



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

Dissertação de Mestrado

**Impacto do exercício físico na hiperalgesia induzida pela administração repetida  
de morfina em ratos neonatos**

Éllen Almeida Nunes

Porto Alegre, 2016

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

**Impacto do exercício físico na hiperalgesia induzida pela administração repetida  
de morfina em ratos neonatos**

Éllen Almeida Nunes

Orientadora: Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Porto Alegre, 2016

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Departamento de Fisiologia

ICBS – UFRGS

Profa. Dra. Isabel Cristina de Macedo

Departamento de Fisiologia

ICBS – UFRGS

Prof. Dr. Régis Adriel Zanette

Departamento de Farmacologia

ICBS – UFRGS

Dedico esse trabalho ao meu filho, a minha família e ao meu noivo que sempre estiveram ao meu lado apoiando-me para a realização dos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me iluminar e me dar força em todos os momentos da minha vida.

A minha família, por estar sempre ao meu lado me apoiando, principalmente a minha mãe que fez todo o esforço possível para que eu seguisse meus estudos, as minhas irmãs por serem minhas companheiras em especial a minha irmã Glêisse que me recebeu com tanto carinho em sua casa para que eu pudesse estudar em Porto Alegre.

Ao meu filho por em todos os momentos me incentivar com seus gestos simples, mas carregados do mais puro amor, a conclusão desse mestrado foi devido a ter ele como minha motivação.

Ao meu noivo e companheiro, Léo, por todo amor, carinho e dedicação para comigo e com nosso filho, por sempre me motivar a seguir meus sonhos e por me apoiar incondicionalmente. Obrigada ainda pela compreensão e paciência.

A minha orientadora, Iraci Torres, por abrir as portas desta instituição e com confiança, me dar a oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa. Obrigada pelos conselhos e sugestões fundamentais para meu desenvolvimento profissional e deste trabalho.

A Liciane, que desempenhou o papel de minha coorientadora mesmo não tendo este título. Obrigada pelas sugestões, pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação.

A todos os colegas do laboratório de Farmacologia e Neuromodulação: Pesquisas pré-clínica, por serem indispensáveis para realização deste trabalho, em especial aos colegas Isabel, Joice e Jonnsin pela amizade, ajuda constante e pelos os momentos de descontração.

Aos profissionais da Unidade de Experimentação Animal pelo bom humor e por estarem sempre prontos a ajudar.

A Andressa, pela ajuda com as análises bioquímicas.

A todos os meus amigos e amigas, que sempre estiveram presentes, pelo apoio, paciência, incentivo, carinho e por entenderem minha ausência em alguns momentos. Enfim a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução dessa dissertação.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

Ao FIPE do Hospital de Clínicas, pelo financiamento deste projeto, e ao GPPG.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
Objetivo geral .....	22
Objetivos específicos .....	23
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
Protocolo experimental.....	23
Tamanho de amostra.....	26
Tratamento farmacológico.....	27
Avaliações das respostas nociceptivas .....	27
Teste da Placa Quente.....	27
Teste Randall & Selitto. ....	28
Teste de Von Frey .....	28
Protocolo de Exercício Físico.....	29
Morte dos animais e coleta das amostras.....	29
Avaliação dos níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL10 por ELISA .....	30
Análise estatística .....	30
Considerações éticas.....	30
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
Efeito da administração de morfina no período neonatal sobre as respostas nociceptivas térmicas e mecânicas em ratos Wistar machos em P16, P30 e P60 .....	31

Efeitos da administração de morfina no período neonatal sobre os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 em tronco encefálico de ratos Wistar machos em P16, P30 e P60..... 34

Efeitos da administração de morfina no período neonatal sobre os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 em córtex cerebral de ratos Wistar machos em P16, P30 e P60..... 36

Efeito da exposição a uma sessão de exercício físico sobre a hiperalgesia térmica e alodinia mecânica induzidas pela administração repetida de morfina no período neonatal, em P30 e P60

39

Efeitos da administração de morfina no período neonatal e/ ou exposição a uma sessão de exercício físico em P30 e P60 sobre os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 em tronco encefálico de ratos Wistar machos em P30 e P60..... 43

Efeitos da administração de morfina no período neonatal e/ ou exposição a uma sessão de exercício físico em P30 e P60 sobre os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 em córtex cerebral de ratos Wistar machos em P30 e P60..... 46

**CONCLUSÃO..... 59**

**Referências ..... 60**

**Anexo ..... Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Linha do tempo com os procedimentos feitos nos animais desde P0 até o P1. .....	24
<b>Figura 2</b> - Linha do tempo com os procedimentos realizados nos animais desde P0 até P32.....	26
<b>Figura 3</b> - Linha de tempo com os procedimentos realizados nos animais do P0 até P62. .....	26
<b>Figura 4</b> - Latência da retirada da pata avaliada pelo teste da placa quente em P16...32	
<b>Figura 5</b> - Latência da retirada da pata avaliada pelo teste da placa quente em P30 e P60.....	32
<b>Figura 6</b> - Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Randall & Selitto no P16, P30 e P60.....	33
<b>Figura 7</b> - Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey no P16, P30 e P60....33	
<b>Figura 8</b> - Níveis de BDNF em tronco encefálico medido em P16, P30 e P60.....	34
<b>Figura 9</b> - Níveis de NGF em tronco encefálico medido em P16, P30 e P60 .....	35
<b>Figura 10</b> - Níveis de IL-6 em tronco encefálico medido em P16, P30 e P60. ....	35
<b>Figura 11</b> - Níveis de IL-10 em tronco encefálico medido em P16, P30 e P60.. ....	36
<b>Figura 12</b> - Níveis de BDNF em córtex cerebral medido em P16, P30 e P60.....	37
<b>Figura 13</b> - Níveis de NGF em córtex cerebral medido em P16, P30 e P60 .....	37
<b>Figura 14</b> - Níveis de IL-10 em córtex cerebral medido em P16, P30 e P60. ....	38
<b>Figura 15</b> - Níveis de IL-6 em córtex cerebral medido em P16, P30 e P60. ....	38
<b>Figura 16</b> - Latência no teste da placa quente em P30, 1h e 24h após o exercício.....	39
<b>Figura 17</b> - Latência no teste da placa quente em P60, 1h e 24h após o exercício.....	40
<b>Figura 18</b> - Limiar nociceptivo avaliado no teste de Von Frey (g) em P30 e 24h após a sessão de exercício.....	41

<b>Figura 19</b> - Limiar nociceptivo avaliado pelo Von Frey (g) em P60 e 24h após o exercício.....	42
<b>Figura 20</b> - Níveis de BDNF em tronco encefálico medido em P30 e P60 após a sessão de exercício.....	44
<b>Figura 21</b> - Níveis de NGF em tronco encefálico medido em P30 e P60 após a sessão de exercício.....	44
<b>Figura 22</b> - Níveis de IL-6 em tronco encefálico medido em P30 e P60 após a sessão de exercício.....	45
<b>Figura 23</b> - Níveis de IL-10 em tronco encefálico medido em P30 e P60 após a sessão de exercício.....	45
<b>Figura 24</b> - Níveis de BDNF em córtex cerebral medido em P30 e P60 após a sessão de exercício.....	47
<b>Figura 25</b> -Níveis de NGF em córtex cerebral medido em P30 e P60 após a sessão de exercício.....	47
<b>Figura 26</b> - Níveis de IL-6 em córtex cerebral medido em P30 e P60 após a sessão de exercício.....	48
<b>Figura 27</b> - Níveis de IL-10 em córtex cerebral medido em P30 e P60 após a sessão de exercício.....	48

## LISTA DE ABREVIACÕES

AMPC - adenosina 5'-monofosfato cíclico

ANOVA - Análise de variância (Analysis of Variance, em inglês)

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (brain derived neurotrophic factor, em inglês)

CFA - Adjuvante completo de Freund (Freund's Complete Adjuvant, em inglês)

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CREAL - Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPM – Erro padrão da média

FTC $\beta$ - Fator transformador de crescimento  $\beta$

GRD – Gânglio da raiz dorsal

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IL – Interleucina

NaCl - Cloreto de sódio

NGF - Fator de crescimento neural (neural growth factor, em inglês)

NMDA - N-metil D-Aspartato

P0 - dia do nascimento

P1- 1º dia pós-natal

P8 - 8º dia pós-natal

P14 - 14º dia pós-natal

P16 - 16º dia pós-natal

P17 - 17º dia pós-natal

P21 - 21º dia pós-natal

P29 - 29º dia pós-natal

P30 - 30º dia pós-natal

P31 - 31º dia pós-natal

P59 - 59º dia pós-natal

P60 - 60º dia pós-natal

P61 - 61º dia pós-natal

P62 - 62º dia pós-natal

PQ –Placa Quente

RN – Recém-nascido

RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro (ribonucleic acid, em inglês)

SNC – Sistema nervoso central

SNK - Student-Newman-Keuls

SNP – Sistema nervoso periférico

TNF-  $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , em inglês)

TrkB-R - Receptor de tropomiosina quinase B

UEA – Unidade de experimentação animal

UTI – Unidade de tratamento intensivo

VF – Von Frey

VR-1 – Receptor vaniloide tipo 1

## RESUMO

A morfina é um analgésico eficaz e muitas vezes opioide usado para aliviar a dor moderada a grave durante o período neonatal precoce. A exposição repetida de morfina no início da vida tem implicações duradouras para o desenvolvimento do sistema nervoso, tais como alterações neuroquímicas e comportamentais a longo prazo em ratos. O exercício físico vem sendo utilizado como uma alternativa não farmacológica para tratamento de quadros dolorosos. Deste modo nosso objetivo foi avaliar o efeito da exposição a morfina no período neonatal nas respostas nociceptiva (térmica e mecânica) e bioquímicas (citocinas e neurotrofinas) em ratos de P30 e P60 antes e após a exposição ao exercício físico. Ratos Wistar com 7 dias foram divididos em dois grupos: salina (SA) e morfina (MO) e submetidos a 5 mg / dia / 7 dias P8 para P14 a soro fisiológico ou MO respectivamente. Nas idades de P16, P30 e P60 a resposta nociceptiva térmica foi avaliada através do teste da placa quente (PQ), a resposta mecânica por Von Frey (VF) e Randal e Selitto (RS). Ainda foram medidos os níveis basais de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 em córtex cerebral e tronco encefálico. Após a sessão de exercício foram realizados em P30 e P60 o teste de PQ, 1h e 24h após o exercício, o teste de VF foi realizado 24h após e os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 também foram medidos em córtex cerebral e tronco encefálico após a exposição ao exercício. Nossos resultados demonstram que os animais que receberam morfina no período neonatal apresentam diminuição do limiar nociceptivo térmico e mecânico em P30 e P60. Os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 apresentaram relação direta com a idade em tronco encefálico, aumento ao longo do tempo. Em córtex cerebral os níveis de BDNF e NGF demonstraram uma interação entre os fatores grupo e idade, onde os animais do grupo MO têm diminuição desses com a idade. A IL-10 teve efeito somente da idade, enquanto a IL-6 não se mostrou alterada por nenhum fator. Após

a exposição ao exercício no teste da PQ no P30 e P60 os animais SAE tiveram uma diminuição do limiar nociceptivo se igualando aos grupos que receberam morfina. No teste de VF em P30 os grupos que receberam morfina são diferentes do grupos salina. Em P60 o grupo SAE mostra mais uma vez diminuição do limiar nociceptivo se igualando as grupos morfina. Nos níveis de BDNF e NGF em tronco encefálico ocorreu interação entre idade e grupo, onde o grupo MOE demonstra diminuição. Em tronco encefálico a IL-6 e IL-10 só tiveram efeito da idade. Em córtex cerebral os níveis de BDNF tiveram interação entre idade e grupo, o grupo MOE teve diminuição destes níveis em comparação aos demais grupos. Nos níveis de NGF se observou efeito do tempo e do grupo onde os grupos que recebem morfina têm níveis menores do que os que recebem salina em P60. O grupo MOS teve níveis menores de IL-6 em cortex cerebral do que os demais grupos, enquanto que os níveis de IL-10 só tiveram efeito da idade. Portanto a morfina no período neonatal leva a diminuição no limiar nociceptivo térmico e mecânico em ratos e que o exercício físico melhora os níveis BDNF, NGF e IL-6 em animais expostos a morfina no período neonatal. Porém o exercício físico não foi capaz de reverter a hiperalgesia e alodínia induzida pela morfina nos animais de P30 e P60. Sendo assim nossos dados mostram a necessidade de mais estudos sobre a dor em recém-nascidos e o sobre o uso de opioides neste período. Também se mostra necessário mais estudos sobre tratamentos não farmacológicos como o exercício físico.

Palavras chave: Morfina, ratos neonatos, nocicepção, BDNF, NGF, IL-6, IL-10, exercício físico.

## ABSTRACT

Morphine is an effective analgesic often used to relieve moderate to severe pain during the early neonatal period. In our previous study, repeated morphine exposure in early life triggered persistent implications for the development of the nervous system, such as neurochemical and behavioral alterations in rats at long-term. The exercise has been used as a non-pharmacological alternative for treating painful conditions. Thus our aim was to evaluate the effect of repeated morphine exposure during the neonatal period upon nociceptive responses (thermal and mechanical) and biochemical markers (cytokines and neurotrophins) before and after unique physical exercise session in rats at P30 and P60. Seven-day-old male Wistar rats were divided into two groups: saline and morphine and subjected to saline and morphine (5 µg/day/7 days) from P8 to P14, respectively. At P16, P30 and P60, the thermal nociceptive response was assessed using the hot plate test (HP), while the mechanical response by Von Frey (VF) and Randal and Selitto (RS) tests. The basal levels of BDNF, NGF, IL-6 and IL-10 were measured in brainstem and cerebral cortex. One hour and 24h after exercise, the HP was conducted in P30 and P60, the VF test was only performed 24 ho after exercise, as well as the levels of BDNF, NGF, IL-6 and IL-10 were also measured in cerebral cortex and brainstem. Our results show that rats that received morphine in the neonatal period presented decreased thermal and mechanical nociceptive threshold in P30 and P60. And, BDNF, NGF, IL-6 and IL-10 levels presented a direct relationship with age in brainstem, increase their levels when the age increased. In cerebral cortex, BDNF and NGF levels showed an interaction between age and treatment group, where the morphine group showed decreased levels when the age increased. There was age effect upon IL-10 levels and no effects upon IL-6 levels in cerebral cortex. After 24h of exercise, saline group subjected to exercise presented decreased nociceptive threshold in using HP at P30 and P60, with similar threshold presented by morphine group. In VF test, both morphine groups presented decreased threshold in relation to both saline groups at P30.

However, at P60, saline group subjected to exercise presented decreased nociceptive threshold, matching the morphine groups. In brainstem, we found interaction between age and group in BDNF and NGF levels, where morphine-exercise group showed decreased levels; and we observed only age effect upon IL-6 and IL-10 levels. In cerebral cortex, we observed interaction between age and group upon BDNF levels, where morphine-exercise group showed decreased levels compared to other groups. In relation to NGF levels, we observed effect of age and group, where morphine groups presented lower levels than saline groups in P60. The morphine-sedentary group presented lower IL-6 levels in the cerebral cortex than the other groups, while only age effect was observed on IL-10 levels. Our data lead us to conclude that morphine exposure in the neonatal period triggers a decrease in thermal nociceptive and mechanical thresholds in rats. And, the physical exercise improves BDNF, NGF and IL-6 levels in rats exposed to morphine in the neonatal period. However, one session of exercise was not able to revert the hyperalgesia and allodynia induced by morphine in rats at P30 and P60. Therefore, our data highlight the need of more studies about pain in newborns and neonates and the effect of the opioid use in this period. And, it is necessary more studies about non-pharmacological treatments, for example exercise.

**Keywords:** Morphine; neonatal rats; nociception; BDNF; NGF; IL-6; IL-10; exercise.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um maior interesse na fisiologia da dor e no tratamento analgésico em recém-nascidos (RNs). RNs são expostos diariamente a muitos procedimentos invasivos em UTIs Neonatais, incluindo coleta de exames para hemograma, hemocultura e realização de punção lombar, intubação endotraqueal e ventilação. Todos estes procedimentos são extremamente dolorosos requerendo a administração de fármacos analgésicos como a morfina (Anand et al., 1999). É importante salientar que RNs tratados com morfina apresentaram menor risco de morte e menor morbidade neurológica quando comparados a RNs tratados com midazolam, importante hipnótico destituído de propriedade analgésica (Anand et al., 1999). Esta diferença é atribuída à diminuição do estresse, estabilidade da pressão arterial e melhora da oxigenação induzidas pela morfina. Estudos em modelos animais mostram a presença dos receptores opioides desde o 1º dia pós-natal (P1) amplamente distribuídos no sistema nervoso central (SNC), com predomínio, neste período, de receptores  $\mu$  (mu) e  $\kappa$  (kappa). Prévio estudo de nosso grupo de pesquisa mostrou que animais que receberam baixa dose de morfina no período neonatal (do P8 ao P14), não desenvolveram tolerância; ao contrário, apresentaram maior tempo de analgesia em P14 do que em P8; e maior tempo de analgesia quando submetidos a tratamento com morfina na idade adulta. Estes dados sugerem possíveis alterações em sistemas de neurotransmissão centrais responsáveis pela modulação das respostas nociceptivas (Rozisky et al., 2008).

Morfina é agonista de receptores opioides  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  (delta), amplamente expressos central e periféricamente. Estes receptores estão acoplados à proteína G inibitória e sua ativação promove inibição de adenilato ciclase, diminuindo a concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Em sequência ocorre o fechamento dos canais de cálcio voltagem-dependentes nas terminações pré-sinápticas, reduzindo a liberação de neurotransmissores excitatórios. Receptores opioides também atuam na pós-sinapse, abrindo

canais de  $K^+$ , promovendo hiperpolarização neuronal, reduzindo a excitabilidade evocada pelas fibras A $\delta$  e C, bloqueando a transmissão do estímulo doloroso (Jordan e Devi, 1999). As ações dos opioides dependem de sua afinidade pelo subtipo de receptores e de sua localização no sistema nervoso. Receptores  $\kappa$  estão localizados no hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa, além de neurônios sensitivos periféricos. Estes receptores  $\kappa$  estão envolvidos na resposta nociceptiva, mas também em termorregulação, controle de diurese e secreção neuroendócrina (Dhawan et al., 1996). Receptores  $\delta$  são responsáveis primariamente pela analgesia, mas também modulam funções cognitivas e de dependência física. Estão localizados nos núcleos pontinos, nas amígdalas, no bulbo olfatório, no córtex cerebral profundo e nos neurônios sensitivos periféricos (Dhawan et al., 1996). Receptores  $\mu$  regulam processos nociceptivos, ciclo respiratório e trânsito intestinal; localizam-se no córtex cerebral, no tálamo, na substância cinzenta periaquedutal, na substância gelatinosa e no trato gastrintestinal (Dhawan et al., 1996).

Os analgésicos opioides apresentam potencial para adição. Em modelos animais, estes fármacos promovem sintomas comportamentais dependentes, em parte, do sistema dopaminérgico (Kuribara, 1995). Por exemplo, o fenômeno de sensibilização comportamental avaliado pelo aumento da resposta locomotora, é observado após a administração crônica de morfina. Prévio estudo de nosso grupo mostrou que animais que receberam baixa dose de morfina no período neonatal (do P8 ao P14) apresentaram aumento da atividade locomotora em P16 e P30 que foi revertido pela administração de antagonista D2 (haloperidol) (Rozisky et al., 2013). Adicionalmente, outro importante estudo de nosso grupo corrobora sobre o envolvimento do sistema glutamatérgico neste modelo animal, uma vez que os ratos que receberam morfina (P8-P14) apresentaram uma menor captação do glutamato extracelular a longo prazo (P30 e P60) (Rozisky et al., 2012). Isto pode indicar uma alteração em transportadores indispensáveis na remoção do glutamato da fenda sináptica, modulando a

ativação de seus receptores e a transmissão neuronal. Alterações nestes transportadores, em sua funcionalidade, densidade e localização podem ter importantes implicações para o funcionamento do SNC (para revisão ver Danbolt, 2001). Estudos de nosso grupo ainda demonstram que animais que receberam morfina no período neonatal apresentaram aumento em comportamentos relacionados à nocicepção no teste da formalina em P30 e P60. No P30, ocorre aumento da resposta nociceptiva na fase II (inflamatória) do teste, enquanto que em P60 a resposta nociceptiva apresentou-se aumentada em ambas as fases neurogênica (fase I) e inflamatória (fase II). Estas respostas nociceptivas foram totalmente revertidas por cetamina, um antagonista de receptor glutamatérgico do tipo NMDA e parcialmente revertidas por indometacina, um antiinflamatório não esteroideal (Rozisky et al., 2011). Isso nos mostra que a exposição à morfina durante o período neonatal é capaz de alterar respostas nociceptivas tanto em médio quanto em longo prazo. A reversão da hiperalgesia pela cetamina indica um envolvimento do sistema glutamatérgico neste fenômeno (Silverman, 2009). O processo de sensibilização central pode ser decorrente da ativação persistente dos receptores NMDA pelo glutamato liberado pelas fibras aferentes primárias levando à hipersensibilização dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal (Baranauskas e Nistri, 1998). Em modelos experimentais de dor inflamatória ocorre aumento dos níveis de glutamato no gânglio da raiz dorsal e na medula espinhal corroborando o envolvimento dos neurotransmissores excitatórios em processos nociceptivos (Lofgren et al., 1997; Ossipov et al., 2005; Wimalawansa, 1996). Adicionalmente, outro importante estudo de nosso grupo corrobora sobre o envolvimento do sistema glutamatérgico neste modelo animal, uma vez que os ratos que receberam morfina (P8-P14) apresentaram uma menor captação do glutamato extracelular a longo prazo (P30 e P60) (Rozisky et al., 2012). Desta forma, estes dados compõem forte evidência da participação do sistema glutamatérgico na hiperalgesia induzida pela administração de morfina no período neonatal. É importante salientar que relatos da literatura têm demonstrado que a duração de uso,

a dose e o tipo de opioide são importantes fatores no desenvolvimento da hiperalgesia induzida por opioides. Sendo assim, a busca de medidas farmacológicas e não farmacológicas que atenuem esta hiperalgesia são de suma importância.

Adicionalmente, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês brain derived neurotrophic factor) e o fator de crescimento neuronal (NGF, nerve growth factor) são neurotrofinas amplamente expressas no sistema nervoso em desenvolvimento. Essas neurotrofinas são peptídeos mediadores de diversas funções centrais, como regulação do crescimento axonal, modulação da atividade sináptica, diferenciação, mielinização, promoção de sobrevivência e regulação de morte neuronal (Zhang e Ko, 2009). Os fatores neurotróficos possuem função no desenvolvimento e regeneração do sistema nervoso e apresentam um papel importante em situações patológicas, incluindo as condições de dor crônica, depressão e adição (Chae e Kim, 2009; Gottmann et al., 2009). Há evidências de que o BDNF desempenha papel central na sensibilização comportamental após a retirada de opioides (Liang et al., 2011). No SNC adulto, ambas neurotrofinas, BDNF e NGF, têm efeitos tróficos sobre modificações estruturais e plasticidade funcional das sinapses centrais (Chao e Bothwell, 2002; Poo, 2001). Um estudo recente descreveu que a hiperalgesia induzida por opioide está relacionada com modificações epigenéticas, como o padrão de metilação do promotor do gene BDNF em neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD)(Chao et al., 2016).

Outros estudos ainda apontavam para uma interação entre os antidepressivos, o exercício e a expressão de neurotrofina, descrevendo a regulação positiva do RNAm do BDNF, após tratamento tanto com antidepressivo como com exercício voluntário (Russo-Neustadt et al., 2001). Os níveis de BDNF encontram-se aumentados em hipocampo de animais após o exercício agudo em esteira (Soya et al., 2007). O exercício voluntário também aumentou os níveis de BDNF em hipocampo após lesão cerebral (Griesbach et al., 2008). Alguns trabalhos na literatura evidenciam que poucos dias de exercício físico são suficientes para aumentar a

produção de BDNF no músculo e no GRD, e também de NGF, melhorando a sobrevivência e a regeneração de axônios em modelos de lesões no SNP ou SNC (Chae e Kim, 2009; Gomez-Pinilla et al., 2001; Molteni et al., 2004; Neeper et al., 1995).

Conclusões interessantes mostraram que a exposição à morfina nas fases iniciais pode desencadear diferentes alterações a longo prazo, embora a exposição pré-natal a morfina reduziu os níveis de BDNF do hipocampo (Ahmadalipour et al., 2015). Em nosso estudo anterior, observou-se que o tratamento com morfina no período neonatal aumenta os níveis de BDNF do hipocampo a médio e longo prazo, e diminui a razão de superóxido dismutase / glutathione peroxidase a longo prazo. No entanto, verificou-se efeito do tratamento e da idade nos níveis de TNF- $\alpha$  em hipocampo e nenhum efeito nos níveis de desidrogenase de lactato ou na viabilidade celular (Rozisky et al., 2013).

Citocinas são importantes mediadores inflamatórios envolvidos em processos de dor, produzidas por diversos tipos de células no local da lesão, influenciando atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência de células do sistema imune. Além disso, regulam produção e atividade de outras citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias envolvidas no processo inflamatório. É importante salientar que a morfina provoca sinais diretos e indiretos (Mika, 2008) provocando mudanças na microglia e nos astrócitos (Horvath et al., 2010), resultando em aumento da produção de muitas substâncias, tais como radicais livres, óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, prostaglandinas, neurotoxinas, fatores neurotróficos, e aminoácidos excitatórios que se opõem ativamente aos efeitos analgésicos da morfina e contribui para o desenvolvimento de tolerância (Eidson e Murphy, 2013; Hameed et al., 2010). As citocinas produzidas pelas células gliais, particularmente as pró-inflamatórias, têm sido relacionadas ao desenvolvimento de tolerância à morfina e hiperalgesia relacionada à abstinência à morfina (Raghavendra et al., 2002; Song e Zhao, 2001). Dentre as consideradas

pró-inflamatórias estão IL1, IL2, IL6, IL7 e TNF-  $\alpha$ , e as antiinflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e FTTC $\beta$  (fator transformador de crescimento  $\beta$ ).

É importante salientar que o exercício físico, utilizado como um tratamento não farmacológico no presente estudo, aumenta as concentrações plasmáticas de IL-6 e IL-10 (Jia et al., 2014; Northoff e Berg, 1991). Apesar das concentrações plasmáticas de outras citocinas aumentarem durante o exercício físico, a IL-6 é que apresenta aumento mais pronunciado (Fischer, 2006), sendo a citocina mais estudada em relação aos efeitos do exercício. A combinação de fatores como modo, intensidade e duração do exercício determina a magnitude do aumento plasmático de IL-6. Porém, a duração do exercício parece ser o parâmetro que mais influencia este aumento (Fischer, 2006).

Estudos prévios têm sugerido o exercício físico como uma alternativa não farmacológica para tratamento de quadros de dores crônicas (Chatzitheodorou et al., 2007; Hayden et al., 2005). Além disto, a analgesia induzida por exercício físico parece ser decorrente da liberação de opioides endógenos, tanto em nível periférico quanto central (Morgan, 1985). No entanto, dados da literatura são controversos em relação às vias e aos efeitos do exercício físico nos quadros de dor. Estudos com modelos animais mostraram que a natação, por tempo prolongado, reduziu a dor neuropática periférica (Kuphal et al., 2007). Exposição à natação e ao exercício em esteira, reduziu a hiperalgesia em modelo de lesão medular (Hutchinson et al., 2004). Um estudo utilizando protocolo de esteira, de curta e de longa duração, mostrou que apenas o protocolo de curta duração reduz dor neuropática induzida por lesão de nervo periférico em camundongos e facilita os processos de regeneração do nervo lesado (Cobianchi et al., 2010). Exercício regular em esteira de intensidade moderada diminui hipersensibilidade de ratos com dor neuropática, este mesmo estudo também sugere que opioides endógenos ao nível do tronco encefálico contribuem para este efeito (Stagg et al., 2011). Atividade em esteira também demonstrou ser benéfica prevenindo desenvolvimento de tolerância à morfina em ratos

(Shokraviyan et al., 2014). Adicionalmente, diversos estudos têm mostrado o benefício do exercício sobre a resposta nociceptiva e o envolvimento do sistema opioide neste efeito (Bement e Sluka, 2005; Haier et al., 1981; Hoffmann e Thoren, 1988; Koltyn, 2000; Stagg et al., 2011). No entanto, poucos estudos elucidam os mecanismos pelos quais o exercício induz analgesia.

Considerando que estudos prévios de nosso grupo de pesquisa demonstram que a morfina administrada no período neonatal causa hiperalgesia em P30 e P60, nesta dissertação buscamos confirmar o modelo de hiperalgesia pela administração de morfina e verificar o efeito do exercício físico em esteira nesta hiperalgesia e os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

## **HIPÓTESES DE TRABALHO**

1. A administração repetida de morfina no período neonatal leva à hiperalgesia térmica e mecânica em ratos jovens (P30) e adultos (P60).
2. Exercício físico reverte em P30 e P60 a hiperalgesia induzida pela administração repetida de morfina no período neonatal de ratos Wistar machos.
3. Hiperalgesia induzida pela administração repetida de morfina no período neonatal e/ou exposição ao exercício físico em ratos Wistar machos alteram os níveis de interleucinas e neurotrofinas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Estudar os efeitos da administração repetida de morfina no período neonatal e de uma sessão de corrida em esteira sobre as respostas nociceptivas térmica e mecânica e sobre marcadores bioquímicos.

### **Objetivos específicos**

Avaliar o efeito da administração de morfina no período neonatal sobre as repostas nociceptivas térmicas e mecânicas em ratos Wistar machos em P16, P30 e P60. Estudar o efeito da exposição em P30 e P60 a uma sessão de exercício físico na hiperalgesia induzida pela administração repetida de morfina no período neonatal nos seguintes parâmetros:

1. resposta nociceptiva por meio dos testes de Von-Frey, Randall & Selitto (alodínia mecânica) e hiperalgesia térmica por meio da Placa Quente em P16, P30 e P60;
2. efeito do exercício físico sobre a resposta nociceptiva por meio dos testes de Von-Frey (alodínia mecânica) e hiperalgesia térmica por meio da Placa Quente em P30 e P60 imediatamente e 24 horas após.
3. avaliar o efeito da morfina e do exercício sobre os níveis das neurotrofinas BDNF e NGF em tronco encefálico e córtex cerebral.
4. avaliar em tronco encefálico e córtex cerebral, o efeito da morfina e do exercício sobre os níveis das citocinas pro- e anti-inflamatórias, IL-6 e IL-10, respectivamente.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Protocolo experimental**

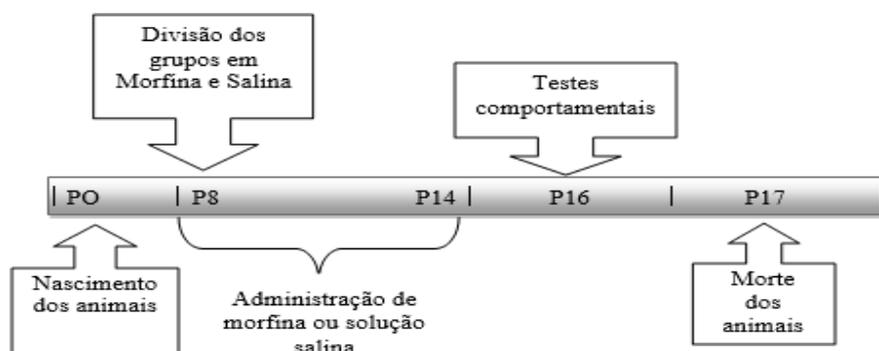
Foram utilizadas ninhadas de ratos machos Wistar provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório - CREAL/UFRGS na Unidade de Experimentação Animal (UEA)/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (considerar-se-á P0 o dia em que for feita a verificação de nascimento), padronizadas em 8 animais por ninhada. As ninhadas foram alojadas em caixas-moradia, confeccionadas em polipropileno, medindo 49x34x16cm, com assoalho recoberto de serragem, 1 ninhada por caixa. Ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e livre acesso à água e ração

Nuvital®. Os filhotes permaneceram junto com as mães até o desmame em P21 e após, foram mantidos quatro animais por caixa. Considerando que a primeira semana de vida do rato corresponde à idade gestacional de 24 a 40 semanas de vida gestacional do feto humano (Marsh et al., 1997; Pattinson e Fitzgerald, 2004) e que no P7 o desenvolvimento do SNC é compatível ao de uma criança nascida a termo (Marsh et al., 1997), foram utilizados nesse estudo animais na segunda semana de vida (P8), portanto com o SNC ainda imaturo. No P8 iniciou-se a administração de morfina uma vez ao dia sempre no mesmo horário (9h) até P14. Os experimentos foram divididos em três levadas, considerando as idades dos animais, em cada leva, os animais foram divididos em dois grupos a partir do P8:

1. SALINA (SA): submetido à administração de solução fisiológica 0,9% (veículo) por via subcutânea (5µL);

2. MORFINA (MO): grupo submetido à administração de morfina (Dimorf® 10mg/ml, Cristália) por via subcutânea (5µL).

Na primeira leva a resposta nociceptiva dos animais foi avaliada em P16 e os animais foram mortos em P17 (Figura 1).



**Figura 1** - Linha do tempo dos procedimentos feitos nos animais desde P0 até o P17.

Na segunda e terceira levadas os animais foram avaliados em P30 e P60 respectivamente, após a avaliação basal eles foram subdivididos em quatro grupos para realização do exercício em:

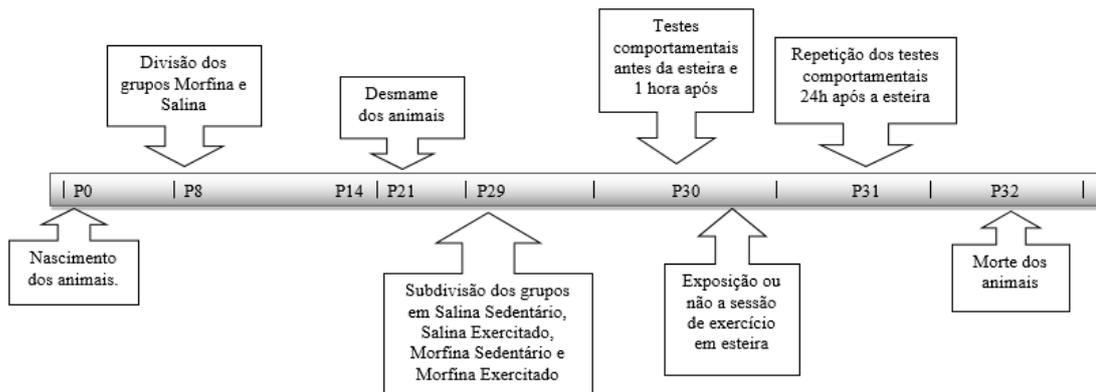
1.1 SALINA SEDENTÁRIO (SAS): foram submetidos à administração de solução fisiológica a 0,9% (veículo) e não foram submetidos ao exercício físico.

1.2. SALINA EXERCITADO (SAE): foram submetidos à administração de solução fisiológica a 0,9% (veículo) e ao exercício físico em esteira ergométrica antes dos testes nociceptivos.

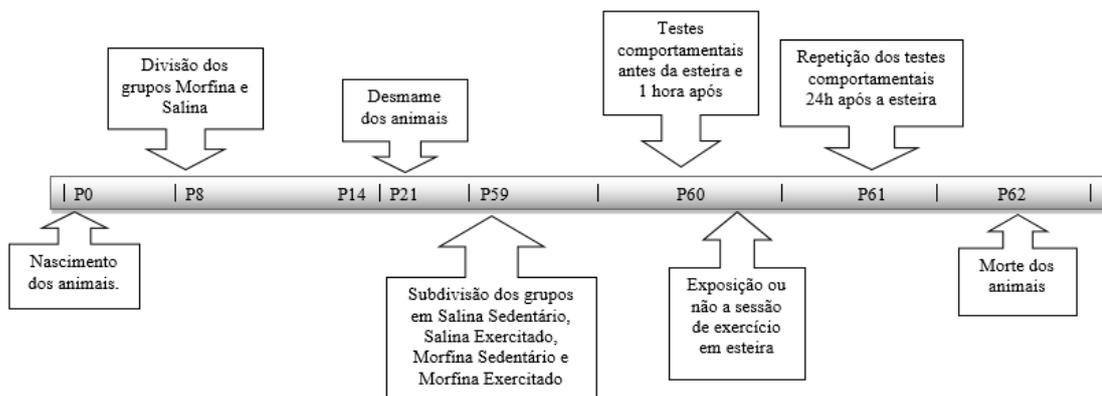
2.1. MORFINA SEDENTÁRIO (MOS): foram submetidos à administração de morfina (Dimorf® 10mg/ml, Cristália) e não foram submetidos ao exercício físico antes dos testes nociceptivos.

2.2. MORFINA EXERCITADO (MOE): foram submetidos à administração de morfina (Dimorf® 10mg/ml, Cristália) e ao exercício físico em esteira ergométrica antes dos testes nociceptivos.

A resposta nociceptiva foi avaliada em uma hora e 24 horas após a realização da sessão de exercício. A morte dos animais ocorreu 24 horas após a última avaliação comportamental (P32 e P62) (Figuras 2 e 3).



**Figura 2** - Linha do tempo dos procedimentos realizados nos animais desde P0 até P32.



**Figura 3** - Linha de tempo dos procedimentos realizados nos animais do P0 até P62.

### Tamanho de amostra

Para detectar uma diferença entre as médias das variáveis em estudo de 1,5 de desvio padrão (magnitude de efeito grande), considerando  $\alpha=0,05$  e poder de confiança de 90%. Serão alocados oito animais por grupo (filhotes) para cada experimento comportamental, com base em estudos prévios do grupo, disponíveis na literatura (Battastini et al., 1991; da Silva et al., 2005; da Silva Torres et al., 2003; Torres et al., 2002a; Torres et al., 2002b). Foram utilizados 117 animais divididos em:

- P16: para testes comportamentais e neuroquímicos foram utilizados quatro grupos de oito animais (morfina e salina), considerando a necessidade de fazer pool de dois animais para cada análise (totalizando 32 animais).
- P30 e P60 os animais foram divididos em quatro grupos de oito animais para os testes comportamentais e bioquímicos (sendo 64 animais divididos em P30 e P60).
- Foram também utilizadas 21 mães que foram descartadas após o desmame.

### **Tratamento farmacológico**

Foram administrados os fármacos e soluções descritas a seguir:

1. Veículo: solução salina (NaCl a 0,9%) por via subcutânea, na região midi-escapular, durante 7 dias, uma vez por dia no volume de 5  $\mu$ L;
2. Morfina (Dimorf® 10 mg/ml, Cristália), na dose total de 5  $\mu$ g, independentemente do peso do animal, por via subcutânea, na região midi-escapular, durante 7 dias, uma vez por dia no volume de 5  $\mu$ L.

### **Avaliações das respostas nociceptivas**

#### **Teste da Placa Quente**

Os animais foram colocados em cilindro transparente de polipropileno sobre a superfície aquecida e o tempo entre a colocação dos animais e o início de retirada das patas ou “sapateado” foram registrados como latências de respostas em segundos (Woolfe e Macdonald, 1944). Os

animais foram habituados ao ambiente, por 5 minutos, 24 horas antes do teste. A temperatura da placa foi mantida entre 50°C para os animais de P16 para que não houvesse lesão e 55°C para as demais idades. O teste da placa quente foi feito no basal, uma hora após a exposição o exercício e 24 horas após, nas idades de P30 e P60.

### **Teste Randall & Selitto**

Os animais foram colocados em equipamento apropriado denominado analgesímetro (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), que gerou aumento linear da força (em gramas) sobre a superfície dorsal da pata do animal, até que o mesmo produzisse uma resposta caracterizada pela retirada da pata. O reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar hipernociceptivo, ou seja, a força necessária aplicada à pata para que induza uma resposta aversiva a um estímulo nocivo. A força necessária para que o animal demonstre tal resposta é registrada em gramas (Randall e Selitto, 1957). Este teste foi feito somente no basal nas idades P16, P30 e P60, pois optamos por somente um teste após o exercício devido a duração do teste.

### **Teste de Von Frey**

Os animais foram alocados na caixa de contenção do aparato 30 minutos antes do teste, o sensor do analgesímetro é posicionado na parte dorsal da pata do animal usando como orientação pela imagem refletida no espelho. O teste baseia-se na pressão máxima em gramas(g), necessária para que o animal demonstre sensibilidade ao sensor do analgesímetro (Fruhstorfer et al., 2001), quando o animal retira a pata essa medida é registrada. Como nestes experimentos os animais não tinham lesão em nenhuma das patas foi feita uma média das patas direitas e esquerdas de cada animal. Os ratos foram habituados ao ambiente, 24 horas antes do teste por um período de 5 minutos. O teste de Von Frey foi realizado no basal e 24 horas após

a exposição ao exercício, pois este teste é relativamente longo e a avaliação imediata do exercício físico ficaria inviável.

### **Protocolo de Exercício Físico**

Em P30 ou P60, os animais foram expostos a uma sessão de exercício que consistiu em correr em uma esteira motorizada para ratos com pistas individuais de acrílico a uma intensidade de 12m/min por 20 min, esta intensidade é considerada como moderada segundo Brust et al, (2014). Os animais foram habituados a esteira desligada durante 3 dias por 5 minutos antes do dia da sessão de exercício. Não se utilizou choque elétrico nem estímulo físico neste estudo. Este procedimento foi adaptado de Brust et al., (2014).

### **Morte dos animais e coleta das amostras**

As ratas mães foram eutanasiadas por sobredose anestésica de isoflurano (4-5%) vaporizado em 100% O<sub>2</sub> (0,5l/min) até 10 minutos após a constatação de parada cardiorrespiratória. Os animais machos submetidos aos tratamentos farmacológicos foram mortos por decapitação. O sangue do tronco foi retirado para centrifugação em tubos plásticos por 5 minutos em 4500 rpm à temperatura ambiente. O soro foi congelado a -80°C para posterior análise. Os animais foram mortos por decapitação e sem uso de anestésico, pois o modelo prevê a verificação dos efeitos neuroquímicos e dosagens bioquímicas que podem ser alteradas pela utilização de anestesia na morte desses animais (Bickler e Fahlman, 2006; Lu et al., 2006). Além do que, estudos já demonstraram que a decapitação causa inconsciência rápida e indolor (Holson, 1992; van Rijn et al., 2011). Os animais foram mortos 48 horas após a sessão de exercício e 24 horas após o último teste comportamental.

### **Avaliação dos níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL10 por ELISA**

Os tecidos do SNC (córtex e tronco encefálico) foram homogeneizados utilizando-se um homogeneizador manual, em solução tampão. Os homogenatos resultantes foram centrifugados durante 10 min a 4500 rpm. Os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 foram determinados por (ELISA) usando-se um *kit* de reagentes para dosagens (Millipore, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. As dosagens foram medidas e expressas como pg/mg de proteína. A quantidade total de proteínas foi medida pelo método de *Coomassie Blue* usando albumina sérica bovina como padrão (Bradford, 1976).

### **Análise estatística**

O teste da Placa Quente em P16 foi avaliado com teste *t* de Student. Todos os testes bioquímicos e comportamentais foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (idade e tratamento como variáveis independentes), e quando necessário, seguidos pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK) para a determinação da diferença entre os grupos. Os testes comportamentais realizados após o exercício foram avaliados por porcentagem do grupo salina sedentário. Quando houve diferença significativa entre os grupos foi realizada ANOVA de uma via para identificação destas diferenças. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), a diferença entre os grupos foi considerada significativa quando  $P < 0,05$ . Para análise estatística utilizou-se software SPSS 20.0 para Microsoft Windows.

### **Considerações éticas**

Os procedimentos realizados neste trabalho obedecem aos princípios internacionais orientadores para a pesquisa envolvendo animais (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: 8th Edition Published 2011*). Bem como foi seguida a Lei nº 11.794/2008 de

Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Arouca). Assim como todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (Resolução Normativa N. 30, 2016) e Resolução Normativa nº 13/2013 (Prática de Eutanásia- CONCEA). Todos os experimentos e procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA protocolo nº 140425). Com base na legislação, todos os procedimentos visaram minimizar o sofrimento dos animais e diminuir fontes externas de dor e desconforto.

## RESULTADOS

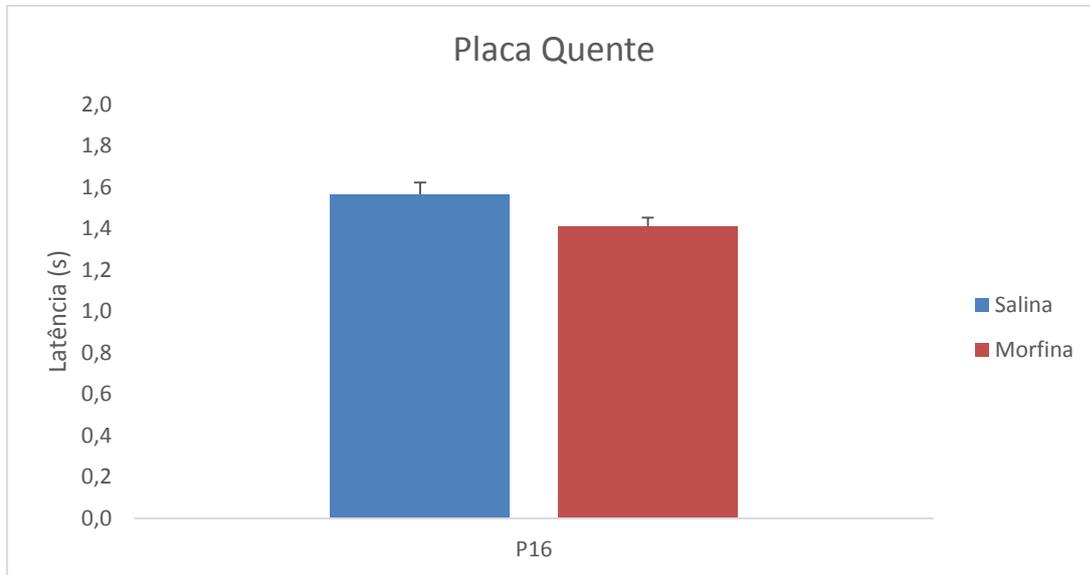
### **Efeito da administração de morfina no período neonatal sobre as respostas nociceptivas térmicas e mecânicas em ratos Wistar machos em P16, P30 e P60**

Para avaliar a resposta nociceptiva mecânica e térmica foram realizados ao longo do tempo, os testes nociceptivos de Randall Selitto, von Frey e Placa Quente, nas idades de P16, P30 e P60.

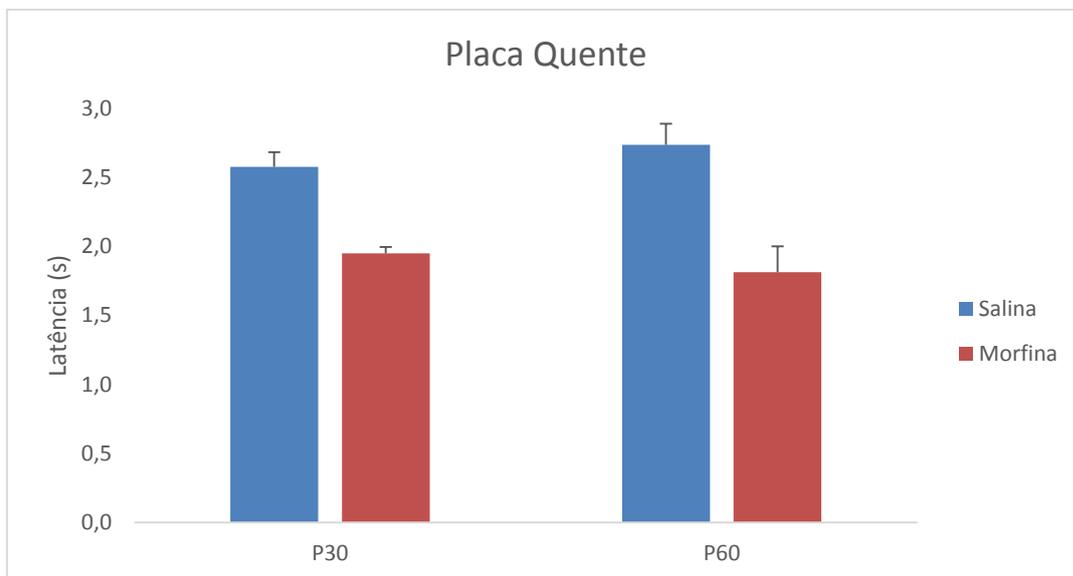
No teste da Placa Quente realizado em P16, não houve diferença significativa no limiar de retirada da pata entre os grupos (teste t de Student,  $P > 0,05$ , Figura 4), no entanto em P30 e P60 observou-se que a morfina promoveu uma diminuição do limiar nociceptivo térmico (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(1,59)}=33,550$   $P < 0,001$ , Figura 5). A comparação entre as três idades (P16, P30 e P60) não pode ser realizada, pois a temperatura da Placa Quente para os animais de P16 é menor em relação às demais idades.

Houve interação entre a idade e o tratamento na resposta nociceptiva mecânica avaliada pelos testes de Randall Selitto e Von Frey (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(2,89)}= 10,037$ ,  $P < 0,001$  e  $F_{(2,89)}= 12,641$ ,  $P < 0,001$ , Figura 6 e 7, respectivamente). Houve uma relação direta entre idade e limiar nociceptivo. No entanto, este aumento foi menor nos animais que receberam

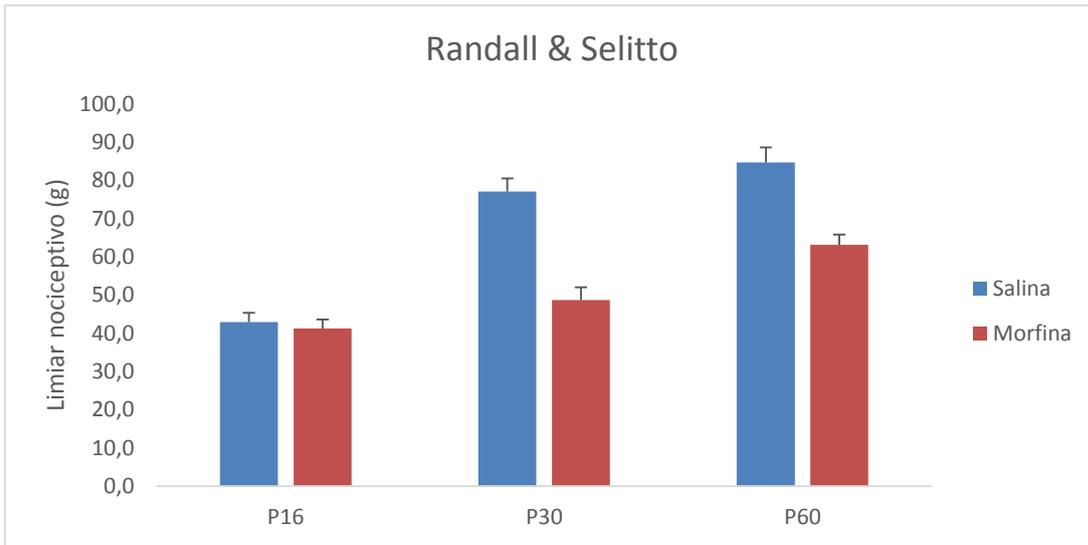
morfina indicando que a morfina administrada no período neonatal induz alteração na resposta nociceptiva mecânica em médio (P30) e longo prazo (P60).



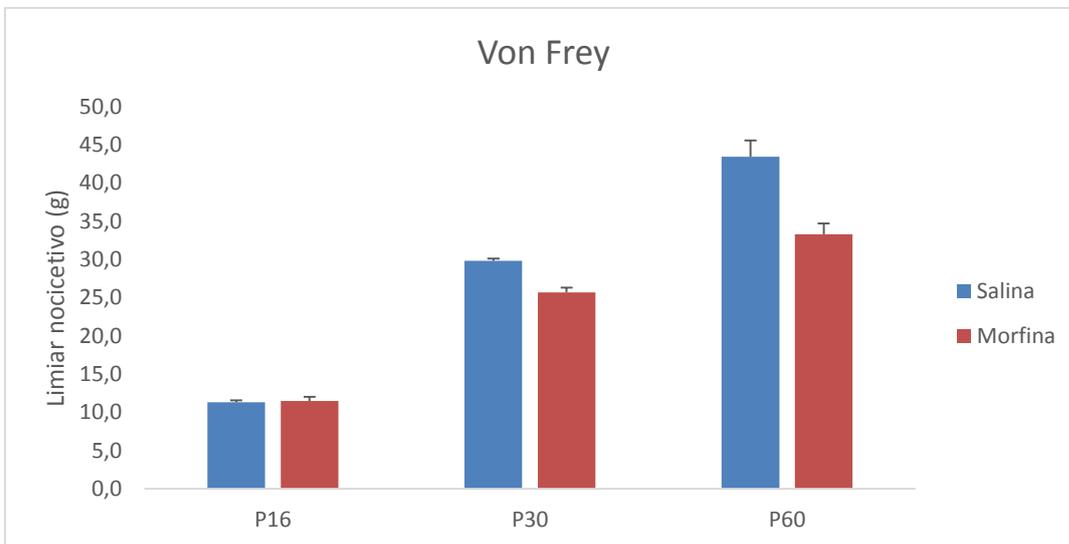
**Figura 4** - Latência da retirada da pata avaliada pelo teste da Placa Quente realizado no P16 nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Não houve diferença significativa entre os grupos (teste t de Student,  $t_{(2,30)} = 2,209$ ,  $P > 0,05$ ,  $n = 16$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. de latência em segundos (s).



**Figura 5** - Latência da retirada da pata avaliada pelo teste da Placa Quente realizado em P30 e P60 nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve efeito significativo do tratamento (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(1,59)} = 33,550$ ,  $P < 0,001$ ,  $n = 31-32$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. da latência em segundos (s).



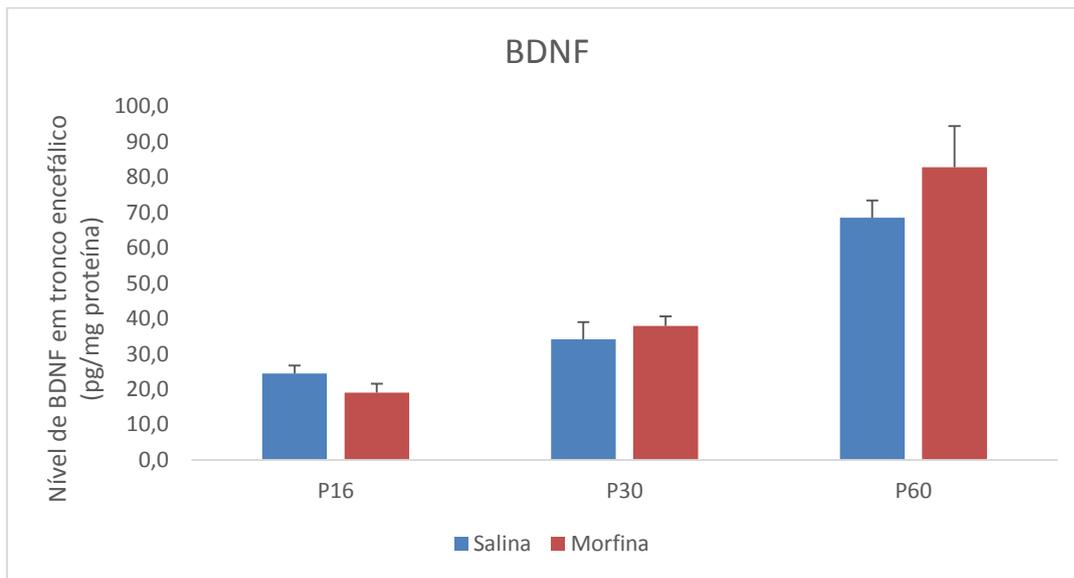
**Figura 6** - Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Randall & Selitto no P16, P30 e P60 nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve interação entre idade e tratamento (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(2,89)}=10,037$ ,  $P < 0,001$ ,  $n = 31-32$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. do limiar da retirada da pata registrado em gramas (g).



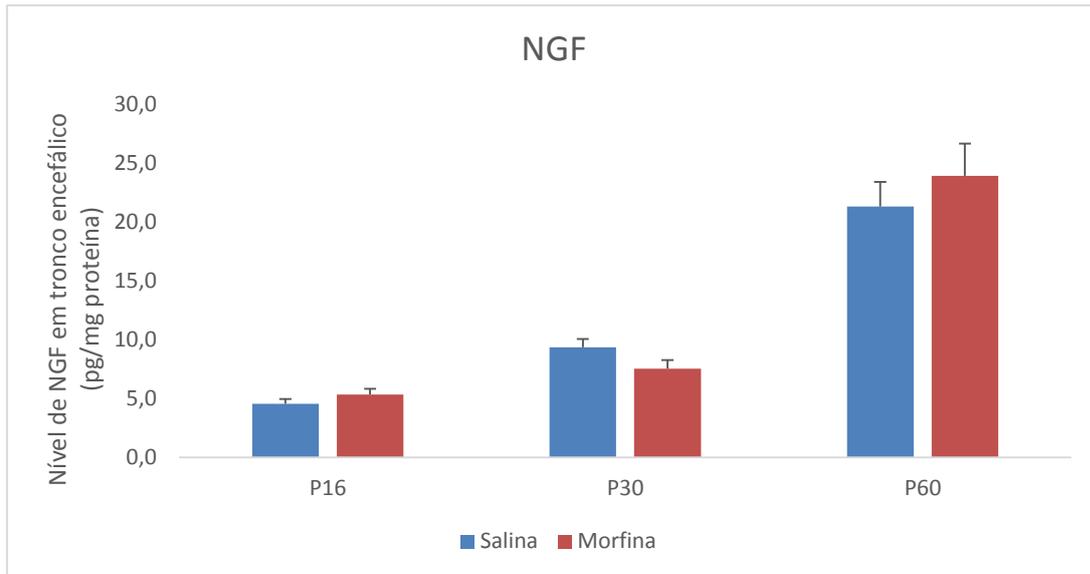
**Figura 7** - Limiar nociceptivo avaliado pelo teste de Von Frey em P16, P30 e P60, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve interação entre idade e tratamento (ANOVA de duas vias/ SNK,  $F_{(2,89)}=12,641$   $P < 0,001$ ,  $n = 31-32$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. do limiar da retirada da pata registrado em gramas (g).

**Efeitos da administração de morfina no período neonatal sobre os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 em tronco encefálico de ratos Wistar machos em P16, P30 e P60.**

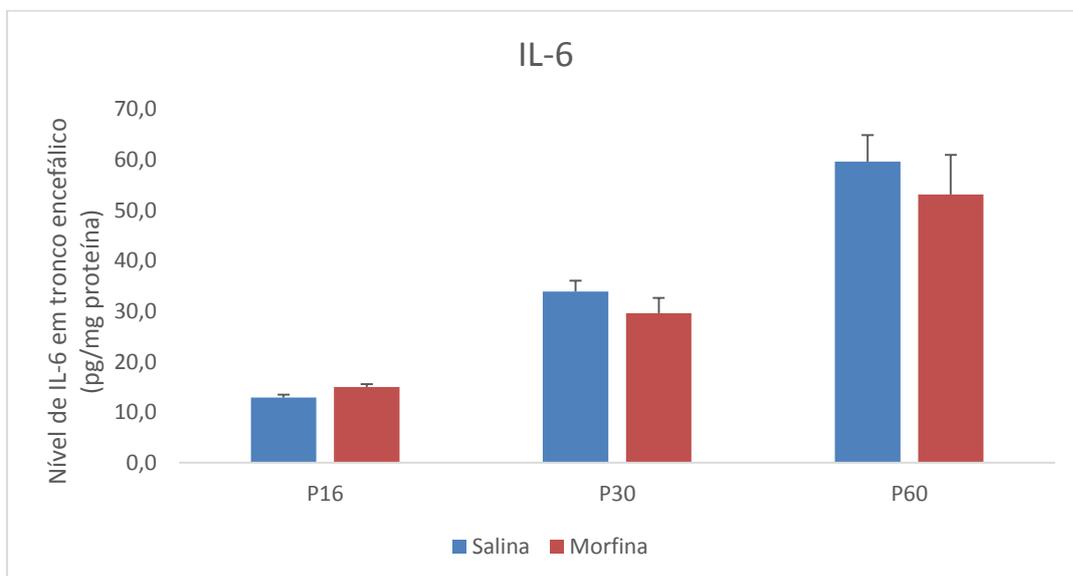
Os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 apresentaram relação direta com a idade (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(2,50)}=85,09$ ,  $F_{(2,50)}=131,55$ ,  $F_{(2,51)}=96,809$  e  $F_{(2,51)}=106,156$ , respectivamente,  $P<0,01$ , (Figura 8, 9, 10 e 11) para ambos os grupos (salina e morfina) em tronco encefálico.



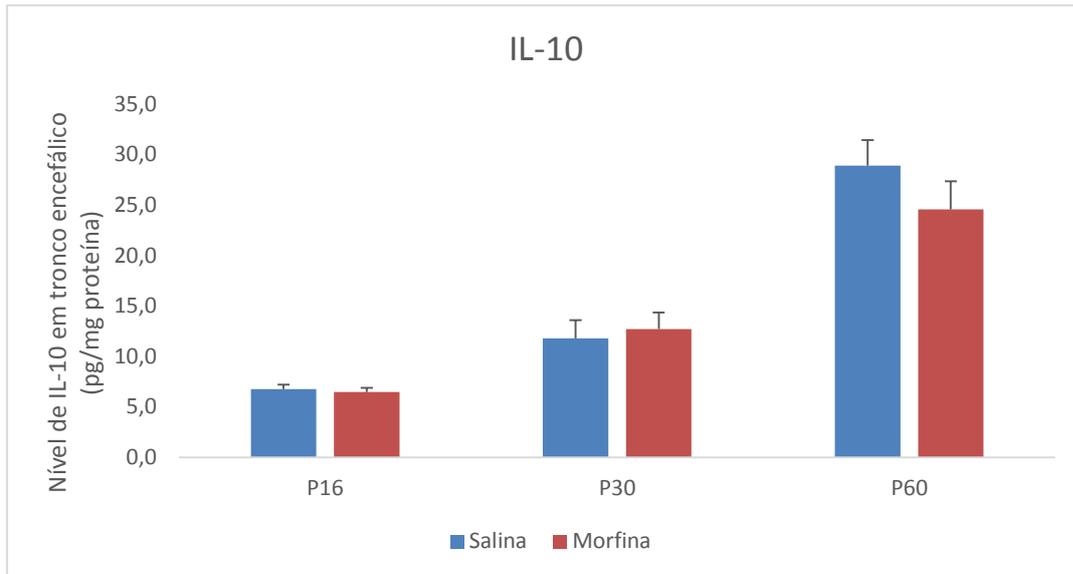
**Figura 8** - Níveis de BDNF em tronco encefálico medidos em P16, P30 e P60, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve efeito significativo da idade (ANOVA de duas vias/ SNK,  $F_{(2,50)}=85,09$ ,  $P <0,01$ ,  $n = 5-15$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).



**Figura 9** - Níveis de NGF em tronco encefálico medido em P16, P30 e P60, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve efeito significativo da idade (ANOVA de duas vias/ SNK,  $F_{(2,50)} = 131,55$ ,  $P < 0,01$ ,  $n = 5-15$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).



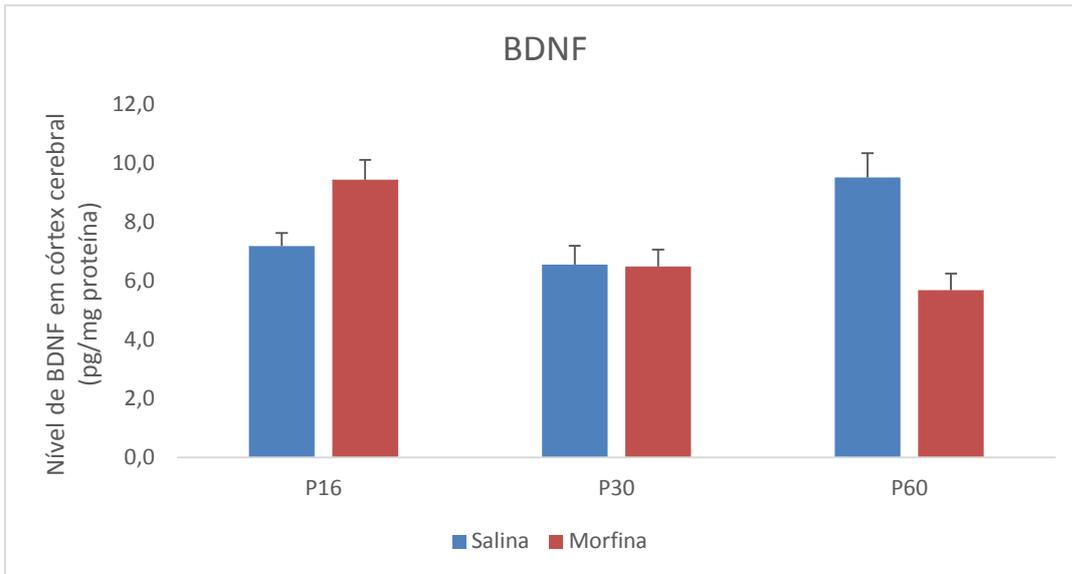
**Figura 10** - Níveis de IL-6 em tronco encefálico medido em P16, P30 e P60, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve efeito significativo da idade (ANOVA de duas vias/ SNK,  $F_{(2,51)} = 96,809$ ,  $P < 0,01$ ,  $n = 6-15$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).



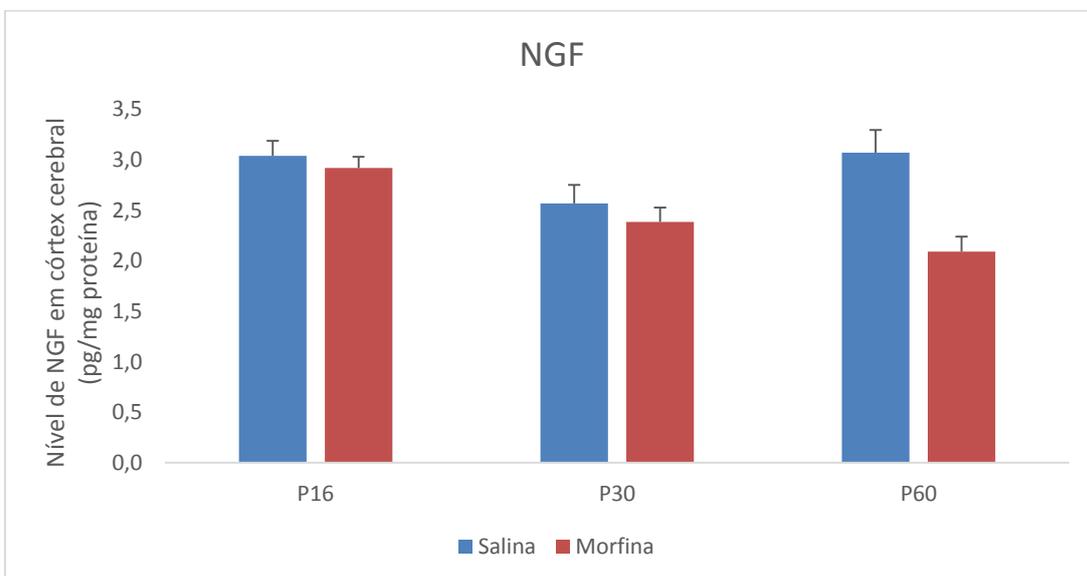
**Figura 11** - Níveis de IL-10 em tronco encefálico medido em P16, P30 e P60, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve efeito da idade (ANOVA de duas vias/ SNK,  $F_{(2,51)}=106,156$ ,  $P<0,01$ ,  $n = 6-15$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).

### **Efeitos da administração de morfina no período neonatal sobre os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 em córtex cerebral de ratos Wistar machos em P16, P30 e P60**

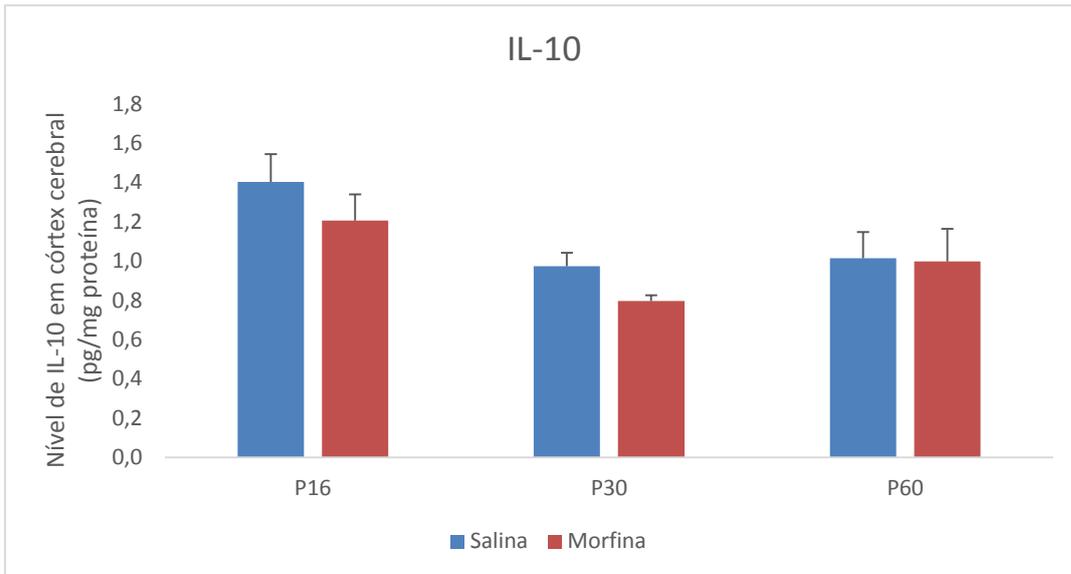
Houve interação entre fatores independentes, tratamento e idade, nos níveis de BDNF e NGF (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(2,57)}=11,870$ ,  $F_{(2,57)}=4,022$ , respectivamente,  $P <0,05$ , Figura 12 e 13). Os grupos controle apresentam níveis de BDNF e NGF aumentando ou se mantendo estáveis durante o crescimento dos animais. No entanto os animais que receberam morfina apresentam um efeito idade-dependente onde ocorre diminuição destes níveis com o aumento da idade dos animais. No córtex cerebral, observou-se somente efeito significativo da idade nos níveis de IL-10 (ANOVA de duas vias /SNK,  $F_{(2,57)}= 5.375$ ,  $P<0.05$ , Figura 14). Não houve diferença significativa entre os grupos nos níveis de IL-6 em córtex cerebral (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,57)}= 1.584$ ,  $P> 0.05$ , Figura 15).



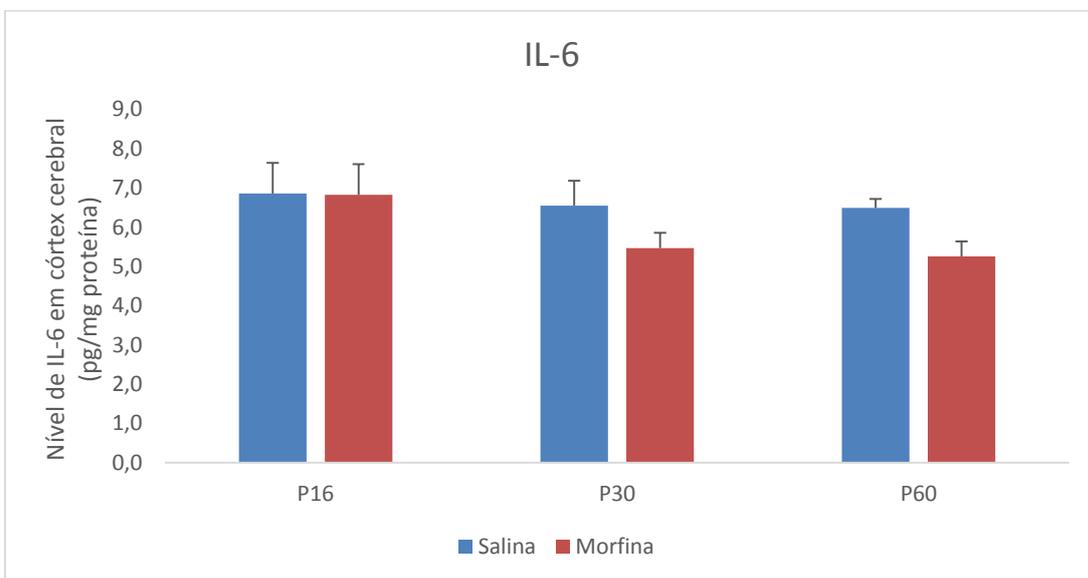
**Figura 12** - Níveis de BDNF em córtex cerebral medidos em P16, P30 e P60, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve interação entre idade e tratamento (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(2,57)}= 11,870$ ,  $P<0,05$ ,  $n = 8-16$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).



**Figura 13** - Níveis de NGF em córtex cerebral medidos em P16, P30 e P60, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve a interação entre idade e tratamento (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(2,57)}=4,022$ ,  $P<0,05$ ,  $n = 8-16$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).



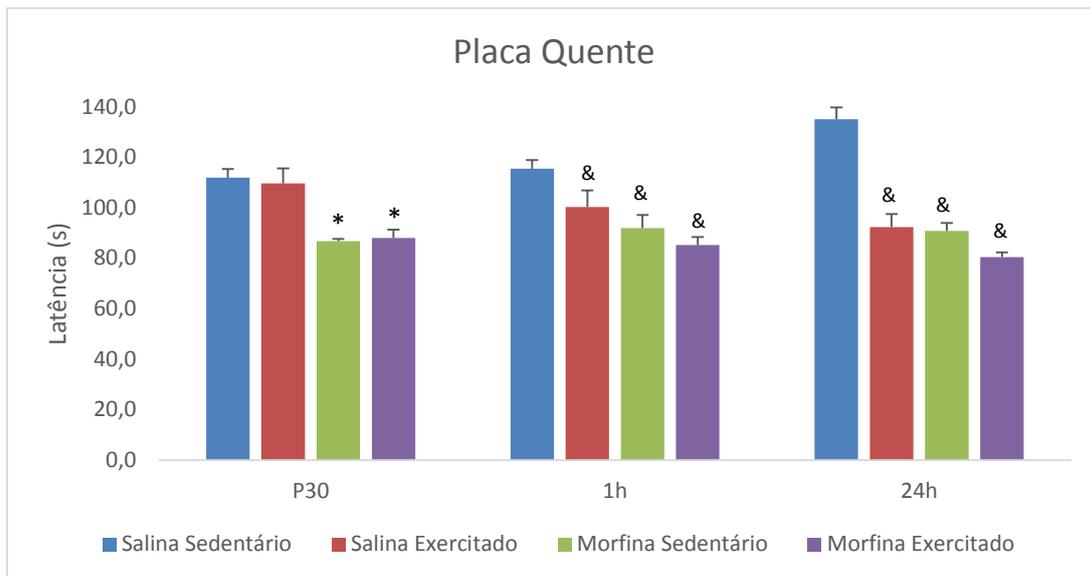
**Figura 14** - Níveis de IL-10 em córtex cerebral medidos em P16, P30 e P60, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve efeito significativo da idade (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(2,57)} = 5,375$ ,  $P < 0,05$ ,  $n = 8-16$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).



**Figura 15** - Níveis de IL-6 em córtex cerebral medidos em P16, P30 e P60, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Não houve efeito de nenhum dos fatores independentes ou interação entre eles (ANOVA de duas vias,  $F_{(1,57)} = 2,597$ ,  $P > 0,05$ ,  $n = 8-16$ ). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).

**Efeito da exposição a uma sessão de exercício físico em P30 e P60 sobre a hiperalgesia térmica e alodinia mecânica induzidas pela administração de morfina no período neonatal.**

No teste da Placa Quente, realizado no P30 após exposição à sessão de exercício, houve interação entre os fatores grupo e idade (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(6,84)}=4,716, P<0.001$ ). No basal os animais do grupo morfina sedentário e morfina exercitado apresentaram menor limiar nociceptivo em relação aos grupos salina sedentário e salina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=12,363 P<0,001$ ). Uma hora e 24 horas após a sessão de exercício os animais do grupo salina exercitado apresentaram menor limiar nociceptivo em relação ao salina sedentário, atingindo os limiares dos grupos expostos à morfina neonatal (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=7,942 P<0,005$ ,  $F_{(3,28)}=37,557 P<0,001$  respectivamente, Figura 16).



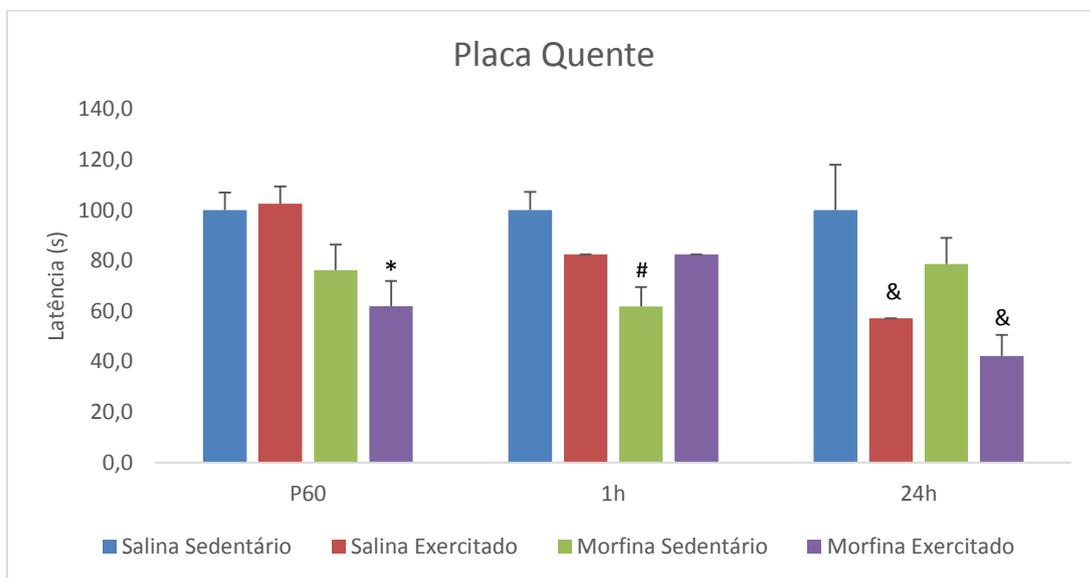
**Figura 16** - Latência no teste da Placa Quente em P30, 1h e 24h após o exercício, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve interação entre idade e grupo (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(6,84)}=4,716 P<0.001$ ,  $n=8$  animais por grupo). Dados apresentados por porcentagem do controle, como média  $\pm$  E.P.M. da latência em segundos (s).

\*Diferença significativa dos grupos salina (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=12,363 P<0,001$ ).

&Diferença do grupo salina sedentário (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=7,942 P<0,005$ );

(ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=37,557 P<0,001$ ).

Em P60 no teste da Placa Quente realizado após a sessão de exercício houve novamente interação entre os fatores idade e grupo (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(6,81)}=3.014$ ,  $P<0.05$ ). O grupo morfina exercício apresentou menor limiar nociceptivo que os grupos salina sedentário e salina exercício no basal (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,27)}=4,928$   $P<0,05$ ). Uma hora após a sessão de exercício o grupo morfina sedentário diferiu dos demais grupos (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=8,384$   $P<0,001$ ), enquanto que o grupo morfina exercício não diferiu do controle sedentário, demonstrando efeito agudo do exercício na melhora da hiperalgesia térmica induzida pela administração de morfina neonatal. Vinte e quatro horas após a sessão de exercício os grupos exercitados apresentam redução significativa no limiar de resposta em relação ao grupo salina sedentário, demonstrando um efeito hiperalgésico do exercício (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=4,862$   $P<0,05$ , Figura 17).



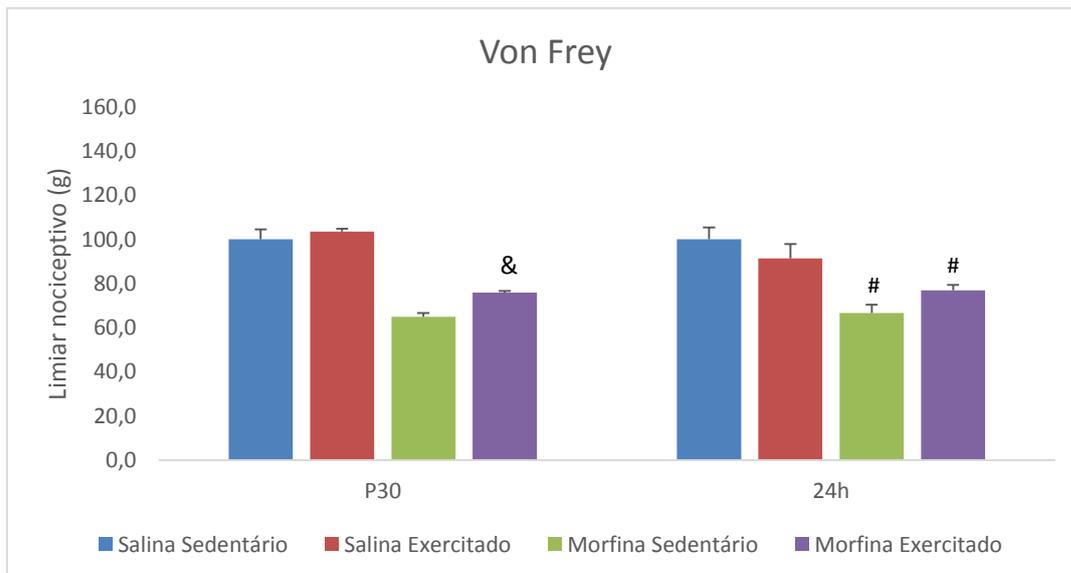
**Figura 17-** Latência no teste da Placa Quente em P60, 1h e 24h, após o exercício, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Há interação idade e grupo (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(6,81)}=3.014$ ,  $P<0.05$ ,  $n=8$  animais por grupo). Dados apresentados por porcentagem do controle, como média  $\pm$  E.P.M. da latência em segundos (s).  
\*Diferença significativa em relação aos grupos salina sedentário e salina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,27)}=5,232$   $P<0,05$ ).

#Diferença significativa em relação aos grupos salina sedentário, salina exercitado e morfina exercitado.

(ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=8,384$   $P<0,001$ ).

&Diferença significativa em relação ao grupo salina sedentário (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=4,862$   $P<0,05$ ).

No teste de von Frey realizado em P30 houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(3,55)}=36,895$   $P<0,05$ , Figura 18). No basal de P30 o grupo morfina sedentário e morfina exercitado diferem entre si e dos grupos salina sedentário e salina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=53,821$ ,  $F_{(3,28)}=9,784$ ,  $P<0,05$ ), já 24 horas após o exercício os grupos que receberam salina diferiram dos grupos tratados com morfina (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,27)}=10,771$   $P<0,05$ ). Em P60, houve interação entre idade e grupo (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(3,54)}=$   $P<0,001$ , Figura 19). Em P60 no basal houve diferença entre grupos salina sedentário e salina exercitado e os grupos morfina sedentário e morfina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,27)}=10,771$   $P<0,05$ ), vinte quatro horas após a exposição ao exercício, os grupos salina exercitado, morfina e morfina exercitado foram diferentes do grupo salina no teste de von Frey (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,27)}=7,949$ ,  $P<0,05$ ).



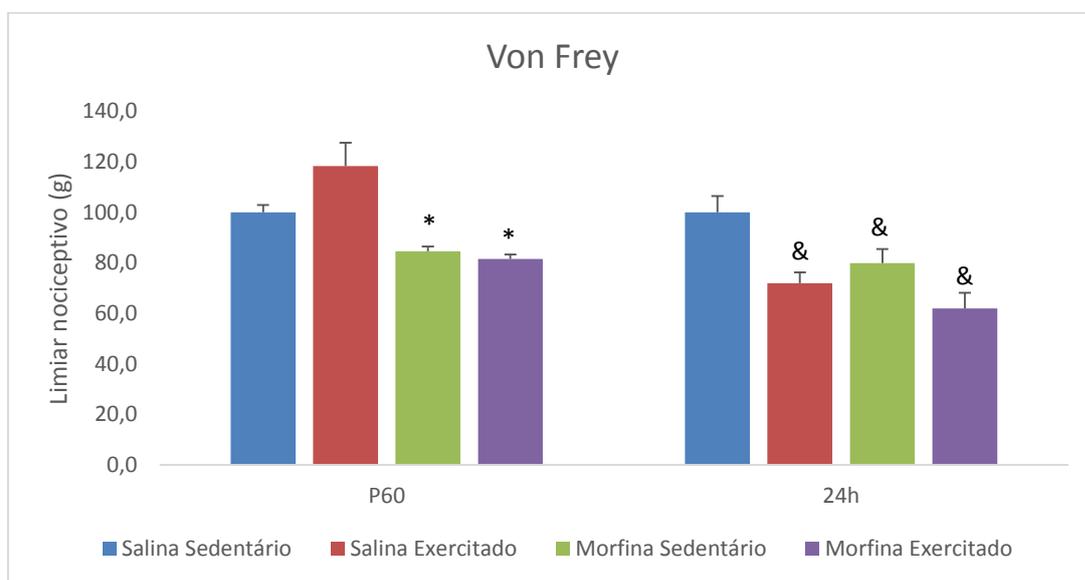
**Figura 18** - Limiar nociceptivo avaliado no teste de Von Frey (g) em P30 e 24h após a sessão de exercício, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de duas

vias/SNK,  $F_{(3,55)}=36,895$   $P<0,05$ ,  $n=8$  animais por grupo). Dados apresentados por porcentagem do controle, como média  $\pm$  E.P.M. do limiar de retirada da pata registrado em gramas (g).

\* Diferença significativa em relação aos grupos salina sedentário, salina exercitado e morfina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=53,821$ ,  $P<0,05$ ).

& Diferença significativa em relação aos grupos salina sedentário, salina exercitado e morfina sedentário (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,28)}=9,784$   $P<0,05$ ).

# Diferença significativa em relação aos grupos salina sedentário e salina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,27)}=10,771$   $P<0,05$ ).



**Figura 19** - Limiar nociceptivo avaliado pelo Von Frey (g) em P60 e 24h após o exercício, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve interação idade e grupo (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(3,54)}=7,699$ ,  $P<0,05$ ,  $n=8$  animais por grupo). Dados apresentados por porcentagem do controle, como média  $\pm$  E.P.M. do limiar de retirada da pata registrado em gramas (g).

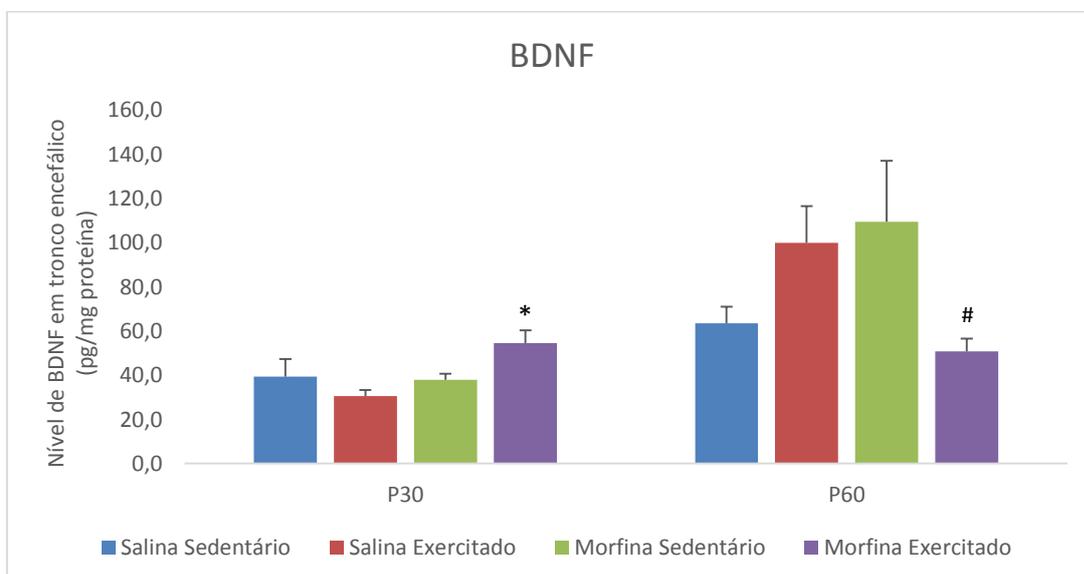
\* Diferença significativa em relação aos grupos salina sedentário e salina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,27)}=10,771$   $P<0,05$ ).

& Diferença significativa em relação ao grupo salina sedentário (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,27)}=7,949$   $P<0,05$ ).

**Efeitos da administração de morfina no período neonatal e/ ou exposição a uma sessão de exercício físico em P30 e P60 sobre os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 em tronco encefálico de ratos Wistar machos em P30 e P60**

Os níveis de BDNF e NGF mostram interação entre os fatores idade e grupo (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(3,47)}=6,059$  e  $F_{(3,47)}=3,929$  respectivamente,  $P<0,05$ , Figura 20 e 21). No BDNF em P30 houve diferença entre os grupos salina exercitado e morfina exercitado, já em P60 a diferença ocorreu entre os grupos morfina sedentário e morfina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,24)}=4,072$ ,  $P<0,05$ ). A idade e o exercício têm efeito nos níveis dessas neurotrofinas, no entanto o grupo morfina exercitado não demonstra a mesma resposta (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,23)}=3,706$ ,  $P<0,05$ ). Em P30 houve diferença significativa nos níveis de NGF em tronco encefálico entre os grupos salina sedentário e salina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,24)}=4,033$ ,  $P<0,05$ ). Em P60 o grupo morfina exercitado apresenta menores níveis neste parametro em relação ao grupo morfina sedentário (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,23)}=3,379$ ,  $P<0,05$ ).

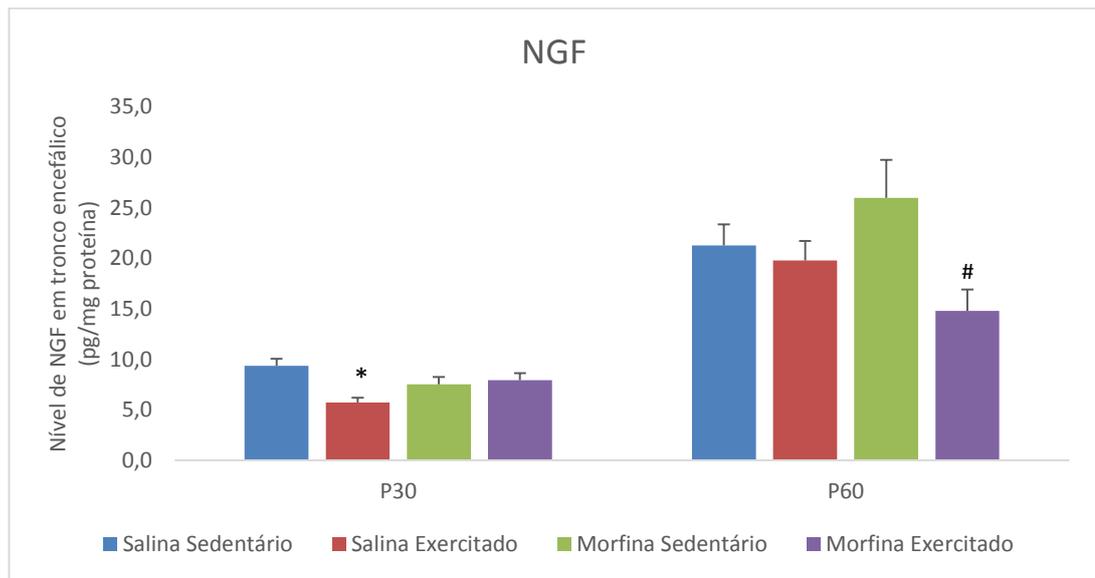
Os níveis de interleucinas 6 e 10 em tronco encefálico apresentaram um efeito significativo positivo em relação a idade (ANOVA de duas vias /SNK,  $F_{(1,47)}=51,719$ ,  $F_{(1,47)}=59,322$  respectivamente,  $P<0,01$ , Figura 22 e 23).



**Figura 20** - Níveis de BDNF em tronco encefálico medido em P30 e P60 após a sessão de exercício, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve interação entre idade e grupo (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(3,47)}=6,059$ ,  $P < 0,01$ ,  $n=5-8$  animais por grupo). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).

\* Diferença significativa do grupo salina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,24)}=4,072$ ,  $P < 0,05$ ).

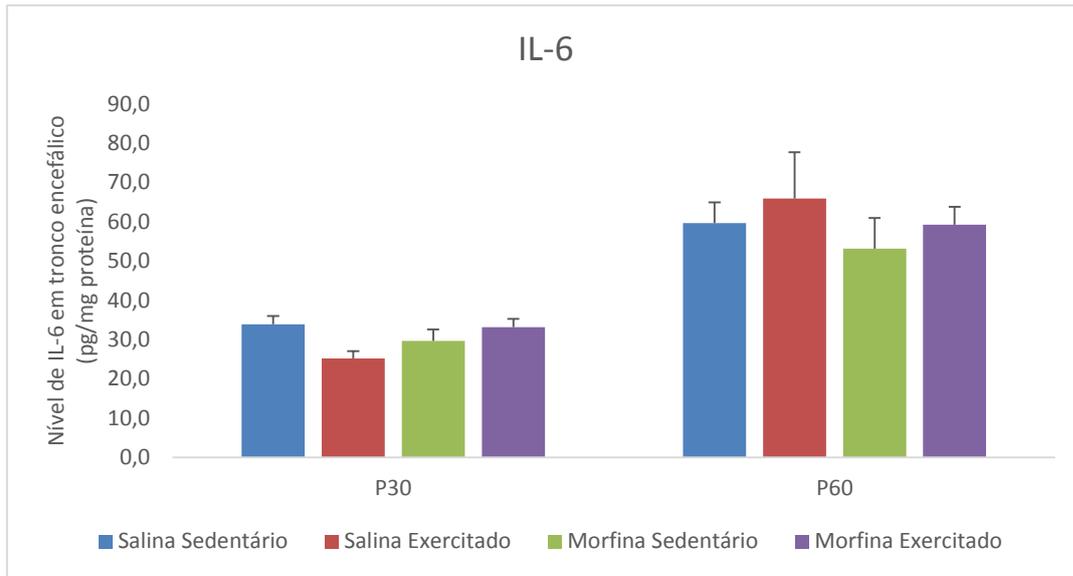
# Diferença significativa do grupo morfina sedentário (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,23)}=3,706$ ,  $P < 0,05$ ).



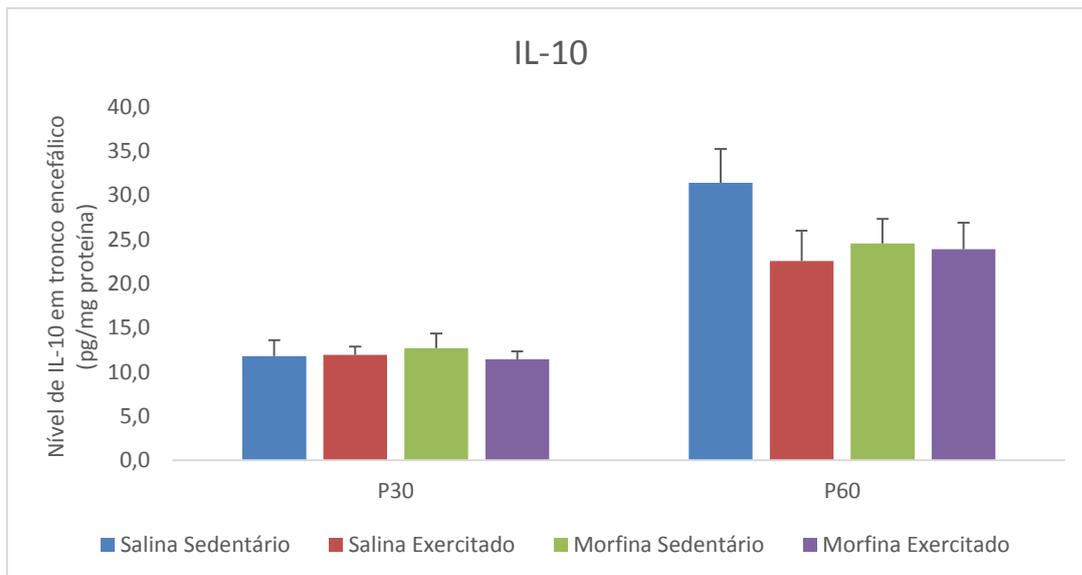
**Figura 21**- Níveis de NGF em tronco encefálico medidos em P30 e P60 após a sessão de exercício, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve interação entre idade e grupo (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(3,47)}=3,929$ ,  $P < 0,05$ ,  $n=5-8$  animais por grupo). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).

\* Diferença significativa do grupo salina sedentário (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,24)}=4,033$ ,  $P < 0,05$ ).

# Diferença significativa do grupo morfina sedentário (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,23)}=3,379$ ,  $P < 0,05$ ).



**Figura 22-** Níveis de IL-6 em tronco encefálico medido em P30 e P60 após a sessão de exercício, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve efeito da idade (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(1,47)}=51,719$ ,  $P < 0,01$ ,  $n=5-8$  animais por grupo). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).

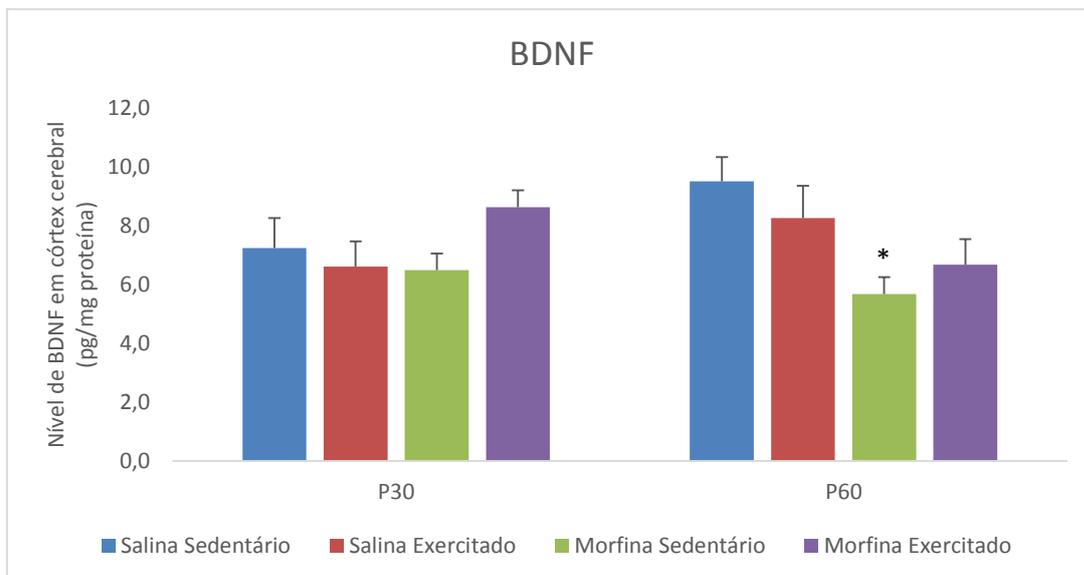


**Figura 23 -** Níveis de IL-10 em tronco encefálico medido em P30 e P60 após a sessão de exercício, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve efeito da idade (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(1,47)}=59,322$ ,  $P < 0,01$ ,  $n=6-8$  animais por grupo). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).

**Efeitos da administração de morfina no período neonatal e/ ou exposição a uma sessão de exercício físico em P30 e P60 sobre os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 em córtex cerebral de ratos Wistar machos em P30 e P60**

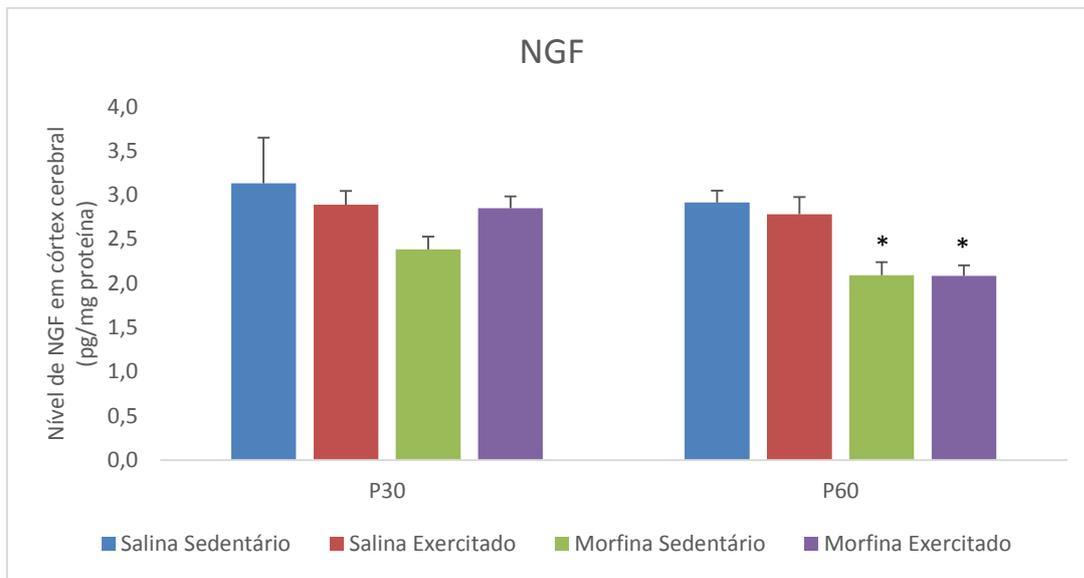
Nos níveis de BDNF houve interação entre os fatores independentes, grupo e idade, (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(3,52)}=3,061$ ,  $P<0,05$ , Figura 24). Os animais dos grupos salina sedentário apresentaram aumento nos níveis de NGF com o aumento da idade, porém os animais do grupo morfina sedentário não demonstram essa mesma resposta (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,25)}= 4,563$ ,  $P<0,05$ ). Nos níveis de NGF se verificou efeito da idade e do grupo (ANOVA de duas vias /SNK,  $F_{(3,52)}= 4,621$ ,  $F_{(1,52)}= 4,186$  respectivamente,  $P<0.05$ , Figura 25). Os grupos salina sedentário e salina exercitado são diferentes em P60 dos grupos morfina sedentário e morfina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,25)}=9,546$ ,  $P<0,001$ ).

Os níveis de IL-6 têm efeito do grupo (ANOVA de duas vias /SNK,  $F_{(3,52)}=3,048$ ,  $P<0.05$ , Figura 26). Em P60, o grupo morfina sedentário é diferente significativamente dos demais grupos (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,25)}=4,379$ ,  $P<0,05$ ). A análise dos dados dos níveis corticais de IL-10 apresentaram efeito da idade (ANOVA de duas vias /SNK,  $F_{(1,52)}=4,608$ ,  $P<0.05$ , Figura 27).



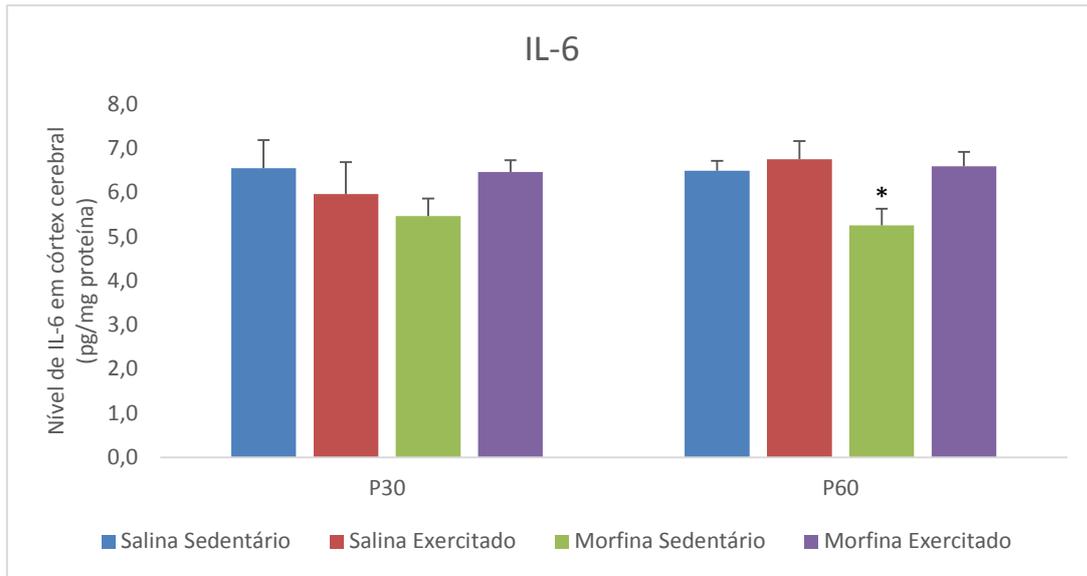
**Figura 24** - Níveis de BDNF em córtex cerebral medido em P30 e P60 após a sessão de exercício, nos animais que receberam morfina no de P8 a P14. Houve interação entre idade e grupo (ANOVA de duas vias/SNK,  $F_{(3,52)}=3,061$ ,  $P < 0,05$ ,  $n=5-8$  animais por grupo). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).

\* Diferença significativa do grupo salina sedentário (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,25)}= 4,563$ ,  $P < 0,05$ ).



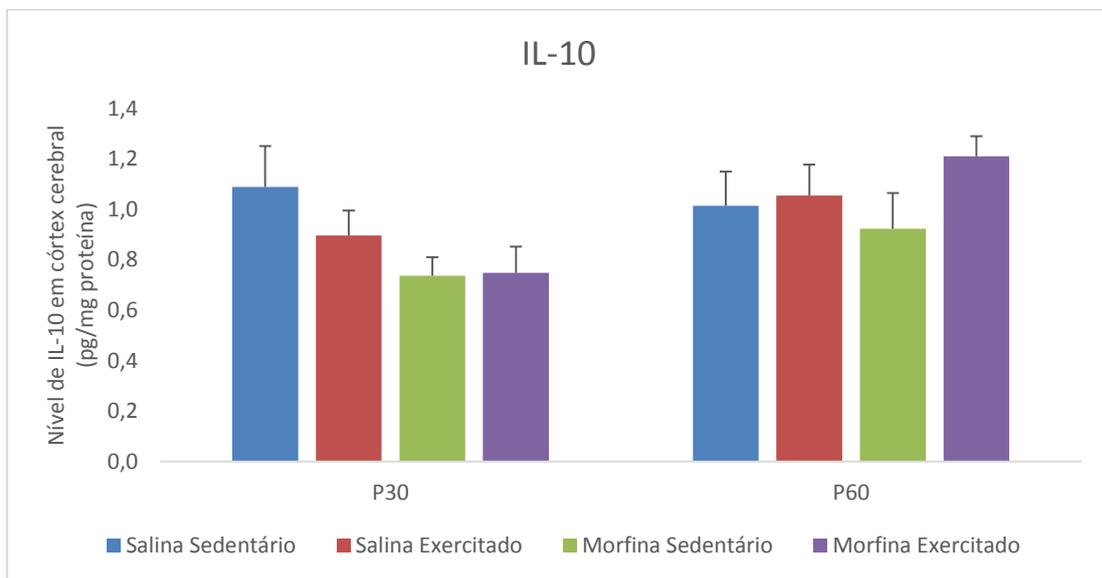
**Figura 25** -Níveis de NGF em córtex cerebral medido em P30 e P60 após a sessão de exercício, nos animais que receberam morfina no de P8 a P14. Houve efeito do tempo e do grupo (ANOVA de duas vias /SNK,  $F_{(3,52)}= 4,621$ ,  $F_{(1,52)}= 4,186$  respectivamente,  $P < 0,05$ ,  $n=5-8$  animais por grupo). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).

\* Diferença significativa dos grupos salina sedentário e salina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,25)}=9,546$ ,  $P < 0,001$ ).



**Figura 26** - Níveis de IL-6 em córtex cerebral medido em P30 e P60 após a sessão de exercício, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve efeito do grupo (ANOVA de duas vias /SNK,  $F_{(3,52)}=3,048$ ,  $P < 0,05$ ,  $n=5-8$  animais por grupo). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).

\* Diferença significativa dos grupos salina sedentário, salina exercitado e morfina exercitado (ANOVA de uma via/SNK,  $F_{(3,25)}=4,379$ ,  $P < 0,05$ ).



**Figura 27** - Níveis de IL-10 em córtex cerebral medido em P30 e P60 após a sessão de exercício, nos animais que receberam morfina de P8 a P14. Houve efeito do tempo (ANOVA de duas vias /SNK,  $F_{(1,52)}=4,608$ ,  $P < 0,05$ ,  $n=5-8$  animais por grupo). Dados apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (pg/mg de proteína).

## DISCUSSÃO

Nesta dissertação observamos que os animais submetidos à administração repetida de morfina no período neonatal entre P8 ao P14 não apresentam alteração no limiar nociceptivo térmico ou mecânico em P16 comparados aos animais que receberam solução salina. No entanto, em P30 e P60 observou-se que a administração repetida de morfina no período neonatal promoveu diminuição do limiar nociceptivo térmico (PQ) e mecânico (VF) em ambas as idades. Adicionalmente, em P30 e P60 houve interação entre as variáveis independentes, grupo e idade para hiperalgesia térmica (teste da Placa Quente), hipernocicepção (teste de Randall-Selitto) e alodínia mecânica (teste de Von Frey). Houve uma relação direta entre idade e limiar nociceptivo mecânico. No entanto, este aumento foi menor nos animais que receberam morfina, indicando que a administração de morfina no período neonatal induz alteração na resposta nociceptiva mecânica em médio (P30) e longo prazo (P60).

Nossos dados concordam com estudo prévio que mostra que a administração de morfina no período neonatal pode induzir alterações duradouras em respostas farmacológicas e sinalização celular em um sistema nervoso em desenvolvimento (Stanwood e Levitt, 2004). Estudo prévio do nosso grupo demonstrou que animais que receberam morfina no período neonatal apresentam hiperalgesia na fase II do teste da formalina em P30 e em P60, houve aumento na resposta nociceptiva em ambas fases I e II do teste de formalina (fases inflamatória e neurogênica, respectivamente) (Rozisky et al., 2010). Corroborando nossos dados, Sweitzer et al., (2004) demonstraram que a administração aguda de morfina em ratos jovens induz hipersensibilidade a estímulo nocivo associada à abstinência à morfina. A administração de morfina neonatal, além de alterar comportamentos nociceptivos pode afetar atividade exploratória e induzir efeito ansiolítico, em curto e médio prazos (Rozisky et al., 2016). Li et al., (2001) mostraram que animais adultos que receberam morfina por seis dias apresentaram hiperalgesia térmica e alodínia mecânica durante vários dias após a administração.

É importante salientar que utilizando diferentes testes de avaliação nociceptiva obtivemos o mesmo resultado, ou seja, os animais submetidos à administração repetida de morfina no período neonatal de P8 ao P14 apresentaram hiperalgesia térmica e alodínia mecânica em P30 e P60. O teste da placa quente é um teste seletivo para avaliação de substâncias analgésicas com efeito central (Ankier, 1974). Este teste gera uma resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação de fibras C e A $\delta$ , conduzindo o impulso ao corno dorsal da medula espinhal e estruturas supramedulares (Dickenson, 1997). Este tipo de estímulo térmico ativa receptores vaniloides, especificamente o receptor do tipo VR-1 (limiar de ativação em torno de 43°C) e receptor tipo VRL-1 (limiar de ativação em torno de 52°C), sendo que os receptores VR-1 são os mais importantes na medição da resposta a estímulos térmicos nocivos (Julius e Basbaum, 2001). Por outro lado, os testes utilizados para avaliação do limiar mecânico foram Randall-Selitto que é utilizado para avaliação da hipernocicepção (Randall e Selitto, 1957) e teste de Von Frey, utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico. Este último permite avaliar o aumento da sensibilidade a estímulos inócuos (alodínia) ou nocivos (hiperalgesia). Porém, além de estímulo de nociceptores de fibras A $\delta$  e nociceptores de fibras C, também podem ativar mecanorreceptores, particularmente von Frey test é usado para avaliar por meio de estímulo mecânico inócuo e crescente sensibilidade tecidual (Le Bars et al., 2001).

Estes resultados indicam que a exposição a opioide, mais especificamente, no início da vida pode ter consequências ao longo da vida. Isto provavelmente ocorra devido a imaturidade estrutural e funcional do sistema nervoso neonatal e a mudanças significativas no sistema opioide que ocorrem após o nascimento atingindo níveis de adulto somente em P21 (Beland e Fitzgerald, 2001; Marsh et al., 1997; Rahman et al., 1998).

Tem sido mostrado que exposição crônica aos opioides induz a mudança na atividade neuronal em medula espinhal, que durante a retirada de opioides pode se manifestar como

hiperatividade neuronal (Gardell et al., 2006; Rohde et al., 1997; Vanderah et al., 2001). A exposição crônica a opioides pode levar a processos neuroplásticos em medula espinhal (Mao e Mayer, 2001), relacionadas a alterações em sistemas moduladores do processo nociceptivo em nível supra-espinhal (Ossipov et al., 2005). A administração de morfina no período neonatal pode levar alterações em vias excitatórias, relacionadas a alterações em número ou sensibilidade de receptores e / ou na síntese de substâncias algésicas (Yaksh et al., 1986), que tem como consequência diminuição no limiar de dor (Celerier et al., 1999; Larcher et al., 1998). Estudo prévio mostra que a administração de morfina no período neonatal está associada com aumento de apoptose supra-espinhal em regiões anatômicas distintas, como áreas sensoriais do córtex e de processamento de memória emocional (amígdala) (Bajic et al., 2013).

Adicionalmente aos resultados de comportamento nociceptivos nesta dissertação mostramos que em córtex cerebral os níveis de NGF e BDNF estão diminuídos após administração de morfina no período neonatal. Estudos indicam que a administração aguda de morfina aumenta os níveis de RNAm de BDNF no córtex pré-frontal, mas o tratamento crônico de morfina não apresenta esse efeito (Robinson e Kolb, 2004; Thomas et al., 2008). Koo et al., (2012) também demonstraram que a administração crônica de morfina suprime a expressão gênica de BDNF na área tegumentar ventral de ratos e que tal bloqueio melhora as respostas de recompensa e atividade locomotora quando em uso de morfina, aumentando a atividade de neurônios dopaminérgicos. Considerando os dados da literatura podemos concluir que o efeito da administração de opioides em níveis centrais de BDNF é controverso, pois depende da via de administração, da área cerebral avaliada e da idade do animal. Em tronco encefálico, os níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10 não sofreram nenhum efeito da morfina, porém os níveis destes marcadores aumentam com a idade dos animais. Este efeito também foi observado quando os animais foram expostos ao exercício físico, pois os níveis de NGF, IL-6 e IL-10 em córtex cerebral também aumentaram com a idade. Assim como houve aumento em tronco

encefálico após o exercício dos níveis de BDNF e IL-10. Em córtex cerebral houve aumento dos níveis de IL-10 com o aumento da idade dos animais, enquanto IL-6 não mostrou alterações em seus níveis tanto pela idade ou quanto pela administração de morfina.

Em relação ao NGF, vários estudos fornecem evidências de que o NGF está envolvido na plasticidade neural anatômica e molecular de aferentes primários e na regulação de peptídeos sabidamente envolvidos em vias nociceptivas (Ma et al., 1995; Verge et al., 1985). NGF apresentou regulação epigenética negativa no soro de pacientes abstinentes ao álcool (Heberlein et al., 2013). Por outro lado a infusão de NGF na área tegumentar ventral não alterou comportamento de procura de cocaína (Lu et al., 2004). Sendo assim, o papel do NGF em drogadição ainda é pouco claro embora possa estar envolvido, juntamente com o BDNF, em alterações estruturais e funcionais observadas durante o processo de dependência de drogas (Russo et al., 2009). Estudo com NGF e morfina em animais acometidos por dor ou lesão do nervo mostra que uma infusão crônica intratecal de NGF reverte os sintomas de dor neuropática e restaura eficácia da morfina neste modelo animal (Cahill et al., 2003). Outro estudo também mostra o papel da neurotrofina sobre o comportamento nociceptivo, onde uma injeção intraperitoneal de NGF induz sensibilidade mecânica depois de 6h e aumento na sensibilidade térmica em 15 min após sua administração (Lewin e Mendell, 1993).

Como a administração de morfina no presente estudo é realizada no período neonatal e existem poucos dados sobre esse tipo de administração e as alterações induzidas em longo prazo, podemos sugerir que a diminuição dessas neurotrofinas ocorra provavelmente devido à desregulação causada pela administração da morfina no período em que o SNC ainda está em desenvolvimento e que seja sítio-específica, pois foi observada somente em córtex cerebral e não em tronco encefálico. Ainda, sabe-se que em ratos adultos a administração crônica de opioides pode diminuir ramificação dendrítica e espinhais, bem como os níveis de BDNF, em algumas regiões (Meng et al., 2013). Ainda podemos sugerir que essa redução pode estar

relacionada à possível diminuição de neurotrofinas, resultando assim em alterações de comportamento apresentadas pelos animais que receberam morfina neonatal. É importante salientar que, em um estudo em humanos, uma análise pós-morte mostrou uma diminuição dos níveis de BDNF e NGF em cérebro de indivíduos suicidas (Banerjee et al., 2013).

Nossos achados mostram que a IL-6 medida em córtex cerebral não sofreu nenhuma alteração em seus níveis pela idade nem pela administração repetida de morfina no período neonatal. No entanto, IL-6, uma citocina pró-inflamatória, é um fator crítico no controle dos sistemas imune e hematopoiético induzindo que as células B iniciem a proliferação e diferenciação nas células formadoras de anticorpos (Abbas, 2015). A IL-6 também atua em conjunto com a IL-3 para induzir a proliferação de progenitores hematopoiéticos, sendo secretada pelas células T, B, macrófagos, monócitos, linfócitos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos e muitas linhagens de células tumorais (Abbas, 2015). No tecido nervoso, IL-6 afeta a sobrevivência, diferenciação e regeneração neuronal (De Jongh et al., 2003; Gadiant e Otten, 1997). IL-6 está envolvida em plasticidade sináptica e hiperexcitabilidade e pode induzir a síntese ou liberação de outras substâncias com efeitos neuroprotetores ou neuromoduladores (Tancredi et al., 2000). Estudos mostram que a administração central ou periférica de IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  são conhecidas por induzir a hiperalgesia e alodínia em ratos (Hori et al., 1998). Um possível mecanismo pelo qual as citocinas induzem hiperalgesia é sua interação e modulação da função de receptores opioides (Raffa et al., 1993). Nossos dados mostram que a morfina administrada no período neonatal não foi capaz de modificar os níveis de IL-6 nesses animais. O estudo de Liang et al., (2008) corrobora parcialmente nossos achados, pois os animais que tiveram tratamento crônico com morfina não apresentaram níveis de IL-6 alterados.

Por outro lado, IL-10 é uma citocina imunorreguladora que desempenha um papel fundamental na regulação da inflamação e desencadeia respostas imunoadaptativas (Choy e

Panayi, 2001). As citocinas são sinais potentes para induzem a síntese e expressão de receptores opioides nas células imunomoduladoras, estas modulam a expressão dos receptores em células neuronais (Kline e Wiley, 2008). De acordo com a literatura, o anticorpo anti-IL-10 quando administrado em longo prazo desencadeou uma hiperalgesia significativa, e também reduziu a expressão do receptor espinhal opioide  $\mu$  e facilitou o desenvolvimento de tolerância à morfina em ratos com artrite induzida por adjuvante (CFA), inferindo assim que a citocina IL-10 pode estar envolvida no desenvolvimento de tolerância à morfina, afetando a expressão do receptor opioide  $\mu$  (Zaringhalam et al., 2014). Em nosso estudo, a morfina administrada no período neonatal não foi capaz de provocar alterações nas citocinas (IL-6 e IL-10) avaliadas em tronco e córtex cerebrais, e nossos achados corroboram os de Monibi et al., (2015), onde as citocinas não se mostram alteradas após a administração de morfina em animais sem comorbidades.

Buscando melhor entender a hiperalgesia térmica e alodínia mecânica induzida pela administração de morfina no período neonatal utilizamos a exposição a uma sessão de exercício físico como uma terapia não farmacológica destes estados hipernociceptivos. Na literatura, já é bem consolidado o fenômeno de analgesia induzida pelo exercício (Koltyn, 2002). Alguns pesquisadores relatam que uma sessão de exercício físico é capaz de alterar a percepção da dor, tanto durante quanto após a realização da mesma (Koltyn, 2000; O'Connor e Cook, 1999). Neste sentido, protocolos de exercício são utilizados na reabilitação de pacientes com doenças musculoesqueléticas crônicas tais como: fibromialgia, lombalgia crônica e dor miofascial (Gowans e deHueck, 2004; Wright e Sluka, 2001).

Atualmente, sabe-se que a prática de exercícios físicos causa benefícios tanto para a saúde física, como mental, reduzindo a incidência de patologias, como: câncer, diabetes, doenças cardíacas e osteoporose (Booth et al., 2002; Cotman et al., 2007; Fentem, 1994; Steinmetz e Potter, 1996). O exercício também promove neuroproteção e neuroplasticidade (Hayes et al., 2008; Viveros et al., 1979), melhora a cognição e possui atividade ansiolítica e

antidepressiva (Cotman et al., 2007; Greenwood e Fleshner, 2008). Além destes efeitos, o exercício físico é capaz de influenciar o limiar nociceptivo (Koltyn, 2000; Kuphal et al., 2007). Quando se trata da prática de exercício físico alguns princípios de treinamento devem ser levados em consideração, como: a frequência, a intensidade e a duração do exercício, eles determinam a extensão da adaptação ao treinamento. A intensidade refere-se ao nível de dificuldade do exercício; a frequência, ao número de sessões; e a duração, ao período de idade durante o qual o indivíduo esteve em treinamento, ou à duração de uma única sessão de exercício (Maughan, 2000).

O exercício físico é importante para auxiliar no controle de algumas condições dolorosas (Wright e Sluka, 2001). Na literatura, alguns estudos relatam a analgesia induzida pelo exercício e o principal mecanismo envolvido nessa analgesia é o sistema opioide endógeno, que teria esse efeito analgésico por meio de beta endorfinas (Koltyn, 2002). As beta-endorfinas são encontradas abundantemente nos olhos, coração, rins, trato gastrointestinal, medula espinal e encéfalo (Imura e Nakai, 1981). Além disso, as células cromafins da medula adrenal foram bem caracterizadas como uma rica fonte de opioides endógenos podendo assim contribuir no controle da dor (Rowbotham, 1999).

Nesta dissertação também trazemos os dados das neurotrofinas e citocinas avaliadas após a exposição ao exercício físico dos animais que foram expostos a morfina no período neonatal. O observado em tronco encefálico na idade de P30 foi um aumento de BDNF nos animais que receberam morfina e foram expostos ao exercício físico, aumento que foi observado nos animais que receberam salina e foram expostos ao exercício. Já nos níveis de NGF em tronco encefálico observou-se que nesta mesma idade os animais que receberam salina e foram expostos ao exercício apresentaram níveis menores de NGF. Os animais de P60 que receberam só morfina demonstram um aumento nos níveis de BDNF e NGF em tronco encefálico. Essa resposta é atenuada nos animais que recebem morfina e foram expostos ao

exercício. Em córtex cerebral temos o mesmo resultado obtido nos testes basais que mostra que a morfina causa uma diminuição dos níveis de NGF e BDNF quando comparados com os animais que receberam solução salina, mas quando comparamos os níveis de BDNF dos animais que receberam morfina e foram expostos ao exercício com os níveis dos demais grupos não vemos diferenças.

Estes resultados nos levam a sugerir que ocorre uma interação entre os fatores morfina e exercício, podendo o exercício causar uma melhora nos níveis de BDNF e NGF dependendo da estrutura analisada. Nossos achados corroboram com dados da literatura que dizem que animais expostos ao exercício de baixa intensidade têm os níveis de BDNF e de RNAm de BDNF aumentados. A mesma resposta não foi observada quando a intensidade do exercício foi moderada ou intensa (Soya et al., 2007). O estudo de Vaynman et al., (2003) nos relata que em hipocampo o exercício voluntário não só eleva a expressão do BDNF, mas também aumenta seu receptor de transdução de sinal TrkB-R. Outro estudo em hipocampo de ratos submetidos a um protocolos de exercício moderado em esteira também mostra aumentar os níveis de NGF (Chae e Kim, 2009).

As interleucinas IL-6 e IL-10 medidas em tronco encefálico após o exercício físico também aumentam com a idade, resposta que corrobora com os nossos dados encontrados no basal. Já em córtex cerebral a morfina reduziu os níveis de IL-6 nos animais com sessenta dias de idade. Esta mesma resposta não foi verificada nos animais que receberam morfina e foram expostos ao exercício físico. Os níveis de IL-10 também se mostraram aumentados com a idade principalmente nos animais que receberam morfina. Nossos achados nos levam a crer que o exercício e a morfina não foram capazes de modificar a maioria das interleucinas mensuradas neste estudo, isso pode ser devido ao fato que a maioria dos estudos que encontra alterações dessas citocinas são feitos com medições logo após a exposição ao exercício. A literatura mostra que a concentração plasmática de IL-6 pode aumentar em até 100 vezes em relação ao valor

basal. Os níveis de IL-10 também se mostram modificados após um protocolo de oito semanas consecutivas de exercício (Yakeu et al., 2010). Aumentos plasmáticos de IL-6 não possuem linearidade com o tempo e o seu pico é atingido ao final do exercício ou em curtos intervalos pós-exercício, retornando rapidamente aos valores pré-exercício (Fischer, 2006). Porém, nossos dados mostram que o exercício reverteu a diminuição nos níveis de IL-6 causada pela morfina, dado que corrobora com a literatura mostrando a normalização da expressão de IL-6 no encéfalo de camundongos com neuroinflamação submetidos ao exercício físico aeróbio (Leem et al., 2011).

Nosso estudo mostra que o exercício físico não foi capaz de reverter a hiperalgesia e alodínia induzida pela administração de morfina nos animais de P30 e P60, e que por outro lado, desencadeou uma diminuição do limiar nociceptivo nos animais do grupo salina exercitado. Porém o exercício físico foi eficaz em normalizar os efeitos da morfina sobre os níveis de BDNF, NGF e IL-6, sendo assim o exercício que propomos neste estudo pode ter sido de intensidade relativamente baixa para produzir uma resposta analgésica, mas foi eficaz para promover a homeostase dos níveis de neurotrofinas e citocinas. A primeira questão a ressaltar com relação à analgesia induzida pelo exercício é que ela está diretamente relacionada com intensidade, e em nosso estudo utilizamos uma intensidade moderada que não foi capaz de produzir analgesia, como também descrito por Droste et al., (1991) e Pertovaara e Kemppainen, (1992), que questionaram se esta intensidade de exercício físico seria suficiente para provocar efeito analgésico. Reforçando essas afirmações, Lana et al., (2006) mostraram uma redução do limiar de dor durante a resposta inflamatória aguda em ratos treinados em esteira ergométrica, sob um protocolo utilizando cerca de 70% do VO<sub>2</sub> máximo destes animais. Corroborando com estes estudos Koltyn, (2000), relata que a hipoalgesia é alcançada apenas com exercício físico de alta intensidade. Outro importante fator a considerar é que realizamos uma única exposição

ao exercício físico em esteira e desta forma não foi possível mensurar a da VO<sub>2</sub> máxima para medirmos exatamente a intensidade do exercício.

Apesar de já ser bem consolidado na literatura que a morfina desencadeia hiperalgesia, os mecanismos pelos quais este fenômeno ocorre ainda não estão bem elucidados, diferentes mecanismos foram identificados para esse processo de adaptação incluindo sensibilização dos neurônios aferentes primários e maior liberação de glutamato por estes aferentes, hiperexcitabilidade de neurônios de segunda ordem, regulação positiva de neuromoduladores nociceptivos feito por controle descendente da dor (Chu et al., 2008; Lee et al., 2011). Mais recentemente, não apenas os neurônios, mas também as células gliais têm sido demonstradas participando deste processo, sendo ativadas concomitantemente com a hiperalgesia induzida por opioides (Hutchinson et al., 2011).

O estudo da dor em pediatria permanece relativamente inexplorado na clínica e experimentalmente. Pouco se sabe sobre a experiência da dor em crianças. Uma razão é a pesquisa limitada na área básica direcionada para este grupo etário, que fornece suporte sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de dor e sua modulação em uma idade precoce. A maioria dos estudos mostraram resultados com animais com idade entre P0 e P7. Embora seja difícil fazer correlações diretas entre seres humanos e roedores, ao nascer o rato tem um desenvolvimento neurológico semelhante ao de um recém-nascido prematuro de 24 semanas (Fitzgerald e Anand, 1993).

## CONCLUSÃO

Os resultados dessa dissertação demonstram que à exposição a morfina no período neonatal leva à diminuição no limiar nociceptivo térmico e mecânico em ratos.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, mostramos efeito da idade nos níveis de BDNF, NGF, IL-6 e IL-10, que aumentam em tronco cerebral, já os níveis de IL-10 diminuem com o aumento da idade em córtex cerebral total.

Ainda com relação aos parâmetros bioquímicos mostramos que o exercício físico melhora os níveis BDNF, NGF e IL-6 em animais expostos a morfina no período neonatal.

O exercício físico não foi capaz de reverter a hiperalgesia e alodínia induzida pela morfina nos animais de P30 e P60.

Nossos dados mostram a necessidade de mais estudos sobre a dor em recém-nascidos e o sobre o uso de opioides neste período. Também se mostra necessário mais estudos sobre tratamentos não farmacológicos como o exercício físico.

## Referências

- Abbas, A., Lichtman, AH, 2015. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Ahmadalipour, A., Sadeghzadeh, J., Vafaei, A.A., Bandegi, A.R., Mohammadkhani, R., Rashidy-Pour, A., 2015. Effects of environmental enrichment on behavioral deficits and alterations in hippocampal BDNF induced by prenatal exposure to morphine in juvenile rats. *Neuroscience* 305, 372-383.
- Anand, K.J., Barton, B.A., McIntosh, N., Lagercrantz, H., Pelausa, E., Young, T.E., Vasa, R., 1999. 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, 331-338.
- Ankier, S.I., 1974. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. *Eur J Pharmacol* 27, 1-4.
- Bajic, D., Commons, K.G., Soriano, S.G., 2013. Morphine-enhanced apoptosis in selective brain regions of neonatal rats. *Int J Dev Neurosci* 31, 258-266.
- Banerjee, R., Ghosh, A.K., Ghosh, B., Bhattacharyya, S., Mondal, A.C., 2013. Decreased mRNA and Protein Expression of BDNF, NGF, and their Receptors in the Hippocampus from Suicide: An Analysis in Human Postmortem Brain. *Clin Med Insights Pathol* 6, 1-11.
- Baranauskas, G., Nistri, A., 1998. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol* 54, 349-365.
- Battastini, A.M., da Rocha, J.B., Barcellos, C.K., Dias, R.D., Sarkis, J.J., 1991. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res* 16, 1303-1310.
- Beland, B., Fitzgerald, M., 2001. Mu- and delta-opioid receptors are downregulated in the largest diameter primary sensory neurons during postnatal development in rats. *Pain* 90, 143-150.
- Bement, M.K., Sluka, K.A., 2005. Low-intensity exercise reverses chronic muscle pain in the rat in a naloxone-dependent manner. *Arch Phys Med Rehabil* 86, 1736-1740.
- Bickler, P.E., Fahlman, C.S., 2006. The inhaled anesthetic, isoflurane, enhances Ca<sup>2+</sup>-dependent survival signaling in cortical neurons and modulates MAP kinases, apoptosis proteins and transcription factors during hypoxia. *Anesth Analg* 103, 419-429, table of contents.
- Booth, F.W., Chakravarthy, M.V., Gordon, S.E., Spangenburg, E.E. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. *J Appl Physiol* (1985) 93, 3-30.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brust, K.B., Corbell, K.A., Al-Nakkash, L., Babu, J.R., Broderick, T.L., 2014. Expression of gluconeogenic enzymes and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in liver of diabetic mice after acute exercise. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7, 495-504.
- Celerier, E., Laulin, J., Larcher, A., Le Moal, M., Simonnet, G., 1999. Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats. *Brain Res* 847, 18-25.
- Chae, C.H., Kim, H.T., 2009. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochem Int* 55, 208-213.
- Chao, M.V., Bothwell, M., 2002. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 33, 9-12.

- Chao, Y.C., Xie, F., Li, X., Guo, R., Yang, N., Zhang, C., Shi, R., Guan, Y., Yue, Y., Wang, Y., 2016. Demethylation regulation of BDNF gene expression in dorsal root ganglion neurons is implicated in opioid-induced pain hypersensitivity in rats. *Neurochem Int* 97, 91-98.
- Chatzitheodorou, D., Kabitsis, C., Malliou, P., Mougios, V., 2007. A pilot study of the effects of high-intensity aerobic exercise versus passive interventions on pain, disability, psychological strain, and serum cortisol concentrations in people with chronic low back pain. *Phys Ther* 87, 304-312.
- Choy, E.H., Panayi, G.S., 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344, 907-916.
- Chu, L.F., Angst, M.S., Clark, D., 2008. Opioid-induced hyperalgesia in humans: molecular mechanisms and clinical considerations. *Clin J Pain* 24, 479-496.
- Cobianchi, S., Marinelli, S., Florenzano, F., Pavone, F., Luvisetto, S., 2010. Short- but not long-lasting treadmill running reduces allodynia and improves functional recovery after peripheral nerve injury. *Neuroscience* 168, 273-287.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., Christie, L.A., 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 30, 464-472.
- da Silva, R.S., Hoffman, A., de Souza, D.O., Lara, D.R., Bonan, C.D., 2005. Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats. *Eur J Pharmacol* 509, 155-159.
- da Silva Torres, I.L., Cucco, S.N., Bassani, M., Duarte, M.S., Silveira, P.P., Vasconcellos, A.P., Tabajara, A.S., Dantas, G., Fontella, F.U., Dalmaz, C., Ferreira, M.B., 2003. Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats-effect of morphine administration. *Neurosci Res* 45, 277-283.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.
- De Jongh, R.F., Vissers, K.C., Booij, L.H., De Jongh, K.L., Vincken, P., Meert, T.F., 2003. Interleukin-6 and perioperative thermoregulation and HPA-axis activation. *Cytokine* 21, 248-256.
- Dhawan, B.N., Cesselin, F., Raghurir, R., Reisine, T., Bradley, P.B., Portoghese, P.S., Hamon, M., 1996. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev* 48, 567-592.
- Dickenson, A., 1997. Mechanisms of Central Hypersensitivity: Excitatory Amino Acid Mechanisms and Their Control. *The Pharmacology of Pain*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 167-210.
- Droste, C., Greenlee, M.W., Schreck, M., Roskamm, H., 1991. Experimental pain thresholds and plasma beta-endorphin levels during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 23, 334-342.
- Eidson, L.N., Murphy, A.Z., 2013. Blockade of Toll-like receptor 4 attenuates morphine tolerance and facilitates the pain relieving properties of morphine. *J Neurosci* 33, 15952-15963.
- Fentem, P.H., 1994. ABC of sports medicine. Benefits of exercise in health and disease. *Bmj* 308, 1291-1295.
- Fischer, C.P., 2006. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 12, 6-33.
- Fruhstorfer, H., Gross, W., Selbmann, O., 2001. von Frey hairs: new materials for a new design. *Eur J Pain* 5, 341-342.
- Gadient, R.A., Otten, U.H., 1997. Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol* 52, 379-390.
- Gardell, L.R., King, T., Ossipov, M.H., Rice, K.C., Lai, J., Vanderah, T.W., Porreca, F., 2006. Opioid receptor-mediated hyperalgesia and antinociceptive tolerance induced by sustained opiate delivery. *Neurosci Lett* 396, 44-49.

- Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Opazo, P., Roy, R.R., Edgerton, V.R., 2001. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci* 13, 1078-1084.
- Gottmann, K., Mittmann, T., Lessmann, V., 2009. BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Exp Brain Res* 199, 203-234.
- Gowans, S.E., deHueck, A., 2004. Effectiveness of exercise in management of fibromyalgia. *Curr Opin Rheumatol* 16, 138-142.
- Greenwood, B.N., Fleshner, M., 2008. Exercise, learned helplessness, and the stress-resistant brain. *Neuromolecular Med* 10, 81-98.
- Griesbach, G.S., Hovda, D.A., Gomez-Pinilla, F., Sutton, R.L., 2008. Voluntary exercise or amphetamine treatment, but not the combination, increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and synapsin I following cortical contusion injury in rats. *Neuroscience* 154, 530-540.
- Haier, R.J., Quaid, K., Mills, J.C., 1981. Naloxone alters pain perception after jogging. *Psychiatry Res* 5, 231-232.
- Hameed, H., Hameed, M., Christo, P.J., 2010. The effect of morphine on glial cells as a potential therapeutic target for pharmacological development of analgesic drugs. *Curr Pain Headache Rep* 14, 96-104.
- Hayden, J.A., van Tulder, M.W., Tomlinson, G., 2005. Systematic review: strategies for using exercise therapy to improve outcomes in chronic low back pain. *Ann Intern Med* 142, 776-785.
- Hayes, K., Sprague, S., Guo, M., Davis, W., Friedman, A., Kumar, A., Jimenez, D.F., Ding, Y., 2008. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol* 115, 289-296.
- Heberlein, A., Muschler, M., Frieling, H., Behr, M., Eberlein, C., Wilhelm, J., Groschl, M., Kornhuber, J., Bleich, S., Hillemacher, T., 2013. Epigenetic down regulation of nerve growth factor during alcohol withdrawal. *Addict Biol* 18, 508-510.
- Hoffmann, P., Thoren, P., 1988. Electric muscle stimulation in the hind leg of the spontaneously hypertensive rat induces a long-lasting fall in blood pressure. *Acta Physiol Scand* 133, 211-219.
- Holson, R.R., 1992. Euthanasia by decapitation: evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents. *Neurotoxicol Teratol* 14, 253-257.
- Hori, T., Oka, T., Hosoi, M., Aou, S., 1998. Pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E2 in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 840, 269-281.
- Horvath, R.J., Landry, R.P., Romero-Sandoval, E.A., DeLeo, J.A., 2010. Morphine tolerance attenuates the resolution of postoperative pain and enhances spinal microglial p38 and extracellular receptor kinase phosphorylation. *Neuroscience* 169, 843-854.
- Hutchinson, K.J., Gomez-Pinilla, F., Crowe, M.J., Ying, Z., Basso, D.M., 2004. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain* 127, 1403-1414.
- Hutchinson, M.R., Shavit, Y., Grace, P.M., Rice, K.C., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2011. Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: an integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia. *Pharmacol Rev* 63, 772-810.
- Imura, H., Nakai, Y., 1981. "Endorphins" in pituitary and other tissues. *Annu Rev Physiol* 43, 265-278.
- Jia, L.L., Kang, Y.M., Wang, F.X., Li, H.B., Zhang, Y., Yu, X.J., Qi, J., Suo, Y.P., Tian, Z.J., Zhu, Z., Zhu, G.Q., Qin, D.N., 2014. Exercise training attenuates hypertension and

- cardiac hypertrophy by modulating neurotransmitters and cytokines in hypothalamic paraventricular nucleus. *PLoS One* 9, e85481.
- Jordan, B.A., Devi, L.A., 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697-700.
- Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-210.
- Kline, R.H.t., Wiley, R.G., 2008. Spinal mu-opioid receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociception and morphine antinociception. *J Neurosci* 28, 904-913.
- Koltyn, K.F., 2000. Analgesia following exercise: a review. *Sports Med* 29, 85-98.
- Koltyn, K.F., 2002. Exercise-induced hypoalgesia and intensity of exercise. *Sports Med* 32, 477-487.
- Koo, J.W., Mazei-Robison, M.S., Chaudhury, D., Juarez, B., LaPlant, Q., Ferguson, D., Feng, J., Sun, H., Scobie, K.N., Damez-Werno, D., Crumiller, M., Ohnishi, Y.N., Ohnishi, Y.H., Mouzon, E., Dietz, D.M., Lobo, M.K., Neve, R.L., Russo, S.J., Han, M.H., Nestler, E.J., 2012. BDNF is a negative modulator of morphine action. *Science* 338, 124-128.
- Kuphal, K.E., Fibuch, E.E., Taylor, B.K., 2007. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. *J Pain* 8, 989-997.
- Kuribara, H., 1995. Modification of morphine sensitization by opioid and dopamine receptor antagonists: evaluation by studying ambulation in mice. *Eur J Pharmacol* 275, 251-258.
- Lana, A.C., Paulino, C.A., Donizeti, I.G., 2006. Influência dos exercícios físicos de baixa e alta intensidade sobre o limiar de hipernocicepção e outros parâmetros em ratos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 12, 248-254.
- Larcher, A., Laulin, J.P., Celerier, E., Le Moal, M., Simonnet, G., 1998. Acute tolerance associated with a single opiate administration: involvement of N-methyl-D-aspartate-dependent pain facilitatory systems. *Neuroscience* 84, 583-589.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53, 597-652.
- Lee, M., Silverman, S.M., Hansen, H., Patel, V.B., Manchikanti, L., 2011. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician* 14, 145-161.
- Leem, Y.H., Lee, Y.I., Son, H.J., Lee, S.H., 2011. Chronic exercise ameliorates the neuroinflammation in mice carrying NSE/htau23. *Biochem Biophys Res Commun* 406, 359-365.
- Lewin, G.R., Mendell, L.M., 1993. Nerve growth factor and nociception. *Trends Neurosci* 16, 353-359.
- Li, X., Angst, M.S., Clark, J.D., 2001. Opioid-induced hyperalgesia and incisional pain. *Anesth Analg* 93, 204-209.
- Liang, D., Shi, X., Qiao, Y., Angst, M.S., Yeomans, D.C., Clark, J.D., 2008. Chronic morphine administration enhances nociceptive sensitivity and local cytokine production after incision. *Mol Pain* 4, 7.
- Liang, J., Zheng, X., Chen, J., Li, Y., Xing, X., Bai, Y., 2011. Roles of BDNF, dopamine D(3) receptors, and their interactions in the expression of morphine-induced context-specific locomotor sensitization. *Eur Neuropsychopharmacol* 21, 825-834.
- Lofgren, O., Yu, L.C., Theodorsson, E., Hansson, P., Lundeborg, T., 1997. Intrathecal CGRP(8-37) results in a bilateral increase in hindpaw withdrawal latency in rats with a unilateral thermal injury. *Neuropeptides* 31, 601-607.
- Lu, L., Dempsey, J., Liu, S.Y., Bossert, J.M., Shaham, Y., 2004. A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *J Neurosci* 24, 1604-1611.

- Lu, L.X., Yon, J.H., Carter, L.B., Jevtovic-Todorovic, V., 2006. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis* 11, 1603-1615.
- Ma, W., Ribeiro-da-Silva, A., Noel, G., Julien, J.P., Cuello, A.C., 1995. Ectopic substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactive fibres in the spinal cord of transgenic mice over-expressing nerve growth factor. *Eur J Neurosci* 7, 2021-2035.
- Mao, J., Mayer, D.J., 2001. Spinal cord neuroplasticity following repeated opioid exposure and its relation to pathological pain. *Ann N Y Acad Sci* 933, 175-184.
- Marsh, D.F., Hatch, D.J., Fitzgerald, M., 1997. Opioid systems and the newborn. *Br J Anaesth* 79, 787-795.
- Maughan R, G.M., Greenhaff P.L., 2000. *Bioquímica do Exercício e do Treinamento*. São Paulo:Manole.
- Meng, M., Zhao, X., Dang, Y., Ma, J., Li, L., Gu, S., 2013. Region-specific expression of brain-derived neurotrophic factor splice variants in morphine conditioned place preference in mice. *Brain Res* 1519, 53-62.
- Mika, J., 2008. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacol Rep* 60, 297-307.
- Molteni, R., Zheng, J.Q., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., Twiss, J.L., 2004. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8473-8478.
- Monibi, F.A., Dodam, J.R., Axiak-Bechtel, S.M., Amorim, J., Zhang, Y., Tsuruta, K., Mann, F.A., DeClue, A.E., 2015. Morphine and buprenorphine do not alter leukocyte cytokine production capacity, early apoptosis, or neutrophil phagocytic function in healthy dogs. *Res Vet Sci* 99, 70-76.
- Morgan, W.P., 1985. Affective beneficence of vigorous physical activity. *Med Sci Sports Exerc* 17, 94-100.
- Neeper, S.A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J., Cotman, C., 1995. Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 373, 109.
- Northoff, H., Berg, A., 1991. Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise. *Int J Sports Med* 12 Suppl 1, S9-15.
- O'Connor, P.J., Cook, D.B., 1999. Exercise and pain: the neurobiology, measurement, and laboratory study of pain in relation to exercise in humans. *Exerc Sport Sci Rev* 27, 119-166.
- Ossipov, M.H., Lai, J., King, T., Vanderah, T.W., Porreca, F., 2005. Underlying mechanisms of pronociceptive consequences of prolonged morphine exposure. *Biopolymers* 80, 319-324.
- 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, 36-44.
- Pertovaara, A., Kemppainen, P., 1992. Comments on Padawer and Levine, *PAIN*, 48 (1992) 132-135. *Pain, Netherlands*, pp. 239-240; author reply 242-233.
- Poo, M.M., 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2, 24-32.
- Raffa, R.B., Mathiasen, J.R., Kimball, E.S., Vaught, J.L., 1993. The combined immunological and antinociceptive defects of beige-J mice: the possible existence of a 'mu-repressin'. *Life Sci* 52, 1-8.
- Raghavendra, V., Rutkowski, M.D., DeLeo, J.A., 2002. The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *J Neurosci* 22, 9980-9989.
- Rahman, W., Dashwood, M.R., Fitzgerald, M., Aynsley-Green, A., Dickenson, A.H., 1998. Postnatal development of multiple opioid receptors in the spinal cord and development of spinal morphine analgesia. *Brain Res Dev Brain Res* 108, 239-254.

- Randall, L.O., Selitto, J.J., 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111, 409-419.
- Robinson, T.E., Kolb, B., 2004. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 33-46.
- Rohde, D.S., McKay, W.R., Abbadie, C., Basbaum, A.I., 1997. Contribution of sacral spinal cord neurons to the autonomic and somatic consequences of withdrawal from morphine in the rat. *Brain Res* 745, 83-95.
- Rozisky, J.R., da Silva, R.S., Adachi, L.S., Capiotti, K.M., Ramos, D.B., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Sarkis, J.J., Torres, I.L., 2010. Neonatal morphine exposure alters E-NTPDase activity and gene expression pattern in spinal cord and cerebral cortex of rats. *Eur J Pharmacol* 642, 72-76.
- Rozisky, J.R., Dantas, G., Adachi, L.S., Alves, V.S., Ferreira, M.B., Sarkis, J.J., Torres, I.L., 2008. Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life. *Int J Dev Neurosci* 26, 561-565.
- Rozisky, J.R., Laste, G., de Macedo, I.C., Santos, V.S., Krolow, R., Noschang, C., Vanzella, C., Bertoldi, K., Lovatel, G.A., de Souza, I.C., Siqueira, I.R., Dalmaz, C., Caumo, W., Torres, I.L., 2013. Neonatal morphine administration leads to changes in hippocampal BDNF levels and antioxidant enzyme activity in the adult life of rats. *Neurochem Res* 38, 494-503.
- Rozisky, J.R., Laste, G., Medeiros, L.F., Santos, V.S.d., Adachi, L.S., Macedo, I.C.d., Caumo, W., Torres, I.L.S., 2016. Morphine Treatment in Neonate Rats Increases Exploratory Activities: Reversal by Antagonist D2 Receptor. *British Journal of Medicine & Medical Research* 4, 351-367.
- Rozisky, J.R., Medeiros, L.F., Adachi, L.S., Espinosa, J., de Souza, A., Neto, A.S., Bonan, C.D., Caumo, W., Torres, I.L., 2011. Morphine exposure in early life increases nociceptive behavior in a rat formalin tonic pain model in adult life. *Brain Res* 1367, 122-129.
- Rozisky, J.R., Vendite, D., Fontella, F.U., Nonose, Y., Laste, G., Dalmaz, C., Caumo, W., Torres, I.L., 2012. Morphine treatment in early life alters glutamate uptake in the spinal synaptosomes of adult rats. *Neurosci Lett* 529, 51-54.
- Russo, S.J., Mazei-Robison, M.S., Ales, J.L., Nestler, E.J., 2009. Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1, 73-82.
- Russo-Neustadt, A., Ha, T., Ramirez, R., Kesslak, J.P., 2001. Physical activity-antidepressant treatment combination: impact on brain-derived neurotrophic factor and behavior in an animal model. *Behav Brain Res* 120, 87-95.
- Shokraviyan, M., Miladi-Gorji, H., Vaezi, G.H., 2014. Voluntary and forced exercises prevent the development of tolerance to analgesic effects of morphine in rats. *Iran J Basic Med Sci* 17, 271-277.
- Silverman, S.M., 2009. Opioid induced hyperalgesia: clinical implications for the pain practitioner. *Pain Physician* 12, 679-684.
- Song, P., Zhao, Z.Q., 2001. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosci Res* 39, 281-286.
- Soya, H., Nakamura, T., Deocaris, C.C., Kimpara, A., Iimura, M., Fujikawa, T., Chang, H., McEwen, B.S., Nishijima, T., 2007. BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun, United States*, pp. 961-967.
- Stagg, N.J., Mata, H.P., Ibrahim, M.M., Henriksen, E.J., Porreca, F., Vanderah, T.W., Philip Malan, T., Jr., 2011. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. *Anesthesiology* 114, 940-948.

- Stanwood, G.D., Levitt, P., 2004. Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. *Curr Opin Pharmacol* 4, 65-71.
- Steinmetz, K.A., Potter, J.D., 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 96, 1027-1039.
- Sweitzer, S.M., Allen, C.P., Zissen, M.H., Kendig, J.J., 2004. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia upon acute opioid withdrawal in the neonatal rat. *Pain* 110, 269-280.
- Tancredi, V., D'Antuono, M., Cafe, C., Giovedi, S., Bue, M.C., D'Arcangelo, G., Onofri, F., Benfenati, F., 2000. The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK. *J Neurochem* 75, 634-643.
- Thomas, M.J., Kalivas, P.W., Shaham, Y., 2008. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol* 154, 327-342.
- Torres, I.L., Buffon, A., Dantas, G., Furstenau, C.R., Bohmer, A.E., Battastini, A.M., Sarkis, J.J., Dalmaz, C., Ferreira, M.B., 2002a. Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 74, 181-186.
- Torres, I.L., Buffon, A., Silveira, P.P., Duarte, M.Z., Bassani, M.G., Oliveira, S.S., Battastini, A.M., Sarkis, J.J., Dalmaz, C., Ferreira, M.B., 2002b. Effect of chronic and acute stress on ectonucleotidase activities in spinal cord. *Physiol Behav* 75, 1-5.
- van Rijn, C.M., Krijnen, H., Menting-Hermeling, S., Coenen, A.M., 2011. Decapitation in rats: latency to unconsciousness and the 'wave of death'. *PLoS One* 6, e16514.
- Vanderah, T.W., Suenaga, N.M., Ossipov, M.H., Malan, T.P., Jr., Lai, J., Porreca, F., 2001. Tonic descending facilitation from the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced abnormal pain and antinociceptive tolerance. *J Neurosci* 21, 279-286.
- Vaynman, S., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2003. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience* 122, 647-657.
- Verge, D., Daval, G., Patey, A., Gozlan, H., el Mestikawy, S., Hamon, M., 1985. Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT<sub>1A</sub> subtype. *Eur J Pharmacol* 113, 463-464.
- Viveros, O.H., Diliberto, E.J., Jr., Hazum, E., Chang, K.J., 1979. Opiate-like materials in the adrenal medulla: evidence for storage and secretion with catecholamines. *Mol Pharmacol* 16, 1101-1108.
- Wimalawansa, S.J., 1996. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev* 17, 533-585.
- WOOLFE, G., MACDONALD, A.D., 1944. THE EVALUATION OF THE ANALGESIC ACTION OF PETHIDINE HYDROCHLORIDE (DEMEROL).
- Wright, A., Sluka, K.A., 2001. Nonpharmacological treatments for musculoskeletal pain. *Clin J Pain* 17, 33-46.
- Yakeu, G., Butcher, L., Isa, S., Webb, R., Roberts, A.W., Thomas, A.W., Backx, K., James, P.E., Morris, K., 2010. Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: Roles of PPAR $\gamma$  and Th2 cytokines. *Atherosclerosis* 212, 668-673.
- Yaksh, T.L., Harty, G.J., Onofrio, B.M., 1986. High dose of spinal morphine produce a nonopiate receptor-mediated hyperesthesia: clinical and theoretic implications. *Anesthesiology* 64, 590-597.
- Zaringhalam, J., Hormozi, A., Tekieh, E., Razavi, J., Khanmohammad, R., Golabi, S., 2014. Serum IL-10 involved in morphine tolerance development during adjuvant-induced arthritis. *J Physiol Biochem* 70, 497-507.

Zhang, H.N., Ko, M.C., 2009. Seizure activity involved in the up-regulation of BDNF mRNA expression by activation of central mu opioid receptors. *Neuroscience* 161, 301-310.