



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

Matheus Gabriel de Freitas Nascimento

**INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA HIPERALGESIA  
INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO NEONATAL À MORFINA EM RATOS**

Porto Alegre

2023

Matheus Gabriel de Freitas Nascimento

**INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA HIPERALGESIA  
INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO NEONATAL À MORFINA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Iraci L.S. Torres  
Coorientador: Prof. Dr. Dirson João Stein

Porto Alegre

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Nascimento, Matheus Gabriel de Freitas  
INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA  
HIPERALGESIA INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO NEONATAL À  
MORFINA EM RATOS / Matheus Gabriel de Freitas  
Nascimento. -- 2023.

81 f.

Orientadora: Iraci Lucena da Silva Torres.

Coorientador: Dirson João Stein.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências  
Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica,  
Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. enriquecimento ambiental. 2. morfina. 3.  
dor. 4. hiperalgesia. 5. ratos neonatos. I. Torres,  
Iraci Lucena da Silva, orient. II. Stein, Dirson João,  
coorient. III. Título.

Matheus Gabriel de Freitas Nascimento

**INFLUÊNCIA DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NA HIPERALGESIA  
INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO NEONATAL À MORFINA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em  
Farmacologia e Terapêutica.

Aprovado em: 05 de outubro de 2023

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dra. Bibiana Verlindo de Araujo – PPGFT/UFRGS

Prof. Dra. Mirna Bairy Leal – PPGFT/UFRGS

Prof. Dr. Leonardo Monteiro Botelho – HCPA

**Membro Suplente**

Prof. Dra. Adriane Ribeiro Rosa – PPGFT/UFRGS

## AGRADECIMENTOS

À Deus, autor da vida, por me conceder essa oportunidade e por ter me dado sabedoria e paciência para concluir mais uma etapa da minha carreira profissional;

Aos meus pais, Rosemberg da Silva Nascimento e Maria Aparecida de Freitas Nascimento por sempre acreditarem no meu potencial e me apoiarem nas minhas conquistas da vida;

À minha esposa Maria Eduarda Leal do Nascimento Cruz Freitas, por encarar o desafio de sair do nosso estado natal para encarar novos desafios no Rio Grande do Sul e por também, me apoiar em meus sonhos trilhar a vida comigo;

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iraci Lucena da Silva Torres pela paciência, confiança e dedicação ao longo dessa jornada;

Ao meu coorientador Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Dirson João Stein por toda paciência e disponibilidade para me auxiliar durante a pesquisa;

Aos integrantes do Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-clínicas pelo convívio e contribuições ao longo dessa jornada;

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – GPPG/HCPA, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto (2022-0185);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado durante minha formação;

À agência de fomento FIPE-HCPA, pelo apoio financeiro viabilizando pesquisas de qualidade na ciência brasileira;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica pela oportunidade de realizar mestrado em uma instituição referência no Brasil e no mundo.

À Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo suporte e apoio durante a fase experimental do projeto;

Por fim, a todos que contribuíram até aqui para a realização dessa conquista!

*“O medo se vai,  
quando ouço a voz do alto me dizer:  
sê valente, sê valente”*

**Marcos Almeida**

## RESUMO

O uso de analgésicos para sedação e analgesia em UTIs pediátricas é uma prática frequente, e a morfina é um dos fármacos mais utilizados. Com isso, a utilização precoce de opioides e a exposição a estímulos estressantes na infância estão relacionados a alterações no desenvolvimento neural. Contudo, podem aumentar a vulnerabilidade a psicopatologias na vida adulta e deste modo, desencadear prejuízos cognitivos, emocionais e sociais, além das alterações neuroquímicas. Neste contexto, estímulos externos positivos como enriquecimento ambiental (EA) podem ser uma estratégia de tratamento e seu potencial neuro protetor tem sido sugerido. Este trabalho teve como objetivo avaliar, em médio (P30) e longo prazo (P60), os efeitos do EA precoce em possíveis alterações neuro motores, nociceptivas, cognitivas, comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração repetida de morfina em ratos no período neonatal. Os reflexos neuromotores foram avaliados por meio dos testes de geotaxia negativa e reflexo do endireitamento. A resposta nociceptiva foi avaliada por meio dos testes da placa quente e do Tail-flick, e a memória de longo prazo pelo teste de reconhecimento de objetos. A atividade exploratória e locomotora e o comportamento do tipo ansioso foram avaliados, respectivamente, por meio dos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado (LCE). Adicionalmente, foram analisados níveis de BDNF e TNF- $\alpha$ , em hipocampo, hipotálamo, tronco encefálico e medula espinhal. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O programa SPSS 29.0 foi utilizado para todas as análises estatísticas. Esse projeto foi avaliado e aprovado pela CEUA-HCPA (#2022-0185). Os resultados demonstraram que filhotes expostos a administração precoce de morfina e a um ambiente enriquecido não apresentam alterações significativas no seu desenvolvimento neuro motor. Animais de 30 dias apresentaram: 1. Hiperalgia induzida pela morfina (Tail-flick) e pelo EA (placa quente); 2. maior índice de reconhecimento; comportamento do tipo ansioso que foi revertido pelo EA. Animais de 60 dias apresentaram: 1. Analgesia induzida pelo EA; 2. comportamento do tipo ansioso induzido pela morfina que foi revertido pelo EA. Todos os parâmetros neuroquímicos foram modulados pela idade e os níveis de BDNF em hipocampo e tronco encefálico foram aumentados pelo EA. É importante salientar a necessidade do desenvolvimento de estudos pré-clínicos que contribuam para uma melhor compreensão dos efeitos do tratamento com morfina no período neonatal ao longo da vida possibilitando, desta forma, a busca de terapias que possam prevenir ou reverter estes efeitos, como o EA.

**Palavras-Chave:** dor, ratos neonatos, morfina, enriquecimento ambiental, hiperalgia.

## ABSTRACT

The use of analgesics for sedation and analgesia in pediatric intensive care units is a common practice, with morphine being one of the most frequently employed drugs. Consequently, early opioid administration and exposure to stressful stimuli during childhood have been associated with alterations in neural development. However, they may also increase vulnerability to psychopathologies in adulthood, potentially leading to cognitive, emotional, and social impairments, in addition to neurochemical changes. In this context, positive external stimuli such as environmental enrichment (EE) may serve as a treatment strategy, and their neuroprotective potential has been proposed. The present study aimed to evaluate, in the medium (P30) and long term (P60), the effects of early EA on possible neuromotor, nociceptive, cognitive, behavioral, and neurochemical changes induced by repeated administration of morphine in rats in the neonatal period. Neuromotor reflexes were evaluated through the negative geotaxis and the righting reflex tests. Nociceptive response was assessed using the Hot Plate and the Tail-flick tests, while long-term memory was evaluated using the object recognition test. Exploratory and locomotor activity, as well as anxious-like behavior, were respectively evaluated through the open field (OF) and elevated plus maze tests (EPM). Additionally, levels of BDNF and TNF- $\alpha$  were analyzed in the hippocampus, hypothalamus, brainstem, and spinal cord. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were conducted using the SPSS 29.0 software. This project was evaluated and approved by the HCPA/CEUA (#2022-0185). Results indicated that neonates exposed to early morphine administration and an EE did not exhibit significant alterations in their neuromotor development. 30-day-old animals presented: 1. Hyperalgesia induced by morphine (Tail-flick), and EE (Hot Plate); 2. higher object recognition index; anxiety-like behavior that was reversed by EE. 60-day-old animals presented: 1. Analgesia induced by EE; 2. morphine-induced anxiety-like behavior that was reversed by EE. All neurochemical parameters were modulated by age, while BDNF levels in the hippocampus and brainstem were increased by EE. It is important to emphasize the need for the development of preclinical studies that contribute to a better understanding of the effects of neonatal morphine treatment throughout life, thereby enabling the search for therapies that can prevent or reverse these effects, such as EE.

**Keywords:** pain, neonatal rats, morphine, environmental enrichment, hyperalgesia.

## **LISTA DE FIGURAS**

|   |   |
|---|---|
| Figura 1 - Desenho esquemático do EA mostrando as regiões encefálicas influenciadas por cada um dos componentes encontrados no ambiente ..... | 5 |
|---|---|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>ANVISA</b>                  | Agência nacional de vigilância sanitária |
| <b>ANOVA</b>                   | Análise de variância                     |
| <b>BDNF</b>                    | Fator neurotrófico derivado do cérebro   |
| <b>CEUA</b>                    | Comissão de ética no uso de animais      |
| <b>EA</b>                      | Enriquecimento ambiental                 |
| <b>EBA</b>                     | Entrada nos braços abertos               |
| <b>EBF</b>                     | Entrada nos braços fechados              |
| <b>EPM</b>                     | Erro padrão da média                     |
| <b>GPPG</b>                    | Grupo de pesquisa e pós-graduação        |
| <b>IL-10</b>                   | Interleucina 10                          |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | Interleucina 1 beta                      |
| <b>IL-6</b>                    | Interleucina 6                           |
| <b>NMDA</b>                    | N-metil-d-aspartato                      |
| <b>NGF</b>                     | Fator de crescimento nervoso             |
| <b>RNs</b>                     | Recém-nascidos                           |
| <b>SN</b>                      | Sistema nervoso                          |
| <b>SNC</b>                     | Sistema nervoso central                  |
| <b>SNP</b>                     | Sistema nervoso periférico               |
| <b>TBA</b>                     | Tempo nos braços abertos                 |
| <b>TBF</b>                     | Tempo nos braços fechados                |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Fator de necrose tumoral alfa            |
| <b>UTINs</b>                   | Unidades de terapia intensiva neonatal   |
| <b>UTIs</b>                    | Unidades de terapia intensiva            |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|             |                  |
|-------------|------------------|
| <b>%</b>    | porcentagem      |
| <b>≥</b>    | maior ou igual a |
| <b>&lt;</b> | menor que        |
| <b>β</b>    | beta             |
| <b>α</b>    | alfa             |
| <b>γ</b>    | gama             |
| <b>κ</b>    | kappa            |
| <b>μ</b>    | micro            |
| <b>μ</b>    | receptor mu      |
| <b>g</b>    | grama            |
| <b>kg</b>   | kilo             |
| <b>L</b>    | litro            |
| <b>ml</b>   | mililitro        |
| <b>mg</b>   | miligrama        |

## SUMÁRIO

|           |                                  |           |
|-----------|----------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>          | <b>14</b> |
| <b>2.</b> | <b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b> | <b>16</b> |
| 2.1       | Dor e Nocicepção .....           | 16        |
| 2.2       | Sistema Opioide .....            | 16        |
| 2.3       | Morfina em neonates .....        | 18        |
| 2.4       | Enriquecimento Ambiental .....   | 21        |
| 2.5       | Biomarcadores .....              | 23        |
| <b>3.</b> | <b>JUSTIFICATIVA .....</b>       | <b>26</b> |
| <b>4.</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>           | <b>27</b> |
| 4.1       | Objetivo Geral .....             | 27        |
| 4.2       | Objetivos Específicos .....      | 27        |
| <b>5.</b> | <b>ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>   | <b>28</b> |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>   | <b>66</b> |
|           | <b>REFERÊNCIAS .....</b>         | <b>67</b> |
|           | <b>ANEXO A .....</b>             | <b>77</b> |
|           | <b>ANEXO B .....</b>             | <b>78</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A prematuridade se refere a todo recém-nascido vivo com menos de 37 semanas completas de gestação, em humanos. Em termos epidemiológicos e clínicos, prematuro é um feto nascido antes do tempo normal de gestação devido a fatores diversos e muitas vezes imprevisíveis, podendo ocorrer em diversos lugares, grupos, independente da classe social (SALGE et al., 2009; RAMOS, 2009).

Com o nascimento de um recém-nascido prematuro (RNPT), a instituição de saúde necessita de um local que possua recursos tecnológicos, humanos e terapêuticos especializados, a fim de proporcionar cuidados mais complexos. Esses suportes são encontrados nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), onde a assistência ocorre de maneira contínua, e cujo surgimento tem proporcionado um aumento na sobrevida dos prematuros (AGUIAR et al., 2010).

Entretanto, a hospitalização em UTIN está associada a uma série de procedimentos como punções venosas, sondas nasogástricas e vesicais, verificação da glicemia capilar, curativos, aspiração de vias aéreas, entubação endotraqueal, entre outros, o que pode gerar desconforto, estresse e dor ao RNPT. Este, ao ser internado, é exposto a um ambiente novo, totalmente diferente do útero materno (AGUIAR et al., 2010), além de ser submetido a cerca de 130 a 250 manipulações nas primeiras 24 horas de vida, com diferentes níveis de intensidade, sendo que muitas dessas são consideradas dolorosas. Até meados do século 20 havia a crença de que o RNPT era incapaz de sentir dor, devido à imaturidade do sistema nervoso central (SNC), à ausência da bainha de mielina e de memória para dor (BIEDA, 2007). Desta forma, RNs hospitalizados foram por muitos anos submetidos a procedimentos invasivos e dolorosos, incluindo cirúrgicos, sem uso de qualquer anestésico (JORGENSEN, 1999).

Ao longo dos anos, foi verificado que a dor é independente da mielinização das fibras nervosas e que o sistema nervoso do recém-nascido (RN) está maduro o suficiente para transmitir o estímulo doloroso. Entretanto, somente a partir de 1990 a dor passou a ser alvo de investigação e pesquisa na assistência ao RN, seja ele a termo ou pré-termo (GASPARY e ROCHA, 2004). Vários estudos têm demonstrado que os circuitos sensoriais nos RN são mais excitáveis e que as vias inibitórias vão ser completamente desenvolvidas após o nascimento, o que aumenta a vulnerabilidade dos neonatos à dor em comparação com os adultos (NANDI; FITZGERALD, 2005). Os neonatos que não recebem analgesia adequada podem apresentar consequências significativas em curto e longo prazo como estresse psicológico e metabólico e

respostas alteradas a estímulos nocivos, como hiperalgesia e alodinia (NANDI; FITZGERALD, 2005, VENEZIANO e TOBIAS, 2017).

Além disso, evidências indicam que experiências sensoriais precoces podem aumentar a vulnerabilidade a transtornos neuropsiquiátricos na vida adulta e, conseqüentemente, a prejuízos cognitivos, emocionais e sociais, além das alterações neuroquímicas. Considerando a relevância do tema, estudos são necessários para melhor elucidar as bases neurobiológicas envolvidas nos processos decorrentes de exposição neonatal a fármacos e estresse, possibilitando um melhor entendimento da farmacologia neonatal em relação a dor e sedação, buscando maximizar os efeitos benéficos e diminuir os riscos dos tratamentos (DONATO et al, 2019).

No que diz respeito aos processos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, os neonatos apresentam particularidades que devem ser consideradas na prescrição (ZHU et al., 2017). Estudos em modelos animais mostram que, no primeiro dia pós-natal (P1), os receptores opioides já estão amplamente distribuídos no SNC, com a predominância de receptores  $\mu$  ( $\mu$ ) e  $\kappa$  ( $\kappa$ ). No sétimo dia pós-natal (P7) ocorre o pico de densidade do receptor  $\mu$ , declinando gradualmente até a terceira semana de vida, quando então atinge os níveis do adulto (BELAND & FITZGERALD, 2001; KAR & QUIRION, 1995).

Com isso, tem sido sugerido que a capacidade analgésica da morfina é maior no neonato e diminui com a idade (NANDI & FITZGERALD, 2005, ROZISKY et al., 2008). Também foi demonstrado que alterações provocadas pela morfina durante o período pré-natal podem ter impacto sobre processos de plasticidade sináptica ao longo do desenvolvimento (SCHROTT et al., 2008).

Por outro lado, apesar da sua inegável eficácia analgésica, há evidências de que os opioides podem, paradoxalmente, induzir hiperalgesia (ANGST & CLARK, 2006). Hiperalgesia induzida por opioide (HIO) é um estado de sensibilização nociceptiva induzida pela exposição a opioides, afetando negativamente o tratamento da dor (ANGST & CLARK, 2006; CHU et al., 2008). A condição para seu desenvolvimento é o uso agudo ou crônico de opioide, em altas doses e por longos períodos de tratamento (ANGST & CLARK, 2006; CHU et al., 2008; DUPEN et al, 2007; GUIGNARD et al., 2000). Entretanto, também pode ocorrer em administração de fármacos por um curto período (DUPEN et al, 2007; SCHMIDT et al., 2007).

Na HIO, há uma redução da curva dose/efeito analgésico que diminui ao longo do tempo com uma dose específica de opioide, mas não melhora com o aumento da dose, podendo

se tornar mais intensa que a dor inicial (ANGST & CLARK, 2006; CHU et al., 2008; DUPEN et al., 2007). Com isso, a estratégia mais usada para evitar a hiperalgesia do opioide é o uso concomitante de outros analgésicos, além de associação a tratamentos não farmacológicos (DUPEN et al., 2007; MAO, 2002).

Como forma de tratamento não farmacológico, muitos estudos relatam a utilização do Enriquecimento Ambiental (EA), um modelo experimental utilizado para estudar eventos relacionados à neuroplasticidade em diferentes regiões encefálicas, de diversas espécies de animais de laboratório, como ratos, camundongos, entre outros, em diferentes idades, como neonatos oriundos de fêmeas criadas em ambiente enriquecido (SALLE et al., 2007; KAZL et al., 2009) e animais idosos (ARNAIZ et al., 2004). O EA tem como característica proporcionar aos animais um aumento da interação social, dos estímulos visuais e sensoriais, por meio de enriquecimento do ambiente da gaiola utilizando escadas, túneis, rampas, cordas e uma variedade de brinquedos e objetos de diversas formas e cores para estimular diversas regiões encefálicas (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006; OLIVEIRA et al, 2017; DURÁN-CARABALI et al., 2019a; DURÁN-CARABALI et al., 2019b)

Prévios estudos demonstraram que ratos expostos ao EA apresentam uma recuperação mais rápida da inflamação em articulações (GABRIEL et al., 2009; GABRIEL et al., 2010), e menor hipersensibilidade (TALL, 2009, OLIVEIRA et al., 2020). O EA também melhora a disfunção sensorial e motora em ratos após a lesão da medula espinhal (BERROCAL et al., 2007), reduz a necessidade de analgesia pós-operatória em camundongos (PHAM et al., 2010) e aumenta a potência analgésica da fármacos opioides (SMITH et al., 2004; 2005).

Considerando o exposto acima, esta dissertação buscou avaliar sistemas envolvidos nos mecanismos de dor do neonato, que contribuam para o melhor entendimento de sua resposta farmacológica, bem como testar os efeitos benéficos do EA como recurso não farmacológico de neuroproteção em animais submetidos à administração repetida de morfina no período neonatal. Além disso, é de suma importância direcionar a busca de esclarecimentos na linha de pesquisa em ratos neonatos para o preenchimento de lacunas de conhecimento que surgiram a partir de estudos previamente realizados utilizando a exposição repetida a morfina no período neonatal (ROZISKY et al., 2008, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2017, NUNES et al, 2016, 2020, OLIVEIRA et al, 2017, 2020).

Com base nestes dados, o EA surge como uma opção terapêutica não farmacológica (OLIVEIRA et al, 2017, 2020) para a minimização dos efeitos da hiperalgesia induzida por opioides, representando assim, uma alternativa promissora.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Dor e Nocicepção

Neonatos prematuros, bem como indivíduos de menor idade, são frequentemente submetidos a uma série de procedimentos dolorosos, tais como intubação, acesso venoso, coleta para exames por punção arterial, punção lombar, aspiração de tubo orotraqueal, ventilação mecânica, drenagem de tórax e punção de calcanhar (ANAND *et al.*, 2006). Na prática clínica, prematuros em UTINs são rotineiramente expostos a uma média de oito a dez terapias ou procedimentos invasivos por dia, sem uso de analgésicos (CARBAJAL *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2016). Os RNs não podem relatar dor ou desconforto da mesma maneira que crianças de maior idade ou adultos conseguem descrever a intensidade da sua dor (ANAND *et al.*, 2006). Por conseguinte, muitos dos instrumentos de estudo padrão usados para medir a eficácia da analgesia ou definir as metas de sedação ou analgesia não podem ser aplicados nesta população (BUTTNER & FINKE, 2000).

O processo nociceptivo envolve alterações neurobiológicas sequenciais induzidas pela ativação de nociceptores periféricos com consequente modulação central (BASBAUM & JESSEN, 2000). Entretanto, se a dor no neonato for de longa duração ou recorrente, o desenvolvimento do sistema nociceptivo pode ser modificado de forma permanente, resultando em alterações em nível espinhal e supraespinhal (ANAND & SCALZO, 2000). Um número de estudos indica que tanto crianças quanto animais de menor faixa etária são capazes de responder a estímulos dolorosos indicativos de dor, uma vez que o processo de maturação das vias nociceptivas inicia na gestação e continua após o nascimento (FALCON *et al.*, 1996; GUINSBURG *et al.*, 2000; SIMONS *et al.*, 2003; EL SAYED *et al.*, 2007; DISHER *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2016).

Nos diversos estágios de desenvolvimento das vias de dor, diferentes sistemas de controle modulam, constantemente, tanto de maneira ascendente quanto descendente, a transmissão da informação nociceptiva (WOOLF, 2011). Assim, o processamento nociceptivo começa a ser traçado a partir da presença dos nociceptores próximos a epiderme e, gradualmente, descem para as camadas mais profundas de acordo com o desenvolvimento epitelial (ANAND & HICKEY, 1987; ANAND & CARR, 1989; FITZGERALD, 1991). Durante a 16ª semana de gestação, os receptores sensoriais cutâneos encontram-se presentes. Na 30ª semana de gestação, as vias nociceptivas talâmicas e espinhais encontram-se mielinizadas e as vias aferentes nociceptivas atingem o córtex entre a 20ª e 26ª semanas de

gestação (SIMONS & TIBBOEL, 2006). A partir da 26ª semana de gestação, o feto já apresenta considerável maturação das vias ascendentes periféricas em nível espinal e supraespinal.

Porém, a maturação das vias inibitórias descendentes ocorre somente após as vias ascendentes estarem pré-estabelecidas (BERDE & SETHNA, 2002). Um fato interessante é que ratos recém-nascidos apresentam maturação das vias nociceptivas semelhantes às de um feto humano de 24 semanas de gestação (MARSH *et al.*, 1997); com uma semana de vida, estas vias, no rato, se assemelham às de um humano recém-nascido a termo, e com 21 dias são semelhantes a uma criança de um ano de idade (FITZGERALD & ANAND, 1993).

Evidências sugerem que dores não tratadas em crianças e adolescentes podem desencadear alterações no perfil de resposta nociceptiva (CAUMO *et al.*, 2003; PETERS *et al.*, 2005). De maneira importante, as consequências da dor intensa ou persistente no prematuro ou neonato podem provocar alterações de comportamento como déficits cognitivos e comportamentais, bem como a percepção da dor, que podem persistir ao longo da vida (BHUTTA & ANAND, 2002).

Estudos prévios indicam que a exposição à morfina durante o período neonatal de ratos pode promover mudanças em vias de sinalização da dor que pode ser expressa como um aumento da resposta nociceptiva na vida adulta (SWEITZER *et al.*, 2004; ROZISKY *et al.*, 2008; 2011; 2012; DURÁN-CARABALI *et al.*, 2019b). Adicionalmente, outros estudos têm demonstrado os efeitos deletérios de longa duração resultantes da exposição repetida a procedimentos dolorosos em UTINs, como hiperalgesia (WHITFIELD & GRUNAU, 2000; GRUNAU *et al.*, 2001) e resposta alterada ao estresse (GRUNAU *et al.*, 2004).

É importante salientar que estudos com modelos animais possibilitaram uma melhor compreensão da neurofisiologia da dor no RN, demonstrando que neonatos não somente sentem dor como também são capazes de responder aos estímulos dolorosos e que esta exposição a estes estímulos pode levar a efeitos deletérios (RUDA *et al.*, 2000; BELAND & FITZGERALD, 2001; ROZISKY *et al.*, 2008; 2012, 2013; DURÁN-CARABALI *et al.*, 2018, 2019).

## 2.2 Sistema Opioide

Opioides endógenos modulam a experiência da dor, enquanto o uso terapêutico de opioides é fundamental para o manejo clínico de muitos quadros de dor aguda e crônica (MARVIZON *et al.*, 2010). Em doses terapêuticas os opioides produzem alívio seletivo da dor sem afetar a consciência. No entanto, os opioides não são eficazes em todos os tipos de dor e

podem resultar em efeitos adversos que impossibilitam seu uso (MARVIZON *et al.*, 2010). A analgesia opioide é decorrente de sua ação em diferentes níveis do SNC (ROCHA *et al.*, 2004). A estimulação de receptores opioides inibe a transmissão do estímulo nociceptivo aos centros superiores de processamento, assim os opioides inibem a aferência da dor em nível de medula espinhal e ativam vias descendentes inibitórias (PEREIRA *et al.*, 2007).

Desde P1 e ao longo do período neonatal de ratos, os receptores opioides encontram-se distribuídos no SNC, sendo que os receptores  $\mu$  e  $\kappa$  são os mais prevalentes. É importante salientar que o pico de ligação do receptor  $\mu$  ocorre no P7, e declina gradualmente até a terceira semana, quando atinge os níveis de adulto (BELAND & FITZGERALD, 2001; KAR & QUIRION, 1995). Dessa forma, alguns autores sugerem que a potência analgésica da morfina é maior no neonato e declina com o avanço da idade (NANDI & FITZGERALD, 2005; ROZISKY *et al.*, 2008). Receptores opioides estão amplamente expressos em várias estruturas do SNC e no sistema nervoso periférico (SNP) (BELAND & FITZGERALD, 2001; PEREIRA *et al.*, 2007).

As ações dos opioides dependem da afinidade pelo subtipo de receptor e da localização deles no SN. Os receptores  $\mu$  regulam os processos nociceptivos, o ciclo respiratório e o trânsito intestinal, estando localizados no córtex cerebral, no tálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa e trato gastrintestinal (DHAWAN *et al.*, 1996). A morfina é um agonista dos receptores opioides atuando por meio de sua ligação aos receptores do tipo  $\mu$ , classificados nos subtipos  $\mu_1$  e  $\mu_2$ , que estão distribuídos ao longo da medula espinhal (VALADÃO *et al.*, 2002). Assim, a morfina atua no mesencéfalo e na medula, ativando as vias nociceptivas descendentes, que modulam a nocicepção, e no sistema límbico, alterando os componentes emocionais da dor (RAHMAN & DICKENSON, 1999).

### 2.3 Morfina em Neonatos

Ao longo das últimas décadas, o uso de analgésicos opioides como a morfina aumentou em UTINs como consequência de mudanças e avanços na compreensão, identificação e tratamento da dor em crianças (SURESH & ANAND, 2001; EL SAYED *et al.*, 2007). É interessante notar que RNs criticamente doentes, muitas vezes necessitam de uso de fármacos opioides para analgesia e sedação (SURESH & ANAND, 2001; EL SAYED *et al.*, 2007). Neonatos são rotineiramente tratados com morfina para o alívio da dor, especialmente com exposição por longo prazo para sedação, para permitir ventilação mecânica nas UTIs pediátricas (ANAND *et al.*; 1999). A partir de estudos neurobiológicos do desenvolvimento das vias

nociceptivas, observou-se que os pacientes nesta faixa etária não só sentem dor, como apresentam diminuição no limiar de resposta a estímulo nocivo e inócuo em relação às crianças de maior idade e aos adultos (GRUNAU *et al.*, 1994; JOHNSTON *et al.*, 1996). Associado a isto, sabe-se que as primeiras experiências dolorosas podem ter consequências ao longo da vida nas respostas nociceptivas e a fármacos analgésicos (JOHNSTON *et al.*, 1996; GRUNAU *et al.*, 1994, 2004; RUDA *et al.*, 2000, ROZISKY *et al.*, 2008).

Devido a estas importantes descobertas e com o reconhecimento dos efeitos em longo prazo da dor subtratada em lactentes e crianças, tem ocorrido um aumento da utilização de analgésicos nessa população de pacientes (DE LIMA *et al.*, 1996; SURESH & ANAND, 2001, EL SAYED *et al.*, 2007).

Quando administrada em neonatos humanos, a morfina apresenta início de ação rápida, de aproximadamente 5 minutos, e o pico do efeito analgésico é de 15 minutos. Esta é metabolizada no fígado pela enzima uridina 5'-difosfato glucoroniltransferase em dois metabólitos: morfina-3-glucuronídeo (M3G) e morfina-6-glucuronídeo (M6G) e a eliminação é via urinária (GUINSBURG, 1999).

Dentre os efeitos adversos da morfina destacam-se depressão respiratória, náuseas e vômitos e retenção urinária, comuns a todos os opioides. A morfina desencadeia também liberação de histamina, a qual está relacionada a prurido e broncoespasmo, este último especialmente em neonatos portadores de doença pulmonar crônica. Além disso, tolerância e síndrome de abstinência podem ser observadas, dependendo do tempo de utilização do fármaco e da estratégia empregada para a sua suspensão (ARNOLD *et al.*, 1990; GUINSBURG, 1999). A tolerância é definida como alterações da resposta fisiológica ou celular à exposição repetida a opioides, levando a diminuição do efeito analgésico, e a dependência representa a manifestação dos sintomas que ocorrem após a retirada do opioide (RICHARDSON *et al.*, 2006).

Do mesmo modo, o tratamento com opioide durante o período neonatal também pode desencadear alterações comportamentais após a retirada do fármaco (síndrome de abstinência). Mais de 48% dos bebês e crianças que recebem doses terapêuticas de opioides intravenosos demonstram sintomas de retirada e dependência, tais como sinais disfóricos e aversivos, os quais têm sido também demonstrados por meio de modelos animais (FRANCK & VILARDI, 1995; 1998; TADDIO, 2002; PEREIRA *et al.*, 2007).

Entretanto, a eficácia analgésica da morfina na redução da dor em animais neonatos já têm sido demonstrada (NANDI & FITZGERALD, 2005; ROZISKY *et al.*, 2008, 2011, 2012,

2013, 2014; DURÁN-CARABALI *et al.*, 2018, 2019). Embora mecanismos inibitórios descendentes não sejam completamente formados até a terceira semana de vida (NANDI & FITZGERALD, 2005), morfina e outros agonistas dos receptores opioides são analgésicos eficazes durante o período neonatal, devido à presença de receptores opioides espinhais desde o nascimento (RAHMAN & DICKENSON, 1999).

É importante destacar que estudos em animais confirmam que a exposição de RNs a estímulos nocivos pode resultar em alterações comportamentais e nociceptivas na idade adulta (ANAND *et al.*, 1999; BHUTTA *et al.*, 2001; ANSELONI *et al.*, 2005, ROZISKY *et al.*, 2008, MEDEIROS, *et al.*, 2011). Corroborando estes dados, estudos prévios mostram que RNs expostos a agentes nocivos podem ter aumento ou diminuição da sensibilidade aos estímulos nociceptivos na idade adulta, dependendo do tipo e duração do estímulo (WANG *et al.*, 2004; HOHMANN *et al.*, 2005; RANDICH *et al.*, 2006). É provável que a natureza plástica do SN do neonato seja responsável por estes efeitos (RUDA *et al.* 2000; WALKER *et al.*, 2003; SAAB *et al.*, 2004).

Prévios estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que animais que receberam morfina no período neonatal, do P8 ao P14, apresentam maior tempo de analgesia no último do que no primeiro dia de tratamento (ROZISKY *et al.*, 2008; DURÁN-CARABALI *et al.*, 2018, 2019), portanto não desenvolveram tolerância ao opioide. Além disto, quando submetidos à exposição aguda à morfina na idade adulta, apresentaram maior tempo de analgesia do que os animais que não foram tratados previamente com morfina (ROZISKY *et al.*, 2008).

Possivelmente, a variação na expressão de receptor opioide e na sensibilidade aos agonistas explique as flutuações na susceptibilidade à analgesia e ao desenvolvimento de tolerância ao longo do desenvolvimento. Adicionalmente, em outro estudo do nosso grupo em que os animais foram submetidos à exposição repetida de morfina no início da vida, os animais apresentaram comportamento hipernociceptivo na vida adulta (ROZISKY *et al.*, 2011; DURÁN-CARABALI *et al.*, 2018, 2019). Interessante é que este aumento da resposta nociceptiva foi revertido por um antagonista do receptor de N-metil-d-aspartato (NMDA) (ROZISKY *et al.*, 2011; DURÁN-CARABALI *et al.*, 2018, 2019), o que sugere o envolvimento do sistema glutamatérgico na hiperalgesia destes animais. Nossos dados mostram ainda que a exposição precoce à morfina induziu aumento dos níveis de BDNF no hipocampo, associado à possível sensibilização central, em médio e longo prazo (ROZISKY *et al.*, 2013).

Sendo assim, estes estudos demonstram que a exposição neonatal a fármacos opioides pode induzir alterações neuroquímicas e comportamentais em longo prazo em roedores

(ROZISKY et al., 2008, 2010, 2011, 2012, 2013, NUNES et al., 2016, MEDEIROS et al., 2020, OLIVEIRA et al., 2017, 2020).

Interessantemente, fortes evidências apontam que em seres humanos, transtornos psiquiátricos apresentados na vida adulta, tais como ansiedade, depressão, medo e esquizofrenia, também têm sido citados como decorrentes de processos dolorosos na infância (REICHERT et al., 2000; CARBAJAL et al., 2008; MCGRATH, 2011; RODKEY & PILLAI RIDDELL, 2013; VICTORIA & MURPHY, 2016), uma vez que qualquer perturbação durante este período representa um risco para consequências negativas imediatas e de longo prazo. Adicionalmente, há um crescente número de estudos clínicos que fornecem evidências demonstrando a influência de fatores externos sobre a dor (TALL, 2009; GABRIEL et al., 2009; GABRIEL et al., 2010). De fato, a exposição a estímulos estressantes é um dos fatores ambientais relacionados a alterações no desenvolvimento neural (LAIET al., 2006; AISA et al., 2009). Desta forma, o ambiente é um fator determinante desde o nascimento até o início da vida adulta, quando o SN está mais suscetível às adaptações (FERNÁNDEZ-TERUEL et al., 2002; NUNES et al., 2003).

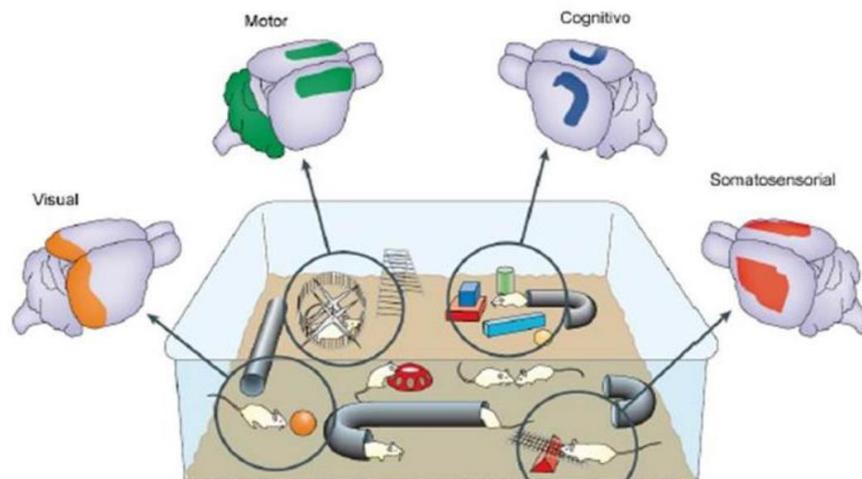
#### 2.4 Enriquecimento Ambiental

Experiências sensoriais no início da vida pós-natal podem afetar o desenvolvimento neural e o comportamento na vida adulta. É interessante notar que em mamíferos, incluindo roedores, intervenções nas fases iniciais da vida promovem alterações na emocionalidade bem como nas funções cognitivas que perduram ao longo da vida. Além disso, a exposição a estímulos estressantes está entre os fatores ambientais que podem interferir no desenvolvimento neural (LAI et al., 2006; AISA *et al.*, 2009).

É importante considerar que estudos em roedores têm demonstrado que a exposição a distintos estímulos durante as primeiras semanas de vida provoca alterações persistentes em uma ampla variedade de processos fisiológicos e comportamentais, os quais persistem na idade adulta (COLORADO *et al.*, 2006; KAZL *et al.*, 2009; VIVINETTO *et al.*, 2013; SCHUCH *et al.*, 2016). Nesse contexto, o ambiente é um fator determinante desde o nascimento até o início da vida adulta, quando o SN está mais suscetível às adaptações (FERNÁNDEZ-TERUEL *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2003; DURÁN-CARABALI et al., 2019a; DURÁN-CARABALI et al., 2019b). Dessa forma, essas alterações representam um considerável fator de risco para o desenvolvimento de doenças de ordem psiquiátrica e neurodegenerativa, como déficits de memória (BENETTI *et al.*, 2009; KIKUSUI *et al.*, 2009).

Por esta razão, estudos sobre EA investigam o impacto da condição do ambiente sobre as adaptações comportamentais, morfológicas e funcionais em diferentes modelos experimentais (SEGOVIA *et al.*, 2009).

O EA é um modelo experimental utilizado para estudar eventos relacionados à neuroplasticidade em diferentes regiões encefálicas, de diversas espécies de animais criados em laboratório, como ratos, camundongos, entre outros, em diferentes idades, desde neonatos de fêmeas criadas em ambiente enriquecido (SALLE *et al.*, 2007; KAZL *et al.*, 2009) até em animais idosos (ARNAIZ *et al.*, 2004). EA tem como característica proporcionar aos animais um aumento da interação social, dos estímulos visuais e sensoriais, além de possibilitar a realização de atividade física, estimulando, deste modo, diversas regiões encefálicas (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006; DURÁN-CARABALI *et al.*, 2019a; DURÁN-CARABALI *et al.*, 2019b) (Figura 1).



**Figura 1** - Desenho esquemático mostrando as regiões encefálicas influenciadas por cada um dos componentes encontrados no EA. Fonte: Adaptado de Nithianantharajah & Hannan, 2006.

Dentre as diferentes mudanças plásticas geradas pelo EA no SNC de distintas espécies, destacam-se: a neurogênese (VAN PRAAG *et al.*, 2000), o aumento nos níveis de neurotrofinas (ROSSI *et al.*, 2006), além do aumento na sobrevivência neuronal, na sinaptogênese e na proliferação celular (MOHAMMED *et al.*, 2002). Têm sido demonstrados que animais criados sob condições de ambiente enriquecido apresentam um aumento da massa cortical e dos níveis de neurotransmissores (NAKA *et al.*, 2002, O'SHEA *et al.*, 1983) e têm melhor desempenho em tarefas de aprendizagem e memória em comparação com ratos criados em caixas-moradia

padrão (KOBAYASHI *et al.*, 2002). No entanto, no que diz respeito aos efeitos de EA sobre a sensibilidade à dor e percepção, apenas um número limitado de estudos está disponível.

Estudos prévios mostraram que a qualidade do ambiente pode influenciar o desenvolvimento da dor relacionada à lesão e recuperação em roedores. Por exemplo, ratos expostos ao EA podem se recuperar mais rapidamente da inflamação nas articulações locais (GABRIEL *et al.*, 2009; GABRIEL *et al.*, 2010) e demonstrar menos hipersensibilidade (TALL, 2009). O EA também melhora a disfunção sensorial e motora em ratos após a lesão da medula espinhal (BERROCALET *et al.*, 2007), reduz a administração de droga analgésica em camundongos com dor pós-operatória (PHAM *et al.*, 2010), e aumenta a potência analgésica da droga opioide (SMITH *et al.*, 2004; 2005).

Cabe salientar que na prática clínica, a crescente utilização de intervenções não farmacológicas, como a terapia cognitivo-comportamental, grupos de apoio, meditação, yoga e fisioterapia, todas contêm aspectos de enriquecimento social e/ou físico (VACHON *et al.*, 2013; BUSHNELL *et al.*, 2013; 2015; SCHUCH *et al.*, 2016). No entanto, ainda pouco se discute sobre a extensão da janela terapêutica para a aplicação do EA, por exemplo, como recurso não farmacológico de neuroproteção em quadros de dor em neonatos. Sendo assim, considerando o aspecto translacional, o estudo de EA em modelos pré-clínicos tem importante relevância.

## 2.5 Biomarcadores

Biomarcadores podem ser usados como parâmetros para uma variedade de situações, como confirmação de um diagnóstico, relação causa-efeito e eficácia do tratamento. Em estudos clínicos utiliza-se marcadores periféricos enquanto estudos pré-clínicos possibilitam a avaliação de biomarcadores também em nível central. A dor pode ativar vários sistemas endógenos, incluindo os sistemas endócrino, autonômico e imunológico, com isso, muitos estudos buscam marcadores que possam estar relacionados aos processos de dor.

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

O BDNF é encontrado em altas concentrações no hipocampo e córtex cerebral, sendo considerada molécula-chave na manutenção da plasticidade sináptica e na sobrevivência das células neuronais (TROMBETTA *et al.*, 2020). Após se ligar ao receptor tirosina quinase B

(TrkB), controla a sobrevivência neuronal, estimula o crescimento neuronal e mantém a conectividade sináptica nos adultos (ZHANG & KO, 2009).

De acordo com vários estudos, a exposição à opioides altera os níveis de BDNF (SCHROTT et al, 2008). Estudos em modelos animais confirmaram que a exposição à morfina durante o período neonatal reduz os níveis de BDNF no hipocampo (SCHROTT et al., 2008; ROZISKY et al., 2013). Possivelmente as alterações provocadas pela morfina durante o período neonatal tenham impacto sobre processos de plasticidade sináptica ao longo do desenvolvimento (SCHROTT et al., 2008).

Adicionalmente, outros estudos demonstraram que o BDNF possui ação neuromoduladora na aprendizagem, na memória, na depressão (ALTAR et al., 1992) e na dependência de drogas (GRIMM et al., 2003; MCGOUGH et al., 2004; FILIP et al., 2006). É importante lembrar que intervenções nas relações mãe-filhote em roedores nas fases iniciais da vida causam mudanças emocionais e funções cognitivas que permanecem ao longo da vida. (FUMAGALLI et al., 2004; LIPPMANN et al., 2007). Interessantemente, há evidências de que o BDNF tem um papel significativo em processos de plasticidade sináptica (LI et al., 2005) e sensibilização locomotora (LIANG et al., 2011) após a retirada de opioides.

Está bem estabelecido que citocinas apresentem atividade no processo nociceptivo (ÜÇEYLER et al., 2009). Citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , apresentam efeitos principalmente algícos. No entanto, as anti-inflamatórias, como a IL-4, tem função analgésica (ÜÇEYLER et al., 2009). IL1 $\beta$ , bem como TNF- $\alpha$  são também liberadas pela glia e capazes de regular o desenvolvimento e plasticidade de circuitos neuronais (DEVERMAN & PATTERSON, 2009), incluindo as vias nociceptivas (SCHÄFERS & SORKIN, 2008; MCMAHON & MALCANGIO, 2009). Associado a isto, prévios estudos em animais indicam que a morfina pode afetar as funções imunológicas (BÖRNER et al., 2009; MADERA-SALCEDO et al., 2011). Um estudo demonstrou que a morfina exerce a ativação de células da glia, com o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (HUTCHINSON et al., 2011).

Prévios estudos demonstraram o papel da glia no desenvolvimento da tolerância à morfina e da hiperalgesia causada pela retirada da morfina, especialmente quando associada às citocinas pró-inflamatórias. (SONG & ZHAO, 2001; RAGHAVENDRA et al., 2002). Além disso, há evidências que sugerem que a hiperalgesia induzida pelo TNF- $\alpha$  pode estar ligada à ativação de outros mediadores inflamatórios que causam hiperalgesia (SCHAFERS et al., 2003; WOOLF et al., 1997; SOMMER & KRESS, 2004).

### 3. JUSTIFICATIVA

Neonatos prematuros e a termo, assim como crianças maiores, são frequentemente expostos a estímulos nocivos, como vacinas, traumas e procedimentos médicos necessários. Ainda que o alívio da dor seja um princípio fundamental da medicina, a analgesia em pacientes que têm dificuldade em expressar suas emoções e sensações é frequentemente negligenciada (PATTINSON and FITZGERALD, 2004).

Analgésicos opioides, como a morfina, compõem a classe de fármacos mais eficazes no alívio da dor moderada a intensa. Além disso, há evidências de que as experiências sensoriais no início da vida podem aumentar a susceptibilidade a transtornos neuropsiquiátricos e prejuízos cognitivos na vida adulta, que podem ser decorrentes de alterações neuroquímicas.

Portanto, modelos experimentais como o aqui proposto são essenciais para estabelecer efeitos adversos de fármacos, alterações neuroquímicas e comportamentais causadas pela exposição a fármacos em animais neonatos, bem como os efeitos a curto e médio prazo decorrentes de sua aplicação, além de possibilitar a busca de alternativas farmacológicas e não farmacológicas que possam impedir ou minimizar estas alterações. Isso permite superar as limitações encontradas em estudos clínicos, especialmente com pacientes pediátricos. Com base nestes dados, o EA surge como uma opção terapêutica não farmacológica, para o tratamento da dor, representando uma alternativa promissora.

Considerando a importância deste tema, este projeto busca estudar sistemas envolvidos com mecanismos de dor, que contribuam para o melhor entendimento da resposta farmacológica, bem como testar os efeitos terapêuticos do EA como recurso não farmacológico de neuroproteção em animais submetidos à administração repetida de morfina no período neonatal.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar, em médio e longo prazo, os efeitos do EA precoce em possíveis alterações neuromotoras, nociceptivas, cognitivas, comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração repetida de morfina em ratos no período neonatal.

### 4.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da administração repetida de morfina no período neonatal sobre:

- Os padrões de reflexos iniciais nos filhotes por meio dos testes de Geotaxia Negativa e Reflexo de Endireitamento;
- A resposta hiperalgésica térmica por meio dos testes da Placa Quente e do Tail-flick;
- A atividade exploratória e locomotora por meio do teste do Campo Aberto;
- O comportamento do tipo ansioso por meio do teste do Labirinto em Cruz Elevado;
- A memória de longa duração por meio do teste de Reconhecimento de Objetos;
- Os níveis de BDNF e TNF- $\alpha$  em hipocampo, hipotálamo, tronco encefálico e medula espinhal.

## **5. ARTIGO CIENTÍFICO**

**SITUAÇÃO:** Em processo de revisão pela revista

**REVISTA:** International Journal of Developmental Neuroscience

**FATOR DE IMPACTO (2022):** 1.8

## **6. CONCLUSÕES GERAIS**

Em resumo, a exposição precoce à morfina pode afetar negativamente o desenvolvimento comportamental e induzir hiperalgesia em ratos neonatos. O enriquecimento ambiental surge como uma alternativa não farmacológica para mitigar os efeitos deletérios induzidos por administrações repetidas de morfina durante um período de alta neuroplasticidade. O enriquecimento ambiental apresentou diferenças significativas em diversas variáveis do nosso estudo, influenciando o desenvolvimento neuromotor. Portanto, estudos pré-clínicos envolvendo esse tipo de intervenção são de grande importância para elucidar o papel do enriquecimento ambiental e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento neonatal.

## REFERÊNCIAS

- AISA, B *et al.* Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. **Hippocampus**. v. 19, n. 12, p. 1222-1231. 2009
- ALTAR, C. A *et al.* Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 89, p. 11347-11351. 1992
- ANAND, K. J; CARR, D. B. The neuroanatomy, neurophysiology, and neurochemistry of pain, stress, and analgesia in newborns and children. **Pediatric Clinics of North America**. v. 36, n. 4, p. 795-822.1989
- ANAND, K. J. S.; HANSEN, D. D.; HICKEY, P. R. Hormonal—Metabolic Stress Responses in Neonates Undergoing Cardiac Surgery. **Anesthesiology**, v. 73, n. 4, p. 661–670, 1990.
- ANAND, K; SCALZO, F. M. Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? **Biology of the Neonate**. v. 77, p. 69-82. 2000
- ANAND, K. J. S. *et al.* Summary Proceedings From the Neonatal Pain-Control Group. **Pediatrics**, v. 117, n. Supplement 1, p. S9–S22, 2006.
- ANAND, K. J. S; HICKEY, P. R. Pain and its effects in the human neonate and fetus. **New England Journal of Medicine**. v. 317 p, 1321-1329. 1987
- ANGST, M. S.; CLARK, J. D. Opioid-induced Hyperalgesia: a quantitative systematic review. **Anesthesiology**, v. 104, n. 3, p. 570–587,2006
- ARNAIZ S. L *et al.* Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 25, p. 91-101. 2004
- AGUIAR, C. R. *et al.* O recém-nascido de muito baixo peso. **O recém-nascido de muito baixo peso**, p. 539–539, 2010.
- ARNOLD, J. H. *et al.* Tolerance and dependence in neonates sedated with fentanyl during extracorporeal membrane oxygenation. **Anesthesiology**. v. 73, n. 6, p. 1136-1140. 1990
- BANNWARTH, B; KOSTINE, M. Targeting nerve growth factor (NGF) for pain management: what does the future hold for NGF antagonists? **Drugs**. v. 74, n. 6, p. 619–626. 2014
- BELAND, B.; FITZGERALD, M. Mu- and delta-opioid receptors are downregulated in the largest diameter primary sensory neurons during postnatal development in rats. **Pain**, v. 90, n. 1, p. 143–150, 2001.
- BENETTI, F. Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats. **Developmental Psychobiology**. v. 49, n. 3, p. 258-264. 2009

- BERROCAL, Y *et al.* Social and environmental enrichment improves sensory and motor recovery after severe contusive spinal cord injury in the rat. **Journal of Neurotrauma**. v. 24, p. 1761-1772. 2007
- BERTAGNA *et al.* Involvement of the ventral, but not dorsal, hippocampus in anxiety-like behaviors in mice exposed to the elevated plus maze: participation of CRF1 receptor and PKA pathway. **Pharmacological Reports**. v. 73, n. 1, p. 57–72, 11 nov. 2020.
- BERDE, C. B; SETHNA, N.F. Drug therapy: analgesics for the treatment of pain in children. **New England Journal of Medicine**. v. 347, p. 1094-1103. 2002
- BENNET D. L. Neurotrophic factors: important regulators of nociceptive function. **Neuroscientist**. v. 7, n. 1p. 3-17. 2001
- BIEDA, A. Where Are the Data? Applying Evidence to Neonatal Care. **Nursing for Women's Health**, v. 11, n. 3, p. 316–318, jun. 2007.
- BÖRNER, C. Mechanisms of opioid-mediated inhibition of human T cell receptor signaling. **Journal of Immunology**. v. 183, p. 882-889. 2009
- BROWN, R. W. *et al.* Effects of Environmental Enrichment on Nicotine Sensitization in Rats Neonatally Treated with Quinpirole: Analyses of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and Implications towards Schizophrenia. **Developmental Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 64–72, 2018.
- BURGOS, H. *et al.* Early postnatal environmental enrichment restores neurochemical and functional plasticities of the cerebral cortex and improves learning performance in hidden-prenatally-malnourished young-adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 363, p. 182–190, 2019.
- BUTTNER, W; FINKE, W. Analysis of behavioral and physiological parameters for the assessment of postoperative analgesic demand in newborns, infants and young children: a comprehensive report on seven consecutive studies. **Pediatric Anaesthesia**. v. 10, p. 303-318. 2000
- BUSHNELL, M. C *et al.* Effect of environment on the long-term consequences of chronic pain. **The Journal of Pain**. v. 156, n. 1, p. 42-49. 2015
- BUSHNELL, M. C; CEKO, M; LOW, L. A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 14, n. 7, p. 502-511. 2013
- BHALLA, S; ANDURKAR, S. V; GULATI, A. Neurobiology of opioid withdrawal: Role of the endothelin system. **Life Sciences**. v. 15, n, 139, p. 34-42. 2016
- BHUTTA, A. T *et al.* Interactions of inflammatory pain and morphine in infant rats:long-term behavioral effects. **Physiology & Behavior**. v. 73, p. 51-58, 2001
- CARBAJAL, R. *et al.* Epidemiology and treatment of painful procedures in neonates in intensive care units. **The Journal of the American Medical Association** v. 300, p. 60-70. 2008

- CAHILL, C. M; DRAY, A; CODERRE, T. J. Intrathecal nerve growth factor restores opioid effectiveness in an animal model of neuropathic pain. **Neuropharmacology**. v. 45, p. 543-552. 2003
- CAUMO, W; FERREIRA, M. B. C. Perioperative anxiety: psychobiology and effects in postoperative recovery. **The Clinical Journal of Pain**. v. 15, n. 2, p. 87-101. 2003
- CHU, L. F.; ANGST, M. S.; CLARK, D. Opioid-induced Hyperalgesia in Humans. **The Clinical Journal of Pain**, v. 24, n. 6, p. 479–496, jul. 2008.
- CHEPPUDIRA, B. P. *et al.* Anti-nerve growth factor antibody attenuates chronic morphine treatment-induced tolerance in the rat. **BMC Anesthesiologia**. v.16, 2016
- DAVIES, A. M. *et al.* The role of neurotrophins during successive stages of sensory neuron development. **Progress in Growth Factor Research**. v. 5, n. 3, p. 263-289. 1994
- DE LIMA, J. *et al.* Infant and neonatal pain: anaesthetists' perceptions and prescribing patterns. **BMJ**. v. 313, p.787.1996
- DE LIMA, J. *et al.* Sensory hyperinnervation after neonatal skin wounding: effect of bupivacaine sciatic nerve block. **British Journal of Anaesthesia**. v. 83, p. 662–664. 1999
- DEVERMAN, B. E; PATTERSON, P. H. Cytokines and CNS development. **Neuron**. v. 64, p. 61-78. 2009
- DONATO, J.; RAO, K.; LEWIS, T. Pharmacology of Common Analgesic and Sedative Drugs Used in the Neonatal Intensive Care Unit. **Clinics in Perinatology**, v. 46, n. 4, p. 673–692, dez. 2019.
- DONCHEVA, N. *et al.* Study of antinociceptive effect of ketamine in acute and neuropathic pain models in rats. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 28, n. 5, p. 573–579, 2018
- DUPEN, A.; SHEN, D.; ERSEK, M. Mechanisms of Opioid-Induced Tolerance and Hyperalgesia. **Pain Management Nursing**, v. 8, n. 3, p. 113–121, set. 2007.
- DURÁN-CARABALI, L. E. *et al.* Preventive and therapeutic effects of environmental enrichment in Wistar rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 485–497, fev. 2019.
- DURÁN-CARABALI, L. E. *et al.* Enriched experience during pregnancy and lactation protects against motor impairments induced by neonatal hypoxia-ischemia. **Behavioural Brain Research**, v. 367, p. 189–193, 23 jul. 2019.
- EL SAYED, M. F *et al.* Safety profile of morphine following surgery in neonates. **Journal of Perinatology**. 27(7):p. 444-447. 2007
- FALCON, M *et al.* Development of thermal nociception in rats. **Pain**. v. 67, p. 203-208. 1996

FEATHER-SCHUSSLER, D. N.; FERGUSON, T. S. A battery of motor tests in a neonatal mouse model of cerebral palsy. **Journal of Visualized Experiments**, n. 117, 2016.

FITZGERALD, M; BEGGS, S. The neurobiology of pain: developmental aspects. **Neuroscientist**. v. 7, p. 246–257. 2001

FILIP, M *et al.* Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. **Brain Research**. v. 1071, p. 218-225. 2006

FRANCK, L; VILARDI, J. Assessment and management of opioid withdrawal in ill neonates. **Neonatal Network**. v. 14, n. 2, p. 39-48. 1995

FUMAGALLI, F *et al.* Corticostriatal brain-derived neurotrophic factor dysregulation in adult rats following prenatal stress. **European Journal of Neuroscience**. v. 20, n. 5, p. 1348-1354. 2004

GASPARY, L. V.; ROCHA, I. Intervenções não-farmacológicas para o alívio da dor em recém-nascidos prematuros (RNPT). **Nursing**, p. 47–50, 2004.

GABRIEL, A. F *et al.* Environmental housing affects the duration of mechanical allodynia and the spinal astroglial activation in a rat model of chronic inflammatory pain. **Brain Research**. v. 1276, p. 83-90. 2009

GABRIEL, A. F *et al.* Enriched environment and the recovery from inflammatory pain: Social versus physical aspects and their interaction. **Behavioural Brain Research**. v. 208, n. 1, p. 90-95. 2010

GUIGNARD, B. *et al.* Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanil increases postoperative pain and morphine requirement. **Anesthesiology**, v. 93, n. 2, p. 409–417, 1 ago. 2000.

GUINSBURG, R. Assessing and treating pain in the newborn. **The Journal of Pediatrics**. v. 75, n. 3, p. 149-160. 1999

GUINSBURG, R *et al.* Differences in pain expression between male and female newborn infants. **Pain**. v. 85, n. 1, p. 127-133. 2000

GRIMM, J. W. Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. **The Journal of Neuroscience**. v. 23, p. 742-747. 2003

GRUNAU, R. V *et al.* Early pain experience, child and family factors, as precursors of somatization: a prospective study of extremely premature and full term children. **Pain**. v. 56, p. 353-359. 1994

GRUNAU R. E *et al.* Demographic and therapeutic determinants of pain reactivity in very low birth neonates at 32 weeks' postconceptional age. **Pediatrics**. v. 107, p. 105–112. 2001

GRUNAU, R. E; WEINBERG, J; WHITFIELD M. F. Neonatal procedural pain and preterm infant cortisol response to novelty at 8 months. **Pediatrics**. v. 114, p. 77–84. 2004

- HEBERLEIN, A. *et al.* Association of nerve growth factor and vascular endothelial growth factor A with psychometric measurements of opiate dependence: results of a pilot study in patients participating in a structured diamorphine maintenance program, **European Addiction Research**. v. 18, p. 213–219. 2012
- HUANG, E. J; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annual Review of Neuroscience**. v. 24, p. 677-736. 2001
- HUTCHINSON, M. R. Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids: an integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia. **Pharmacological Reviews**. v. 63, p. 772–810. 2011
- ICKES, B. R. *et al.* Long-Term Environmental Enrichment Leads to Regional Increases in Neurotrophin Levels in Rat Brain. **Experimental Neurology**, v. 164, n. 1, p. 45–52, 2000.
- JORGENSEN, K. M. Pain assessment and management in the newborn infant. **Journal of PeriAnesthesia Nursing**, v. 14, n. 6, p. 349–356, dez. 1999.
- JOHNSTON, C. C; STEVENS, B. J. Experience in a neonatal intensive care unit affects pain response. **Pediatrics**. v. 98, p. 925-930. 1996
- KALINICHEV, M.; EASTERLING, K. W.; HOLTZMAN, S. G. Repeated neonatal maternal separation alters morphine-induced antinociception in male rats. **Brain Research Bulletin**, v. 54, n. 6, p. 649–654, abr. 2001.
- KAR, S; QUIRION, R. Neuropeptide receptors in developing and adult rat spinal cord: an in vitro quantitative autoradiography study of calcitonin gene-related peptide, neurokinins, mu-opioid, galanin, somatostatin, neurotensin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 354, n. 2, p. 253-281. 1995
- KAZL C. *et al.* Early-life experience alters response of developing brain to seizures. **Brain Research**. v. 18, n. 285, p. 174-181. 2009
- KHALAJI, S. *et al.* Environmental enrichment attenuates morphine-induced conditioned place preference and locomotor sensitization in maternally separated rat pups. **Basic and Clinical Neuroscience**. v. 9, n. 4, p. 241-250. 2018
- KISS, P. *et al.* Environmental Enrichment Decreases Asphyxia-Induced Neurobehavioral Developmental Delay in Neonatal Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 22258–22273, 13 nov. 2013.
- KIKUSUI, T; ICHIKAWA, S; MORI, Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. **Psychoneuroendocrinology**. v. 34, n. 5, p. 762-772. 2009
- KOBAYASHI S, OHASHI Y, ANDO S. Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined

procedure of the Hebb–Williams maze task. *Journal of Neuroscience Research*. v. 70, p. 340-346. 2002

KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods in Molecular Biology*, p. 99–103, 11 dez. 2018.

LARI, M. *et al.* Environmental enrichment ameliorates psychological dependence symptoms and voluntary morphine consumption in morphine withdrawn rats under methadone maintenance treatment. *Basic and Clinical Neuroscience Journal*, v. 12, n. 5, p. 607–616, 1 set. 2021.

LEE, J. H. *et al.* Neonatal inflammatory pain and systemic inflammatory responses as possible environmental factors in the development of autism spectrum disorder of juvenile rats. *Journal of Neuroinflammation*. v. 16, n. 13, p. 109. 2016

LIANG J. *et al.* Roles of BDNF, dopamine d(3) receptors, and their interactions in the expression of morphine-induced context-specific locomotor sensitization. *European Neuropsychopharmacology*. v. 21, p. 825-834. 2011

LIPPMANN, M. *et al.* Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *European Journal of Neuroscience*. v. 25, n. 10, p. 3091-3098. 2007

MADERA-SALCEDO, I. K; CRUZ, S. L; GONZALEZ-ESPINOSA, C. Morphine decreases early peritoneal innate immunity responses in Swiss-Webster and C57BL/6/J mice through the inhibition of mast cell TNF- $\alpha$  release. *Journal of Neuroimmunology*. v. 232, p. 101-107. 2011

MAO, J. Opioid-induced abnormal pain sensitivity: implications in clinical opioid therapy. *Pain*, v. 100, n. 3, p. 213–217, dez. 2002.

MATHIASSEN, J. R.; DICAMILLO, A. Novel object recognition in the rat: a facile assay for cognitive function. *Current Protocols in Pharmacology*, v. 5, p. 5.59, 1 jun. 2010.

MALHEIROS, J. M. *et al.* Repetitive noxious neonatal stimuli increases dentate gyrus cell proliferation and hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Hippocampus*, v. 24, n. 4, p. 415–423, 2013.

MARSH, D. F; HATCH, D. J; FITZGERALD, M. Opioid system and the newborn. *British Journal of Anaesthesia*. v. 79, p. 787-795. 1997

McGOUGH, N. N. *et al.* RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *The Journal of Neuroscience*. v. 24, p. 10542-10552. 2004

McMAHON, S. B; MALCANGIO, M. Current challenges in glia-pain biology. *Neuron*. v. 64, p. 46-54. 2009

MOTZ, B. A; ALBERTS, J. R. The validity and utility of geotaxis in young rodents. *Neurotoxicology and Teratology*. v. 27, n. 4, p. 529-533. 2005

MOHAMMED, A. H. *et al.* Environmental enrichment and the brain. **Progress in Brain Research**. v. 138, p. 109-133. 2002

MOUSA, A. S. *et al.* Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. **Brain**. v. 130, p. 502-513. 2007

NANDI, R; FITZGERALD, M. Opioid analgesia in the newborn. **European Journal of Pain**. v. 9, n. 2, p. 105-108. 2005

NAKA, F. *et al.* An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. **Brain Research**. v. 924, p. 124-126. 2002

NEAL, S. *et al.* Enriched environment exposure enhances social interactions and oxytocin responsiveness in male long-evans rats. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v. 12, n. 198. 2018

NITHIANANTHARAJAH, J; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 7, n. 9, p. 697-709. 2006

NIN, M. S. *et al.* Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. **European Journal of Pharmacology**. v. 684, p. 95-101. 2012

NUSEIR, K. Q. *et al.* Sucrose and naltrexone prevent increased pain sensitivity and impaired long-term memory induced by repetitive neonatal noxious stimulation: Role of BDNF and  $\beta$ -endorphin. **Physiology & Behavior**, v. 179, p. 213–219, out. 2017.

NUNES, E. A. *et al.* Morphine exposure during early life alters thermal and mechanical thresholds in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 60, n. 1, p. 78–85, 2016.

OLIVEIRA, Carla de. **Administração de morfina durante o período neonatal: avaliação de sistemas de neurotransmissão, parâmetros comportamentais e bioquímicos**. 2017. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina: Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

O'SHEA, L. *et al.* Neonatal 6-hydroxydopamine attenuates the neural and behavioral effects of enriched rearing in the rat. **European Journal of Pharmacology**. v. 92, p. 43-47. 1983

PATTINSON, D. The neurobiology of infant pain: development of excitatory and inhibitory neurotransmission in the spinal dorsal horn. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 29, n. 1, p. 36–44, 2004.

PHAM, T. M. *et al.* Housing environment influences the need for pain relief during post-operative recovery in mice. **Physiology & Behavior**. v. 99, p. 663-668. 2010

PEREIRA, S. Y. *et al.* Sedação e analgesia em neonatologia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 57, n. 5, p. 575-587. 2007

- PEREIRA, L. O. *et al.* Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 87, n. 1, p. 101-108. 2007
- PEREIRA, L. O. *et al.* Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female but not in male, rats after neonatal hypoxia–ischemia. **Brain Research**. v. 1218, p. 257-266. 2008
- RAHMAN, W; DICKENSON, A. H. Development of spinal opioid systems. **Regional Anesthesia & Pain Medicine**. v. 24, p. 383-385. 1999
- RAGHAVENDRA, V; RUTKOWSKI, M. D; DELEO, J. A. The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. **The Journal of Neuroscience**. v. 22, p. 9980–9989. 2002
- ROSSATO, J. I. *et al.* On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning and Memory**. v. 14, p. 36-46. 2007
- ROCHA, A. P. C. *et al.* Uso de medicações por via subaracnóidea no tratamento da dor crônica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 52, n. 5. 2004
- ROSSI, C. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**. v. 24, n. 7, p. 1850-1856. 2006
- ROZISKY, J. R. *et al.* Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v. 26, n. 6, p. 561-565. 2008
- ROZISKY J. R. *et al.* Morphine exposure in early life increases nociceptive behavior in a rat formalin tonic pain model in adult life. **Brain Research**. 1367, p. 122-129. 2011
- ROZISKY J. R. *et al.* Neonatal morphine administration leads to changes in hippocampal BDNF levels and antioxidant enzyme activity in the adult life of rats. **Neurochemical Research**. v. 38, n. 3, p. 494-503. 2013
- ROZISKY JR. *et al.* Morphine Treatment in Neonate Rats Increases Exploratory Activities: Reversal by Antagonist D2 Receptor. **British Journal of Medicine & Medical Research**. v. 4, n. 1, p. 351-367. 2014
- ROZISKY, J. R. *et al.* Melatonin as a potential counter-effect of hyperalgesia induced by neonatal morphine exposure. **Neuroscience Letters**, v. 633, p. 77–81, 2016.
- SALE, A. *et al.* Maternal enrichment during pregnancy accelerates retinal development of the fetus. **PLoS One**. 2007; 14;2(n. 11, p. 1160. 2007
- SAIED, N. M. *et al.* Neuromodulatory effect of curcumin on catecholamine systems and inflammatory cytokines in ovariectomized female rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 48, n. 3, p. 337–346, 22 nov. 2020.

SEGOVIA, G; ARCO, A; MORA, F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. **Journal of Neural Transmission**. v. 116, n. 8, p. 1007-1016. 2009

SCHÄFERS, M; SORKIN, L. Effect of cytokines on neuronal excitability. **Neuroscience Letters**. v. 437, p. 188-193. 2008

SCHROTT, L. M; FRANKLIN, L. M; SERRANO, P. A. Prenatal opiate exposure impairs radial arm maze performance and reduces levels of BDNF precursor following training. **Brain Research**. v. 1198, p. 132-140. 2008

SCHMIDT, S. *et al.* Enhanced postoperative sensitivity to painful pressure stimulation after intraoperative high dose remifentanyl in patients without significant surgical site pain. **The Clinical Journal of Pain**, v. 23, n. 7, p. 605–611, set. 2007.

SIMONS, S. H. P. *et al.* Do we still hurt newborn babies? A prospective study of procedural pain and analgesia in neonates. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**. v. 157, p. 1058-1064. 2003

SIMONS, S. H; TIBBOEL, D. Pain perception development and maturation. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**. v. 11, n. 4, p. 227-231.2006

SMITH, M. A; MCCLEAN, J. M; BRYANT, P. A. Sensitivity to the effects of a kappa opioid in rats with free access to exercise wheels: differential effects across behavioral measures. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 77, p. 49-57. 2004

SMITH, M. A. *et al.* Social and environmental influences on opioid sensitivity in rats: importance of an opioid's relative efficacy at the mu-receptor. **Psychopharmacology**. v. 181, p. 27-37. 2005

SOMMER, C; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**. v. 361,184-187. 2004

SONG, P; ZHAO, Z. Q. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. **Neuroscience Research**. v. 39, p. 281-286. 2001

SURESH, S; ANAND, K. J. Opioid tolerance in neonates: a state-of-the-art review. **Pediatric Anaesthesia**. v. 11, n. 5, p. 511-521. 2001

TADDIO, A. Opioid analgesia for infants in the neonatal intensive care unit. **Clinics in Perinatology**. v. 29, p. 493-509. 2002

TALL, J. M. Housing supplementation decreases the magnitude of inflammation-induced nociception in rats. **Behavioural Brain Research**. v. 197, p. 230-233. 2009

TROMBETTA, I. C. *et al.* Níveis Séricos do BDNF na Proteção Cardiovascular e em Resposta ao Exercício. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 2, p. 263–269, 2020.

UÇEYLER, N; SCHÄFERS, M; SOMMER, C. Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. **Experimental Brain Research**. v. 196, n. 1, p. 67-78. 2009

- VACHON, P. *et al.* Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain. **Behavioral and Brain Functions**. v. 7, n. 9, p. 22. 2013
- VAN PRAAG, H; KEMPERMANN, G; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 1, n. 3, p. 191-198. 2000
- VENEZIANO, G.; TOBIAS, J. D. Chloroprocaine for epidural anesthesia in infants and children. **Pediatric Anesthesia**, v. 27, n. 6, p. 581–590, 2017.
- VIVINETTO, A. L.; SUÁREZ, M. M; RIVAROLA, M. A. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. **Behavioural Brain Research**. v. 1, n. 240, p. 110-118. 2013
- WELLS, C. E. *et al.* Changes to open field surfaces typically used to elicit hippocampal remapping elicit graded exploratory responses. **Behavioural Brain Research**. 2009; v. 197, n. 1, p. 234-8.
- WHITFIELD, M. F; GRUNAU, R. E. Behavior, pain perception, and the extremely low-birth weight survivor. **Clinics in Perinatology**. v. 2, p. 363-379. 2000
- WOOLF, C. J. *et al.* Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor  $\alpha$ . **British Journal of Pharmacology**. v. 121, p. 417-424. 1997
- WOOLF, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**. v. 152, n. 3, p. 2-15. 2011
- YAZDANFAR, N. *et al.* Maternal morphine exposure and post-weaning social isolation impair memory and ventral striatum dopamine system in male offspring: is an enriched environment beneficial? **Neuroscience**. v. 461, p. 80–90, 2021.
- ZHU, A.; BENZON, H. A.; ANDERSON, T. A. Evidence for the Efficacy of Systemic Opioid-Sparing Analgesics in Pediatric Surgical Populations. **Anesthesia & Analgesia**, v. 125, n. 5, p. 1569–1587, nov. 2017.
- ZHANG, H. N; KO, M. C. Seizure activity involved in the up-regulation of BDNF mRNA expression by activation of central mu opioid receptors. **NeuroSci**. v. 161, p. 301-310. 2009

## ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO PELA CEUA/HCPA



### HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE DIRETORIA DE PESQUISA

#### Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 2022/0185

**Título:** Influência do Enriquecimento Ambiental na hiperalgesia induzida pela exposição neonatal à morfina em ratos

**Pesquisador Responsável:** IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

#### Equipe de Pesquisa:

JOSIMAR MACEDO DE CASTRO

DIRSON JOAO STEIN

MATHEUS GABRIEL DE FREITAS  
NASCIMENTO

**Data de Aprovação:** 07/10/2022

**Data de Término:** 01/06/2024

| Espécie/Linhagem  | Sexo/Idade    | Quantidade | Data Reunião | Documento |
|-------------------|---------------|------------|--------------|-----------|
| RATO HETEROGÊNICO | F/9 Semana(s) | 10         |              | Projeto   |
| RATO HETEROGÊNICO | M/0 Dia(s)    | 80         |              | Projeto   |

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



Assinado digitalmente por:  
**PATRICIA ASHTON PROLLA**  
DIRETORIA DE PESQUISA  
18/10/2022 15:32:12

externo\_hcpa.edu.br/besquisa/publico/cadastroapoio/conferenciaArquivo.xhtml?co  
demp=2562217

## ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

08/12/2023, 12:23

Final Review | Wiley Authors

WILEY

[My Submissions](#)Iraci 

## International Journal of Developmental Neuroscience

[JOURNAL HOME](#)[AUTHOR GUIDELINES](#)[EDITORIAL CONTACT](#)

## Submission Overview

**Initial Submission** This manuscript has been submitted to the editorial office for review. Changes cannot be made during editorial review, but you can view the information and files you submitted, below.

|                  |  |                         |          |
|------------------|--|-------------------------|----------|
| Article Type     | Research Article   |                         |          |
| Title            | Long-lasting behavioral and neurochemical effects of early-life environmental enrichment in rats submitted to neonatal morphine administration   |                         |          |
| Manuscript Files | Name   | Type of File            | Size     |
|                  | <a href="#">Nascimento et al., JJDN.docx</a>   | Main Document - MS Word | 44.8 KB  |
|                  | <a href="#">Figure 1.jpg</a>   | Figure                  | 459.6 KB |
|                  | <a href="#">Figure 2.jpg</a>   | Figure                  | 1.8 MB   |
|                  | <a href="#">Figure 3.jpg</a>   | Figure                  | 2 MB     |
|                  | <a href="#">Figure 4.jpg</a>   | Figure                  | 1.5 MB   |
|                  | <a href="#">Figure 5.jpg</a>   | Figure                  | 3.1 MB   |
|                  | <a href="#">Figure 6.jpg</a>   | Figure                  | 3.7 MB   |
|                  | <a href="#">Figure 7.jpg</a>   | Figure                  | 4.8 MB   |
|                  | <a href="#">Figure 8.jpg</a>   | Figure                  | 1.4 MB   |
|                  | <a href="#">Figure 9.jpg</a>   | Figure                  | 4.2 MB   |
|                  | <a href="#">Nascimento et al. Cover Letter - JJDN.pdf</a>  | Cover letter / Comments | 134.7 KB |
| Abstract         | The present study aimed to evaluate the medium- and long-term effects of early environmental enrichment (EE) on neuromotor, nociceptive, cognitive, behavioral, and neurochemical parameters in rats submitted to repeated administration of morphine during the neonatal period. A total of 90 animals were used, comprising 10 adult nulliparous females |                         |          |

and 80 male puppies. Animals were divided into 4 groups: saline + standard conditions (S + SC); saline + EE (S + EE); morphine + standard conditions (M + SC); morphine + EE (M + EE). Morphine was administered to the pups from day 8 to day 14, (5 ug / s.c.) regardless of the animal's weight, once a day, and EE was offered to the animals from day 1 to day 21, day of weaning. The neuromotor reflexes were evaluated using the righting reflex and negative geotaxis tests; the exploratory behavior by the open field test; the anxiety-like behavior by the elevated plus-maze test; the thermal nociceptive response by the Hot Plate test, and the long-term memory by the object recognition test. BDNF and TNF- $\alpha$  levels were analyzed in the hippocampus, hypothalamus, brainstem, and spinal cord. There was no significant difference between groups in neuromotor development. 30-day-old animals presented: 1. a higher recognition index; higher anxiety-like behavior, which was reversed by EE. 2. hyperalgesia induced by EE. 60-day-old animals presented: 1. neonatal morphine-induced anxiety-like behavior, that was reversed by EE; 2. analgesia induced by EE. All neurochemical parameters were modulated by age, while BDNF levels in the hippocampus and brainstem were increased by EE. In summary, the findings of this study indicate that both adolescent and adult rodents exhibited anxious-like behavior after being exposed to neonatal morphine. EE increased BDNF in the brainstem and hippocampus of these animals, modified behavioral and nociceptive parameters, and inhibited the anxious-like behavior induced by morphine.

## Authors

| Name   | Email                                | Country/Loca |
|--|--------------------------------------|--------------|
| <b>Matheus Gabriel de Freitas Nascimento</b> <sup>1, 2</sup> | farmaceuticomatheusgabriel@gmail.com | Brazil       |
| <b>Josimar Macedo de Castro</b> <sup>2, 3</sup>              | josimarmacedodecastro@hotmail.com    | Brazil       |
| <b>Khetrüin Jordana Fiuza</b> <sup>2</sup>                   | khetruiufiuza@hotmail.com            | Brazil       |
| <b>Thais Collioni de Oliveira</b> <sup>2</sup>               | thaiscollioni6@gmail.com             | Brazil       |
| <b>Iala Thais de Sousa Morais</b> <sup>1, 2</sup>            | lalathaismorais@gmail.com            | Brazil       |
| <b>Tenille Dal Bosco</b> <sup>2, 3</sup>                     | tenilledalbosco@gmail.com            | Brazil       |
| <b>Liciane Fernandes Medeiros</b> <sup>2, 4</sup>            | licimedeiros@gmail.com               | Brazil       |
| <b>Wolnei Caumo</b> <sup>2</sup>                             | wcaumo@hcpa.edu.br                   | Brazil       |
| <b>Dirson J. Stein</b> <sup>2, 3</sup>                       | dirstein@gmail.com                   | Brazil       |
| <b>Iraci L. S. Torres</b> <sup>1, 2, 3</sup>                 | iltorres@hcpa.edu.br                 | Brazil       |

|   | Name  | Email   | Country/Loca |
|---|---|---|--------------|
| <p><b>Affiliations</b></p> <p>We will use the best match from our database to determine if your manuscript is eligible for special benefits. Matched organizations are for internal purposes and will not be published.</p> | <p>Corresponding Author Submitting Author</p> | <p>1. Postgraduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil</p> <p><b>Matched organization</b><br/>Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciencias Basicas da Saude<br/>PORTO ALEGRE, Brazil</p> <p>2. Pharmacology of Pain and Neuromodulation Laboratory: Preclinical Investigations, Department of Pharmacology, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil</p> <p><b>Matched organization</b><br/>Hospital de Clinicas de Porto Alegre<br/>PORTO ALEGRE, Brazil</p> <p>3. Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil</p> <p><b>Matched organization</b><br/>Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina<br/>PORTO ALEGRE, Brazil</p> <p>4. Postgraduate Program in Health and Human Development, Universidade La Salle, Canoas, RS 92010-000, Brazil</p> <p><b>Matched organization</b><br/>Centro Universitario La Salle<br/>CANOAS, Brazil</p> |              |
| <p><b>Additional Information</b></p>  |   | <p><b>Is your data available?</b></p> <p>The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.</p> <p><b>Funders</b></p> <p>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico<br/>Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior<br/>Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos HCPA<br/>Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação HCPA<br/>Hospital de Clínicas de Porto Alegre</p>  |              |

08/12/2023, 12:23

Final Review | Wiley Authors

Financiadora de Estudos e Projetos

**Keywords**

environmental enrichment; morphine; hyperalgesia

**Is this submission for a special issue?**

No, this is not for a special issue

**Has this manuscript been submitted previously to this journal?**

No, it wasn't submitted previously

**Suggested Reviewers**

Ali Rashidy-Pour

Rashidy-Pour@semums.ac.ir

Semnan University of Medical Sciences and Health Services

Elke Bromberg

bromberg@pucrs.br

Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina

Gaurav Singhal

Gaurav.Singhal@adelaide.edu.au

The University of Adelaide

**Opposed Reviewers***No response provided***Cover Letter / Comments**

Yes, I'd like to add a cover letter or comments

(see [Manuscript Files](#))**History****Submitted On** 8 December 2023 by Iraci Torres▼ [Hide this version history](#)

8 December 2023 by Iraci Torres

**Submission Started** 8 December 2023 by Iraci Torres[Privacy policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Contact us](#) | [Help](#) | [Cookie Preferences](#)©Atypon Systems, LLC **Atypon ReX**