour (Student's *t* test,  $P < 0.05$ ). There is no difference for latency behaviour between the groups (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ).

**B:** The absolute number of rearing and crossing behaviours in the Open Field at P16, two days after repeated morphine administration. The animals did not show difference between groups in either behaviour (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ).

**C:** Time spent on grooming and latency in leaving the first quadrant in the Open Field at P30. The animals showed differences between groups in the time of grooming behaviour (Student's *t* test,  $P < 0.05$ ), but not for latency behaviour (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ).

**D:** The absolute number of rearing and crossing behaviours in the Open Field at P30. The animals showed differences between groups for both behaviours (Student's *t* test,  $P < 0.05$ ).

**E:** Time spent in grooming and latency in leaving the first quadrant in the Open Field at P60. The animals did not show differences between groups for either behaviour (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ).

**F:** The absolute number in rearing and crossing behaviours in the Open Field at P60. The animals did not show any differences between groups in either behaviour (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ).

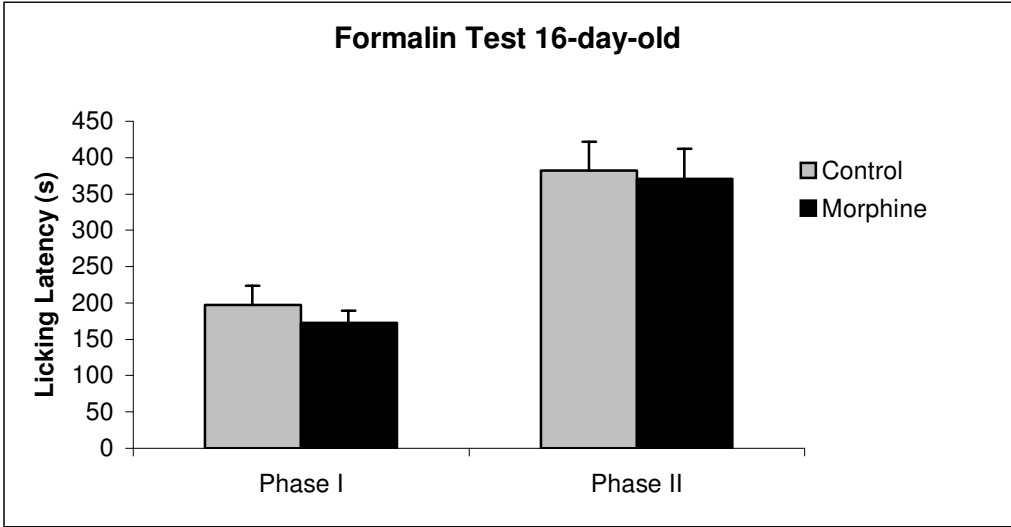
### **FIGURE 3**

**A:** Time spent in grooming and latency in leaving the first quadrant in the Open Field at P88, after the second treatment with repeated morphine administration (P80 until P86). The animals did not show differences between groups in either behaviour (one way ANOVA,  $P > 0.05$ ).

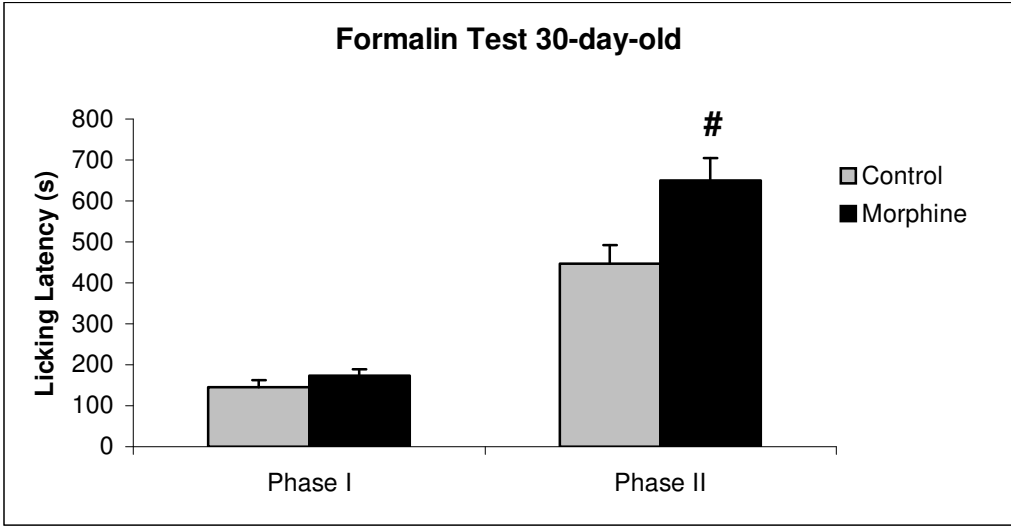
**B:** The absolute number of rearing and crossing behaviours in the Open Field at P88. The animals showed differences in rearing behaviour (one way ANOVA,  $P < 0.05$ ), but not in crossing behaviour (one way ANOVA,  $P > 0.05$ ).

**FIGURE 1**

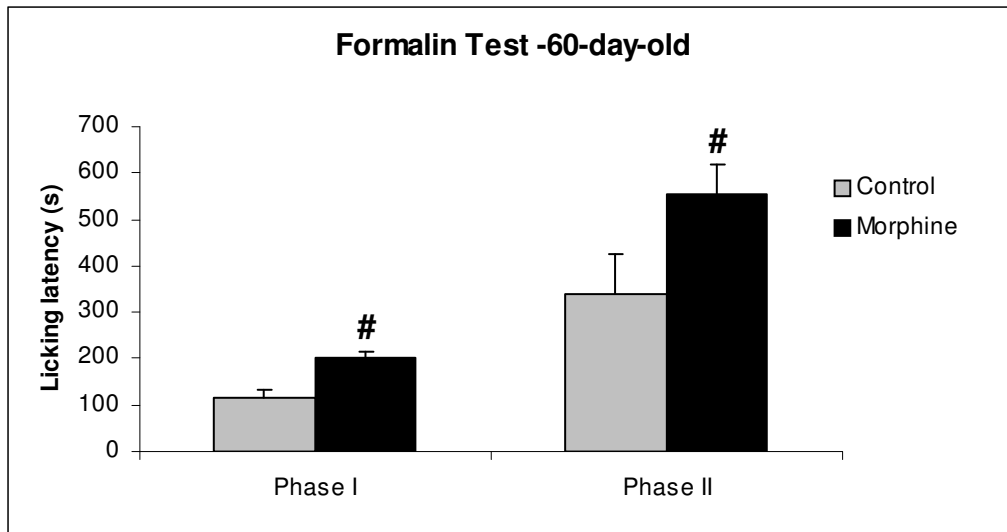
**A**



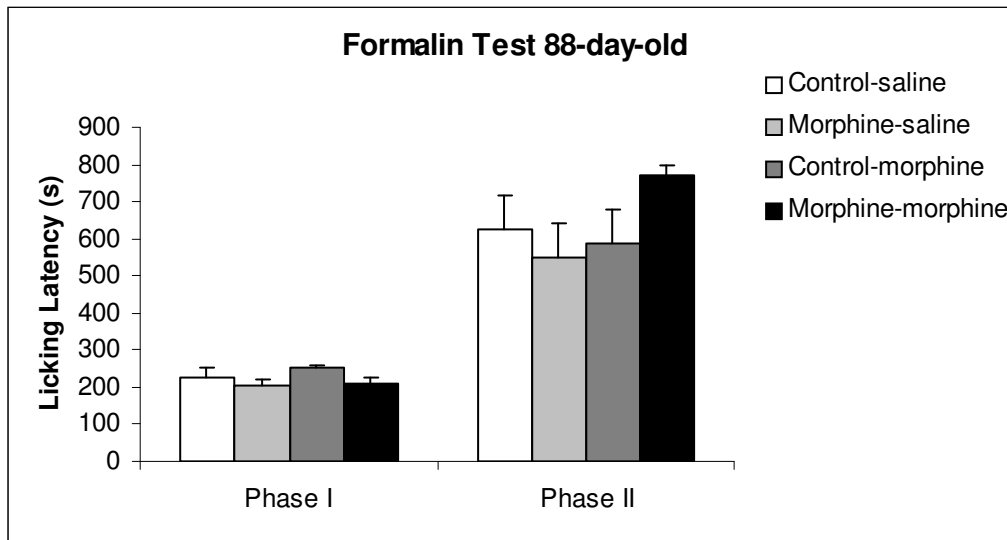
**B**



**C**

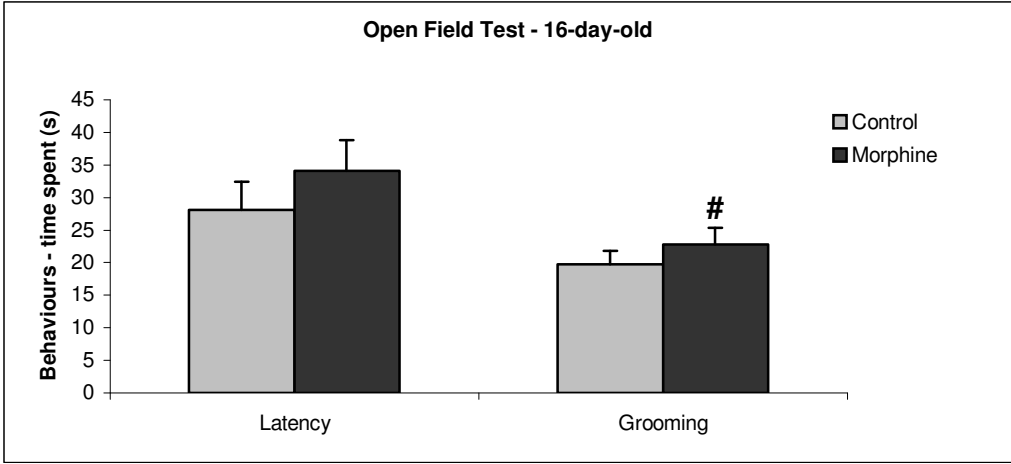


**D**

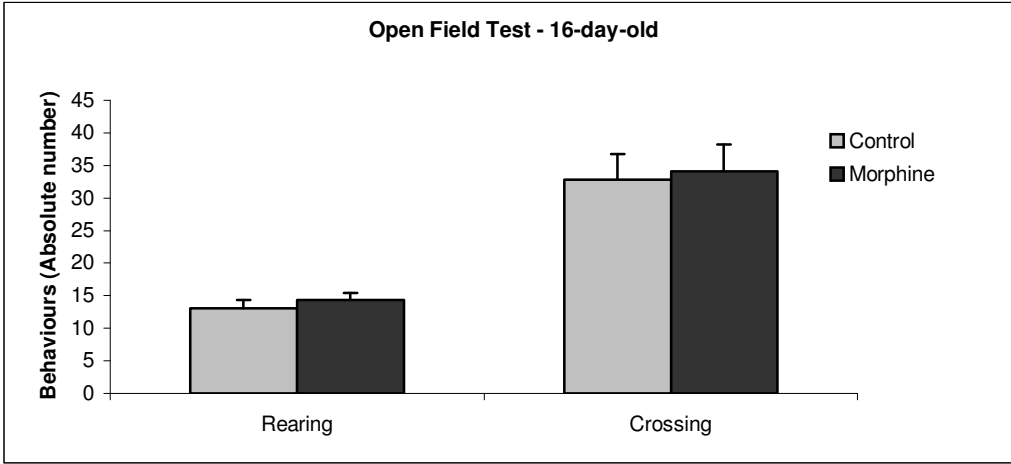


**FIGURE 2**

**A**

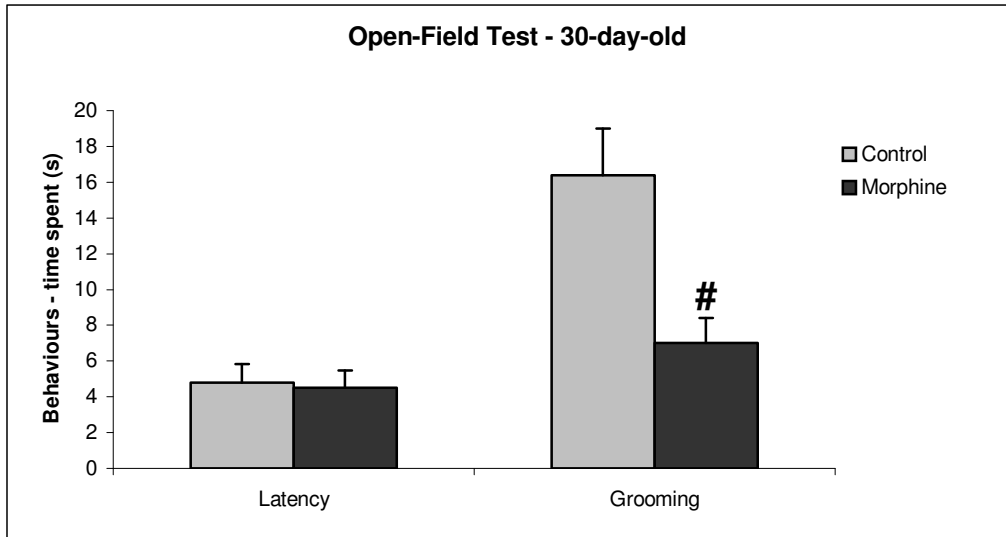


**B**

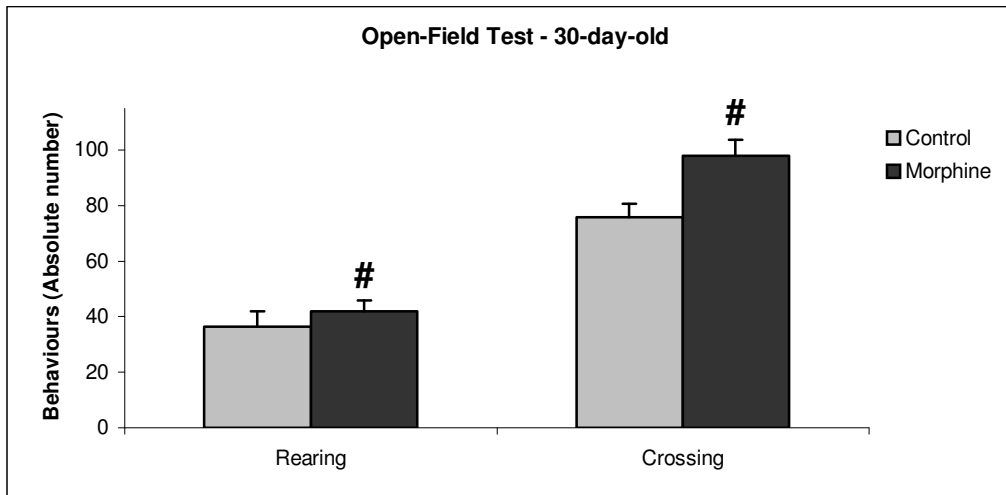




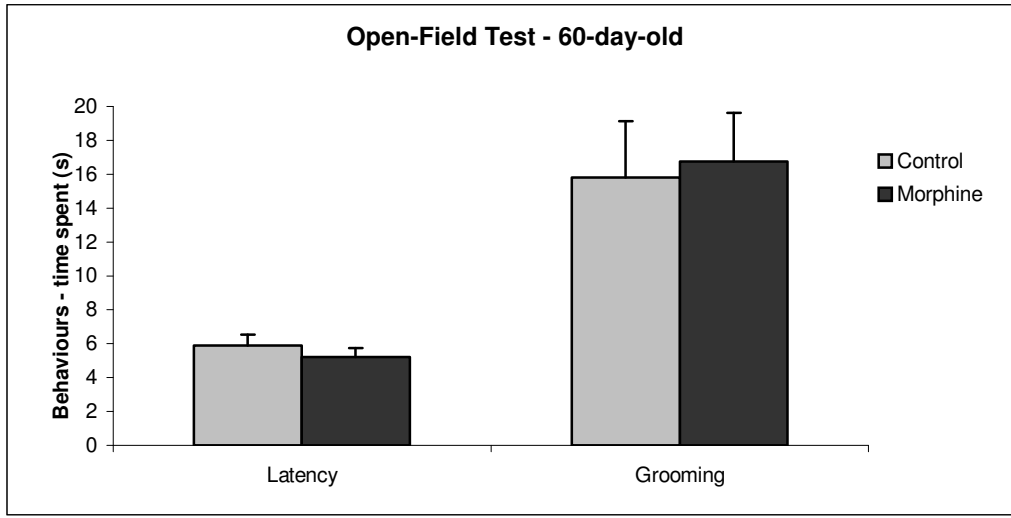
C



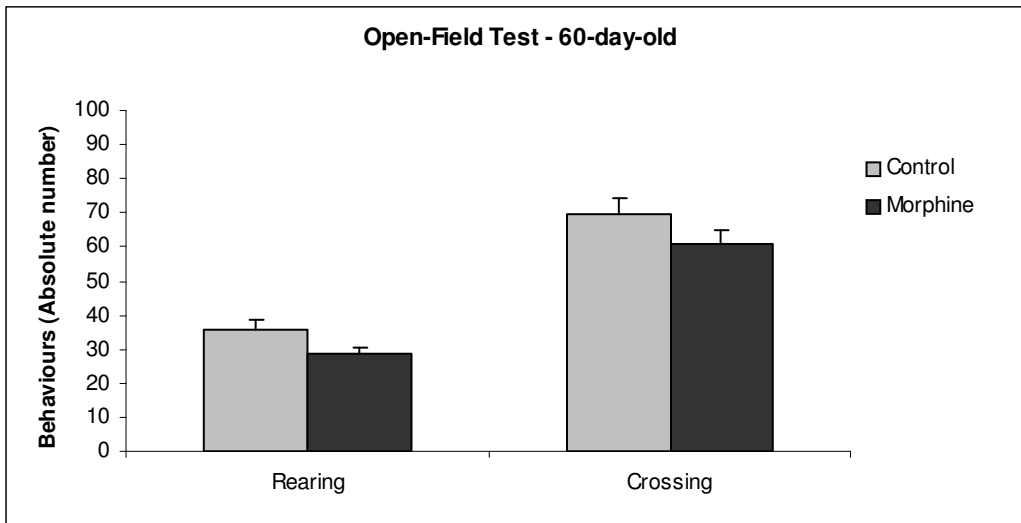
D



**E**

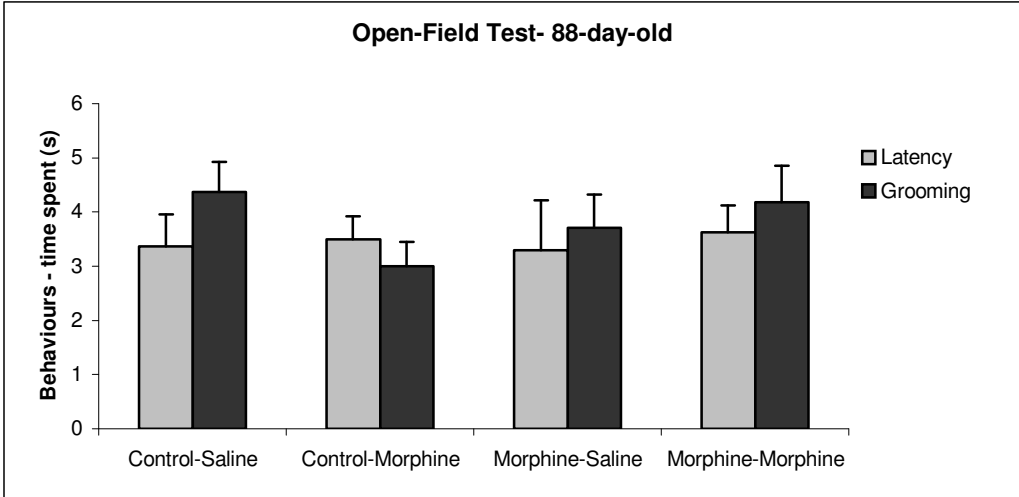


**F**

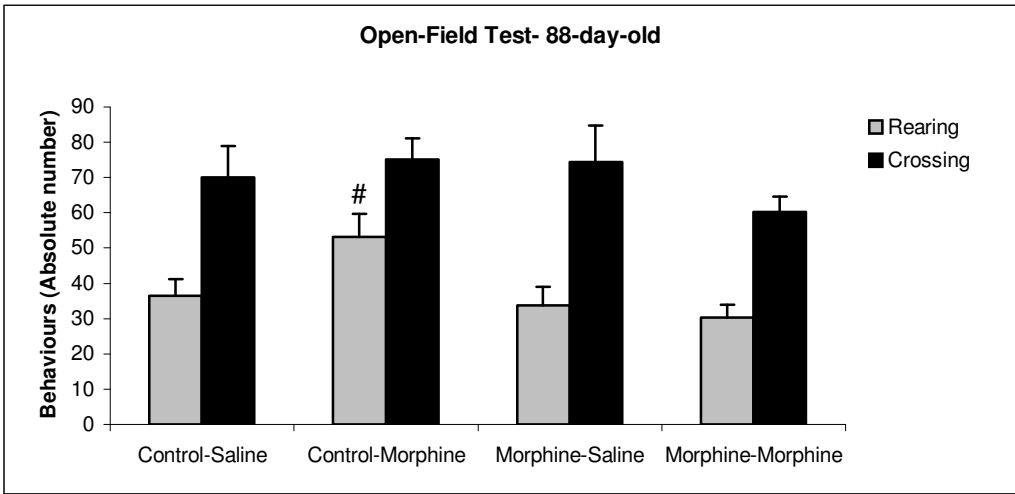


**FIGURE 3**

**A**



**B**



### 3. CAPÍTULO 3

#### **NEONATAL MORPHINE EXPOSURE ALTERS THE ECTONUCLEOTIDASE ACTIVITIES FROM SPINAL CORD AND CEREBRAL CORTEX SYNAPTOSOMES OF RATS**

Artigo a ser submetido à publicação na revista *Pharmacology Biochemistry and Behavior*.

# Neonatal morphine exposure alters the ectonucleotidase activities from spinal cord and cerebral cortex synaptosomes of rats

JOANNA RIPOLL ROZISKY<sup>1</sup>, ROSANE SOUZA DA SILVA<sup>3</sup>, DENISE BARBOSA RAMOS<sup>1</sup>, LAUREN SPEZIA ADACHI<sup>2</sup>, MAURÍCIO REIS BOGO<sup>4</sup>, CARLA DENISE BONAN<sup>3</sup>, JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS<sup>1</sup>, IRACI LUCENA DA SILVA TORRES<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamentos de Bioquímica e de <sup>2</sup>Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre - Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia e <sup>4</sup>Laboratório de Biologia Genômica e Molecular - Departamento de Biologia Celular e Molecular - Faculdade de Biociências - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Porto Alegre - Brazil

\*CORRESPONDENCE ADDRESS:

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.

Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202.

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 0055-51 3316 3183; FAX: 0055-51 3316 3121.

E-mail: iracitorres@gmail.com

**Running head:** Morphine administration in pup rats

## **Abstract**

The issue of neonate opioid system has been frequently researched. Studies have shown that exposure to drugs in early life can have long-lasting implications on the developing of central nervous system. There are many spinal systems that modulate nociceptive neurotransmission in the dorsal horn. It has been proposed that the extracellular adenosine is involved in one of these mechanisms of modulation, more properly in the physiological control of pain at the spinal cord level and in opioid antinociception. Otherwise, ATP is a neurotransmitter released from the spinal cord terminals of primary afferent sensory nerves to act in the central pain pathway. Extracellular nucleotides can be hydrolyzed by E-NTPDase and 5' nucleotidase. This cascade presents a double function of removing a signal of ATP and generating a second one, from adenosine. Here, we evaluated ATP, ADP and AMP hydrolysis in the synaptosomes from the spinal cord and cerebral cortex of male rats at different ages (P16 and P30) following repeated morphine exposure in early life (P8 until P14). We observed an increase in ATP hydrolysis activity in the synaptosomes from cerebral cortex, and a decrease ADP hydrolysis activity in the synaptosomes from spinal cord at P16. At other ages, P30 and P60, it was not observed differences on nucleotides hydrolysis activity from both structures. Our findings highlight the effect of purinergic system of young rats submitted to the repeated morphine exposure. These alterations of E-NTPDases activities may constitute one of the mechanisms that mediate the development of some of the side effects, such as opioid withdrawal, associated with repeated morphine exposure in early life.

**Keywords:** adenosine, ectonucleotidases, morphine, nociception, pup rats

## 1. Introduction

The issue of neonate opioid system has been frequently researched (Rahman *et al.*, 1998; Beland and Fitzgerald, 2001; Bouwmeester *et al.*, 2003; Nandi and Fitzgerald, 2005). The neonatal nervous system is both structurally and functionally immature and significant changes in nociceptive pathways and opioid analgesic mechanisms occur before and after birth (Marsh *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 1998; Beland and Fitzgerald, 2001). Previous studies have shown that exposure to drugs in early life can have long-lasting implications on the developing of central nervous system, mainly such as permanent alterations in pharmacological responses and cell signaling (Stanwood and Levitt, 2004).

There are multiple spinal systems that modulate nociceptive neurotransmission in the dorsal horn. It has been proposed that extracellular adenosine is involved in physiological pain control at the spinal cord level and in opioid antinociception (Sawynok and Liu, 2003) possibly through the A<sub>1</sub> adenosine receptor (Keil and DeLander, 1995). Both  $\mu$  opioid and A<sub>1</sub> adenosine agonists have been shown to produce a potent antinociception when administered in the periphery (Aley *et al.*, 1995). Although any of the agonists administered alone produce antinociception, the mu ( $\mu$ ) and A<sub>1</sub> receptors may not act independently to produce antinociception, but rather may require the physical presence of the other receptor to produce antinociception by any one agonist (Aley and Levine, 1997). Other researches that support the hypothesis that adenosine is involved in opioid – induced – analgesia is that morphine promote the adenosine release into spinal cord (Sweeney *et al.*, 1987).

On the other hand, it has been widely accepted that adenosine triphosphate (ATP) is involved in both central and peripheral nociception mechanisms. ATP is a neurotransmitter released from the spinal cord terminals of primary afferent sensory nerves to act in the central

pain pathway (Burnstock 2001, 2006). This nucleotide modulates synaptic transmission of sensory information by activating two families receptors: P2X receptor (ligand – gated ion channels) and P2Y receptor (G – protein coupled receptors) (Abbrachio e Burnstock, 1994; Bardoni *et al.*, 1997; Burnstock, 1997). Besides the existence in peripheral tissues (Burnstock, 1997), P2X receptor is also found highly expressed in small – diameter sensory neurons of the dorsal root ganglion and dorsal horn presynaptic terminals of primary afferent fibers (Burnstock, 2001). Electrophysiological tests showed that peripherally applied ATP caused a marked increase in the discharge of sensory neurons (Burnstock and Wood, 1996) and activation of presynaptic P2X receptor by ATP elicited spontaneous glutamate release, followed by an enhanced postsynaptic response (Burnstock, 2001). The ATP – mediated signaling in nociception takes place mainly on P2X<sub>3</sub> and P2X<sub>2/3</sub> receptors, because they are expressed in a subset of predominantly nociceptive sensory neurons (Burnstock, 2001).

Extracellular nucleotides can be hydrolyzed by a variety of enzymes that are located in the surface, or may be soluble in the interstitial medium or within body fluids (Zimmermann, 2001). Members of several families of ectonucleotidases can contribute to the extracellular hydrolysis of nucleotides. Nucleoside 5'– tri– and diphosphates (NTP and NDP) may be hydrolyzed by members of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family and alkaline phosphatases (Zimmermann, 2001). These ectonucleotidases, together with 5' nucleotidase, control the availability of ligands (ATP, ADP, AMP and adenosine) for both nucleotide and nucleoside receptors and, consequently, the duration and extension of receptor activation (Chen and Guidotti, 2001). Therefore, this cascade formed by ectonucleotidases and 5' nucleotidase is an enzymatic pathway with a double function of removing a signal of ATP and generating a second one, from adenosine. These enzymes may also have a protective function by



keeping extracellular ATP/ADP and adenosine levels within physiological conditions (Agteresch *et al.*, 1999).

In order to improve the understanding of the opioid and purinergic interaction on development of antinociception mechanisms, in this study we investigate ATP, ADP and AMP hydrolysis in the synaptosomes from the spinal cord and cerebral cortex of male rats at different ages following repeated morphine exposure in early life.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Reagents**

Nucleotides (ATP, ADP and AMP), Percoll, Trizma base, Coomassie Brilliant Blue G, EDTA, HEPES were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA. Morphine sulfate (Dimorf® 10 mg/mL) were purchased from CRISTÁLIA, Porto Alegre, RS, Brazil. All other reagents were of analytical grade.

### **2.2. Animals**

Neonate male Wistar rats' 8-days old were used at the beginning of the experiment. They were in home cages with their mothers and maintained on a standard 12-h dark/light cycle (lights on 7:00 a.m.) at room temperature ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). The animals had free access to food and water. Litters were culled to eight pups per dam, and rat pups were randomly cross-fostered on the day of birth. Pups were divided into two groups: Control (C) and Morphine (M). The Institutional Research Committee approved all animal procedures that were planned to minimize

pain and discomfort. Rats of 8-days old were chosen because it is accepted that animals with this age have a similar neurological development to that of a newborn child (Fitzgerald and Anand, 1993), and that they are in a physiologically immature state (Pattinson and Fitzgerald, 2004), since this period is characterized by major developmental changes in the brain and plasticity of the developing pain system (Bishop, 1982; Kim *et al.*, 1996; Rabinowicz *et al.*, 1996). The experimental assays were performed with synaptosomes from spinal cord at P16 (C: n= 6; M: n=6) and P30 (C: n= 12; M: n=9), and also from cerebral cortex at P16 (C: n= 6; M: n=6) and P30 (C: n= 6; M: n=8).

### 2.3. Morphine administration:

The animals began to receive saline (C) or morphine (M), (5 µg s.c.), at P8 once a day for seven days (Bhutta *et al.*, 2001). Morphine sulfate 1 ml was dissolved in 9 ml of 0.9% saline. At P16 and P30 the animals were killed and their structures were removed for enzyme assays.

### 2.4. Subcellular Fractionation

The animals were killed by decapitation and the spinal cord and cerebral cortex were rapidly removed and gently homogenized in 10 vol. of ice-cold medium containing 320mM sucrose, 0.1mM EDTA, and 5.0mM HEPES, pH 7.5, with a motor driven Teflon-glass homogenizer. The synaptosomes were isolated as described previously (Nagy *et al.*, 1984). Briefly, 0.5mL of the crude mitochondrial fraction was mixed with 4.0mL 8.5 % Percoll solution and layered onto an isosmotic Percoll sucrose discontinuous gradient (10/20% for spinal cord and 10/16% for cerebral cortex). The synaptosomes that banded at the 10/20% and 10/16% Percoll

interface were collected with wide tip disposable plastic transfer pipette. The material was prepared fresh daily and maintained at 0-4°C throughout preparation.

## 2.5. Enzyme Assays

The reaction medium used to assay ATP and ADP hydrolysis was essentially as described previously (Battastini *et al.*, 1991). The reaction medium contained 5.0mM KCl, 1.5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, 10mM glucose, 225mM sucrose and 45mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, in a final volume of 200 µL. The synaptosomal fraction (10-20 µg protein) was added to the reaction mixture and pre-incubated for 10min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of ATP or ADP to a final concentration of 1.0mM and was stopped by the addition of 200 µL 10% trichloroacetic acid. The samples were chilled on ice for 10min, and 100 µL samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) (Chan *et al.*, 1986).

The reaction medium used to assay the AMP hydrolysis contained 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1M Tris-HCl, pH 7.0 and 0.15M sucrose in a final volume of 200 µl (Heymann *et al.*, 1984). The synaptosomal preparation (10-20 µg protein) was pre-incubated for 10min at 37°C. The reaction was initiated by the addition of AMP to a final concentration of 1.0mM and stopped by the addition of 200µL of 10% trichloroacetic acid; 100 µL of samples were taken for the assay of released inorganic phosphate (Pi) (Chan *et al.*, 1986).

For both enzyme assays, incubation times and protein concentration were chosen in pilot studies to ensure the linearity of the reactions. Controls with the addition of the enzyme preparation after addition of trichloroacetic acid were used to correct non-enzymatic hydrolysis of the substrates. All samples were run in triplicate. Protein was measured by the Coomassie Blue method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as standard.

## 2.6. Statistical Analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). The comparison among groups was analyzed by Student's *t* test, considering  $P < 0.05$  as significant.

## 3. Results

### 3.1 *Ectonucleotidase activities from spinal cord synaptosomes after repeated morphine administration in pup rats:*

After the repeated morphine exposure, at P8 until P14, the ectonucleotidase activities from spinal cord were compared between the control and morphine groups at P16 and P30. Our results demonstrated a significant decrease in ADP hydrolysis in morphine group when compared to control group at P16 (C =  $82.55 \pm 1.64$ , M =  $51.85 \pm 10.32$ ; Student's *t* test,  $P < 0.05$ ; Figure 1A). There was no difference in other nucleotides hydrolysis (ATP: C =  $155.59 \pm 10.05$ , M =  $142.35 \pm 14.05$ ; AMP: C =  $8.59 \pm 1.97$ , M =  $6.54 \pm 1.14$ ; Student's *t* test,  $P > 0.05$ ; Figure 1A). We also investigate the hydrolysis activities at P30. There is no difference in all nucleotides hydrolysis (ATP: C =  $187.72 \pm 26.98$ , M =  $166.71 \pm 31.07$ ; ADP: C =  $50.56 \pm 7.92$ , M =  $37.09 \pm 8.72$ ; AMP: C =  $7.92 \pm 1.32$ , M =  $10.31 \pm 1.5$ ; Student's *t* test,  $P > 0.05$ ; Figure 1B)

### 3.2 *Ectonucleotidase activities from cerebral cortex synaptosomes after repeated morphine administration in pup rats:*

The ectonucleotidase activities from cerebral cortex, after the repeated morphine exposure, at P8 until P14, were also compared between the control and morphine groups at P16 and P30. Our results demonstrated a significant increase in ATP hydrolysis in morphine group when

compared to control group at P16 ( $C = 161.65 \pm 27.52$ ,  $M = 213.03 \pm 30.88$ ; Student's *t* test,  $P < 0.05$ ; Figure 2A). There is no difference in other nucleotides hydrolysis (ADP:  $C = 95.88 \pm 19.55$ ,  $M = 104.33 \pm 17.67$ ; AMP:  $C = 12.44 \pm 1.97$ ,  $M = 14.53 \pm 2.85$ ; Student's *t* test,  $P > 0.05$ ; Figure 2A). There was no difference in all nucleotides hydrolysis at P30 (ATP:  $C = 238.68 \pm 34.17$ ,  $M = 272.93 \pm 37.19$ ; ADP:  $C = 76.23 \pm 4.76$ ,  $M = 83.21 \pm 6.97$ ; AMP:  $C = 19.55 \pm 5.51$ ,  $M = 22.22 \pm 3.36$ ; Student's *t* test,  $P > 0.05$ ; Figure 2B).

---

insert Figure-1 and Figure-2 about here

---

#### 4. Discussion

In this study, after the repeated morphine exposure at P8 until P14, it was observed an increase in ATP hydrolysis activity in the synaptosomes from cerebral cortex, and a decrease of ADP hydrolysis activity in the synaptosomes from spinal cord at P16 (after two days of morphine withdrawal). At P30 it was not observed differences on nucleotides (ATP, ADP and AMP) hydrolysis activity from both structures.

Previous studies have shown that ectonucleotidase activities are different in central nervous system in agreement with development in spinal cord and cerebral cortex (de Paula Cognato *et al.*, 2005, Torres *et al.*, 2003). The cerebral cortex synaptosomes present a significant increase in nucleotide hydrolysis at 16 days of age (Cognato *et al.*, 2005). This period coincides with an intense synaptogenesis and augmentation in the activities of several enzymes involved in neurotransmitter metabolism and neuronal functions (Fiedler *et al.*, 1987).

The different activities verified only two days after morphine withdrawal in this study are possibly due to different E-NTPDases types present in both structures. Since, our results showed alteration in the ADPase and the ATPase activities in rat spinal cord and in rat cerebral cortex, respectively in spinal cord synaptosome we observed a decrease of ADP hydrolysis. The E-NTPDase1, well known by apyrase, stands out for its high preference for nucleoside triphosphates and nucleoside diphosphates. This enzyme presents wide distribution of cell-surface in the from all cell types of the central nervous system (Nagy, 1997; Zimmermann, 2001, 2006). When E-NTPDase1 is active, extracellular ATP is converted to AMP and then to adenosine by 5' nucleotidase, and ADP is not an appreciable product. However, when E-NTPDase1 is inhibited, as is the case in synaptosomes from spinal cord, ATP is converted to ADP by other ATPases, and ADP will be relatively stable. In this case, the AMP that is substrate to 5' nucleotidase may be reduced. In addition, in this case, the ADP may accumulate in the sensory neurons of spinal cord due to decreased ADPase activity. Although, it was not observed change in the 5' nucleotidase activity is difficult to infer whether this result, which was measured in vitro, will or will not result in increased extracellular adenosine in vivo. Conversely, the ATPase activity did not change probably due to an up-regulation of an ecto-ATPase that is coexpressed with the ATP diphosphohydrolase in central nervous system (Kegel *et al.*, 1997).

The E-NTPDase2 stands out for its high preference for nucleoside triphosphates over nucleoside diphosphates. It is expressed in brain rats since embryonic period and thus not only inactivates ligands for nucleoside triphosphate-sensitive receptors but also generates ligands for nucleoside diphosphates-sensitive receptors (Zimmermann, 2006). The increased activity in cerebral cortex synaptosomes observed in this study, after the repeated morphine exposure, was possible that the enzyme serves to modulate the ATP signal. Although we know that the ATP is neurotransmitter facilitatory of nociception by the P2X<sub>3</sub> receptors binding, these receptors are

co-localized with the inhibitory receptors of nociception transmission, the P2Y<sub>1</sub> receptor (Ruan and Burnstock, 2003). The extracellular nucleoside diphosphates are potent agonist of any P2Y receptors (Burnstock, 2006; Zimmermann, 2006). These receptors all belong to G protein-coupled receptors, act on a longer, second timescale, appropriate for the fine-tuning of synaptic transmission. As for the signal transduction pathways activated by P2Y receptors, the G protein to stimulate various modulatory mechanisms inside the cell, such as activate phospholipase C and increase in adenylyl cyclase (von Kügelgen, 2006). On the other hand, others P2Y receptors are capable to inhibit the enzyme (von Kügelgen, 2006) and this can promote an inhibition of neurotransmitter release (Hussl and Boehm, 2006). Previous studies have been showed that the P2Y activation by ADP, which is generated by the enzymatic degradation of ATP, may be decrease the excitatory neurotransmission onto secondary sensory neurons and thereby partly counterbalance the alogenic effect of ATP (Gerevich *et al.*, 2004). Although this hypothesis was not tested in the present study, we could suggest that this increase activity of ATP hydrolysis in cerebral cortex synaptosomes have the function of remove the ATP signal and generate a second signal, mediate by ADP.

Therefore, it is probably that the E-NTPDase 1 and E-NTPDase 2 are carrying through the same function, one hydrolyzing the ATP more quickly, and to another one more hydrolyzing slowly, thus increasing the ADP level of in the synaptic cleft. These effects remained for little time, a time that the activities already are normalized to the 30 and 60 days of age (date not shown). These results could suggest that the ADP may be neuromodulator in the opioid withdrawal process due the sustained morphine exposure in early life. Although our laboratory has been demonstrated that these animals do not present the tolerance to morphine in this age (Rozisky *et al.*, unpublished results), they present any symptoms of morphine withdrawal

(Rozisky *et al.*, unpublished results). Thus, it is probable that results are consequences of opioid modulation on different E-NTPDases activities in central nervous system.

In summary, our findings highlight the importance of purinergic system of young rats submitted to the repeated morphine exposure. Although, we do not know what the mechanisms that the ADP is carrying out in the spinal cord and cerebral cortex synaptosomes, we can suggest that the repeated morphine exposure in early life alters the E-NTPDases activities in these structures involved in the pain response. These alterations of E-NTPDases activities may constitute one of the mechanisms that mediate the development of some of the side effects, such as opioid withdrawal, associated with repeated morphine exposure in early life. Further studies are required, however, to investigate the ectonucleotidases and the role ADP following the repeated opioid administration in young rats.

**Acknowledgments:** This work was supported National Research Council of Brazil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Pró-Reitoria de Pesquisa - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ-UFRGS).



## References

- Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 1994; 64(3):445-75.
- Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW, Wilson JH. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 1999;58(2):211-32.
- Aley KO, Green PG, Levine JD. Opioid and adenosine peripheral antinociception are subject to tolerance and withdrawal. *J Neurosci* 1995;15(12):8031-8.
- Aley KO, Levine JD. Multiple receptors involved in peripheral alpha 2, mu, and A1 antinociception, tolerance, and withdrawal. *J Neurosci* 1997;17(2):735-44.
- Bardoni R, Goldstein PA, Lee CJ, Gu JG, MacDermott AB. ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Neurosci* 1997; 17(14):5297-304.
- Battastini AMO, da Rocha JBT, Barcellos CK, Dias RD, Sarkis JF. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res* 1991; 16:1303-10.
- Beland B, Fitzgerald M. Mu- and delta opioid receptors are down-regulated in large primary sensory neurons during postnatal development in rats. *Pain* 2001; 90:143-50.
- Bhutta AT, Rovnaghi C, Simpson PM, Gossett JM, Scalzo FM, Anand KJ. Interactions of inflammatory pain and morphine in infant rats. Long-term behavioral effects. *Physiol Behav* 2001; 73(1-2):51-8.
- Bishop B. Neural plasticity: Part 2. Postnatal maturation and function-induced plasticity. *Phys Ther* 1982; 62(8):1132-43.

- Bouwmeester NJ, van den Anker JN, Hop WC, Anand KJ, Tibboel D. Age- and therapy-related effects on morphine requirements and plasma concentrations of morphine and its metabolites in postoperative infants. *Br J Anaesth* 2003; 90:642-52.
- Bradford MMA. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem* 1976; 72:218-251.
- Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology*. 1997; 36(9):1127-39.
- Burnstock G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22(4):182-8.
- Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27(3):166-76.
- Burnstock G, Wood JN. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6(4):526-32.
- Chan K, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157:375-80.
- Chen W, Guidotti G. Soluble apyrases release adp during ATP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282(1):90-5.
- de Paula Cognato G, Bruno AN, Vuaden FC, Sarkis JJ, Bonan CD. Ontogenetic profile of ectonucleotidase activities from brain synaptosomes of pilocarpine-treated rats. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23(8):703-9.
- Fiedler EP, Marks MJ, Collins AC. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. *J Neurochem* 1987; 49(3):983-90.
- Fitzgerald M, Anand KJ. Developmental neuroanatomy and neurophysiology of pain. In:

- Schechter NL, Berde CB, Yaster M, editors. Pain in infant, children, and adolescents. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p. 11-31.
- Gerevich Z, Borvendeg SJ, Schröder W, Franke H, Wirkner K, Nörenberg W, Fürst S, Gillen C, Illes P. Inhibition of N-type voltage-activated calcium channels in rat dorsal root ganglion neurons by P2Y receptors is a possible mechanism of ADP-induced analgesia. *J Neurosci* 2004; 24(4):797-807.
- Heymann D, Reddington M, Kreutzberg GW. Subcellular localization of 5' nucleotidase in rat brain. *J. Neurochem* 1984; 43:971-78.
- Hussl S, Boehm S. Functions of neuronal P2Y receptors. *Pflugers Arch* 2006; 452(5):538-51.
- Kegel B, Braun N, Heine P, Maliszewski CR, Zimmermann H. An ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 1997;36:1189–200.
- Keil GJ 2nd, Delander GE. Time-dependent antinociceptive interactions between opioids and nucleoside transport inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274(3):1387-92.
- Kim JJ, Foy MR, Thompson RF. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(10):4750-3.
- Marsh DF, Hatch DJ, Fitzgerald M. Opioid system and the newborn. *Br J Anaesth* 1997; 79(6):787-95.
- Nagy AK, Houser C, Delgado-Escueta AV. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isosmotic gradient (Percoll) *J. Neurochem* 1984; 43 1114-1123.
- Nagy AK. Ecto-ATPases of the nervous system. In: Plesner L, Kirley TL, Knowles AF (eds). *Ecto-ATPases: Recent progress in structure and function*. New York: Plenum; 1997. p. 1-13.

- Nandi R, Fitzgerald M. Opioid analgesia in the newborn. *Eur J Pain* 2005; 9(2):105-8.
- Pattinson D, Fitzgerald M. The neurobiology of infant pain: Development of excitatory and inhibitory neurotransmission in the spinal dorsal horn. *Reg Anesth Pain Med* 2004; 29(1):36-44.
- Rabinowicz T, de Courten-Myers GM, Petetot JM, Xi G, de los Reyes E. Human cortex development: estimates of neural numbers indicate major loss late during gestation. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55(3):320-8.
- Rahman W, Dashwood MR, Fitzgerald M, Aynsley-Green A, Dickenson AH. Postnatal development of multiple opioid receptors in the spinal cord and development of spinal morphine analgesia. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;108(1-2):239-54.
- Ruan HZ, Burnstock G. Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem Cell Biol* 2003;120(5):415-26.
- Sawynok J, Liu XJ. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol* 2003; 69(5):313-40.
- Stanwood GD, Levitt P. Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4(1):65-71.
- Sweeney MI, White TD, Sawynok J. Involvement of adenosine in the spinal antinociceptive effects of morphine and noradrenaline. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 243(2):657-65.
- Torres IL, Battastini AM, Buffon A, Fürstenau CR, Siqueira I, Sarkis JJ, Dalmaz C, Ferreira MB. Ecto-nucleotidase activities in spinal cord of rats changes as function of age. *Int J Dev Neurosci* 2003; 21(8):425-9.
- von Kügelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 2006; 110(3):415-32.

Zimmermann H. Ecto-nucleotidases. Purinergic and pyrimidergic signalling. In: Abbracchio MP, Williams M (eds). Handbook of experimental pharmacology. New York: Springer, Berlin Heidelberg; 2001. p. 209-250.

Zimmermann H. Nucleotide signaling in nervous system development. Pflugers Arch 2006; 452(5):573-88.

## Legends

### FIGURE 1

**A:** ATP, ADP and AMP hydrolysis in synaptosomes from spinal cord of male rats at 16-days old. Values are mean  $\pm$  S.E.M. Specific enzyme activities were expressed as nmol Pi min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> protein. There is difference in ADP hydrolysis between the groups. (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ).

# indicates difference between the control (white bars) and morphine-treated group (black bars).

**B:** ATP, ADP and AMP hydrolysis in synaptosomes from spinal cord of male rats at 30-days old. Values are mean  $\pm$  S.E.M. Specific enzyme activities were expressed as nmol Pi min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> protein. There was not difference between the control (white bars) and morphine-treated group (black bars).

### FIGURE 2

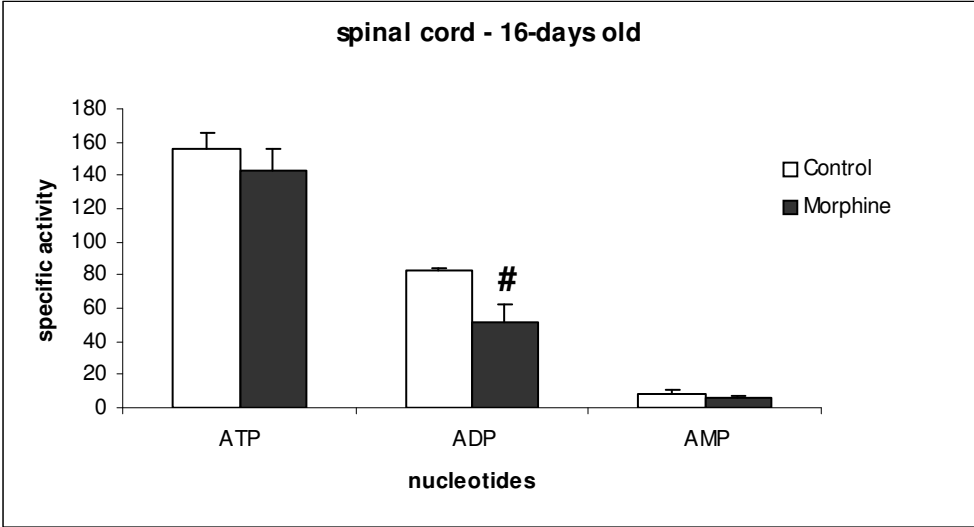
**A:** ATP, ADP and AMP hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex of male rats at 16-days old. Values are mean  $\pm$  S.E.M. Specific enzyme activities were expressed as nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein. There is difference in ATP hydrolysis between the groups. (Student's *t* test,  $P > 0.05$ ).

# indicates difference between the control (white bars) and morphine-treated group (black bars).

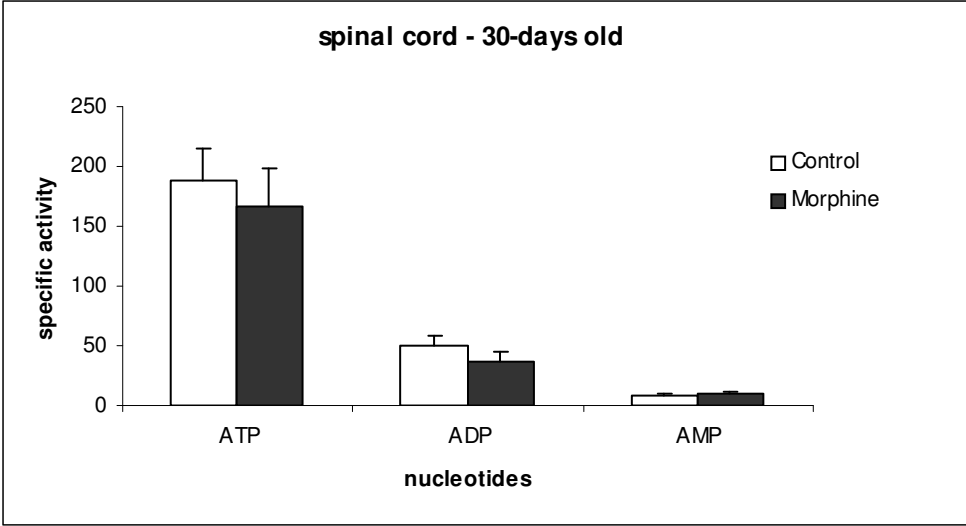
**B:** ATP, ADP and AMP hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex of male rats at 30-days old. Values are mean  $\pm$  S.E.M. Specific enzyme activities were expressed as nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein. There was not difference between the control (white bars) and morphine-treated group (black bars).

**FIGURE 1**

**A**

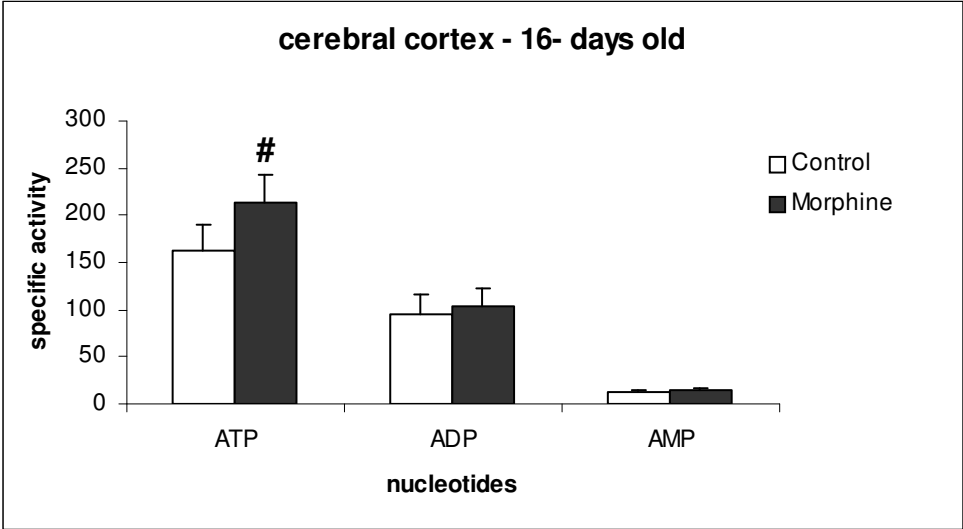


**B**

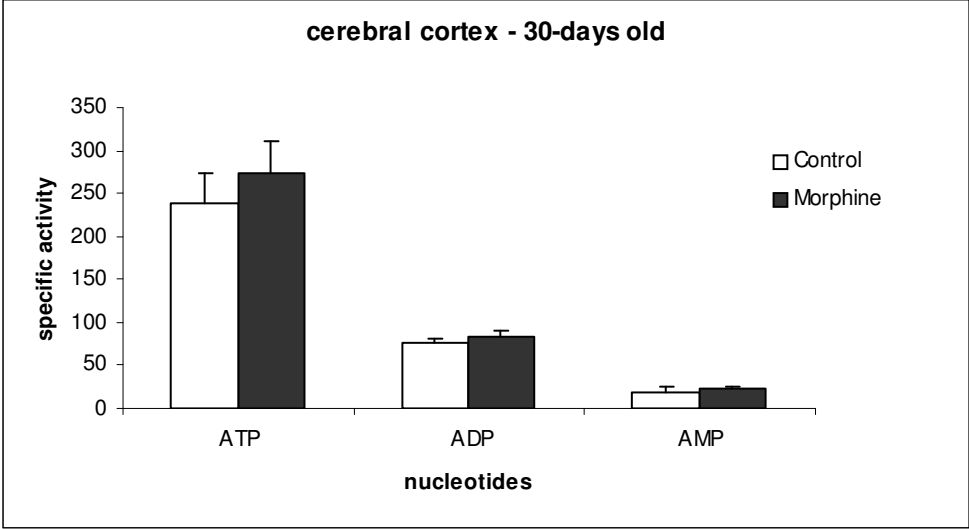


**FIGURE 2**

**A**



**B**





## **PARTE III**

## 1. DISCUSSÃO

Neste estudo, observamos que ratos submetidos à administração diária de morfina por sete dias, durante a segunda semana de vida, não desenvolveram o clássico fenômeno de tolerância à morfina. É importante salientar que esses animais, no último dia de tratamento, apresentaram maior tempo de analgesia quando comparados ao grupo controle. Esses resultados podem indicar a evolução da maturação do SNC desses animais durante o período de tratamento, corroborando com estudos prévios, os quais sugerem que a potência analgésica da morfina aumenta com a idade (Auguy-Valette *et al.*, 1978; Zhang e Pasternak, 1981; Nandi e Fitzgerald, 2005). Também devemos considerar que no dia do nascimento (P0), as vias nociceptivas aferentes e suas conexões já estão bem estabelecidas. Porém, o estabelecimento das vias inibitórias descendentes ocorre mais tarde que as excitatórias (Berde e Sethna, 2002).

Quando os animais atingiram a idade de 80 dias foram submetidos novamente ao tratamento repetido com morfina (por sete dias). Observamos, no primeiro dia de exposição, que o grupo que já havia recebido morfina previamente (grupo morfina-morfina) apresentou maior período de analgesia que os demais grupos. No último dia de exposição todos os animais que receberam morfina demonstraram a ausência de analgesia, ou seja, desenvolveram tolerância à morfina.

Considerando esses resultados em conjunto, confirmamos hipóteses de estudos prévios que demonstram que a tolerância à administração crônica de morfina em ratos infantis é menos pronunciada do que em adultos (Praag and Frenk, 1991). Um dos mecanismos que pode mascarar a presença da tolerância nestes animais é a maior expressão de receptores opióides, principalmente receptor  $\mu$  nesta idade. O desenvolvimento desses receptores ocorre principalmente durante a segunda semana de vida (Nandi and Fitzgerald, 2005). Estudos

demonstram que os receptores  $\mu$  e  $\kappa$  estão presentes desde o nascimento (P0) e o receptor  $\delta$  aparece somente a partir da segunda semana pós-natal (Rahman and Dickenson, 1999). No rato recém-nascido o receptor  $\mu$ , principal receptor responsável pela ação analgésica da morfina, está amplamente distribuído no corno dorsal da medula espinhal. A densidade de ligação dos opióides no receptor  $\mu$  ocorre durante as três primeiras semanas pós-natal e o pico de ligação ocorre no sétimo dia (P7). No final da terceira semana (P21) a expressão desse receptor cai e permanece constante em níveis de adulto (Rahman *et al.*, 1998). Esta abundância de receptor pode explicar porque os animais que receberam morfina durante sete dias apresentaram analgesia ao invés de tolerância, além de apresentarem maior tempo de analgesia ao final do tratamento (P14). Podemos considerar também a possibilidade de que a dose de 5  $\mu$ g administrada por sete dias não tenha sido capaz de desencadear tolerância, provavelmente devido à abundância de ligação aos receptores opióides presentes na medula espinhal e à não-saturação destes receptores, uma vez que para que esse fenômeno ocorra é necessário que os receptores estejam saturados. Além disso, é possível que os mecanismos envolvidos na tolerância possam estar ocorrendo, porém, não foi possível observar o efeito fisiológico por meio do teste utilizado nesse estudo.

A eficácia analgésica dos agonistas opióides parece ser diferente em neonatos e adultos (Rahman and Dickenson, 1999). Existem evidências de que o requerimento de morfina é menor em pacientes mais jovens (Bouwmeester *et al.*, 2003). Testes de limiar sensorial, nesses animais, têm demonstrado que a potência analgésica à morfina em relação à estimulação mecânica é significativamente maior no neonato que em adultos e declina com o avanço da idade (Nandi *et al.*, 2004). Entretanto, outros estudos demonstram que a potência analgésica da morfina, em ratos na primeira semana de vida, aumenta com a maturação devido à proliferação dos receptores opióides (Auguy-Valette *et al.*, 1978; Zhang e Pasternak, 1981) e à maturação dos sistemas modulatórios de inibição descendentes, os quais parecem ser totalmente funcionais

somente a partir da terceira semana pós-natal (Beland and Fitzgerald, 2001). A mudança na sensibilidade à morfina durante o período pós-natal parece ser parte de uma reorganização na estrutura e função das sinapses aferentes primárias, expressão e função de neurotransmissores e receptores, e modulação excitatória e inibitória descendente a partir do SNC (Fitzgerald and Beggs, 2001; Fitzgerald and Howard, 2003; Pattinson and Fitzgerald, 2004). Com isto, é possível sugerir que o efeito analgésico por um tempo mais prolongado, observado no P14, seja devido aos processos de maturação do sistema opióide durante o período do tratamento e que a administração repetida do fármaco possa produzir alterações na resposta analgésica a opióides ao longo da vida. O período de analgesia da morfina permanece aumentado no P80, mas somente quando avaliada a resposta aguda ao fármaco (primeiro dia de administração). O grupo que recebeu dois tratamentos com morfina (do P8 ao P14 e do P80 ao P86), apresentou um maior tempo de analgesia comparado aos demais grupos no P80. Estudos prévios têm demonstrado que a exposição crônica opióide durante a infância pode afetar o desenvolvimento do SNC, alterando o número e/ou sensibilidade dos receptores opióides (Thornton e Smith, 1998). Por outro lado, esses dados sugerem que a administração de morfina durante o período de desenvolvimento das funções dos receptores opióides, visto nas primeiras semanas de vida, pode exercer uma importante função na sensibilidade de animais adultos aos agonistas  $\mu$ . Conseqüentemente, a exposição repetida de morfina durante as primeiras semanas de vida pode levar a alterações a longo prazo na resposta opióide. No último dia de tratamento (P86), os animais que receberam morfina por sete dias (grupos morfina-morfina e controle-morfina) não apresentaram mais analgesia caracterizando o fenômeno de tolerância opióide (para revisão ler Suresh e Anand, 2001).

Na análise dos efeitos a curto, médio e longo prazos da exposição repetida a morfina, durante a segunda semana de vida, sobre a resposta nociceptiva e inflamatória, utilizou-se o teste da formalina. Neste estudo observou-se que ratos de 8 dias que foram expostos à administração repetida de morfina não apresentaram mudanças na resposta a formalina dois dias após o término do tratamento (P16) quando comparados ao grupo controle. Entretanto, aos 30 e 60 dias de idade demonstraram aumento de resposta na Fase II do teste da formalina (Fase inflamatória) a qual permaneceu até 60 dias, somando-se neste período aumento do comportamento nociceptivo na Fase I (Fase neurogênica). Adicionalmente, o novo tratamento com morfina do P80 ao P86, com uma dose diária, não alterou a resposta nociceptiva e inflamatória dos animais que receberam morfina (grupos morfina-morfina e controle-morfina) quando comparados aos grupos controles (controle-salina e morfina-salina). Estes resultados sugerem que a administração repetida de morfina durante a segunda semana de vida promove um aumento das respostas nociceptivas pelo menos até os 60 dias de idade, e que um novo tratamento do P80 ao P86, não promove alteração de resposta no P88. O aumento observado nos comportamentos nociceptivos induzidos pela formalina na Fase II sugere sensibilização central (Martindale *et al.*, 2001). O fenômeno de sensibilização central é representado pelo fenômeno de potenciação de longa duração (“*Long-term of Potentiation*” ou “LTP” em inglês) em que os receptores glutamatérgicos NMDA exercem importante papel no aumento da excitabilidade neuronal na medula espinhal (Loeser *et al.*, 2001). O SN do neonato é estrutural e funcionalmente imaturo, e significantes mudanças nos mecanismos de analgesia opióide ocorrem antes e após o nascimento (Marsh *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 1998; Beland e Fitzgerald, 2001). Estudos prévios revelam que a exposição a fármacos durante o período neonatal pode desencadear conseqüências no desenvolvimento do SNC, tais como alterações permanentes na resposta farmacológica e na sinalização celular (Stanwood e Levitt, 2004). Outros estudos demonstram que a exposição repetida opióide pode

levar à neuroplasticidade em alguns sistemas de neurotransmissores na medula espinhal (para revisão ler Mao e Mayer, 2001) e estas adaptações podem envolver mudanças na circuitaria modulatória da dor (Ossipov *et al.*, 2005). Embora estudos prévios tenham demonstrado que a exposição crônica opióide induz uma latente sensibilização dos neurônios da medula espinhal, que pode ser manifestada como hiperatividade neuronal durante a retirada opióide (Rohde *et al.*, 1997), outros estudos têm demonstrado que a administração opióide pode paradoxalmente induzir hiperalgesia (Gardell *et al.*, 2006). Por outro lado, alguns trabalhos têm relatado os vários efeitos da ativação do sistema glutamatérgico na nocicepção, tolerância e dependência mediada por opióide (Mao e Mayer, 2001). Embora, os animais que receberam o tratamento repetido com morfina do P8 ao P14 não tenham demonstrado os sintomas de tolerância, é possível que este limiar nociceptivo, no teste da formalina, seja devido a mudanças neuroplásticas na circuitaria nociceptiva. Ainda, outros estudos relatam que a transmissão facilitatória descendente tem importante função na hiperalgesia induzida por exposição crônica a morfina (Gardell *et al.*, 2006; Vanderah *et al.*, 2001).

Consistente a estes resultados, pode-se sugerir que a exposição repetida de morfina, do P8 ao P14, promove neuroplasticidade em sistemas excitatórios, observada principalmente pelo aumento na resposta neurogênica, e dessensibilização central, observada pelo aumento na resposta inflamatória. Os animais aos 30 dias não foram capazes de demonstrar alteração de resposta na Fase I, isto pode ser decorrente da imaturidade de outros sistemas fisiológicos desses animais, uma vez que nesta idade ainda são considerados animais infantis. Assim, sugere-se que outros sistemas possam estar mascarando o aumento da resposta neurogênica nestes animais. A Fase II, além de promover sensibilização central, também é considerada como fase inflamatória. Um envolvimento de neurotransmissores excitatórios na nocicepção inflamatória está relacionado com aumento nos níveis desses neurotransmissores no corno dorsal da medula

espinhal, elicitado pelo processo de inflamação crônica (Löfgren *et al.*, 1997; Ossipov *et al.*, 2005; Wimalawansa, 1996). Assim, a interação entre receptores opióides e excitatórios possui importante função na neuroplasticidade seguida pela exposição repetida de opióide. Experiências clínicas de que os opióides são menos efetivos e freqüentemente incertos para o tratamento de dor neuropática é comum. Tal neuroplasticidade pode ser a base do desenvolvimento de síndromes de dor e do resultado na redução dos efeitos antinociceptivos dos opióides (Mao e Mayer, 2001).

Na análise das respostas comportamentais resultantes da retirada da morfina, após sete dias de tratamento do P8 ao P14, observaram-se respostas alteradas aos 16 e 30 dias, mas não aos 60 dias. Os seguintes comportamentos foram analisados e medidos: atividade locomotora (número de vezes em que o animal cruza os quadrantes), *rearing* (número de vezes em que o animal se levanta e se mantém em posição vertical sobre os pés traseiros), latência (tempo em que o animal demora a sair do primeiro quadrante) e *grooming* (tempo em que o animal realiza autolimpeza do corpo). A latência representa uma medida de resposta de ansiedade (Lister, 1990; Britton and Britton, 1981). Observamos que os animais apresentaram alteração comportamental dois dias após a retirada da morfina (P16), o qual permanece até os 30 dias. Embora diferentes comportamentos tenham sido analisados nos diferentes períodos, como aumento de *grooming* aos 16 dias e aumento de *rearing* e locomoção aos 30 dias, sugere-se que o desenvolvimento de sensibilização comportamental ocorra de acordo com a idade. Os animais de 16 dias ainda apresentam o SNC imaturo, e como estão no período de amamentação, não são capazes de demonstrar os comportamentos típicos de atividade exploratória (como o *rearing* e locomoção) (Arakawa, 2005). Embora o comportamento de *grooming* tenha demonstrado ser bastante útil em investigações de anormalidades neurais resultantes de manipulações farmacológicas em animais (Aude *et al.*, 2006), também está envolvido em comportamentos de atividade exploratória

(Spruijt *et al.*, 1992). A modulação do *grooming* espontâneo demonstra o envolvimento do sistema dopaminérgico. A administração sistêmica de agonista dopaminérgico está envolvida com o aumento de *grooming* em ratos, enquanto que a administração de antagonista suprime este comportamento (Berridge *et al.*, 2000; Eilam *et al.*, 1992; Van Wimersma Greidanus *et al.*, 1989; Wachtel *et al.*, 1992). Assim, o *grooming* oferece um método mais discriminativo do que a atividade locomotora em animais mais jovens na avaliação da sensibilização comportamental à morfina. Os animais que receberam um novo tratamento com morfina entre P80 ao P86, tiveram seus comportamentos analisados aos 88 dias, e somente o grupo que recebeu a morfina neste último período (controle-morfina) foi capaz de desencadear respostas de retirada opióide, como o aumento de *rearing*. O grupo que recebeu morfina do P8 ao P14 e novamente do P80 ao P86 (grupo morfina-morfina) não apresentou esses sintomas, por pelo menos até dois dias de retirada. Pode-se sugerir que a exposição repetida de morfina durante a segunda semana pós-natal pode promover alterações na resposta opióide, assim não induzindo os sintomas de sensibilização comportamental, vistos neste estudo, após um segundo tratamento com morfina na idade adulta.

Nos últimos anos, muitos estudos têm demonstrado os efeitos de adição de drogas sobre o comportamento social (Andersen *et al.*, 2002; Carlezon *et al.*, 2003; Bolaños *et al.*, 2003). Eles descrevem que a exposição repetida ou intermitente às drogas de abuso como a cocaína, anfetamina e morfina causam uma sensibilização dos efeitos estimulantes em ratos (Carlezon e Nestler, 2002). Alterações na expressão gênica de proteínas em várias áreas do SN têm sido observadas após administração repetida destas drogas (Nestler, 2001; Carlezon e Nestler, 2002). As conseqüências moleculares da exposição aos opióides têm sido estudadas mais extensivamente em nível do sistema mesocorticolímbico e suas aferências. Sabe-se que a morfina é capaz de estimular a transmissão dopaminérgica, particularmente em duas áreas: putamen-caudado e núcleo accumbens (Cadoni e Di Chiara *et al.*, 1999) e esta propriedade tem



sido relacionada aos efeitos estimulantes da atividade locomotora (Babbini e Davis, 1972; Di Chiara e Imperato, 1988; Koob, 1992; Wise e Bozarth, 1987). Este fenômeno é conhecido como sensibilização comportamental a drogas (Koob, 1992). Assim, os resultados deste estudo, com animais jovens, corroboram com outros estudos que demonstram que a exposição repetida à morfina leva a sensibilização comportamental (Cadoni e Di Chiara *et al.*, 1999).

Em conclusão, estes resultados mostram que as respostas nociceptivas e comportamentais em relação à exposição repetida da morfina podem mudar de acordo com a idade estudada. Além disso, esses dados demonstram que a exposição repetida de morfina, durante a segunda semana de vida dos animais, pode resultar em subsequente desenvolvimento de alterações de respostas nociceptivas e comportamentais, as quais podem ser expressas até a idade adulta. Considerados em conjunto, tais resultados sugerem que a administração repetida de opióides no período neonatal, provavelmente promova adaptações em nível de diferentes sistemas de neurotransmissão. Estas mudanças comportamentais em resposta à exposição repetida à morfina nesta idade indicam a necessidade de avaliação das conseqüências clínicas da administração em longo prazo. Adicionalmente, estes resultados sugerem uma necessidade para novas pesquisas com o envolvimento de agentes que podem neutralizar estas adaptações induzidas por opióide.

Na análise dos efeitos a curto e médio prazo da exposição repetida de morfina, durante a segunda semana de vida, sobre a hidrólise dos nucleotídeos da adenina em estruturas do SNC, observaram-se diferenças nas atividades enzimáticas nos animais que receberam morfina. Em sinaptossomas de córtex cerebral, observou-se um aumento na atividade de hidrólise do ATP e em sinaptossomas de medula espinhal uma diminuição na atividade de hidrólise do ADP, diferenças vistas apenas aos 16 dias de idade (dois dias após a retirada de morfina). Aos 30 dias

não houve diferença nas atividades enzimáticas entre os grupos analisados em ambas as estruturas.

Estudos prévios têm demonstrado que as atividades das ectonucleotidases são diferentes em estruturas do SNC, como o córtex cerebral e medula espinhal, de acordo com o desenvolvimento (de Paula Cognato *et al.*, 2005, Torres *et al.*, 2003). Sinaptossomas de córtex cerebral apresentam aumento significativo na hidrólise dos nucleotídeos aos 16 dias de idade (de Paula Cognato *et al.*, 2005). Este período coincide com uma intensa sinaptogênese e aumento nas atividades de várias enzimas envolvidas no metabolismo de neurotransmissores e funções neuronais (Fiedler *et al.*, 1987). Apesar disso, as diferenças nas atividades de hidrólise, verificadas após dois dias de retirada opióide observadas neste estudo, podem ser devido a diferentes tipos de E-NTPDases presentes em ambas estruturas. Desde que, estes resultados sugerem alteração nas atividades ADPásicas e ATPásicas em medula espinhal e córtex cerebral, respectivamente. A E-NTPDase 2 apresenta grande preferência pelos nucleosídeos trifosfatados sobre os difosfatados. Ela é expressa em cérebro de ratos desde o período embrionário e, dessa maneira, não somente inativa ligantes de receptores de nucleosídeos trifosfatados, mas também gera ligantes para os receptores dos nucleosídeos difosfatados (Zimmermann, 2006). É possível que esta enzima tenha a função de modular o sinal do ATP em sinaptossomas de córtex cerebral, observado por meio do aumento da atividade de hidrólise deste nucleotídeo, após a exposição repetida à morfina. Embora já esteja bem estabelecido que o ATP seja um neurotransmissor facilitatório da nocicepção através da ligação aos receptores P2X<sub>3</sub>, alguns estudos demonstram que estes receptores estão co-localizados com receptores inibitórios da nocicepção, o receptor P2Y<sub>1</sub> (Ruan and Burnstock, 2003). Os nucleosídeos difosfatados são potentes agonistas de vários receptores P2Y (Burnstock, 2006; Zimmermann, 2006). Estes receptores estão acoplados à proteína G, e atuam por um tempo mais longo, apropriado para um fino ajustamento da

transmissão sináptica. Para a transdução do sinal via receptor P2Y, a proteína G estimula vários mecanismos modulatórios dentro da célula, tais como ativação da fosfolipase C e aumento da adenilato ciclase (von Kügelgen, 2006). Por outro lado, outros receptores P2Y são capazes de inibir a adenilato ciclase (von Kügelgen, 2006), podendo promover uma inibição da liberação de neurotransmissores (Hussl and Boehm, 2006). Estudos prévios têm relatado que a ativação do receptor P2Y pelo ADP, o qual é gerado pela degradação enzimática do ATP, pode diminuir a transmissão excitatória nos neurônios sensoriais secundários, e assim parte irá contrabalancear o efeito algogênico do ATP (Gerevich *et al.*, 2004). Embora essa hipótese não tenha sido testada neste estudo, pode-se sugerir que o aumento da atividade de hidrólise do ATP em sinaptossoma de córtex cerebral tenha a função de remover o sinal do ATP e gerar um segundo sinal, mediado pelo ADP. Por outro lado, em sinaptossoma de medula espinhal, observou-se uma diminuição da hidrólise do ADP. A E-NTPDase 1, também conhecida como apirase, apresenta preferência aos nucleosídeos tri e difosfatados. Esta enzima apresenta ampla distribuição nas superfícies celulares de todos os tipos de células do SNC (Nagy, 1997; Zimmermann, 2001, 2006). Quando a E-NTPDase 1 está ativa, o ATP extracelular é convertido a AMP e após à adenosina pela ecto-5' nucleotidase, e com isto o ADP não é um produto apreciável. Entretanto, quando a E-NTPDase 1 está inibida, como é o caso do sinaptossoma de medula espinhal, o ATP pode ser convertido em ADP também por outras ecto-ATPases, e o ADP pode ser relativamente estável. Neste caso, o AMP que é o substrato da ecto-5' nucleotidase pode estar reduzido. Em adição, neste caso, o ADP pode acumular nos neurônios sensoriais da medula espinhal devido à atividade ADPásica estar diminuída. Embora alteração na atividade da ecto-5' nucleotidase não tenha sido observada neste estudo, é difícil inferir se esse ensaio, realizado *in vitro*, resultará ou não em aumento de adenosina extracelular *in vivo*. Inversamente, a atividade ATPásica não foi alterada provavelmente devido a uma compensação por aumento da atividade de uma outra E-NTPDase

que pode ser co-expressa com a E-NTPDase 1 no SNC (Kegel *et al.*, 1997). Conseqüentemente, é provável que a E-NTPDase 1 e a E-NTPDase 2 estejam realizando a mesma função, uma hidrolisando mais rapidamente o ATP, enquanto a outra hidrolisa mais lentamente o ADP, assim aumentando o nível de ADP na fenda sináptica. Estes efeitos permaneceram por dois dias após a retirada da morfina, uma vez que as atividades enzimáticas já estão normalizadas aos 30 e 60 dias (dados não mostrados). Estes resultados podem sugerir uma ação moduladora do ADP em mecanismos de retirada opióide decorrente da exposição repetida de morfina durante as primeiras semanas de vida. Embora, os animais que receberam esse tratamento não apresentaram o fenômeno de tolerância, eles foram capazes de demonstrar alguns sintomas de retirada opióide. Assim, é provável que diferentes E-NTPDases estejam atuando em mecanismos iguais.

Em resumo, estes resultados destacam a importância do sistema purinérgico em ratos infantis submetidos à exposição repetida de morfina. Embora ainda não se conheçam quais os mecanismos que o ADP executa em sistemas neuromodulatórios em medula espinhal e córtex cerebral, demonstramos que o tratamento repetido com morfina naquela idade altera as atividades das E-NTPDases em tais estruturas envolvidas com a resposta da dor. Essas alterações nas atividades das E-NTPDases podem constituir um dos mecanismos responsáveis por efeitos secundários, tais como retirada opióide, associados com o tratamento repetido com morfina durante o período neonatal. Estudos adicionais são requeridos, entretanto, para investigar as ectonucleotidases e o papel do ADP seguindo a exposição repetida de morfina em ratos de duas semanas.

## 2. CONCLUSÕES

**2.1.** Animais de 8 dias expostos ao tratamento repetido com morfina, em dose de 5µg, por sete dias, não desenvolvem sintomas de tolerância opióide.

**2.2.** Animais de 80 dias, expostos ao tratamento repetido com morfina do P8 ao P14, apresentam maior tempo de analgesia quando submetidos à administração aguda de morfina.

**2.3.** Animais de 80 dias, expostos ao tratamento repetido com morfina do P8 ao P14, e a um segundo tratamento do P80 ao P86 apresentam o clássico fenômeno da tolerância opióide.

**2.4.** Animais de 8 dias expostos ao tratamento repetido com morfina, em dose de 5µg, por sete dias apresentam resposta nociceptiva aumentada no teste da formalina aos 30 e 60 dias de idade.

**2.5.** Animais de 8 dias expostos ao tratamento repetido com morfina, em dose de 5µg, por sete dias apresentam sintomas de retirada opióide, vistos como aumento de *grooming* aos 16 dias e aumento de locomoção e *rearing* aos 30 dias.

**2.6.** Animais de 88 dias, submetidos ao tratamento prévio com morfina (do P8 ao P14) e submetidos a um segundo tratamento (do P80 ao P86) não demonstram sintomas de retirada opióide. Porém, os animais que recebem somente o último tratamento apresentam estes sintomas, vistos como o aumento de *rearing*.

**2.7.** A exposição repetida de morfina, do P8 ao P14, altera as atividades ectonucleotídicas em estruturas do SNC em animais com 16 dias de idade. Em sinaptossomas de córtex cerebral, há aumento na atividade ATPásica, enquanto que em sinaptossomas de medula espinhal há diminuição na atividade ADPásica.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

As perspectivas futuras para continuação deste estudo, relacionadas aos processos neurobiológicos da resposta nociceptiva e comportamental frente à exposição repetida de morfina, são as seguintes:

- Investigar os efeitos da administração repetida de morfina em ratos machos em diferentes intervalos de tempo do P8 ao P14, sobre a resposta analgésica no último dia;
- Investigar os sistemas de neurotransmissores envolvidos com o comportamento alterado de ratos machos no P16 e P30, após a administração repetida de morfina do P8 ao P14;
- Investigar a captação e liberação de glutamato em medula e córtex cerebral de ratos machos no P16, P30 e P60, após a administração repetida de morfina do P8 ao P14, uma vez que este neurotransmissor está envolvido com a resposta nociceptiva;
- Investigar a concentração de substâncias pró-inflamatórias em nível sistêmico de ratos machos no P16, P30 e P60, após a administração repetida de morfina do P8 ao P14, uma vez que os animais apresentaram uma resposta aumentada no teste da formalina;
- Verificar o *binding* de receptores opióides em medula e córtex cerebral de ratos machos no P16, P30 e P60, após a administração repetida de morfina do P8 ao P14;
- Avaliar a concentração de ATP, ADP, AMP e adenosina em medula e córtex cerebral de ratos machos no P16, P30 e P60, após a administração repetida de morfina do P8 ao P14.

## REFERÊNCIAS

AGTERESCH HJ, DAGNELIE PC, VAN DER BERG JW, WILSON JH. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 58(2):211-32, 1999.

ALEY KO, GREEN PG, LEVINE JD. Opioid and adenosine peripheral antinociception are subject to tolerance and withdrawal. *J Neurosci* 15(12):8031-8, 1995.

ALEY KO, LEVINE JD. Multiple receptors involved in peripheral alpha 2, mu, and A1 antinociception, tolerance, and withdrawal. *J Neurosci* 17(2):735-44, 1997.

ANAND KJS, HICKEY PR. Pain and its effects in the human neonate and fetus. *N Engl J Med* 317:1321-1329, 1987.

ANAND KJS, CARR DB. The neuroanatomy, neurophysiology and neurochemistry of pain, stress and analgesia in newborn, infants and children. *Pediatr Clin North Am* 36:795-822, 1989.

ANAND KJ. Clinical importance of pain and stress in preterm neonates. *Biol Neonate* 73:1-9, 1998.

ANAND KJ, BARTON BA, MCINTOSH N, LAGERCRANTZ H, PELAUSA E, YOUNG TE, VASA R. Analgesia and sedation in preterm neonates who require ventilatory support: results from the NOPAIN trial. Neonatal Outcome and Prolonged Analgesia in Neonates. *Arch Pediatr Adolesc Med* 153(4):331-338, 1999.



ANAND KJ. Pharmacological approaches to the management of pain in the neonatal intensive care. *J Perinatol* 1:S4-S11, 2007.

ANDERSEN SL, ARVANITOGIANNIS A, PLIAKAS AM, LEBLANC C, CARLEZON WA JR. Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. *Nat Neurosci* 5(1):13-4, 2002.

ARAKAWA H. Interaction between isolation rearing and social development on exploratory behavior in male rats. *Behav Processes* 70(3):223-34, 2005.

ARNOLD JH, TRUOG RD, ORAV EJ, SCAVONE JM, HERSHENSON MB. Tolerance and dependence in neonates sedated with fentanyl during extracorporeal membrane oxygenation. *Anesthesiology* 73(6):1136-1140, 1990.

AUDE MC, GOULET S, DORÉ FY. Repeated subchronic exposure to phencyclidine elicits excessive atypical grooming in rats. *Behav Brain Res* 167:103–11, 2006.

AUGUY-VALETTE A, CROSS J, GOUARDERES C, GOUT R, PONTENNIER G. Morphine analgesia and cerebral opiate receptors: a developmental study. *Br J Pharmacol* 63:303-308, 1978.

BABBINI M, DAVIS WM. Time-dose relationships for locomotor activity effects of morphine after acute or repeated treatment. *Br J Pharmacol* 46(2):213-24, 1972.

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

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.

BASBAUM AI, JESSEL TM. The Perception of Pain. In: KANDEL ER, SCHARTZ JH, JESSEL TM (eds). *Principles of Neural Science*. 4ed. New York: McGraw-Hill, 2000. p. 472-491.

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

BELAND B, FITZGERALD M. Mu- and delta opioid receptors are down-regulated in large primary sensory neurons during postnatal development in rats. *Pain* 90:143-50, 2001

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

BERRIDGE KC, ALDRIDGE JW. Super-stereotypy I: enhancement of a complex movement sequence by systemic dopamine D1 agonists. *Synapse* 37:194-204, 2000.

BOLAÑOS CA, BARROT M, BERTON O, WALLACE BLACK D, NESTLER EJ. Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. *Biol Psychiatry* 54(12):1317-29, 2003.

BONICA JJ, LOESER JD. History and Pain Concepts and Therapies. In: LOESER JD, BUTLER SH, CHAPMAN CR, TURK DC (eds). *Bonica's Management of Pain*. 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 3-16.

BOUWMEESTER NJ, VAN DEN ANKER JN, HOP WC, ANAND KJ, TIBBOEL D. Age- and therapy-related effects on morphine requirements and plasma concentrations of morphine and its metabolites in postoperative infants. *Br J Anaesth* 90:642-52, 2003.

BRITTON DR, BRITTON KT. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. *Pharmacol Biochem Behav* 15(4):577-82, 1981.

BURNSTOCK G, WOOD JN. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol* 6(4):526-532, 1996.

BURNSTOCK G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* 36(9):1127-39, 1997.

BURNSTOCK G. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* 22(4):182-8, 2001.

BURNSTOCK G. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S172-81, 2006.

CADONI C, Di CHIARA G. Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine. *Neuroscience* 90(2):447-55, 1999.

CAHILL CM, WHITE TD, SAWYNOK J. Spinal opioid receptors and adenosine release: neurochemical and behavioral characterization of opioid subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 275(1):84-93, 1995.

CARLEZON WA Jr, MAGUE SD, ANDERSEN SL. Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biol Psychiatry* 54(12):1330-7, 2003.

CARLEZON WA Jr., NESTLER EJ. Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? *Trends Neurosci* 25(12):610-5, 2002.

CERVERO F, IGGO A. The substantia gelatinosa of the spinal cord. A critical review. *Brain* 103:717-772, 1980.

CHEN W, GUIDOTTI G. Soluble apyrases release ADP during ATP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 282(1):90-5, 2001.

CURRO FA. Assessing the physiological and clinical characteristics of acute versus chronic pain. Introduction. *Dent Clin North Am* 31(4):xiii-xxiii, 1987.

DE LIMA J, LLOYD-THOMAS AR, HOWARD RF, SUMNER E, QUINN TM. Infant and neonatal pain: anaesthetists' perceptions and prescribing patterns. *BMJ* 313(7060):787, 1996.

DE PAULA COGNATO G, BRUNO AN, VUADEN FC, SARKIS JJ, BONAN CD. Ontogenetic profile of ectonucleotidase activities from brain synaptosomes of pilocarpine-treated rats. *Int J Dev Neurosci* 23(8):703-9, 2005.

DESHPANDE JK, ANAND KJS. Basic aspects of acute pediatric pain and sedation. In: DESHPANDE JK, TOBIAS JD (eds). *The Pediatric Pain Handbook*. St. Louis: Mosby-Years Book, Inc., 1996. p.1-48.

DI CHIARA G, IMPERATO A. Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 244(3):1067-80, 1988.

EILAM D, TALANGBAYAN H, CANARAN G, SZECHTMAN H. Dopaminergic control of locomotion, mouthing, snout contact, and grooming: opposing roles of D1 and D2 receptors. *Psychopharmacology* (Berl) 106:447-54, 1992.

EL SAYED MF, TADDIO A, FALLAH S, DE SILVA N, MOORE AM. Safety profile of morphine following surgery in neonates. *J Perinatol* 27(7):444-447, 2007.

FERREIRA MBC, TORRES ILS. Dor Crônica. In: KAPCZINSKI F, QUEVEDO J, IZQUIERDO I (eds). Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 347-365.

FIEDLER EP, MARKS MJ, COLLINS AC. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. *J Neurochem* 49(3):983-90, 1987.

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

FISK NM, GITAU R, TEIXEIRA JM, GIANNAKOULOPOULOS X, CAMERON AD, GLOEVR VA. Effect of direct fetal opioid analgesia on fetal hormonal and hemodynamic stress response to intrauterine needling. *Anesthesiology* 95:828-835, 2001.

FITZGERALD M. Development of pain mechanisms. *Br Med Bull* 47:667-675, 1991.

FITZGERALD M, ANAND KJ. Developmental neuroanatomy and neurophysiology of pain. In: SCHECHTER NL, BERDE CB, YASTER M (eds). Pain in infant, children, and adolescents. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p. 11-31.

FITZGERALD M, BEGSS S. The neurobiology of pain: developmental aspects. *Neuroscientist* 7:246-57, 2001.

FITZGERALD M, HOWARD R. The neurobiological basis of pediatric pain. *IN*: Schechter NL, Berde CB, Yaster M, (eds). Pain in children and adolescents. 2nd ed. Lippincott: Williams & Wilkins; 2003. p. 19-42.

FULOP-MUELLER R. Triumph over pain. New York: Literary Guild of America, 1938.

GARDELL LR, KING T, OSSIPOV MH, RICE KC, LAI J, VANDERAH TW, PORRECA F. Opioid receptor-mediated hyperalgesia and antinociceptive tolerance induced by sustained opiate delivery. *Neurosci Lett* 396(1):44-9, 2006.

GEREVICH Z, BORVENDEG SJ, SCHRÖDER W, FRANKE H, WIRKNER K, NÖRENBERG W, FÜRSTS S, GILLEN C, ILLES P. Inhibition of N-type voltage-activated calcium channels in rat dorsal root ganglion neurons by P2Y receptors is a possible mechanism of ADP-induced analgesia. *J Neurosci* 24(4):797-807, 2004.

GRUNAU RE, OBERLANDER TF, WHITFIELD MF, FITZGERALD C, LEE SK. Demographic and therapeutic determinants of pain reactivity in very low birth weight neonates at 32 Weeks' postconceptional Age. *Pediatrics* 107(1):105-112, 2001.

HAYASHIDA M, FUKURA KI, FUKUNAGA A. Clinical application of adenosine and ATP for pain control. *J Anesth* 19:225-235, 2005.

HORI Y, ENDO K, TAKAHASHI T. Presynaptic inhibitory action of enkephalin on excitatory transmission in superficial dorsal horn of rat spinal cord. *J Physiol* 450:673-85, 1992.

HOWARD BG, HUDA A. Analgésicos Opióides. In: ALFRED GOODMAN GILMAN, JOEL G. HARDMAN, LEE E. LIMBIRD (eds). *The pharmacological basis of therapeutics*, 11ed. United States of America: McGRAW-HILL, Medical Publishing Division. 2001. p. 569-617.

HOVAV E, WEINSTOCK M. Temporal factors influencing the development of acute tolerance to opiates. *J Pharmacol Exp Ther* 242(1):251-256, 1987.

HUGHES J, SMITH TW, KOSTERLITZ HW, FOTHERGILL LA, MORGAN BA, MORRIS HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258:577-580, 1975.

HUSSL S, BOEHM S. Functions of neuronal P2Y receptors. *Pflugers Arch* 452(5):538-51, 2006.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. Ethical Guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110, 1983.

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

JOHANSSON B, HALLDNER L, DUNWIDDIE TV, MASINO SA, POELCHEN W, GIMÉNEZ-LLORT L, ESCORIHUELA RM, FERNÁNDEZ-TERUEL A, WIESENFELD-HALLIN Z, XU XJ, HÅRDEMARK A, BETSHOLTZ C, HERLENIUS E, FREDHOLM BB.



Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(16):9407-12, 2001.

JOHNSTON CC, COLLINGE JM, HENDERSON SJ, ANAND KJ. A cross-sectional survey of pain and pharmacological analgesia in Canadian neonatal intensive care units. *Clin J Pain* 13(4):308-12, 1997.

KAHN DJ, RICHARDSON DK, GRAY JE, BEDNAREK F, RUBIN LP, SHAH B, et al. Variation among neonatal intensive care units in narcotic administration. *Arch Pediatr Adolesc Med* 152(9):844-51, 1998.

KAR S, QUIRION R. Neuropeptide receptors in developing and adult rat spinal cord: an in vitro quantitative autoradiography study of calcitonin gene-related peptide, neurokinins,  $\mu$ -opioid, galanin, somatostatin, neurotensin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. *J Comp Neurol* 354(2):253-81, 1995.

KAVASHIMA Y, TOSHIRO N, NINOMIYA H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of the platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96:2157-2162, 2000.

KEELE KD. *Anatomies of Medicine*. Vol 1. New York: Oxford University Press, 1957.

KEGEL B, BRAUN N, HEINE P, MALISZEWSKI CR, ZIMMERMANN H. An ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 36:1189– 200, 1997.

KOSTERLITZ HW. The Wellcome Foundation lecture, 1982. Opioid peptides and their receptors. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 225(1238):27-40, 1985.

KOOB GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13(5):177-84, 1992.

KUKULSKI F, LÉVESQUE SA, LAVOIE ÉG *et al.* Comparative hydrolysis of P2 receptors agonists by E-NTPDase 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signaling* 1:193-204, 2005.

LAVOIE EG, KUKULSKI F, LÉVESQUE SA, LECKA J, SÉVIGNY J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem Pharmacol.* 67(10):1917-26, 2004.

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, 1999. p. 25-42.

LISTER RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 46(3):321-40, 1990.

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

LÖFGREN O, YU LC, THEODORSSON E, HANSON P, LUNDERBERG T. Intrathecal CGRP

(8-37) results in a bilateral increase in hindpaw withdrawal latency in rats with a unilateral thermal injury. *Neuropeptides* 31(6):601-7, 1997.

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.

LOMBARD M-C, BESSON JM. Attempts to gauge the relative importance of presynaptic and postsynaptic effects of morphine on the transmission of noxious messages in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Pain* 37:35-345, 1989.

MACGREGOR R, EVANS D, SUGDEN D, GAUSSEN T, LEVENE M. Outcome at 5-6 years of prematurely born children who received morphine as neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* Ed 79:F40-43, 1998.

MAO J, MAYER DJ. Spinal cord neuroplasticity following repeated opioid exposure and its relation to pathological pain. *Ann N Y Acad Sci* 933:175-84, 2001.

MARSH DF, HATCH DJ, FITZGERALD M. Opioid system and the newborn. *Br J Anaesth* 79:787-95, 1997.

MARTÍN WR, EADES CG, THOMPSON JA, HUPPLER RE, GILBERT PE. The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197:17-532, 1976.

MARTINDALE J, BLAND WARD PA, CHESSEL P. Inhibition of C-fibre mediated sensory

transmission in the rat following intraplantar formalin. *Neurosci Lett* 316(1):33-6, 2001.

MELZACK R, WALL PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979, 1965.

MELZACK R, WALL PD. The challenge of pain. New York: Basic Books, 1982.

MIURA E, PROCIANOY RS. Neonatologia: Princípios e Prática. 2ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

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

NAGY AK. Ecto-ATPases of the nervous system. In: Plesner L, Kirley TL, Knowles AF (eds). *Ecto-ATPases: Recent progress in structure and function*. New York: Plenum; 1997. p. 1-13.

NANDI R, FITZGERALD M. Opioid analgesia in the newborn. *Eur J Pain* 9(2):105-108, 2005.

NESTLER EJ. Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* 10(3):201-17, 2001.

NANDI R, BEACHAM D, MIDDLETON J, KOLTZENBURG M, HOWARD RF, FITZGERALD M. The functional expression of mu opioid receptors on sensory neurons is developmentally regulated; morphine analgesia is less selective in the neonate. *Pain* 111(1-2):38-50, 2004.

OSSIPOV MH, LAI J, KING T, VANDERAH TW, PORRECA F. Underling mechanisms of pronociceptive consequences of prolonged morphine exposure. *Pept Sci* 80:319-325, 2005.

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

PERT CB, SNYDER SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179:1011-1014, 1973.

PLEUVRY BJ, LAURETTI GR. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacol Ther* 71(3):313-324, 1996.

PORTER FL, GRUNAU RE, ANAND KJ. Long-term effects of pain in infants. *J Dev Behav Pediatr* 20(4):253-261, 1999.

PRAAG HV, FRENK H. Evidence for opiate tolerance en newborn rats. *Dev Brain Res* 60:99-102, 1991.

QUINN MW, WILD J, DEAN HG, HARTLEY R, RUSHFORTH JA, PUNTIS JW, LEVENE MI. Randomised double-blind controlled trial of effect of morphine on catecholamine concentrations in ventilated pre-term babies. *Lancet* 342(8867):324-327, 1993.

RAHMAN W, DASHWOOD MR, FITZGERALD M, AYNSLEY-GREEN A, DICKENSON AH. Postnatal development of multiple opioid receptors in the spinal cord and development of

spinal morphine analgesia. *Dev Brain Res* 108:239-254, 1998.

RAHMAN W, DICKENSON AH. Development of spinal opioid systems. *Reg Anesth Pain Med* 24(5):383-5, 1999.

RALEVIC V, BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3):413-492, 1998.

RANDIC M, JIANG MC, CERNE R. Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurosci* 13:5228-5241, 1993.

RANE K, SEGERDAHL M, GOINY M, SOLEVI A. An intrathecal adenosine administration: a phase 1 clinical safety study in healthy volunteers, with additional evaluation of its influence on sensory thresholds and experimental pain. *Anesthesiology* 89:1108-1115, 1998.

REYNOLDS ML, FITZGERALD M. Long-term sensory hyperinnervation following neonatal skin wounds. *J Comp Neurol* 358:487-498, 1995.

RICHARDSON KA, YOHAY AL, GAUDA EB, MCLEMORE GL. Neonatal animal models of opiate withdrawal. *Ilar J* 47(1):39-48, 2006.

ROBSON SC, SÉVIGNY J, ZIMMERMANN H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* 2:409-430, 2006.

ROHDE DS, MCKAY WR, ABBADIE C, BASBAUM AI. Contribution of sacral spinal cord neurons to the autonomic and somatic consequences of withdrawal from morphine in the rat. *Brain Res* 745(1-2):83-95, 1997.

RUAN HZ, BURNSTOCK G. Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem Cell Biol* 120(5):415-26, 2003.

SAWYNOK J, SWEENEY MI, WHITE TD. Adenosine release may mediate spinal analgesia by morphine. *Trends Pharmacol Sci* 10(5):186-189, 1989.

SILVEIRA PP, PORTELLA AK, CLEMENTE Z, GAMARO GD, DALMAZ C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci* 23(1):93-9, 2005.

SIMONS SH, TIBBOEL D. Pain perception development and maturation. *Semin Fetal Neonatal Med* 11:227-231, 2006.

SOLLEVI A. Adenosine for pain control. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 110:135-6, 1997.

SPRUIJT BM, VAN HOOFF JA, GIPSEN W.H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev* 72:825-52, 1992.

STANWOD GD, LEVITT P. Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. *Curr Opin*

*Pharmacol* 4(1):65-71, 2004.

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

SURESH S, ANAND KJ. Opioid tolerance in neonates: a state-of-the-art review. *Pediatric Anaesth* 11:211-251, 2001.

SWEENEY MI, WHITE TD, JHAMANDAS KH, SAWYNOK J. Morphine releases endogenous adenosine from the spinal cord in vivo. *Eur J Pharmacol* 141:169-170, 1987.

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

THORNTON SR, WANG AF, SMITH FL. Characterization of neonatal rat morphine tolerance and dependence. *Eur J Pharmacol* 340(2-3):161-167, 1997.

THORNTON SR, SMITH FL. Long-term alterations in opiate antinociception resulting from infant fentanyl tolerance and dependence. *Eur J Pharmacol* 363(2-3):113-9, 1998.

TORRES IL, BATTASTINI AM, BUFFON A, FÜRSTENAU CR, SIQUEIRA I, SARKIS JJ, DALMAZ C, FERREIRA MB. Ecto-nucleotidase activities in spinal cord of rats changes as function of age. *Int J Dev Neurosci* 21(8):425-9, 2003.



VANDERAH TW, SUENAGA NM, OSSIPOV MH, MALAN TP Jr., LAI J, PORRECA F. Tonic descending facilitation from the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced abnormal pain and antinociceptive tolerance. *J Neurosci* 21:279-86, 2001.

VAN WIMERSMA GREIDANUS TB, MAIGRET C, TORN M, RONNER E, VAN DER KRACHT S, VAN DER WEE NJ, *et al.* Dopamine D-1 and D-2 receptor agonists and antagonists and neuropeptide-induced excessive grooming. *Eur J Pharmacol* 173:227–31, 1989.

VON KÜGELGEN I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110(3):415-32, 2006.

WACHTEL SR, BROODERSON RJ, WHITE FJ. Parametric and pharmacological analysis of the enhanced grooming response elicited by the D1 dopamine receptor agonist SKF 38393 in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 109:41–8, 1992.

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

WANG JK, NAUSS LA, THOMAS JE. Pain relief by intrathecally applied morphine in man. *Anesthesiology* 50(2):149-51, 1979.

WANNMACHER L, FERREIRA MBC. Princípios gerais de dor. In: FUCHS FD, WANNMACHER L, FERREIRA MBC (eds). Farmacologia Clínica – Fundamentos da Terapêutica Racional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 152-156.

WIMALAWANSA SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev* 17(5):533-85, 1996.

WISE RA, BOZARTH MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94(4):469-492, 1987.

YASTER M, DESHPANDE JK. Management of pediatric pain with opioid analgesics. *J Pediatr*. 113:421-429, 1988.

ZHANG AZ, PASTERNAK GW. Ontogeny of opioid pharmacology and receptors: high and low affinity site differences. *Eur J Pharmacol* 73:29-40, 1981.

ZIMMERMANN H. 5'nucleotidase- molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285:345-365, 1992.

ZIMMERMANN H, BRAUN N. Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog Brain Res*. 120:371-85, 1999.

ZIMMERMANN H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362:299-309, 2000.

ZIMMERMANN H. Ecto-nucleotidases. Purinergic and pyrimidergic signalling. In: Abbracchio MP, Williams M (eds). *Handbook of experimental pharmacology*. New York: Springer, Berlin Heidelberg; 2001. p. 209-250.

ZIMMERMANN H. Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Arch* 452(5):573-88, 2006.

## DIVULGAÇÃO

Apresentações e publicações em anais de congressos relacionadas à Dissertação:

1. BRANCHER LM; **ROZISKY JR**; ADACHI LNS; ALVES VS; FERREIRA MBC; TORRES ILS. Administração repetida de morfina em filhotes de ratos: efeitos em testes de Campo-aberto e *Tail-flick* **In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre.**
2. ALVES VS; **ROZISKY JR**; ADACHI LNS; BRANCHER LM; TEIXEIRA JE; FERREIRA MBC; TORRES ILS. Avaliação da resposta inflamatória em ratos submetidos à administração repetida de morfina **In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre. v. XIX. p. 359 .**
3. ADACHI LNS; **ROZISKY JR**; RAMOS DB; DA SILVA RS; BONAN CD; SARKIS JJF, TORRES ILS. Efeito da administração repetida de morfina nas atividades ATP-ADPásicas e de 5'nucleotidase em medula espinhal de filhotes de ratos **In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre. v. XIX. p. 472.**
4. ADACHI LNS; **ROZISKY JR**; RAMOS DB; DA SILVA RS; BONAN CD; SARKIS JJF, TORRES ILS Avaliação das atividades ecto-nucleotidásicas em medula espinhal de ratos em diferentes idades **In: Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2007, Porto Alegre.**
5. **ROZISKY JR**; ADACHI LNS; ALVES VS; BRANCHER LM.; DA SILVA RS; BONAN CD; FERREIRA MBC; TORRES ILS. Avaliação da hidrólise de nucleotídeos e de alguns parâmetros comportamentais em filhotes de ratos submetidos à administração de morfina **In: 39ª Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2007, Ribeirão Preto.**
6. ADACHI LNS; **ROZISKY JR**; ALVES VS; RAMOS DB; BONAN CD; DA SILVA RS; SARKIS JJF; TORRES ILS. Avaliação das atividades de ectonucleotidases em medula espinhal de filhotes de ratos submetidos à administração repetida de agonista opióide. **Revista HCPA- Suplemento 1 - Anais da 27ª. Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Editora da UFRGS, 2007. v. 26. p. 237 – 237.**
7. ALVES VS; **ROZISKY JR**; ADACHI LNS; TEIXEIRA JE; BRANCHER LM; FERREIRA MBC; TORRES ILS. Avaliação da resposta nociceptiva no teste da formalina

- em ratos submetidos à administração repetida de agonista opióide no período pós-natal. **Revista HCPA - Suplemento 1- Anais da 27<sup>a</sup>. Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Editora da UFRGS, 2007. v. 27. p. 253 – 254.**
8. **ROZISKY JR;** ADACHI LNS; ALVES VS; BRANCHER LM; FERREIRA MBC; TORRES ILS. Avaliação das respostas nociceptiva e comportamental em filhotes de ratos submetidos à administração repetida de agonista opióide. **Revista HCPA- Suplemento- Anais do Salão de Iniciação Científica do Hospital de Clínica de Porto Alegre. Editora da UFRGS, 2007. v. 27. p. 237 – 237.**
  9. ALVES VS; **ROZISKY JR;** ADACHI LNS; TEIXEIRA JE; BRANCHER LM; FERREIRA MBC; TORRES ILS. Avaliação da resposta nociceptiva no teste da formalina em ratos submetidos à administração repetida de agonista opióide no período pós-natal. **In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2007, Águas de Lindóia - São Paulo.**
  10. ADACHI LNS; **ROZISKY JR;** ALVES VS; BRANCHER LM; FERREIRA MBC; TORRES ILS. Efeito da administração repetida de morfina sobre o comportamento de filhotes de ratos no campo aberto **In: XXII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2007, Águas de Lindóia - São Paulo.**
  11. **ROZISKY JR;** ADACHI LNS; ALVES VS; BRANCHER LM.; DA SILVA RS; BONAN CD; SARKIS JJF; TORRES ILS. Impacto da administração repetida de morfina sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina em medula espinhal de filhotes de ratos. **In: XXII Reunião Anual da Federação Sociedades de Bilogia Experimental, 2007, Águas de Lindóia - São Paulo.**

#### **Destaques do período:**

- Destaque de Sessão - Joanna Ripoll Rozisky, 27<sup>a</sup> Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007.
- Destaque de Sessão - Aluna IC - Lauren Naomi Adachi, 27<sup>a</sup> Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007.