



**Dissertação de Mestrado**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANESTÉSICOS GERAIS, ASSOCIADO OU NÃO AO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO, SOBRE: PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, ATIVIDADES E-NTPDÁSICA E DE ECTO-5'-NUCLEOTIDASE EM MEDULA ESPINHAL DE RATOS.**

---

**LICIANE FERNANDES MEDEIROS**

**Porto Alegre**

**2010**

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

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANESTÉSICOS GERAIS,  
ASSOCIADO OU NÃO AO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO, SOBRE:  
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, ATIVIDADES E-  
NTPDÁSICA E DE ECTO-5'-NUCLEOTIDASE EM MEDULA  
ESPINHAL DE RATOS.**

**LICIANE FERNANDES MEDEIROS**

**ORIENTADORA**

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

**CO-ORIENTADORA**

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria Oliveira Battastini

Porto Alegre

2010

*“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito,  
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã,  
Portanto hoje é o dia certo para amar,  
Acreditar, fazer e principalmente viver. ”*

*MAHATMA GANDHI*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e promover muitas conquistas durante a minha vida.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Iraci Lucena da Silva Torres, um agradecimento especial, pois foi a partir de sua aceitação que começou todo esse processo de aprendizagem e desenvolvimento; um carinhoso muito obrigado.

À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra Ana Maria Oliveira Battastini, por sua compreensão, apoio e entusiasmo.

À minha família, que, mesmo distante, sempre acreditou em mim e me incentivou em todas as horas, em especial ao meu pai Odilon, por me ajudar todo este tempo, sempre procurando oferecer o melhor para meu crescimento e desenvolvimento.

Ao meu namorado Renato, pela sua compreensão e seu incentivo para seguir em frente sempre. Pelo amor e companheirismo, enfim por tudo.

À amiga Joanna, por todo carinho, compreensão e apoio.

À amiga Andressa, pela ajuda no desenvolvimento de experimentos, pela amizade e inúmeras risadas.

Aos colegas de grupo, Vanessa, Isabel, Bernardo, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelo companheirismo em congressos e experimentos longos e por muitos momentos de alegria e boas risadas.

Aos alunos de iniciação científica Alberto, Anelise, Lauren, Vinícius, Yasmine, Stefânia, pela boa convivência e colaboração.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFRGS.

À Prof<sup>a</sup> Dra Lenir Orlandi Pereira, pela disponibilidade e auxílio no aprendizado da cirurgia, que foi essencial para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do lab. 22 do Departamento de Bioquímica, por entenderem e colaborarem com o espaço que dividíamos ao fazer experimentos com enzimas.

Aos funcionários do ratário, Dona Geni (CREAL) e Karen, bem como à Fabíola Meyer e à Marta Cioato da Unidade de Experimentação Animal, por toda paciência e ajuda. E também aos funcionários Eduardo e Carol.

A todos os professores, colegas e funcionários do PPG, em especial às secretárias Alice e Sílvia.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação - Hospital de Clinicas de Porto Alegre pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto e pela excelente qualidade de sua Unidade de Experimentação Animal, onde o trabalho pôde ser desenvolvido com qualidade e segurança.

A CAPES pelo auxílio parcial de bolsa (2º semestre de 2008 e 2º semestre de 2009).

A PIBIC-CNPq/UFRGS, pelas bolsas dos alunos que participaram deste trabalho.

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

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
I.1 – DOR.....	2
I.1.1 – CONTEXTO HISTÓRICO.....	2
I.1.2 – DEFINIÇÃO DE DOR.....	5
I.1.3 – TRANSMISSÃO DO ESTÍMULO NOCICEPTIVO.....	6
I.1.4 – MODULAÇÃO DA DOR.....	8
I.2 - DOR E NEONATOS.....	9
I.3 - SISTEMA PURINÉRGICO E DOR.....	13
<b>II. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....</b>	<b>19</b>
<b>III. HIPÓTESE.....</b>	<b>21</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
IV.1 – OBEJTIVO GERAL.....	23
IV.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>V. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
VI.1 – PRIMEIRO DESENHO EXPERIMENTAL.....	38
VI.2 – SEGUNDO DESENHO EXPERIMENTAL.....	52
<b>VII. DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
VII.1 – RESPOSTA COMPORTAMENTAL NOCICEPTIVA.....	67
VII.2 – RESPOSTA COMPORTAMENTAL: ATIVIDADE LOCOMOTORA E	

ANSIEDADE .....	73
VII.3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	78
<b>VIII. CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
VIII.1 – CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	85
VIII.2 – CONCLUSÃO GERAL.....	85
<b>IX. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>86</b>
<b>X. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
<b>XI. ANEXOS.....</b>	<b>108</b>
XI.1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	109
XI.2 – DIVULGAÇÕES.....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP = adenosina 5' difosfato

AMP = adenosina 5' monofosfato

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

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

ATP = adenosina 5' trifosfato

C = grupo controle

Ca<sup>2+</sup> = íon cálcio

CaCl<sub>2</sub> = cloreto de cálcio

CA= campo-aberto

CF = grupo cetamina S+/fentanil

CF-CIR = grupo cetamina S+/fentanil com procedimento cirúrgico

CGRP = peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

E = período embrionário

EBA = entrada nos braços abertos

EBF = entrada nos braços fechados

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

(E-)NDPK = (Ecto-)nucleosídeo difosfoquinase

(E-)NPP = (Ecto-)nucleotídeo pirofosfato/fosfodiesterase

(E-)NTPDase = (Ecto-)nucleosídeo trifosfato difosfo-hidrolase

EPM = erro padrão da média

GABA = ácido- $\gamma$ -aminobutírico

H<sup>+</sup> = íons hidrogênio

HCl = ácido clorídrico

HEPES = Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico

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

i.p. = intraperitoneal

ISO = grupo isoflurano

ISO-CIR = grupo isoflurano com procedimento cirúrgico

K<sup>+</sup> = íons potássio

KCl = cloreto de potássio

LCE = labirinto em cruz elevado

$\mu\text{L}$  = microlitro  
mM = milimolar  
M = molar  
m/s = metros por segundo  
 $\text{Mg}^{2+}$  = íon magnésio  
 $\text{MgCl}_2$  = cloreto de magnésio  
NMDA = N-metil-D-aspartato  
NPHD = *unprotected head dipping*  
pH = potencial hidrogeniônico  
PHD = *protected head dipping*  
P0 = dia do nascimento  
P7 = 7° dia pós-natal  
P8 = 8° dia pós-natal  
P14 = 14° dia pós-natal  
P15 = 15° dia pós-natal  
P16 = 16° dia pós-natal  
P17 = 17° dia pós-natal  
P21 = 21° dia pós-natal  
P28 = 28° dia pós-natal  
P30 = 30° dia pós-natal  
P55 = 55° dia pós-natal  
P60 = 60° dia pós-natal  
P80 = 80° dia pós-natal  
RN = recém-nascido  
SCP = substância cinzenta periaquedutal  
SN = sistema nervoso  
SNK = *Student-Newman-Keuls*  
SNC = sistema nervoso central  
TBA = tempo de permanência nos braços abertos  
TBF = tempo de permanência nos braços fechados  
TFL = latência para retirada da cauda (*Tail Flick Latency*, em inglês)  
UCIN = Unidade de Cuidado Intensivo Neonatal

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Transmissão do estímulo nociceptivo.....	8
<b>Figura 2.</b> Linha de tempo da nocicepção.....	11
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de liberação e degradação do ATP, e os purinoceptores.....	16
<b>Figura 4.</b> Árvore filogenética hipotética.....	18
<b>Figura 5.</b> Analgesímetro para avaliação de latência de retirada da cauda.....	29
<b>Figura 6.</b> Aparato de Campo Aberto.....	31
<b>Figura 7.</b> Labirinto em Cruz Elevado.....	32
<b>Figura 8.</b> Etapas da preparação da fração sinaptossomal.....	34
<b>Figura 9.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a resposta nociceptiva, avaliada em analgesímetro, em P14, P30 e P60.....	39
<b>Figura 10.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre as respostas neurogênica e inflamatória, avaliada no teste da formalina, em P14 e P30 .....	40
<b>Figura 11.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a resposta comportamental (mensurada em número absoluto), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P14.....	42
<b>Figura 12.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a resposta comportamental (mensurada em número absoluto), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P30.....	42
<b>Figura 13.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a resposta comportamental (mensurada em número absoluto), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P60.....	43
<b>Figura 14.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a resposta comportamental (mensurada em segundos), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P14.....	44
<b>Figura 15.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a resposta comportamental (mensurada em segundos), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P30.....	45
<b>Figura 16.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a resposta comportamental (mensurada em segundos), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P60.....	45
<b>Figura 17.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a resposta comportamental (mensurada em número absoluto), avaliada em Labirinto em Cruz Elevado, em P30.....	47
<b>Figura 18.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a resposta comportamental (mensurada em número absoluto), avaliada em Labirinto em Cruz Elevado, em P60.....	48
<b>Figura 19.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a resposta comportamental (mensurada em segundos), avaliada em Labirinto em Cruz Elevado, em P30.....	49
<b>Figura 20.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a resposta comportamental (mensurada em segundos), avaliada em Labirinto em Cruz Elevado em, P60.....	49

<b>Figura 21.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a atividade enzimática de hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas de medula espinhal, em P14.....	<b>51</b>
<b>Figura 22.</b> Efeito da administração de isoflurano sobre a atividade enzimática de hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas de medula espinhal, em P30.....	<b>51</b>
<b>Figura 23.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a resposta nociceptiva, avaliada em anagésímetro, em P14, P30 e P60.....	<b>53</b>
<b>Figura 24.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre as respostas neurogênica e inflamatória, avaliada no teste da formalina, em P14 e P30 .....	<b>54</b>
<b>Figura 25.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a resposta comportamental (mensurada em número absoluto), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P14.....	<b>56</b>
<b>Figura 26.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a resposta comportamental (mensurada em número absoluto), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P30.....	<b>56</b>
<b>Figura 27.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a resposta comportamental (mensurada em número absoluto), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P60.....	<b>57</b>
<b>Figura 28.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a resposta comportamental (mensurada em segundos), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P14.....	<b>58</b>
<b>Figura 29.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a resposta comportamental (mensurada em segundos), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P30.....	<b>58</b>
<b>Figura 30.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a resposta comportamental (mensurada em segundos), avaliada em aparato de Campo Aberto, em P60.....	<b>59</b>
<b>Figura 31.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a resposta comportamental (mensurada em número absoluto), avaliada em Labirinto em Cruz Elevado, em P30.....	<b>61</b>
<b>Figura 32.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a resposta comportamental (mensurada em número absoluto), avaliada em Labirinto em Cruz Elevado, em P60.....	<b>61</b>
<b>Figura 33.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a resposta comportamental (mensurada em segundos), avaliada em Labirinto em Cruz Elevado, em P30.....	<b>63</b>
<b>Figura 34.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a resposta comportamental (mensurada em segundos), avaliada em Labirinto em Cruz Elevado, em P60.....	<b>63</b>
<b>Figura 35.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a atividade enzimática de hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas de medula espinhal, em P14.....	<b>65</b>
<b>Figura 36.</b> Efeito da administração de cetamina S+/fentanil sobre a atividade enzimática de hidrólise de nucleotídeos em sinaptossomas de medula espinhal, em P30.....	<b>65</b>

## RESUMO

Devido a dificuldades técnicas de modelagem experimental e de aferição de dor, até os anos 70, acreditava-se que recém-nascidos e lactentes jovens não teriam maturidade neurológica para conduzir, de forma adequada, os estímulos dolorosos; portanto, não sentiam dor. Recentes estudos, focados na área de neurobiologia do desenvolvimento, têm demonstrado como as informações sensoriais são processadas no início da vida e que dor intensa ou persistente no prematuro ou neonato pode provocar alterações de comportamento e percepção da dor que podem persistir no decorrer da vida. Considerando a relevância do tema, este trabalho teve como objetivo avaliar possíveis alterações comportamentais e bioquímicas, a partir de uma intervenção farmacológica com anestésicos gerais, acompanhados ou não de procedimento cirúrgico realizado no 14º dia de vida do animal. Foram utilizadas 40 ninhadas padronizadas com 8 ratos Wistar machos. O modelo cirúrgico utilizado foi descrito por Levine, modificado por Rice *et al.* (1981), porém sem a oclusão da carótida. Para as avaliações comportamentais foram utilizados os testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, *tail-flick* e formalina. O parâmetro bioquímico avaliado foi atividade das enzimas E-NTPDases e ecto-5' nucleotidase. Este trabalho foi dividido em dois desenhos experimentais. No primeiro, os animais foram divididos em 3 grupos: controle (O<sub>2</sub>), anestesia (isoflurano), anestesia/cirurgia (isoflurano/cirurgia); no segundo, os animais foram divididos em 3 grupos: controle (salina), anestesia (cetamina S+/fentanil), anestesia/cirurgia (cetamina S+/fentanil/cirurgia). Os animais que receberam isoflurano apresentaram aumento na atividade locomotora em P14 e P30 e maior analgesia no *tail-flick* em P14 e P60, associados a uma diminuição da hidrólise de ATP, ADP e AMP em P14. É importante salientar que o procedimento cirúrgico reverteu a diminuição na hidrólise do ATP e do ADP. Os animais que receberam cetamina S+/fentanil (CF) apresentaram diminuição do nível de ansiedade (P30 e P60) e maior analgesia no *tail-flick* (P30), associadas a aumento da hidrólise de ATP e AMP, o procedimento cirúrgico reverteu o efeito observado no ATP. Esses resultados indicam que manipulações farmacológicas com anestésicos gerais, como as utilizadas nesta dissertação, em um período de maturação do sistema nervoso central, promovem alterações que podem ser percebidas ao longo da vida do animal. Os anestésicos são capazes de interagir com uma variedade de sistemas neuronais, incluindo sistemas GABAérgico, glicinérgico, colinérgico e glutamatérgico, e alterações em número e/ou afinidade de receptores destes sistemas podem estar contribuindo com os resultados obtidos nesta dissertação. No entanto, as técnicas utilizadas neste estudo não nos permitem determinar os mecanismos de neurotransmissão suscetíveis à exposição a anestésicos gerais, associado ou não ao procedimento cirúrgico, em animais com 14 dias, e envolvidos nas alterações observadas nas respostas comportamentais e bioquímicas em curto, médio e longo prazos. Novos estudos são necessários para melhor elucidar os resultados obtidos.

## **ABSTRACT**

Due to technical difficulties of modeling and experimental measurement of pain, until the 70th decade, it was thought that newborns and young infants would not have neurological maturity to drive properly painful stimuli, so they felt no pain. Recent studies focused on the area of developmental neurobiology have shown how sensory information is processed at the beginning of life and severe or persistent pain in premature or newborn may cause changes in behavior and perception of pain that can persist throughout life. Considering the relevance of the theme of this work, it was evaluated possible behavioral and biochemical changes from a pharmacological intervention with general anesthetics, associated or not with surgical procedure performed on the 14th day of life of the animal. Fourty litters were used with standard 8 male Wistar rats. The surgical model used was described by Levine, modified by Rice et al. (1981), but without carotid occlusion. For behavioral assessments the open-field, elevated plus-maze, *tail-flick* and formalin were performed. The biochemical parameters evaluated was the enzymatic activity of E-NTPDases and ecto-5'nucleotidase. This work was divided into two experimental designs: the first, the animals were divided into 3 groups: control (O<sub>2</sub>), anesthesia (isoflurane), anesthesia / surgery (isoflurane / surgery); in the second, the animals were divided into 3 groups: control (saline), anesthesia (ketamine S+/fentanyl), anesthesia / surgery (ketamine S+/fentanyl / surgery). The animals that received isoflurane showed an increase in locomotor activity in P14 and P30 and greater analgesia in *tail-flick* in P14 and P60, associated with decreased hydrolysis of ATP, ADP and AMP in P14. It is important to note that the surgery reversed the decrease in the hydrolysis of ATP and ADP. The animals that received ketamine S+/fentanyl had decreased levels of anxiety (P30 and P60) and greater analgesia in *tail-flick* (P30) associated with increased ATP hydrolysis and AMP, the surgery reversed the effect observed in the ATP. These results indicate that pharmacological manipulation with general anesthetics, such as those used in this work, in a period of maturation of the central nervous system, can promote changes which could be seen throughout the animal's life. Anesthetics are able to interact with a variety of neuronal systems, including systems GABAergic, glycinergic, glutamatergic and cholinergic, and changes in the level of receptors of these systems in numbers and / or affinity may be contributing to the results obtained in this dissertation. However, the techniques used in this study did not allow us to determine the mechanisms of neurotransmission susceptible to exposure to general anesthetics in association or not surgery in animals with 14 days and involved in the observed changes in behavioral and biochemical alterations in short, medium and long term. Further studies are needed to further elucidate the results.

---

## I. INTRODUÇÃO

## **I.1 - DOR**

### **I.1.1 – CONTEXTO HISTÓRICO**

Desde os primórdios da civilização, o ser humano procura esclarecer as razões que justificam a ocorrência da dor e desenvolver procedimentos destinados ao seu controle. Bhudda (623-543 a.C.) atribuiu à universalidade da dor à frustração do desejo. Embora reconhecendo que a dor fosse sensação, os budistas e hindus conferiam maior significado emocional à experiência dolorosa. Demócrito (460-370 a.C.) descreveu a dor como resultado da invasão do corpo por partículas em estado anormal de agitação, do que resultaria desorganização da harmonia das moléculas. Hipócrates (460-360 a.C.) sugeriu a existência de quatro humores: o sangue, o muco, a bile amarela e a bile negra; ocorreria dor quando houvesse déficit ou excesso em um dos quatro humores ou desarmonia entre os quatro elementos fundamentais (calor, frio, umidade e secura). Platão (427-347 a.C.) acreditava que a dor e o prazer eram condições comuns a todo corpo e que o prazer resultaria do alívio da dor. Aristóteles (384-322 a.C.) distinguiu as cinco sensações: visão, audição, gustação, olfato e tato. Ele imaginava que a dor seria sentida no coração e, como o tato, se originaria na carne e seria transferida através do sangue ao coração; as sensações seriam de prazer, mas, em excesso, passariam a ser destrutivas ou dolorosas (Rey, 1993; Bonica & Loeser, 2001).

Straton posteriormente descreveu o encéfalo e propôs que o centro das sensações, incluindo a dor, deveria localizar-se no cérebro. Herofilus (335-280 a.C.) e Erasistratus (310-250 a.C.) apresentaram evidência de dois tipos de nervos: os responsáveis pelos movimentos e os responsáveis pelos sentimentos e sensações (Madigan & Raj, 2000). Celsus (42 a.C. - 37 d.C.), conhecido como “Cícero da Medicina”, relacionou a dor ao fenômeno da inflamação – hiperemia, calor e edema - mas não mencionou o papel do encéfalo. Galeno (131-201 d.C.) recuperou o trabalho dos egípcios e gregos; restabeleceu a importância dos sistemas nervosos central (SNC) e periférico no processamento das funções sensitivas, onde os nervos maiores

veiculariam sensibilidades especiais e o centro das atividades sensitivas seria o encéfalo. Este pesquisador identificou três condições necessárias para a percepção da dor: o órgão para receber as impressões externas, a via de conexão e o centro organizacional para transformar a sensação em percepção consciente. Classificou as diferentes qualidades de dor (pulsátil, em peso, em tensão, lancinante) e sugeriu duas possíveis causas para as doenças e a dor: desorganização interna e agressão externa (Bonica & Loeser, 2001).

No século XVII, os conceitos de Aristóteles mantiveram-se como verdadeiros, atestados por autoridades científicas, e a idéia de ser o coração o *sensorium commune* manteve-se paralelamente à teoria do cérebro ser o centro da percepção sensitiva. Descartes (1596-1650 d.C.) teorizou que a percepção da dor seria uma modalidade particular, dentre as várias sensações (Bonica & Loeser, 2001). Willis (1621-1675 d.C.) enfatizou que a dor preveniria a lesão do organismo em perigo e geraria movimentos de proteção ou fuga para proteger o corpo da agressão. No século XVIII, Bilon considerava a dor não somente como sinal de alarme, mas também como instrumento para localizar a doença que a causou (Teixeira & Okada, 2009).

No século XIX, Comte resumiu que as sensações de dor envolveriam um órgão mutável pelo estímulo doloroso e um sistema de vias de condução deste estímulo para centros nervosos prévios ao centro nervoso da percepção. Os estudos propiciaram a formulação de duas teorias fisiológicas para a dor: a teoria da especificidade e a teoria do padrão de estímulos. Pacini, em 1840, descobriu os corpúsculos táteis responsáveis pela sensação de pressão. Meissner e Wagner, em 1852, descobriram os receptores responsáveis pelo tato (Teixeira & Okada, 2009).

No século XX, até 1960, as pesquisas sobre dor foram relativamente negligenciadas. Muitos trabalhos, fundamentados em ensaios animais, dedicavam-se à dor aguda. Zotterman, em 1933, teorizou que a dor aguda era mediada por fibras mielinizadas e a dor lenta, por

fibras amielínicas. A mediação química da dor foi evidenciada por Rosenthal e Minard, em 1939. Wolff e Goodell, na década de 40, reintroduziram o conceito de dualismo da dor: a percepção e a reação. Em 1965, Melzack e Wall reavaliaram as teorias da especificidade e intensidade e propuseram a teoria da comporta. Esta foi modificada em 1982, incluindo a influência dos sistemas inibitórios descendentes (Teixeira & Okada, 2009).

Até os anos 70, devido a dificuldades técnicas de modelagem experimental e de aferição de dor, acreditava-se que recém-nascidos (RN) e lactentes jovens não teriam maturidade neurológica para conduzir, de forma adequada, os estímulos dolorosos, devido à imaturidade do sistema nervoso (SN) (mielinização incompleta, imaturidade do córtex cerebral, sinaptogênese incompleta das vias envolvidas com a sensação dolorosa); portanto, não sentiam dor (Berde *et al.*, 1989). Havia, também, a crença de que esses pacientes não teriam capacidade de armazenar em sua memória essas experiências dolorosas, e, mesmo que experimentassem dor, esta manifestação não seria deletéria ao seu organismo. Autores como Swafford e Allen (1968) afirmavam textualmente que: “pacientes pediátricos raramente necessitam de medicação para aliviar a dor, tolerando bem o desconforto”. E acreditava-se que, mesmo que experimentassem dor e que esta levasse a danos orgânicos, seria muito perigoso administrar agentes anestésicos ou analgésicos nessa faixa etária (Berde *et al.*, 1989).

Atualmente, 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). Além disso, tem sido relatado que pacientes submetidos a cirurgias no início da vida apresentam menor limiar de dor pós-operatória quando estão na faixa etária entre 7 e 13 anos, em comparação com crianças submetidas a cirurgias na mesma faixa etária, mas que não foram operadas quando bebês (Caumo *et al.*, 2000; 2003). Em outro estudo, foi demonstrado que bebês operados até os três meses de idade, que sofreram cirurgia

subseqüente no mesmo dermatomo até os três anos de idade, precisaram de maior analgesia nos períodos trans-operatório e pós-operatório, associada a maior concentração de norepinefrina plasmática (Peters *et al.*, 2005), em comparação com crianças da mesma idade operadas pela primeira vez. Recentes estudos focados na área de neurobiologia do desenvolvimento têm demonstrado como as informações sensoriais são processadas no início da vida (Pattinson & Fitzgerald, 2004; Sternberg *et al.*, 2004; Fitzgerald, 2005) e que dor intensa ou persistente no prematuro ou neonato pode provocar alterações de comportamento e percepção da dor que podem persistir no decorrer da vida (Caumo *et al.*, 2000, 2003).

### I.1.2 – DEFINIÇÃO DE DOR

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for Study of Pain – IASP*) conceitua a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada com lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos deste tipo de dano” (Merskey e Bogduk, 1994; Linton e Skevington, 1999). A IASP também acrescentou os seguintes comentários: "a incapacidade de se comunicar verbalmente não impede que um indivíduo esteja experimentando dor"; “há necessidade de tratamento adequado para o alívio da dor”; "a dor é sempre subjetiva”.

A dor é sintoma comum a muitos quadros clínicos. E esta pode ser classificada em aguda ou crônica, segundo critério de classificação temporal. A dor aguda tem geralmente uma causa próxima e exerce uma função de proteção essencial, associando estímulos nocivos potencialmente prejudiciais, com uma sensação desagradável (Woolf, 2004). É causada por traumas, doenças subjacentes ou alterações funcionais musculares ou viscerais. Na maioria dos casos, cessa em alguns dias ou semanas, com a administração de analgésicos clássicos. A dor é dita crônica quando persiste além do estágio de proteção da região lesada, podendo não ter uma causa identificável. A IASP adotou parâmetros temporais com base na

experiência médica para classificar a dor crônica, considerando três meses de dor como o ponto mais conveniente de transição da dor aguda à dor crônica não-maligna (Merskey & Bogduk, 1994). Outros autores sugerem que a dor crônica pode variar de um a seis meses (Loeser *et al.*, 2001; Morgan & Mikhail, 1996). A dor crônica pode resultar de nocicepção periférica ou de disfunções do SNC ou periférico.

A dor apresenta dois componentes: reatividade à dor e nocicepção. A nocicepção é o processo neurobiológico pelo qual, estímulos nocivos são codificados como impulsos neurais e enviados para o cérebro, onde são decodificados de acordo com as propriedades dos estímulos (térmico, mecânico, químico) (Chapman & Nakamura, 1999). Em termos clínicos, toda nocicepção produz dor, mas nem toda dor resulta de nocicepção.

### I.1.3 – TRANSMISSÃO DO ESTÍMULO NOCICEPTIVO

Os receptores de dor encontram-se distribuídos de forma ampla no organismo: pele, peritônio, tecido subcutâneo, músculo, tendões, órgãos internos e tecidos profundos. Também chamados de nociceptores, estão localizados nas terminações nervosas livres, com o seu corpo celular localizado nos gânglios da raiz dorsal e nos gânglios dos nervos trigêmeos. Destacam-se três principais classes de nociceptores: mecânicos, térmicos e polimodais. Os nociceptores térmicos são ativados por temperaturas extremas ( $>45^{\circ}\text{C}$  ou  $<5^{\circ}\text{C}$ ), e os mecânicos são ativados por intensa pressão aplicada na pele. Ambas as classes de nociceptores são constituídas por fibras cutâneas mielinizadas, do tipo A $\delta$ , que possuem velocidade de condução em torno de 5-30 m/s (condução rápida). Os nociceptores polimodais são ativados por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos de alta intensidade. São constituídos por fibras não-mielinizadas do tipo C e possuem velocidade de condução em torno de 1 m/s (condução lenta). Em parte, isto explica a dupla sensação de dor quando o estímulo é aplicado à pele, de modo que a primeira dor percebida, aguda, é transmitida por

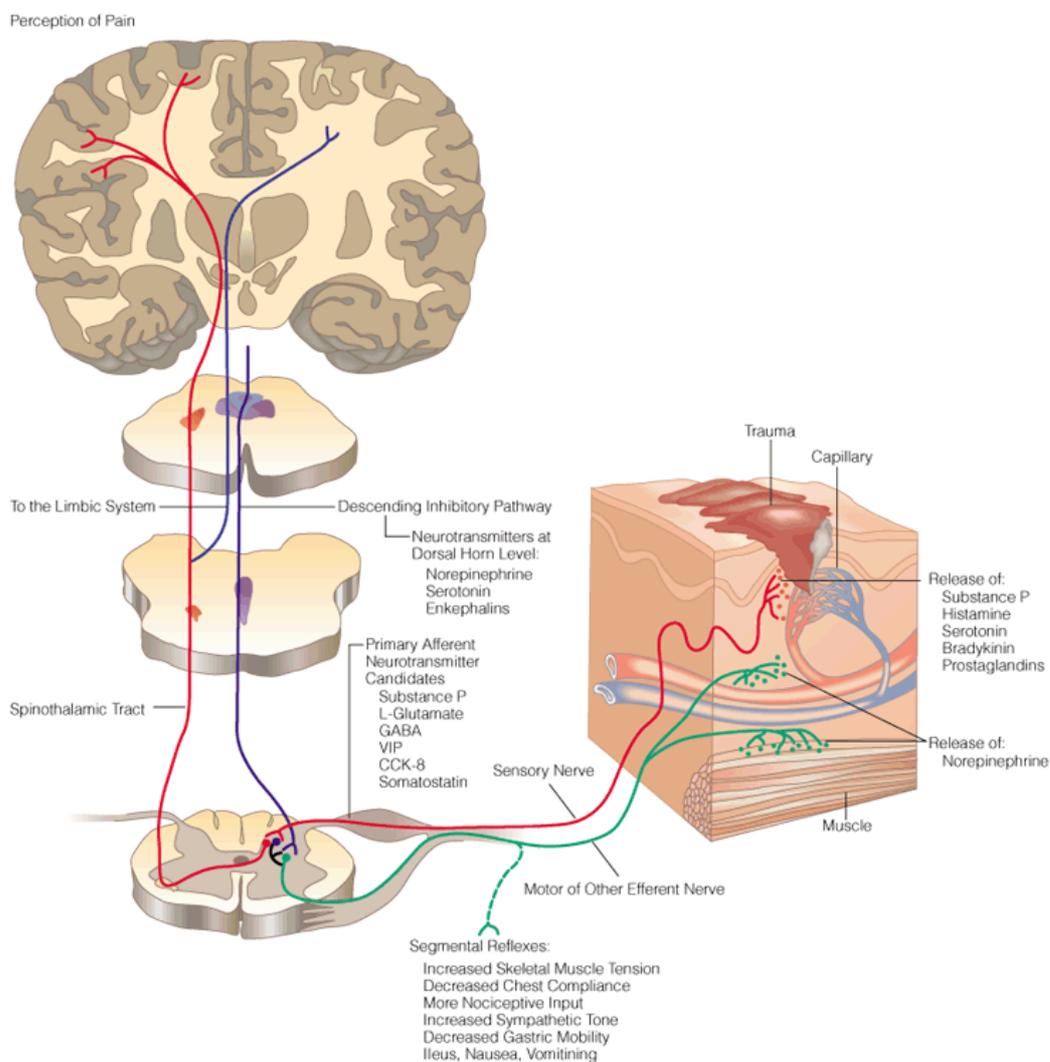
fibras A $\delta$ , e a segunda, uma dor difusa lenta, é transmitida pelas fibras C. Os nociceptores são estimulados por substâncias liberadas no meio extracelular, como serotonina, H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, histamina, bradicinina, colecistocinina e substância P (Loeser *et al.*, 2001).

A transmissão sináptica entre neurônios de 1<sup>a</sup> ordem (nociceptores) e neurônios de 2<sup>a</sup> ordem no corno dorsal é mediada por diversos neurotransmissores, como glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). O glutamato promove potenciais excitatórios pós-sinápticos rápidos, por meio da ativação de receptores AMPA. Já os potenciais lentos são produzidos por meio da liberação de peptídeos como substância P e CGRP (Menescal-de-Oliveira, 2008).

A informação é conduzida através da medula espinhal até centros superiores por vias ascendentes, como os tratos espinotalâmico, espinorreticular, espinomesencefálico e espinohipotalâmico. O trato espinotalâmico é a via nociceptiva ascendente mais proeminente na medula espinhal. Os axônios cruzam a linha média ao nível da comissura anterior e chegam até o tálamo. Este trato é subdividido em dois: espinotalâmico lateral ou via neoespinotalâmica, e espinotalâmico medial ou via paleoespinotalâmica. A via neoespinotalâmica projeta-se no núcleo pósterolateral do tálamo, de onde partem projeções para o córtex somatossensorial primário. Aí ocorre a percepção da dor. Este trato está relacionado com aspectos discriminativos da dor (localização, intensidade e duração) (Loeser *et al.*, 2001). A via paleoespinotalâmica, a partir da medula, projeta-se para o tálamo medial e, posteriormente, para o córtex cerebral de ambos os hemisférios. Nela, perde-se a somatotopia do estímulo (Ferreira, 2004).

As aferências chegam ao tálamo, estrutura responsável pela integração dos impulsos nociceptivos e que envia projeções até o córtex, através dos neurônios de 3<sup>a</sup> ordem (DeMarco & Pascoe, 2008). O córtex é essencial para determinar aspectos discriminativos, como localização, intensidade, duração e natureza do estímulo nocivo, e aspectos afetivo-

cognitivos, como emoção, percepção, aprendizado e memória (Craig & Dostrovsky, 1999; Sherman & Guillery, 1996, 2002) (Figura 1).



**Figura 1.** Transmissão do estímulo nociceptivo da periferia até o córtex, destacando os neurotransmissores, neuropeptídeos e neuromoduladores nas sinapses.

#### I.1.4 – MODULAÇÃO DA DOR

A transmissão nociceptiva é influenciada por processos centrais e periféricos, associada à liberação de substâncias mediadoras (neurotransmissores, peptídeos e neuromoduladores) que podem excitar ou inibir a transmissão.

Em nível espinhal, a estimulação mecânica de fibras aferentes de maior diâmetro, como as fibras A $\beta$ , favorece a ativação de interneurônios inibitórios, que diminuem a excitação dos neurônios aferentes primários e inibem a neurotransmissão nociceptiva para os neurônios de 2ª ordem (Giordano, 2005; Westlund, 2005).

O sistema inibitório descendente inclui várias estruturas supra-espinhais: substância cinzenta periaquedutal (SCP), formação reticular e núcleo magno da rafe (Menescal-de-Oliveira, 2008) atuando em diferentes sítios do processo nociceptivo. Este sistema diminui a liberação de neurotransmissores excitatórios nas terminações pré-sinápticas de aferentes primários, e reduz a excitabilidade nas terminações pós-sinápticas de neurônios de 2ª ordem; e em interneurônios (Fields, 1991).

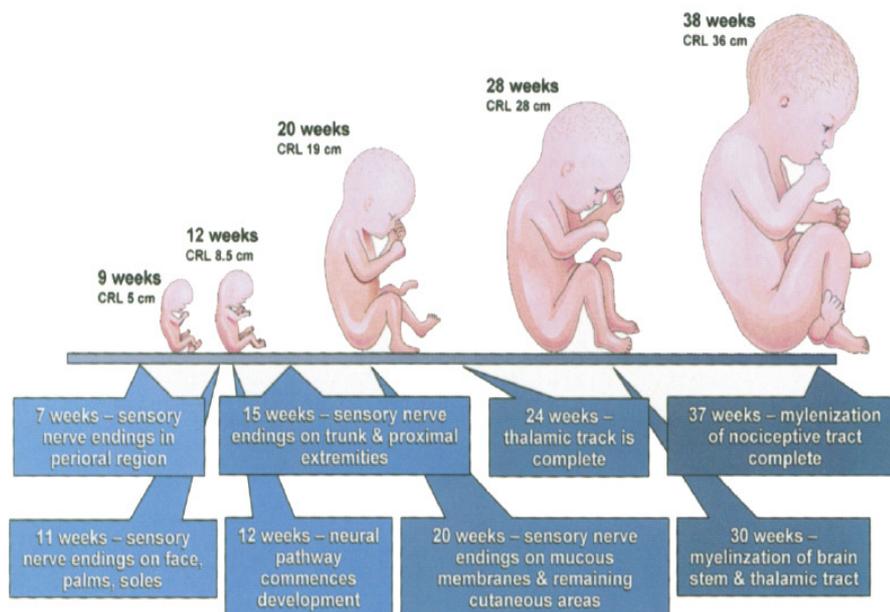
## **I.2 - DOR E NEONATOS**

Os primeiros estudos abordando o desenvolvimento fetal difundiram a crença de que o feto e o recém-nascido (RN) humanos não sentiam dor ou não a percebiam como os adultos (McGraw, 1943; Levy, 1960). A suspeita de que o RN era capaz de sentir dor foi introduzida na década de 1960, quando foi possível observar que a mielinização não era imprescindível para a transmissão dos impulsos pelo trato sensorial. Atualmente, sabe-se que os componentes do SN necessários para a transmissão do estímulo doloroso ao córtex cerebral estão presentes em RN a termo e em prematuros, embora a maturação e a organização desse sistema neurosensorial continue durante a vida pós-natal (Falcon *et al.*, 1996; Guinsburg *et al.*, 2000).

O desenvolvimento do sistema nociceptivo em humanos ocorre durante os 2º e 3º trimestres de gestação, e sua maturação, durante os dois primeiros anos de vida (Anand, 1987). Durante o 2º trimestre de gestação ocorre o desenvolvimento de vários tipos celulares neuronais, a organização laminar e o estabelecimento de conexões interneuronais e a expressão de neurotransmissores e de receptores.

As aferências nociceptivas, que transmitem a informação nociceptiva até centros superiores, estão completamente mielinizadas na 30<sup>a</sup> semana de gestação (Kostovic & Rakic, 1990), e as fibras talamocorticais, na 37<sup>a</sup> semana, sendo de fundamental importância para a percepção cortical da dor (Deshpande & Anand, 1996).

No dia do nascimento, as vias nociceptivas aferentes e suas conexões já estão estabelecidas. Estudos histológicos demonstram que a densidade e as propriedades neurofisiológicas dos nociceptores no neonato são semelhantes às do adulto (Deshpande & Anand, 1996). Além disso, outros estudos demonstram que as vias inibitórias são desenvolvidas durante o período pós-natal (revisado por Berde & Sethna, 2002). Em ratos, o sistema inibitório descendente parece não estar funcional até três semanas após nascimento (van Praag & Frenk, 1991; Boucher *et al.*, 1998). Fibras serotoninérgicas provenientes do tronco cerebral não atingem padrão e densidade de terminações adultas até P21. A estimulação da SCP não produz analgesia até P21, o que indica que a inibição descendente tem pouco impacto no corno dorsal neonatal (van Praag & Frenk, 1991). As fibras noradrenérgicas parecem estar funcionalmente ativas antes das serotoninérgicas. Assim a administração de agonistas  $\alpha 2$ -seletivos reverte a hiperalgesia inflamatória em todas as idades do período pós-natal (Fitzgerald, 2005). Estudos indicam que ratos recém-nascidos possuem um desenvolvimento neurológico similar ao de um ser humano de 24 semanas de gestação (Dobbing & Sands, 1979; Andrews & Fitzgerald, 1997; Marsh *et al.*, 1997). Com uma semana de vida, aquele desenvolvimento equivale ao de um ser humano RN a termo (Figura 2) e com três semanas, equivale ao de uma criança de um ano de idade (Fitzgerald & Anand, 1993) sendo considerado adulto, a partir da 6<sup>a</sup> semana de vida.



**Figura 2.** Linha de tempo da nociceção em seres humanos (Adaptado de Moore & Persuad, 1998).

Estudos em animais têm demonstrado que a exposição de RN 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). RN expostos a agentes nocivos podem ter aumento ou diminuição da sensibilidade aos estímulos nociceptivos na idade adulta, dependendo do tipo e duração do estímulo (Ruda *et al.*, 2000; Lin & Al-Chaer, 2003; 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). Em seres humanos, transtornos psiquiátricos apresentados na vida adulta, tais como ansiedade, depressão e esquizofrenia, também têm sido citados como decorrentes de processos dolorosos na infância (Reichert *et al.*, 2000).

As memórias para eventos precoces podem não estar acessíveis por meio de uma memória explícita (consciente), mas, provavelmente, se incorporam à memória implícita (condicionamento), que é codificada por mudanças estruturais ou funcionais dentro do sistema de dor e mapas neurais (Grunau *et al.*, 2000).

Assim a correta avaliação da dor e o estabelecimento da intervenção adequada para o alívio desta são imprescindíveis para diminuir ou evitar efeitos nocivos para o desenvolvimento do RN. Sabe-se que RN internados em Unidade de Cuidado Intensivo Neonatal (UCIN) são expostos a múltiplos procedimentos médicos ou de enfermagem considerados dolorosos ou potencialmente dolorosos, estimando-se que, em média, cada um sofra cerca de oito a dez eventos dolorosos por dia (Castro, 2001). Estudo mais recente (Carbajal *et al.*, 2008) encontrou a média de procedimentos dolorosos e estressantes em torno de 12 e 16 por dia, respectivamente, nas duas primeiras semanas de vida.

Estudo de Chermont e colaboradores (2003) abordou a utilização de analgesia durante procedimentos dolorosos freqüentemente realizados em berçários ou em UCIN. Foi observado que menos de 15% dos profissionais utilizavam alguma medida analgésica para a punção capilar e para a punção venosa. Em relação à punção lombar, cerca de 20 a 30% dos médicos utilizavam alguma medida analgésica. Em situações sabidamente dolorosas, como no período pós-operatório de laparotomia exploradora, somente 25 a 30% dos médicos que trabalhavam em UCIN relataram empregar medidas para o tratamento da dor.

Em estudo longitudinal, foram investigadas as respostas dos bebês prematuros a punções no calcâneo. Foram observadas diferenças comportamentais e fisiológicas na resposta à dor com até 32 semanas de idade, sugerindo correlação com os procedimentos invasivos (Grunau *et al.*, 2001). Foram observadas diferenças, em longo prazo (meses), na resposta a estímulos dolorosos entre crianças não circuncisadas e circuncisadas no período neonatal sem analgesia (Taddio *et al.*, 1997). Observações experimentais em roedores e primatas sugerem que a administração de diferentes anestésicos, na ausência de um estímulo doloroso, é associada com aumento da neuroapoptose (Sanders *et al.*, 2008). Da mesma forma, evento traumático cirúrgico ou inflamatório, na ausência de analgesia adequada, também

resulta em aumento da neurodegeneração (Anand *et al.*, 1998; Fitzgerald, 2005; Howard *et al.*, 2008).

O SNC imaturo é capaz de responder ao estresse desencadeado por procedimentos dolorosos, sendo, portanto, fundamental que neonatos, bebês e crianças recebam anestesia adequada para a realização de tais procedimentos (Anand & Hickey, 1987). Atualmente, milhões de crianças fazem uso de anestésicos gerais quando submetidas a procedimentos cirúrgicos e estudos de imagem (Cohen *et al.*, 1990). Embora seu uso seja considerado seguro, o risco de complicações permanece maior em RN e lactentes, em comparação com adultos. Evidências na literatura indicam que a exposição precoce a agentes anestésicos pode ser prejudicial ao desenvolvimento do SNC de mamíferos, resultando em seqüelas comportamentais em longo prazo (Ikonomidou *et al.*, 1999; Yon *et al.*, 2006).

Os anestésicos gerais amplamente utilizados na clínica médica incluem os anestésicos intravenosos, como benzodiazepínicos, barbitúricos, cetamina, propofol e etomidato, e os anestésicos inalatórios, como halotano, isoflurano, sevoflurano, desflurano e óxido nitroso. Embora estes compostos sejam quimicamente diferentes, o mecanismo de ação proposto para inibir a atividade neuronal é semelhante, pois, em diferentes níveis, promovem alterações da transmissão sináptica, envolvendo receptores GABA e NMDA (Campagna *et al.*, 2003). Devido à atividade neuronal mediada por receptores GABA e NMDA ser essencial para desenvolvimento do SNC de mamíferos, a exposição a anestésicos gerais pode interferir em sua maturação normal (Varju *et al.*, 2001; de Lima *et al.*, 2004).

### **I.3 - SISTEMA PURINÉRGICO E DOR**

Os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares (ATP, ADP, AMP e adenosina) têm pronunciado efeito em uma variedade de processos biológicos, envolvendo dentre eles, o

desenvolvimento, o funcionamento do sistema cardiovascular, inflamação, sistema imune (Robson *et al.*, 2006) e neurotransmissão (Agteresch *et al.*, 1999; Millan, 1999; Cunha, 2001).

Há evidências de que o ATP e a adenosina atuam como neuromoduladores no processo nociceptivo na medula espinhal (Rhee *et al.*, 2000). O ATP, presente em quase todas as sinapses, variando em sua concentração, é co-armazenado em vesículas sinápticas e co-liberado com outros neurotransmissores, como GABA, noradrenalina e glutamato (Abbracchio *et al.*, 2009).

O ATP tem habilidade para modular a função neural (Burnstock & Williams, 2000; Burnstock, 2007). Seu papel na informação sensorial do processo doloroso foi inicialmente indicado pela demonstração que o ATP é liberado por neurônios sensoriais (Holton & Holton, 1954; Holton, 1959) e, subsequentemente, pela demonstração de que o ATP produz potencial de ação excitatório (Jahr & Jessel, 1983).

A superfamília dos receptores do ATP compreende receptores acoplados à proteína G (P2Y) ou ligados a canais iônicos (P2X) (North, 2002; Burnstock, 2007). A ativação de receptores P2X estimula a excitabilidade celular, aumenta a liberação de aminoácidos excitatórios, estimula a resposta nociceptiva e pode levar à apoptose (Burnstock & Williams, 2000; Burnstock, 2007). A ativação dos receptores P2Y também facilita a neurotransmissão excitatória por modulação da atividade sináptica neurônio-glia (Moriyama *et al.*, 2003).

Há uma diversidade de receptores P2X, que são encontrados sob formas homoméricas (P2X<sub>1-7</sub>) e heteroméricas (P2X<sub>1/2</sub>, P2X<sub>1/4</sub>, P2X<sub>1/5</sub>, P2X<sub>2/3</sub>, P2X<sub>2/6</sub> e P2X<sub>4/6</sub>), estas últimas, são formas recombinantes dos primeiros citados. Esses receptores são encontrados em diversas estruturas, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> e P2X<sub>6</sub> são distribuídos amplamente no SNC; no cerebelo, é encontrado P2X<sub>1</sub> e, no tronco cerebral, P2X<sub>3</sub> (Fields & Burnstock, 2006). P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2/3</sub> e P2X<sub>3</sub> são receptores pré-sinápticos e facilitam a liberação de glutamato (Fields & Burnstock, 2006). A ação nociceptiva do ATP ocorre principalmente por meio da ligação aos receptores P2X<sub>3</sub> e

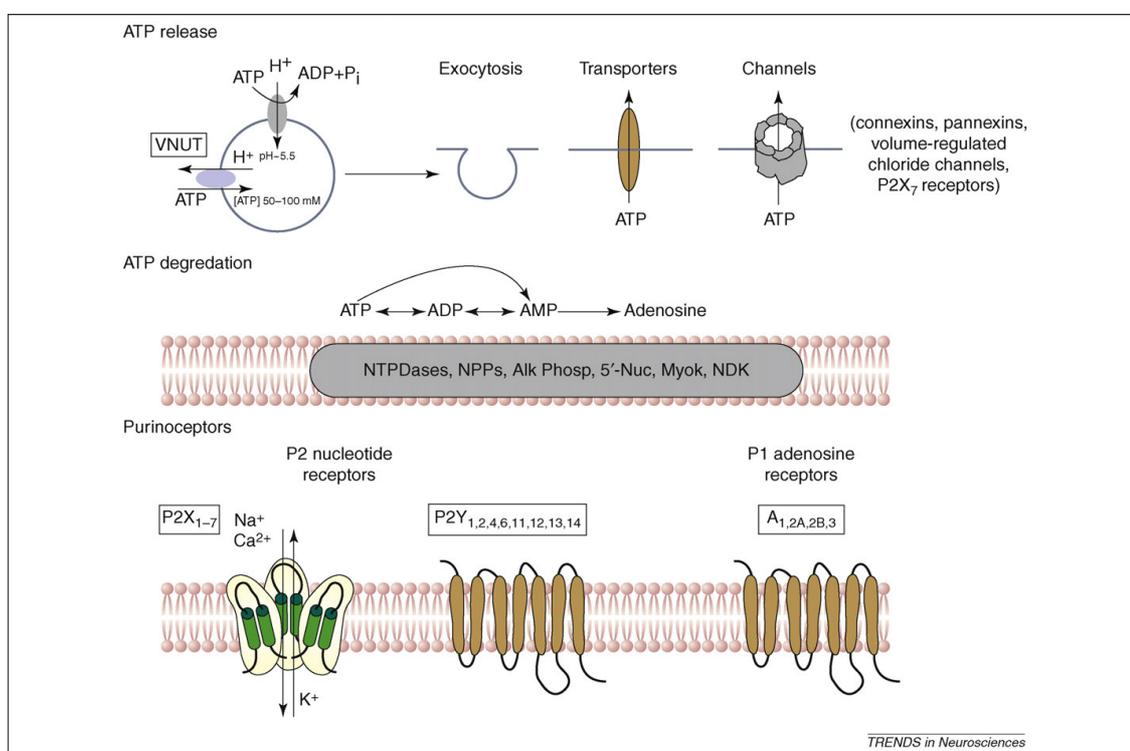
P2X<sub>2/3</sub>, os quais estão amplamente expressos nos neurônios aferentes primários (Burnstock, 2001).

Em mamíferos, oito subtipos dos receptores P2Y foram clonados (P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>). Estes subtipos respondem, em diversos graus, a uma variedade de ligantes endógenos, como ATP, ADP, UTP e UDP, e estão localizados nos mais diversos tecidos (Burnstock, 2007). A expressão dos receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub> em neurônios do gânglio da raiz dorsal sugere que estes possam estar envolvidos na transmissão somatossensorial periférica (Moriyama *et al.*, 2003; Burnstock, 2007). Os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>13</sub> são encontrados no córtex cerebral. Os P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> são ativados principalmente por nucleotídeos difosfatados; enquanto que os P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub> são ativados por purinas e pirimidinas (Fields & Burnstock, 2006).

As ações do ATP extracelular são delimitadas pela sua degradação por enzimas acopladas à membrana plasmática ou encontradas na forma solúvel no meio extracelular (Burnstock, 2007). Assim, por ação dessas enzimas, o ATP é seqüencialmente hidrolisado a ADP e AMP (nucleotídeos). Este último é finalmente hidrolisado a adenosina, o nucleosídeo da adenina. O ATP e cada um de seus metabólitos têm atividade mediada por receptores específicos (Abbracchio *et al.*, 2009).

A adenosina pode exercer sua ação por ativação dos receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, que são subtipos dos receptores P1. Todos estão acoplados à proteína G (receptores metabotrópicos). A adenosina pode regular o processo nociceptivo por ações em sítios espinhais, supraespinhais e periféricos (Sawynok, 1998, 1999). O receptor A<sub>1</sub>, acoplado à proteína G inibitória (Abbracchio *et al.*, 2009), é bastante distribuído pelo SNC, com altos níveis em estruturas como córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, tálamo, tronco e medula espinhal (Fields & Burnstock, 2006); está implicado na neuromodulação inibitória e neuroproteção (Fredholm, 1997). O receptor A<sub>2A</sub> produz ações excitatórias (Sebastião &

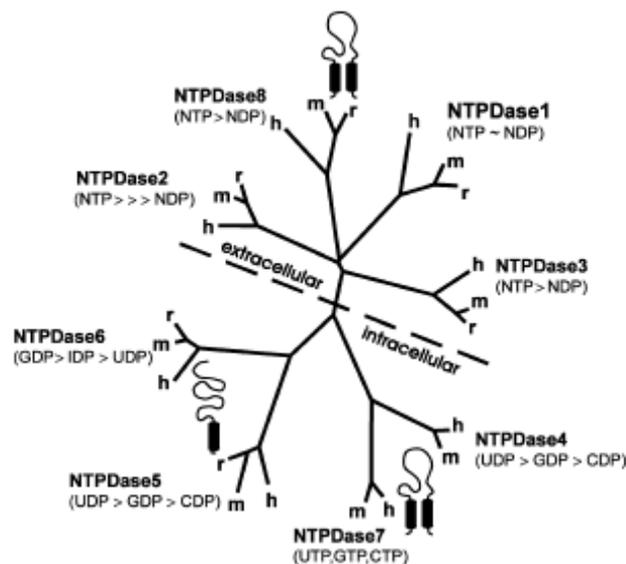
Ribeiro, 1996), podendo exacerbar injúria cerebral (Chen *et al.*, 1999). O receptor  $A_{2B}$  exerce efeito no processo neuroinflamatório regulado pela função glial (Peakman & Hill, 1994; Fiebich *et al.*, 1996a), enquanto que os receptores  $A_3$  podem exercer tanto efeitos protetores quanto deletérios (Von Lubitz, 1999; De Mendonça *et al.*, 2000). A adenosina pode alterar o processo nociceptivo por ação em nociceptores ou transmissão neuronal (Sawynok, 1998, 1999; Dickenson *et al.*, 2000) (Figura 3).



**Figura 3.** Mecanismo de liberação e degradação do ATP, e os purinoceptores. Alk phos, fosfatase alcalina; Myok, mioquinase; NDK, nucleosídeo difosfoquinase; NPPs, fosfodiesterases; 5'-Nuc, 5'-nucleotidase; VNUT, transportador vesicular do nucleotídeo; E-NTPDases, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (figura apresentada em Abbracchio *et al.*, 2009).

O metabolismo do ATP e de outros nucleotídeos ocorre pela ação das enzimas E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), E-NPPs (ectonucleotídeo

pirofosfatase), ecto-fosfatase alcalina, ecto-5'-nucleotidase e E-NPDK (ectonucleosídeo difosfoquinase) (Robson *et al.*, 2006). Oito E-NTPDases foram caracterizadas, sendo que as formas 1, 2, 3 e 8 estão ancoradas à membrana e com sua atividade catalítica voltada para o meio extracelular. As NTPDases 4, 5, 6 e 7 estão localizadas intracelularmente (Robson *et al.*, 2006). As NTPDases localizadas na membrana, com sítio catalítico voltado para o meio extracelular, necessitam de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  em concentração milimolar para atividade máxima e são inativas na ausência desses íons (Zimmermann, 2001). A NTPDase1 também é conhecida como ecto-apirase/CD39 ou ecto-ATPDase (Wang & Guidotti, 1996), e a NTPDase 2/CD39L1 é conhecida como ecto-ATPase (Chadwick & Frischauf, 1997). Cada enzima tem sua particularidade no mecanismo de ação e preferência de substrato. A NTPDase1 hidrolisa o ATP diretamente até AMP, enquanto que a NTPDase2 hidrolisa ATP em ADP, com subsequente hidrólise do ADP (Fields & Burnstock, 2006). A NTPDase1 hidrolisa ATP e ADP igualmente (1:1). As NTPDase3 e 8 têm preferência por ATP, em relação a ADP (3:1 e 2:1, respectivamente) (Lavoie *et al.*, 2004), enquanto que a NTPDase2 tem alta preferência por ATP (30:1) (Zimmermann, 2001; Kukulski *et al.*, 2005). As NTPDases 1, 2 e 3 são expressas no cérebro de mamíferos (Kegel *et al.*, 1997) (Figura 4).



**Figura 4.** Árvore filogenética hipotética derivada dos 22 membros selecionados da família das E-NTPDases (NTPDase 1 a NTPDase 8) de rato (*r*), humano (*h*) e camundongo (*m*), seguindo o alinhamento da seqüência de aminoácidos. O tamanho das linhas indica as diferenças entre as seqüências de aminoácidos. A linha tracejada indica os tipos de NTPDases que apresentam o sítio catalítico voltado para o meio extra ou intracelular. Adaptado de Robson, Sévigny e Zimmermann, 2006.

Os nucleotídeos monofosfatados, como AMP, são hidrolisados pela 5'-nucleotidase, formando adenosina (Zimmermann, 1992). Sete 5'-nucleotidases foram isoladas e caracterizadas, sendo cinco enzimas localizadas no citosol, uma na matriz mitocondrial e uma ancorada à parte externa da membrana, a ecto-5'-nucleotidase/CD37, a qual é expressa em diferentes tecidos, sendo abundante em cólon, rim, cérebro, fígado, coração e pulmões (Yegutkin, 2008).

## **II. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

Neonatos prematuros e a termo, bebês e crianças são freqüentemente expostos a estímulos nocivos repetidos, incluindo vacinações, traumas e procedimentos diagnósticos e terapêuticos diversos. Registros mostram que, em crianças, as dores estão presentes em 25% das consultas ambulatoriais, em 50% das consultas hospitalares e em 80% dos procedimentos terapêuticos e diagnósticos. Embora o alívio da dor seja um dos princípios básicos da medicina, na prática, a analgesia em pacientes com dificuldades de verbalizar sensações e sentimentos é freqüentemente ignorada. É importante salientar a necessidade de adequada atenção à dor do recém-nascido por parte da equipe multiprofissional, mas sabe-se que dores decorrentes de procedimentos invasivos, de doenças ou de traumas e cirurgias ainda são inadequadamente tratadas. É importante ressaltar que há freqüente subtratamento, além do fato de existirem poucos dados na literatura sobre eficácia ou efetividade de fármacos em recém-nascidos. Adicionalmente, estudos morfológicos demonstram que as vias nociceptivas já estão desenvolvidas, mesmo nos prematuros. Alguns pesquisadores vêm esclarecendo os mecanismos da dor nesta faixa etária e sugerem que estes pacientes não somente experimentam dor e estresse da mesma maneira que crianças de maior idade e adultos, mas que suas respostas à estimulação dolorosa podem comprometer suas condições clínicas e fisiológicas.

A criança não é um “adulto em miniatura” e as suas peculiaridades devem ser observadas e respeitadas. Como conseqüência de ações inadequadas no passado, quando freqüentemente as crianças eram submetidas a procedimentos diagnósticos ou cirúrgicos dolorosos sem analgesia/anestesia adequadas, enfrentando situações complementares adversas, em que o sofrimento oriundo de uma dor não percebida ou cuidada não era considerado, hoje vários programas de saúde pública trabalham com os cuidados na infância, visando a prevenção de problemas na vida adulta. Estudos que abordam quadros de dor não

tratados adequadamente na infância têm demonstrado repercussões em sua saúde quando adultos. Estudos em animais, como o aqui desenvolvido, são úteis para o estabelecimento de efeitos adversos de fármacos e de alterações neuroquímicas e comportamentais decorrentes da exposição a fármacos e quadros dolorosos agudos em animais neonatos e permitem suplantar limitações presentes em estudos clínicos, especialmente com pacientes pediátricos.

### **III – HIPÓTESE**

O desenvolvimento deste trabalho baseia-se na hipótese de que a administração de anestésicos gerais, associada ou não a procedimento cirúrgico, no período de desenvolvimento nociceptivo, pode acarretar alterações comportamentais e bioquímicas a curto, médio e longo prazos.

---

#### **IV. OBJETIVOS**

#### **IV.1 - OBJETIVO GERAL**

Avaliar as repercussões de tratamentos farmacológicos e/ou cirúrgico em animais de 14 dias sobre as respostas nociceptiva, bioquímica e comportamental a curto, médio e longo prazos.

#### **IV.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**IV.2.1** - Avaliar a resposta comportamental nociceptiva em P14, P30 e P60 dos animais submetidos à administração de anestésico inalatório ou anestésico injetável associado ou não a procedimento cirúrgico no P14, utilizando teste de *tail-flick*;

**IV.2.2** - Avaliar a resposta comportamental nociceptiva (neurogênica e inflamatória) em P14 e P30 dos animais submetidos à administração de anestésico inalatório ou anestésico injetável, associado ou não a procedimento cirúrgico no P14, utilizando teste da formalina;

**IV.2.3** - Avaliar parâmetros comportamentais no teste do Campo Aberto, em P14, P30 e P60, dos animais submetidos à administração de anestésico inalatório ou anestésico injetável, associado ou não a procedimento cirúrgico no P14;

**IV.2.4** - Avaliar a ansiedade no teste do Labirinto em Cruz Elevado, em P30 e P60, dos animais que foram submetidos à administração de anestésico inalatório ou anestésico injetável, associado ou não a procedimento cirúrgico no P14;

**IV.2.5** - Avaliar as atividades E-NTPDásica e de ecto-5'nucleotidase em sinaptossomas de medula espinhal, em P14 e P30, dos animais submetidos à administração de anestésico injetável ou anestésico inalatório, associado ou não a procedimento cirúrgico no P14.

---

## **V. MATERIAIS E MÉTODOS**

## **V.1 - ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizadas ninhadas de ratos machos *Wistar* provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, os quais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas-moradia, confeccionadas em *plexiglass*, medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de serragem. Os animais foram submetidos a ciclo normal claro/escuro (luzes acesas das 7 às 19 h), com ração padronizada e água *ad libitum*. Considerou-se P0 o dia que foi feita a primeira verificação do nascimento e as ninhadas foram padronizadas com 8 animais somente machos. 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 & Fitzgerald, 2004) e que, no P7, o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central é compatível ao de uma criança nascida a termo (Marsh *et al*, 1997), foram utilizados nesse estudo animais na segunda semana de vida (P14) e, portanto, com o SNC ainda imaturo e compatível com o desenvolvimento do SNC de um neonato humano (Marsh *et al*, 1997). O desmame foi feito em P21.

## **V.2 - DESENHO EXPERIMENTAL**

Este estudo experimental foi desenvolvido com o intuito de avaliar o efeito de anestésicos gerais, associado ou não ao procedimento cirúrgico, sobre as respostas comportamentais e bioquímicas de ratos neonatos. Para tanto, foram escolhidos dois procedimentos de anestesia geral, o primeiro utilizando um anestésico geral inalatório e o segundo utilizando um anestésico geral injetável. Os experimentos foram desenvolvidos utilizando os seguintes desenhos experimentais:

### **Primeiro:**

1. Controle (C);

2. Grupo submetido à anestesia com isoflurano (ISO);
3. Grupo submetido à anestesia (isoflurano) e cirurgia (ISO-CIR).

**Segundo:**

1. Controle (C);
2. Grupo submetido à anestesia com cetamina S+/fentanil (CF);
3. Grupo submetido à anestesia (cetamina S+/fentanil) e cirurgia (CF-CIR).

### **V.3 - TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS**

#### **Primeiro desenho**

1. Controle: Os animais CONTROLE receberam oxigênio (O<sub>2</sub>) individualmente, por 4 min, utilizando-se cone nasal, sem umidificação.

2. Isoflurano: Os animais do grupo ANESTESIA receberam isoflurano (Isoforine®, em frasco de 100 mL, Laboratório Cristália), liberado por cone nasal, conforme descrito por Smith e colaboradores (2004), com pequenas modificações. Foram empregadas concentrações de 5% para a indução e 3% para a manutenção, juntamente com oxigênio (600 mL/min). Os animais do grupo ANESTESIA receberam anestésicos por 4 min, sem sofrer qualquer manipulação adicional.

Isoflurano é um potente agente hipnótico em adultos e RN. No entanto, o RN devido a alterações de farmacocinéticas, características da idade, apresenta menor resposta aos anestésicos voláteis (Ledez, 1987). Devido a este fator, houve necessidade de aumentar de 2% utilizada em estudo realizado por Smith e col, 2004, em que foram utilizados ratos adultos para 3% a concentração de isoflurano na manutenção da anestesia e, assim, realizar o procedimento cirúrgico com segurança.

## **Segundo desenho**

**1. Solução fisiológica (C):** Os animais do grupo CONTROLE receberam solução fisiológica (NaCl a 0,9%), por via intraperitoneal (i.p).

**2.a. Cetamina S+:** Os animais do grupo ANESTESIA receberam cetamina S+ (Ketamin-S®, 50 mg/mL, Laboratório Cristália), por via i.p. Dados da literatura sugerem doses entre 10 mg/kg e 100 mg/kg (Freo & Ori, 2004). No entanto, para adequada realização do procedimento, houve necessidade de uso de dose menor - 20 mg/kg, para que os filhotes retornassem da anestesia mais rapidamente (em 1 h e 1 h 30 min), sem qualquer manipulação adicional.

Cetamina é encontrada sob forma de mistura racêmica (cetamina-S,R). Porém os enantiômeros possuem perfis farmacológicos diferentes. Cetamina S+ é mais efetiva como anestésico e analgésico que a mistura racêmica e que cetamina R- (Reich & Silvay, 1989).

**2.b. Fentanil:** para a obtenção de uma anestesia completa (sedação + analgesia) e realização do procedimento cirúrgico com segurança para os animais, foi necessário usar a associação de cetamina S+ com o agonista opióide fentanil (Fentanest®, 0,05 mg/mL, Laboratório Cristália), na dose de 0,09 mg/kg, administrado por via i.p. Segundo Danneman e Mandrell (1997), a dose indicada de fentanil para ratos neonatos é de 0,16 mg/kg. Neste estudo houve necessidade de redução da dose para 0,09 mg/kg devido à letalidade para dose sugerida. Fentanil foi injetado dez minutos antes da cetamina S+, para produzir analgesia. A anestesia foi verificada por meio da incapacidade de retirar a pata quando estimulada por pinçamento.

#### **V.4 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO**

No grupo CIRURGIA, no 14º dia pós-natal, os animais foram anestesiados com isoflurano ou cetamina S+/fentanil e submetidos ao modelo utilizado para produzir lesão cerebral unilateral em ratos RN, descrito por Levine e modificado por Rice *et al.* (1981), sem produção de hipóxia-isquemia. Foi feita uma incisão na superfície ventral do pescoço, paralela e lateral à traquéia. A artéria carótida comum direita foi manipulada, isolada do nervo e da veia, sendo as bordas aproximadas para cicatrização. Os animais foram mantidos em uma incubadora até sua recuperação, após foram devolvidos às suas respectivas caixas-moradia junto de suas mães. Os grupos controle e anestesia foram submetidos à assepsia da área cirúrgica. Receberam veículo (O<sub>2</sub> ou salina i.p) e anestésico (isoflurano ou cetamina-s/fentanil), respectivamente.

#### **V.5 - PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS**

Os testes comportamentais foram realizados no P14, seis horas após o procedimento anestésico, associado ou não a procedimento cirúrgico. Foram repetidos no P30 e no P60.

Os aparatos foram limpos com álcool entre cada animal testado. Todos os experimentos comportamentais foram executados em ambiente adequado à realização de testes comportamentais e com atenuação dos níveis de ruído.

##### **V.5.1 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA COMPORTAMENTAL NOCICEPTIVA EM TAIL-FLICK**

Foi realizada em aparelho de *tail-flick*, conforme técnica descrita por Castilho e colaboradores (2002). Os ratos foram contidos, utilizando-se toalha de pano, e colocados no aparelho, com a cauda imobilizada sobre um fio metálico, aquecido pela passagem de corrente elétrica. Quando acionado o aquecimento do fio, era disparado automaticamente um

cronômetro digital. A deflexão da cauda, motivada pelo aquecimento do fio metálico, encerrava a medida, ou seja, travava o cronômetro. A leitura era, então, verificada e anotada. O equipamento foi calibrado para se obter uma latência de retirada da cauda (TFL) de 3 a 4 s no grupo controle. O aparelho limita automaticamente a temperatura máxima de 75°C para evitar danos teciduais aos animais. Vinte e quatro horas antes do teste foi realizada uma primeira medida com a finalidade de habituar o animal ao aparelho. No dia do teste, foram realizadas três medidas da latência de retirada da cauda e calculada a média. Os resultados são apresentados como a média das percentagens em relação ao controle  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). As médias dos controles foram definidas como 100%.



**Figura 5.** Analgesímetro para avaliação de latência de retirada da cauda.

### **V.5.2 - AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS NEUROGÊNICA E INFLAMATÓRIA EM TESTE DA FORMALINA**

As respostas neurogênica e inflamatória foram avaliadas pelo teste da formalina. O procedimento foi similar ao previamente descrito por Tjølsen e colaboradores (1992) e Tai e colaboradores (2006), com modificações. O teste consistiu na injeção subcutânea de solução diluída a 2% de formalina em (0,17 mL/kg) (formaldeído PA ® obtido da Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), na parte dorsal da pata traseira. Vinte e quatro horas antes do teste, os animais foram habituados ao ambiente por um período de 10 min, uma vez que a exposição do animal a

um ambiente novo pode induzir antinocicepção (Netto *et al.*, 2004). A formalina induz um padrão de resposta dolorosa bifásica (Aloisi *et al.*, 1994), sendo a 1ª fase (0-15 min) considerada neurogênica e a 2ª fase (15-30 min) considerada inflamatória. Durante o teste, observaram-se as respostas evocadas pela formalina como lambidas, batidas e flexões da pata. Estas respostas foram somadas e expressas em segundos. Obtendo-se um único grupo de respostas para cada fase. Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM do tempo em segundos da soma dos comportamentos.

### **V.5.3 - AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS EM CAMPO ABERTO (CA)**

Tal avaliação foi realizada em uma caixa de madeira envernizada, medindo 50 x 60 x 40 cm, com a face anterior de vidro e o assoalho recoberto com linóleo, dividido em 12 retângulos de 15,0 x 13,3 cm, com linhas escuras. O animal foi gentilmente colocado no canto posterior esquerdo da caixa e deixado livre para explorar o ambiente por 5 min (Bianchin *et al.*, 1993; Carlini *et al.*, 2002). A medida da latência para saída do primeiro quadrado, tempo que o animal levou para colocar as quatro patas no quadrante seguinte, foi tomada como uma medida de ansiedade (Britton & Britton, 1981; Lister, 1990). O número de cruzamentos foi usado como medida de atividade locomotora. O número de *rearings*, definido como comportamento de levantar ambas as patas dianteiras, acima do piso, equilibrando-se nos membros traseiros (Wells *et al.*, 2009), foi utilizado como uma atividade exploratória (Silveira *et al.*, 2005). Avaliação de *grooming*, definido como o comportamento de lambar a cabeça e o corpo, foi utilizada como medida da função biológica de autolimpeza (Spruijt *et al.*, 1992). O número de bolos fecais foi avaliado como uma medida indicativa do nível de ansiedade do animal. Seis medidas foram tomadas durante os 5 min de teste: (1) latência de saída do primeiro quadrante;

(2) número de cruzamentos externos; (3) número de cruzamentos internos; (4) número de *rearings*; (5) tempo de *grooming* (segundos); (6) número de bolos fecais.

Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM do tempo em segundos da latência de saída do primeiro quadrante e de comportamento de *grooming* e do número absoluto dos demais comportamentos analisados.



**Figura 6.** Aparato de Campo Aberto.

#### **V.5.4 - AVALIAÇÃO DE RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS: LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)**

O LCE é um teste utilizado para avaliar o comportamento de ansiedade do animal. O aparelho é composto por dois braços abertos e dois braços fechados (50 cm x 40 cm x 10 cm) que se estende a partir de uma plataforma central comum (10 cm x 10 cm). O labirinto utilizado foi construído a partir de material sintético de PVC preto e elevado a uma altura de 50 cm acima do nível do chão. No início do teste, o animal foi colocado na área central da LCE, de frente para um dos braços abertos, e seu comportamento foi registrado por 5 minutos. O teste baseou-se no fato de que animais mais ansiosos permanecem mais tempo nos braços fechados, onde se sentem mais protegidos. Treit e colaboradores. (1993) sugerem que o fator que mais contribui para a “reação de medo” é a falta das paredes altas dos braços abertos, o que impede a tigmotaxia (proximidade com as paredes do aparato). O menor número de entradas e a redução do tempo despendido nos braços abertos também são comportamentos indicativos de

menor ansiedade (Pellow & File, 1986; Rodgers *et al.*, 1997). Em adição, foram analisados os comportamentos de *grooming*, *rearing* e defecação. Comportamentos como *protected head dipping* e *unprotected head dipping* também foram medidos. São caracterizados por movimentos exploratórios realizados pela cabeça em direção ao chão, sendo que, no primeiro, ao realizar este movimento o animal, encontra-se no centro da plataforma e, no segundo, nos braços abertos (Rodgers & Cole; 1993; 1994). No LCE, foi considerada como a entrada do animal em uma nova área quando colocava as quatro patas (Lynn & Brown, 2009). Os comportamentos avaliados neste experimento foram os seguintes: (1) número de entradas nos braços abertos (EBA); (2) número de entradas nos braços fechados (EBF); (3) tempo gasto nos braços abertos (TBA); (4) tempo gasto nos braços fechados (TBF); (5) número de *protected head dipping* (PHD); (6) número de *unprotected head dipping* (NPHD); (7) tempo de *grooming* (em segundos); (8) número de *rearings*; (9) número de bolos fecais. Os resultados são expressos em média  $\pm$  EPM do tempo em segundos de permanência nos braços abertos, nos braços fechados e de comportamento de *grooming*, e do número absoluto dos demais comportamentos analisados.



**Figura 7.** Labirinto em Cruz Elevado.

## **V.6 – OBTENÇÃO DE AMOSTRAS**

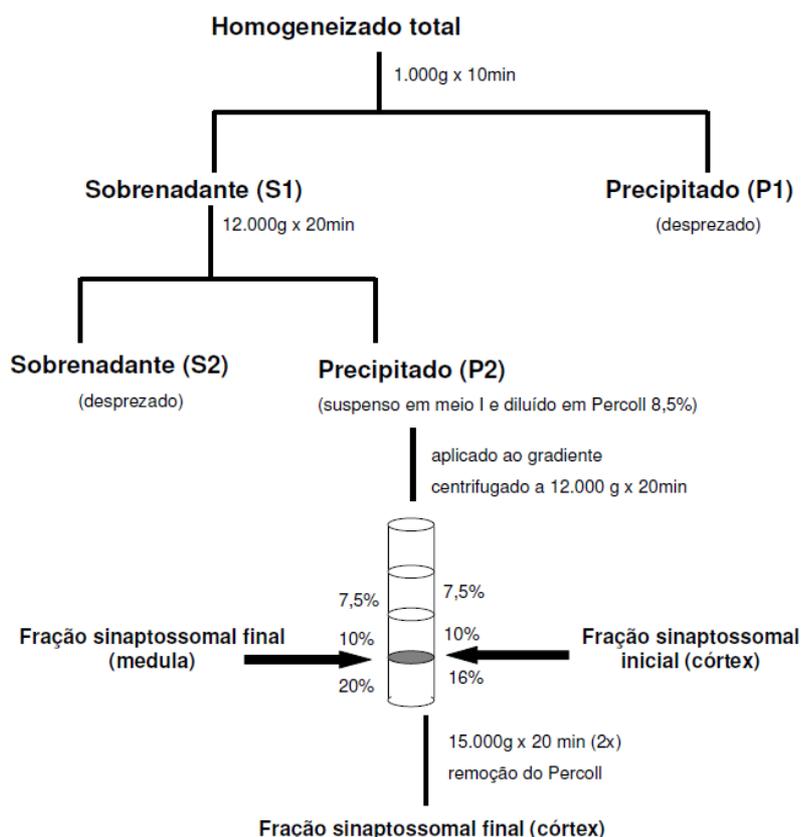
Após a realização de procedimento cirúrgico e anestesia, os animais utilizados para a realização de técnicas bioquímicas foram decapitados, por um experimentador treinado. Este método foi utilizado, porque é necessária a utilização de estruturas do sistema nervoso central que devem estar preservadas. É importante salientar que o modelo previu a verificação dos efeitos bioquímicos de anestésicos, o que nos impossibilitou de utilizar altas doses de anestésicos na morte desses animais.

## **V.7 - TÉCNICAS BIOQUÍMICAS**

### **V.7.1 - PREPARAÇÃO DE SINAPTOSSOMAS**

Os animais foram mortos no P14, imediatamente após a recuperação total da anestesia, ou no P30. A medula espinhal foi removida, e imediatamente foram preparados os sinaptossomas, como descrito por Nagy e colaboradores (1984). As amostras foram homogeneizadas em tampão HEPES, pH 7,5 (medium I, contendo: HEPES 5,0 mM, sacarose 0,32 mM e EDTA 0,1 mM), com um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e êmbolo de teflon a 4°C, com velocidade de 1.000 rpm e 10 movimentos verticais. O homogeneizado foi submetido a uma primeira centrifugação a 1.000 g por 10 minutos. O sedimento (P1), contendo células íntegras, restos de núcleo, endotélio, membranas nucleares e hemácias, foi desprezado, e o sobrenadante (S1) foi coletado e novamente centrifugado a 12.000 g, por 20 minutos, para sedimentar a fração enriquecida com sinaptossomas e mitocôndrias (P2). O sobrenadante (S2) foi descartado, e o sedimento (P2) foi ressuspensado em 0,5 mL de medium I e 4,0 mL de Percoll 8,5%, sendo, então, aplicado em gradiente isosmótico descontínuo de Percoll, previamente preparado em cada experimento que compreende de baixo para cima dos tubos: 4,0 mL da solução a 20% de Percoll, 4,0 mL da solução a 10% e 4,0 mL da mistura de P2 e Percoll a 8,5% (finalizando com a concentração de 7,5%). O pH final dessas soluções foi sempre

ajustado para 7,5. Estes tubos foram centrifugados a 12.000 g, por 20 minutos. A fração sinaptossomal, localizada na interfase 10% e 20%, foi coletada com o auxílio de pipeta automática, com ponteira de plástico, sendo, então, utilizada para os ensaios enzimáticos sempre no dia da preparação (Figura 8).



**Figura 8.** Etapas da preparação da fração sinaptossomal de medula espinal.

## V.7.2 - DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

A quantidade de proteína foi determinada pelo método de *Coomassie Blue* (Bradford, 1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

## V.7.3 - DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A atividade enzimática para hidrólise de ATP e ADP foi determinada em meio de incubação previamente descrito (Battastini *et al.*, 1991; Torres *et al.*, 2002), contendo KCl 5

mM, EDTA 0,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Tris-HCl 45 mM, pH 8 e glicose 10 mM (água Milli-Q foi utilizada para completar o volume de 160 µL do sistema de incubação), totalizando um volume final de 200 µL (160 µL + 20 µL da preparação + 20 µL de substrato). As diferentes preparações (frações enzimáticas) foram adicionadas ao meio de reação e pré-incubadas por 10 minutos a 37°C. A reação foi iniciada pela adição dos substratos de ATP e ADP, na concentração final de 1 mM. O tempo de incubação e o volume da fração (quantidade de proteína) adicionada ao meio de reação foram escolhidos de modo a assegurar a linearidade de formação do produto. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 10% (concentração final de 5%). A seguir, os tubos de ensaio foram colocados no gelo para posterior determinação do fosfato inorgânico liberado, utilizando o método do verde de malaquita (Chan *et al.*,1986). Para o ensaio da ecto-5'-nucleotidase, os sinaptossomas foram incubados com 1 mM de AMP em um meio contendo MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl e sacarose 0,15 M pH 7,5, seguindo-se a determinação do fosfato inorgânico liberado pelo mesmo método descrito acima. Para determinação do fosfato inorgânico liberado, foi necessária diluição de acordo com cada nucleotídeo. Para ATP, alíquotas de 100 µL foram retiradas e diluídas em 300 µL de água Milli-Q (volume final de 400 µL); para ADP e AMP, alíquotas de 200 µL foram retiradas e diluídas em 200 µL de água Milli-Q (volume final de 400 µL). As amostras foram analisadas em triplicatas, sendo a hidrólise não-enzimática corrigida por meio de controles feitos nas mesmas condições da amostra, exceto que a fração enzimática foi adicionada após a adição do ácido tricloroacético. As atividades específicas foram expressas em nanomoles de fosfato inorgânico liberado por minuto, por miligrama de proteína (nmoles Pi.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>).

## **V.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos em média ± Erro Padrão da Média (EPM). Para as comparações entre os grupos, foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Student-

Newman-Keuls (SNK), quando indicado. Dados foram considerados significativamente diferentes com  $P < 0,05$ .

## **V.9 - ASPECTOS ÉTICOS**

Os procedimentos do projeto obedeceram a normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS*) (Goldim & Raymundo, 1997). O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

---

## **VI. RESULTADOS**

## VI.1 - PRIMEIRO DESENHO EXPERIMENTAL

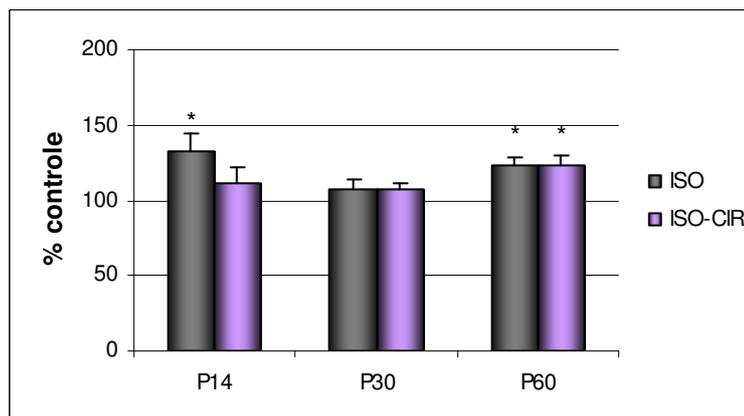
### VI.1.1 - Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta nociceptiva em P14, P30 e P60

Avaliou-se o efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta nociceptiva no teste do TFL, em P14 (seis horas após a intervenção), P30 e P60.

Quando analisou-se o TFL no P14, seis horas após a intervenção, observou-se diferença significativa entre os grupos. Os animais que receberam somente isoflurano (grupo ISO) mostraram um aumento significativo no TFL, quando comparados aos animais do grupo controle (C: 100; ISO:  $132,33 \pm 11,86$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,20)} = 3,697$ ;  $P < 0,05$ ). No entanto, o grupo submetido à cirurgia, sob anestesia com isoflurano não diferiu dos grupos controle e submetido apenas à anestesia. Portanto, a cirurgia reverteu parcialmente o efeito do isoflurano (ISO-CIR:  $111,19 \pm 10,13$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 7-8$  animais/ grupo - Figura 9).

Quando a resposta nociceptiva foi avaliada dezesseis dias após a intervenção (P30), não observamos diferença significativa entre os grupos experimentais (C: 100; ISO:  $107,60 \pm 6,21$ ; ISO-CIR:  $107,60 \pm 3,98$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 10-11$  animais/ grupo - Figura 9).

Quando a resposta nociceptiva foi avaliada quarenta e seis dias após intervenção (P60) os animais que receberam isoflurano (grupos ISO e ISO-CIR) mostraram aumento significativo no TFL comparados ao grupo controle (C: 100; ISO:  $122,95 \pm 5,48$ ; ISO-CIR;  $122,95 \pm 6,71$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,22)} = 7,021$ ;  $P < 0,01$ ;  $n = 10-11$  animais/ grupo – Figura 9).



**Figura 9.** Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta nociceptiva no aparato de TFL, em P14, P30 e P60. Dados apresentados em porcentagem do controle e expressos como média  $\pm$  EPM, tendo como média  $\pm$  EPM dos valores absolutos dos animais controles: (P14)  $3,83 \pm 0,24$ ; (P30)  $4,90 \pm 0,18$ ; (P60)  $4,88 \pm 0,30$ .

\*Diferença significativa em relação ao grupo controle (P14: ANOVA de uma via,  $F_{(2,20)} = 3,697$ ;  $P < 0,05$ ; P60: ANOVA de uma via,  $F_{(2,22)} = 7,021$ ;  $P < 0,01$ );  $n = 7-11$  animais/grupo.

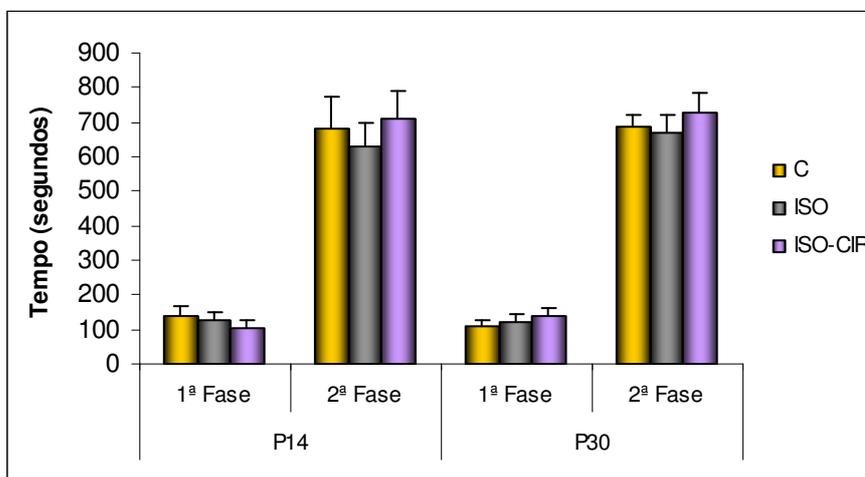
### VI.1.2 - Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas neurogênica e inflamatória em P14 e P30

Avaliou-se o efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas neurogênica e inflamatória, analisadas no teste da formalina, em P14 (seis horas após intervenção) e P30.

Em P14, seis horas após a intervenção, não se observou diferença significativa entre os grupos experimentais, tanto na 1ª fase (C:  $135,80 \pm 33,27$ ; ISO:  $129,50 \pm 22,28$ ; ISO-CIR:  $105,86 \pm 21,55$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ), quanto na 2ª fase (C:  $683,20 \pm 89,21$ ; ISO:  $630,17 \pm 70,71$ ; ISO-CIR:  $711,14 \pm 76,48$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 5-7$  animais/ grupo - Figura 10).

Quando avaliaram-se as respostas neurogênica e inflamatória dezesseis dias após a intervenção (P30), não se observou diferença significativa entre os grupos experimentais, tanto na 1ª fase (C:  $111,75 \pm 16,33$ ; ISO:  $121,42 \pm 21,92$ ; ISO-CIR:  $136,50 \pm 27,60$ ; ANOVA de uma

via,  $P>0,05$ ); quanto na 2ª fase (C:  $687,50\pm35,80$ ; ISO:  $667,08\pm55,96$ ; ISO-CIR:  $728,90\pm56,35$ ; ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n = 8-12$  animais / grupo - Figura 10).



**Figura 10.** Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas neurogênica e inflamatória, avaliadas no teste da formalina, realizado em P14 e em P30. Dados apresentados como soma do tempo em segundos dos comportamentos analisados e expressos em média  $\pm$  EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n = 5-12$  animais/grupo).

### VI.1.3 - Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta comportamental em P14, P30 e P60, no teste do campo aberto (CA)

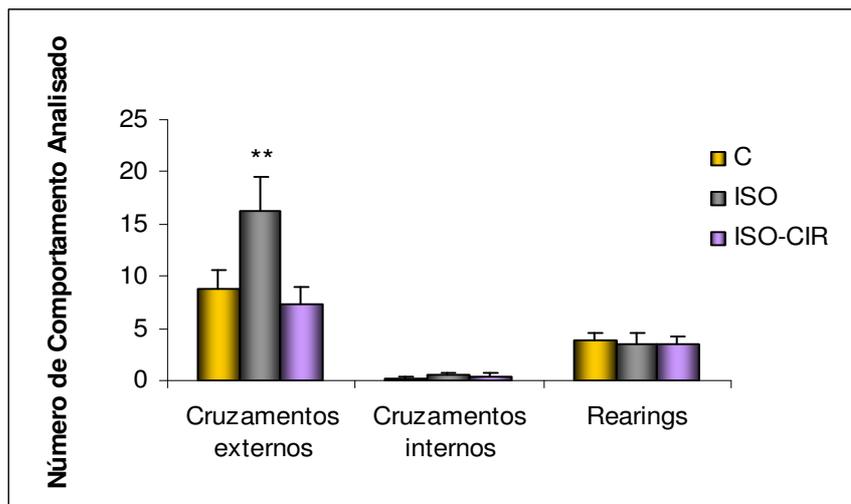
Avaliou-se o efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico nas respostas comportamentais analisadas no teste do CA, em P14 (seis horas após a intervenção), P30 e P60.

Quando foi analisado o número de cruzamentos externos, de cruzamentos internos e *rearings*, no P14, 6 horas após a intervenção, observou-se um aumento significativo no número de cruzamentos externos no grupo ISO em relação aos demais grupos (C:  $8,80\pm1,75$ ; ISO:  $16,23\pm3,34$ ; ISO-CIR:  $7,30\pm1,72$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,34)} = 3,857$ ;  $P < 0,05$  - Figura 11). Não houve diferença significativa entre os grupos nos demais comportamentos analisados,

como cruzamentos internos (C:  $0,20 \pm 0,20$ ; ISO:  $0,46 \pm 0,22$ ; ISO-CIR:  $0,38 \pm 0,38$ ) e *rearings* (C:  $3,80 \pm 0,81$ ; ISO:  $3,54 \pm 0,96$ ; ISO-CIR:  $3,54 \pm 0,57$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 10-13$  animais / grupo - Figura 11). Os resultados relativos ao número de bolos fecais foram suprimidos, uma vez que os grupos não produziram bolos fecais durante o teste.

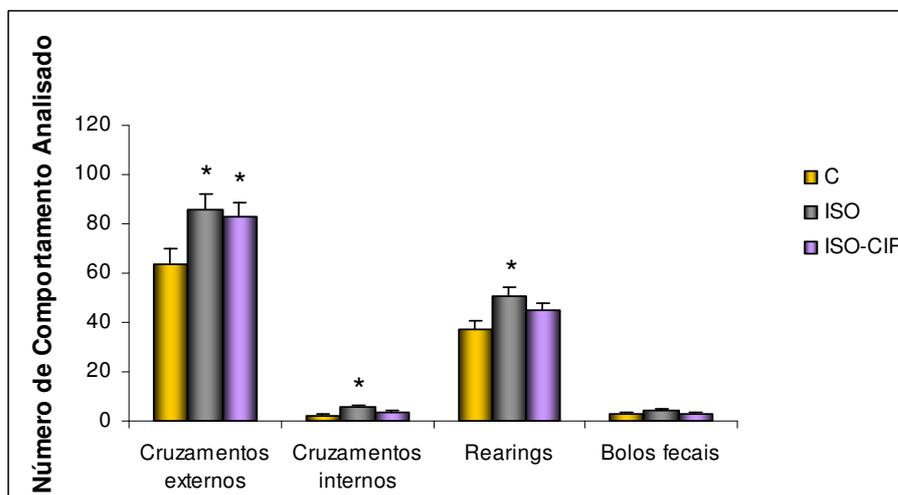
Quando foi analisado o número de cruzamentos externos, de cruzamentos internos, *rearings* e bolos fecais, dezesseis dias após a intervenção (P30) observou-se que, quando comparados ao grupo controle, os animais que receberam isoflurano (grupos ISO e ISO-CIR) mostraram um aumento significativo no número de cruzamentos externos (C:  $63,92 \pm 5,86$ ; ISO:  $86,00 \pm 6,27$ ; ISO-CIR:  $83,19 \pm 5,40$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,42)} = 3,711$ ;  $P < 0,05$  - Figura 12). Houve também um aumento significativo no número de cruzamentos internos (C:  $2,25 \pm 0,54$ ; ISO:  $5,44 \pm 0,84$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,42)} = 4,842$ ;  $P < 0,02$ ) e *rearings* (C:  $36,92 \pm 3,81$ ; ISO:  $51,00 \pm 3,34$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,42)} = 4,474$ ;  $P < 0,02$ ) nos animais que receberam isoflurano, sem intervenção cirúrgica (grupo ISO), comparados ao grupo controle. No entanto, o grupo ISO-CIR não apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos nos comportamentos de cruzamentos internos e *rearings* (ISO-CIR:  $3,56 \pm 0,65$ ;  $45,25 \pm 2,61$ ; respectivamente, ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 12-16$  animais/grupo - Figura 12). Não foram observadas diferenças significativas no número de bolos fecais entre os grupos (C:  $3,00 \pm 0,74$ ; ISO:  $4,19 \pm 0,68$ ; ISO-CIR:  $2,75 \pm 0,53$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$  - Figura 12).

Quando foi analisado o número de cruzamentos externos, de cruzamentos internos, *rearings* e bolos fecais, quarenta e seis dias após a intervenção (P60), não houve diferença significativa entre os grupos nos comportamentos analisados: cruzamentos externos (C:  $55,13 \pm 3,89$ ; ISO:  $49,88 \pm 5,51$ ; ISO-CIR:  $50,25 \pm 6,39$ ); cruzamentos internos (C:  $4,25 \pm 1,10$ ; ISO:  $3,50 \pm 0,87$ ; ISO-CIR:  $2,00 \pm 0,7$ ); *rearings* (C:  $21,50 \pm 2,29$ ; ISO  $16,50 \pm 2,31$ ; ISO-CIR:  $15,75 \pm 2,40$ ) e bolos fecais (C:  $3,50 \pm 1,05$ ; ISO:  $3,25 \pm 0,82$ ; ISO-CIR:  $4,25 \pm 0,92$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 8$  animais/grupo - Figura 13).



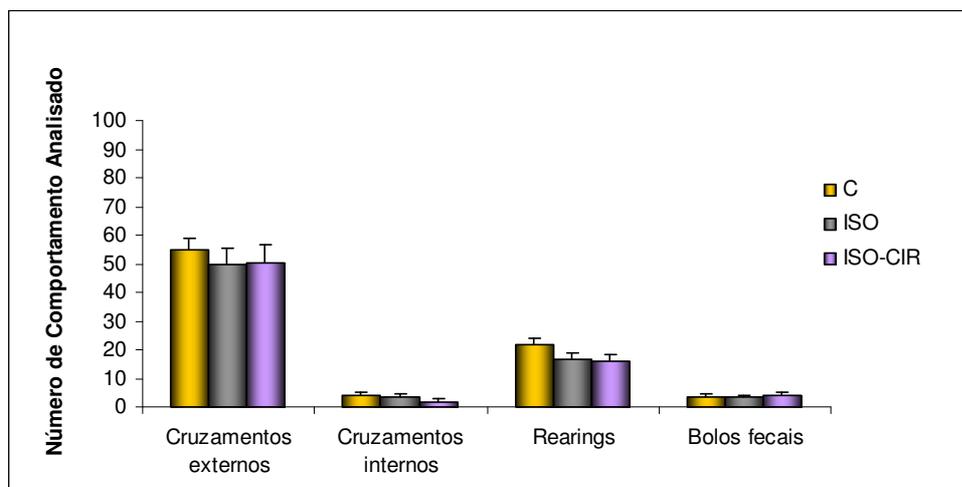
**Figura 11.** Efeito da administração isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre o número de cruzamentos externos, de cruzamentos internos e de *rearings*, avaliados no CA, em P14. Dados apresentados em número de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM.

\*\*Diferença significativa em relação aos demais grupos (ANOVA de uma via,  $F_{(2,34)} = 3,857$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 10-13$  animais/grupo).



**Figura 12.** Efeito da administração isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre o número de cruzamentos externos, de cruzamentos internos e de *rearings*, avaliados no CA, em P30. Dados apresentados em número de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM.

\*Diferença significativa em relação ao controle (cruzamentos externos: ANOVA de uma via,  $F_{(2,42)} = 3,711$ ;  $P < 0,05$ ; cruzamentos internos: ANOVA de uma via,  $F_{(2,42)} = 4,842$ ;  $P < 0,02$ ; *rearing*: ANOVA de uma via,  $F_{(2,42)} = 4,474$ ;  $P < 0,02$ ;  $n = 12-16$  animais / grupo).



**Figura 13.** Efeito da administração isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre o número de cruzamentos externos, de cruzamentos internos e de *rearings*, avaliados no CA, em P60. Dados apresentados em número de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 8$  animais / grupo).

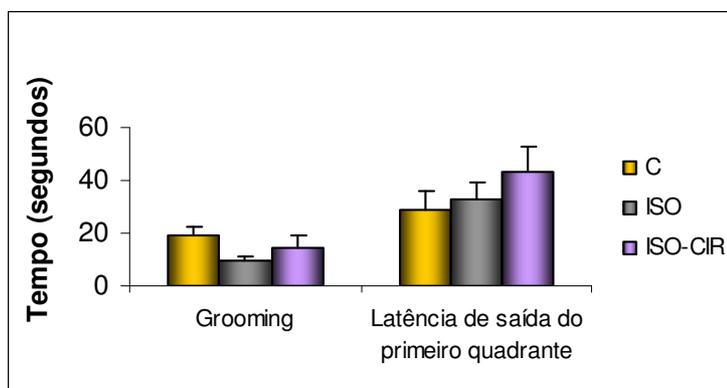
As demais respostas comportamentais avaliadas no teste do CA, em P14, seis horas após a intervenção, P30 e P60, foram latência de saída do primeiro quadrante e tempo de *grooming*.

No P14, 6 horas após a intervenção, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos comportamentos de latência de saída do primeiro quadrante (C:  $29,10 \pm 6,79$ ; ISO:  $33,00 \pm 6,10$ ; ISO-CIR:  $43,38 \pm 9,41$ ) e *grooming* (C:  $19,60 \pm 2,81$ ; ISO:  $9,69 \pm 1,73$ ; ISO-CIR:  $14,69 \pm 4,24$ ) (ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 10-13$  animais / grupo - Figura 14).

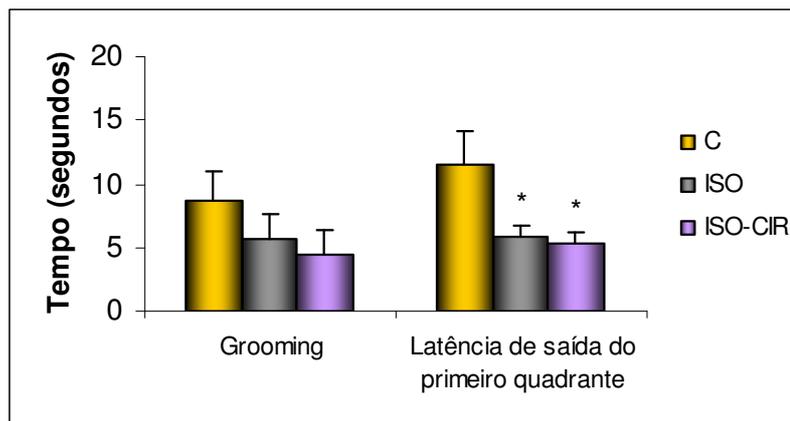
Quando os comportamentos foram avaliados dezesseis dias após a intervenção (P30), observou-se uma diminuição significativa da latência de saída do primeiro quadrante entre os animais que receberam isoflurano (grupos ISO e ISO-CIR), em relação ao grupo controle (C:  $11,50 \pm 2,71$ ; ISO:  $5,81 \pm 0,89$ ; ISO-CIR:  $5,38 \pm 0,90$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,42)} = 4,635$ ;  $P < 0,02$  - Figura 15). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no

comportamento de *grooming* (C:  $8,67 \pm 2,36$ ; ISO:  $5,63 \pm 1,94$ ; ISO-CIR:  $4,44 \pm 1,93$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$  – Figura 15).

Ao se verificar a latência de saída do primeiro quadrante e o *grooming* quarenta e seis dias após a intervenção (P60), observou-se que os animais do grupo cirurgia (ISO-CIR) apresentaram uma diminuição significativa na latência de saída do primeiro quadrante, quando comparados aos do grupo controle (C:  $5,00 \pm 0,93$ ; ISO-CIR:  $2,13 \pm 0,55$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,22)} = 3,512$ ;  $P < 0,05$  - Figura 16). No entanto, o grupo de animais que recebeu apenas isoflurano (grupo ISO) não apresentou diferença em relação aos demais grupos (ISO:  $4,25 \pm 0,86$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ). Não foi observada diferença entre os grupos no comportamento de *grooming* (C:  $20,00 \pm 6,06$ ; ISO:  $17,88 \pm 2,73$ ; ISO-CIR:  $17,25 \pm 4,55$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 8$  animais/grupo - Figura 16).

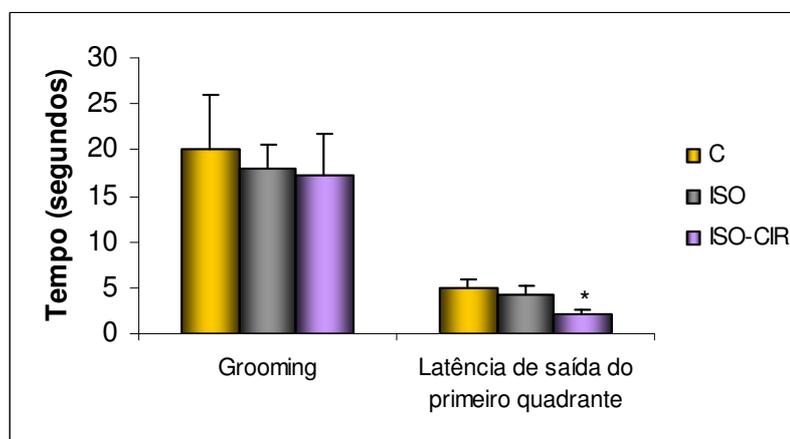


**Figura 14.** Efeito da administração isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a latência de saída do primeiro quadrante e o tempo (s) de *grooming*, avaliados no CA, em P14. Dados apresentados como tempo em segundos de cada comportamento analisado e expressos em média  $\pm$  EPM. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos comportamentos analisados (ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 10-13$  animais/grupo).



**Figura 15.** Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a latência de saída do primeiro quadrante e o tempo (s) de *grooming*, avaliados no CA, em P30. Dados apresentados como tempo em segundos de cada comportamento analisado e expressos em média  $\pm$  EPM.

\*Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA de uma via,  $F_{(2,42)}=4,635$ ;  $P<0,02$ ;  $n = 12-16$  animais / grupo).



**Figura 16.** Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a latência de saída do primeiro quadrante e o tempo (s) de *grooming*, avaliados no CA, em P60. Dados apresentados como tempo em segundos de cada comportamento analisado e expressos em média  $\pm$  EPM.

\*Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA de uma via,  $F_{(2,22)} = 3,512$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$  animais / grupo).

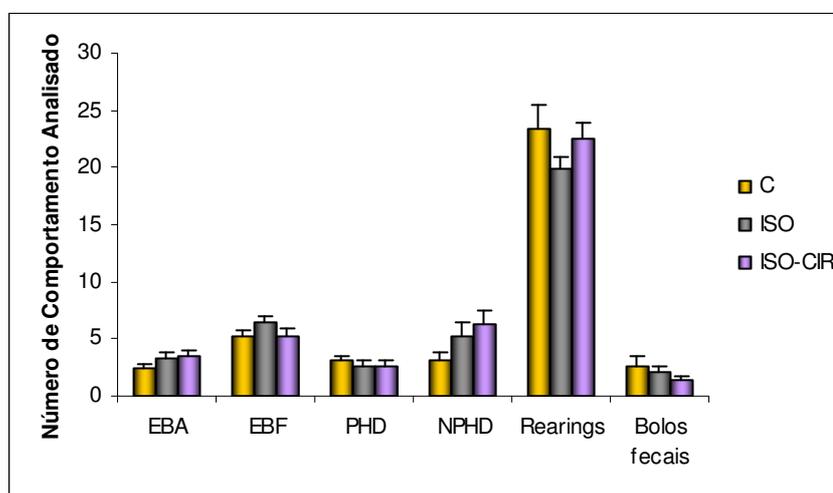
#### VI.1.4 - Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta comportamental em P30 e P60, no Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Considerando os resultados comportamentais obtidos com o campo aberto, que sugeriram alteração no limiar de ansiedade dos animais que receberam isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, optou-se por utilizar LCE. Como os animais em P14 não apresentaram os comportamentos indicativos de ansiedade no LCE, optou-se por avaliar apenas animais em P30 e em P60. Os comportamentos avaliados neste experimento foram: número de entradas nos braços abertos (EBA); número de entradas nos braços fechados (EBF); o tempo gasto nos braços abertos (TBA); o tempo gasto nos braços fechados (TBF); número de *protected head dipping* (PHD); número de *unprotected head dipping* (NPHD); tempo de *grooming* (em segundos); número de *rearings*; número de bolos fecais. Os resultados foram apresentados conforme as medidas utilizadas: número absoluto ou segundos.

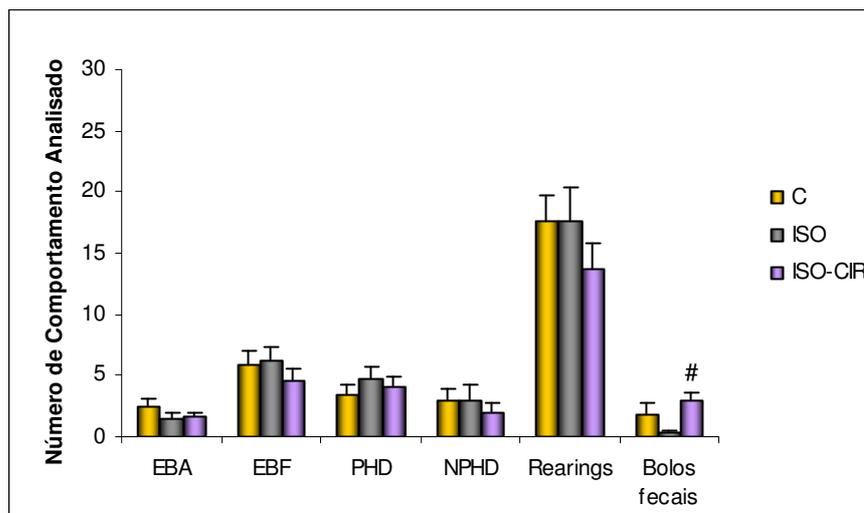
Quando analisou-se o efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta comportamental no teste do LCE, dezesseis dias após a intervenção (P30), não se observou diferença significativa entre os grupos nos seguintes comportamentos analisados: EBA (C: 2,40±0,43; ISO: 3,25±0,64; ISO-CIR: 3,50±0,52); EBF (C: 5,30±0,52; ISO: 6,44±0,47; ISO-CIR: 5,31±0,56); PHD: (C: 3,10±0,3; ISO: 2,63±0,47; ISO-CIR: 2,69±0,42); NPHD (C: 3,10±0,74; ISO: 5,25±1,28; ISO-CIR: 6,25±1,19); *rearings* (C: 23,40±2,00; ISO: 19,81±1,15; ISO-CIR: 22,56±1,34); bolos fecais (C: 2,70±0,75; ISO: 2,06±0,62; ISO-CIR: 1,31±0,47; ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n = 10-16$  animais/ grupo – Figura 17).

Quando analisou-se o efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta comportamental no teste do LCE, quarenta e seis dias após a intervenção (P60), observou-se um aumento no número de bolos fecais do grupo ISO-

CIR em relação ao grupo ISO (C:  $1,88 \pm 0,87$ ; ISO:  $0,25 \pm 0,25$ ; ISO-CIR:  $2,88 \pm 0,67$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,22)} = 4,139$ ;  $P < 0,05$ ). Não se observou diferença significativa entre os grupos nos demais comportamentos analisados: EBA (C:  $2,50 \pm 0,57$ ; ISO:  $1,50 \pm 0,46$ ; ISO-CIR:  $1,63 \pm 0,32$ ); EBF (C:  $5,88 \pm 1,13$ ; ISO:  $6,25 \pm 1,13$ ; ISO-CIR:  $4,63 \pm 0,89$ ); PHD: (C:  $3,50 \pm 0,68$ ; ISO:  $4,75 \pm 0,90$ ; ISO-CIR:  $4,13 \pm 0,79$ ); NPHD (C:  $2,88 \pm 0,97$ ; ISO:  $2,88 \pm 1,36$ ; ISO-CIR:  $2,00 \pm 0,76$ ); *rearings* (C:  $17,63 \pm 2,09$ ; ISO:  $17,63 \pm 2,81$ ; ISO-CIR:  $13,75 \pm 1,99$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 8$  animais/ grupo - Figura 18).



**Figura 17.** Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas comportamentais avaliadas no LCE, em P30. Dados apresentados em número de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 10-16$  animais/ grupo).

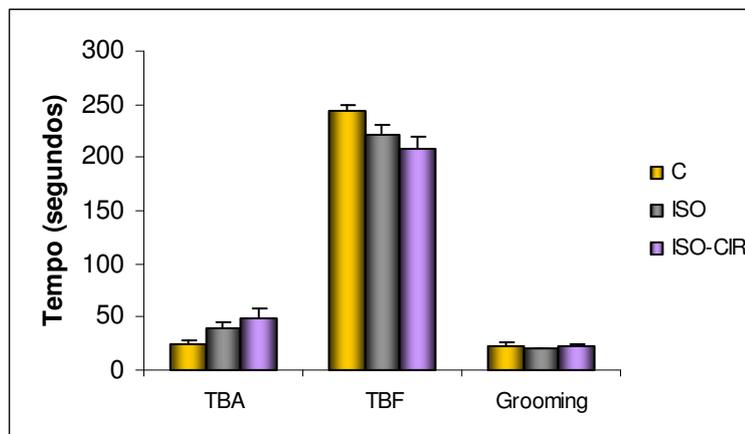


**Figura 18.** Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas comportamentais avaliadas no LCE, em P60. Dados apresentados em número de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM.

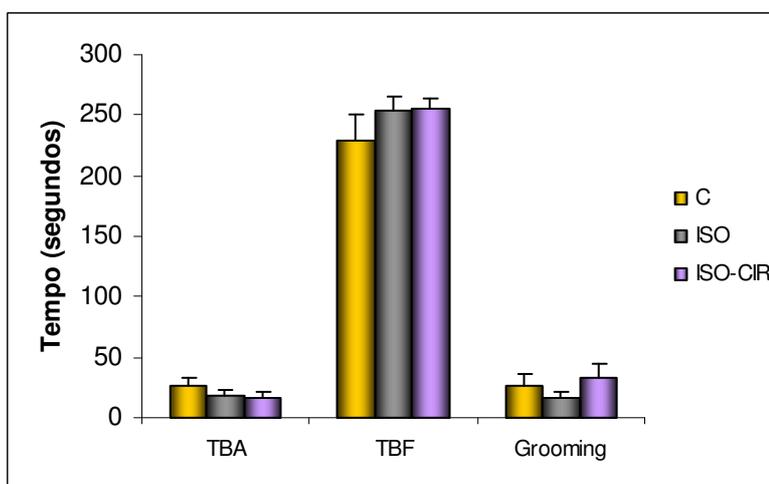
<sup>#</sup>Diferença significativa em relação ao grupo ISO (ANOVA de uma via,  $F_{(2,22)} = 4,139$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$  animais/grupo).

Quando avaliou-se o efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre os comportamentos de TBA, TBF e *grooming* em P30, não se observou diferença significativa entre os grupos nos comportamentos citados: TBA (C:  $23,60 \pm 4,96$ ; ISO:  $38,50 \pm 7,43$ ; ISO-CIR:  $48,75 \pm 8,64$ ); TBF (C:  $244,00 \pm 6,11$ ; ISO:  $221,13 \pm 10,20$ ; ISO-CIR:  $207,38 \pm 12,75$ ); *grooming* (C:  $11,50 \pm 2,85$ ; ISO:  $8,75 \pm 1,38$ ; ISO-CIR:  $6,44 \pm 1,80$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 10-16$  animais/grupo - Figura 19).

Quando avaliou-se o efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre os comportamentos de TBA, TBF e *grooming* em P60, não se observou diferença significativa entre os grupos nos comportamentos citados: TBA (C:  $25,88 \pm 7,40$ ; ISO:  $17,38 \pm 5,68$ ; ISO-CIR:  $17,00 \pm 4,49$ ); TBF (C:  $229,50 \pm 20,85$ ; ISO:  $254,63 \pm 10,36$ ; ISO-CIR:  $255,38 \pm 8,12$ ); *grooming* (C:  $26,50 \pm 9,52$ ; ISO:  $16,38 \pm 4,48$ ; ISO-CIR:  $33,13 \pm 11,24$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 8$  animais/grupo - Figura 20).



**Figura 19.** Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas comportamentais de TBA, TBF e *grooming*, avaliadas no LCE, em P30. Dados apresentados em segundos (média  $\pm$  EPM). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n= 10-16$  animais/grupo).



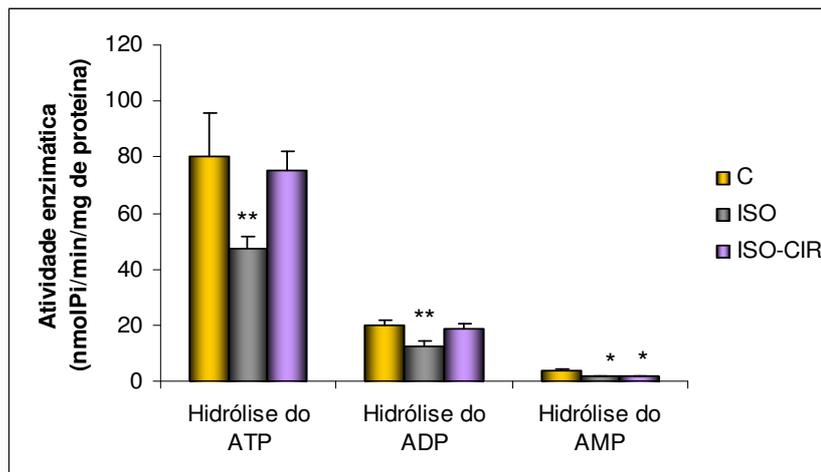
**Figura 20.** Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas comportamentais de TBA, TBF e *grooming*, avaliadas no LCE, em P60. Dados apresentados como tempo em segundos de cada comportamento analisado e expressos em média  $\pm$  EPM. Não houve diferença significativa (ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n = 8$  animais/ grupo).

### **VI.1.5 - Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina em sinaptossomas de medula espinhal de ratos**

Avaliou-se o efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, em ratos com 14 dias, sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina em sinaptossomas de medula espinhal, imediatamente após a intervenção e em P30.

Em P14, houve uma diminuição significativa na atividade de hidrólise de ATP e ADP no grupo que recebeu somente isoflurano (grupo ISO), comparado aos demais grupos (ATP: C:  $80,05 \pm 15,62$ ; ISO:  $47,17 \pm 4,73$ ; ISO-CIR:  $75,47 \pm 6,45$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,30)} = 4,055$ ;  $P < 0,05$ ; ADP: C:  $20,19 \pm 1,75$ ; ISO:  $12,21 \pm 1,84$ ; ISO-CIR:  $18,83 \pm 1,49$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,30)} = 6,338$ ;  $P < 0,01$ ). Por outro lado, os animais que receberam isoflurano (grupo ISO e ISO-CIR) mostraram uma diminuição significativa na atividade de hidrólise do AMP, comparados ao grupo controle (C:  $3,73 \pm 0,85$ ; ISO:  $1,72 \pm 0,41$ ; ISO-CIR:  $1,63 \pm 0,50$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,30)} = 3,908$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 9-12$  animais/grupo - Figura 21).

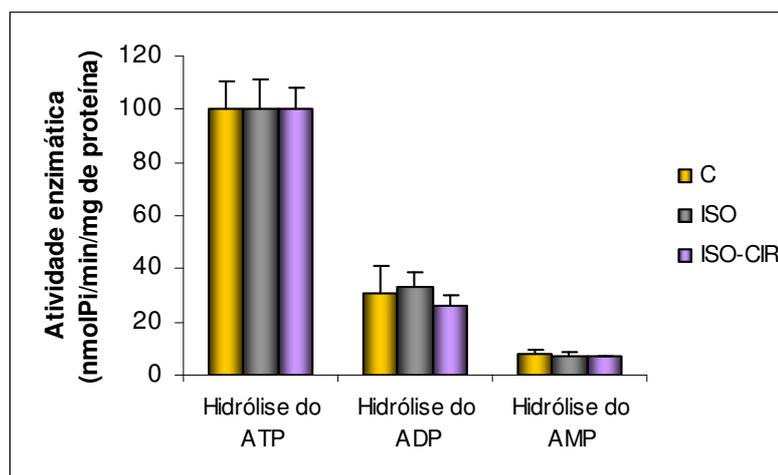
Em P30, não foi observada diferença significativa entre os grupos quanto à hidrólise dos três nucleotídeos [ATP: C ( $100,12 \pm 10,42$ ); ISO ( $100,60 \pm 10,81$ ); ISO-CIR: ( $99,89 \pm 8,51$ ); ADP: C ( $30,90 \pm 9,96$ ); ISO ( $33,11 \pm 5,36$ ); ISO-CIR ( $25,97 \pm 4,05$ ); AMP: C ( $7,98 \pm 1,67$ ); ISO ( $7,07 \pm 1,25$ ); ISO-CIR ( $6,93 \pm 0,55$ ); ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 4-6$  animais/grupo - Figura 22].



**Figura 21.** Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a atividade enzimática de hidrólise dos nucleotídeos de adenina em medula espinhal, em P14. Dados apresentados em atividade enzimática e expressos em nmolPi/min/mg de proteína (média  $\pm$  EPM).

\*Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA de uma via,  $F_{(2,30)} = 3,908$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 9-12$  animais/grupo).

\*\*Diferença significativa em relação aos demais grupos (hidrólise do ATP: ANOVA de uma via,  $F_{(2,30)} = 4,055$ ;  $P < 0,05$ ; hidrólise do ADP: ANOVA de uma via,  $F_{(2,30)} = 6,338$ ;  $P < 0,01$ ).



**Figura 22.** Efeito da administração de isoflurano, associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a atividade enzimática de hidrólise dos nucleotídeos de adenina em medula espinhal, em P30. Dados apresentados em atividade enzimática e expressos em nmolPi/min/mg de proteína (média  $\pm$  EPM). Não houve diferença significativa (ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 4-6$  animais/grupo).

## VI.2 – SEGUNDO DESENHO EXPERIMENTAL

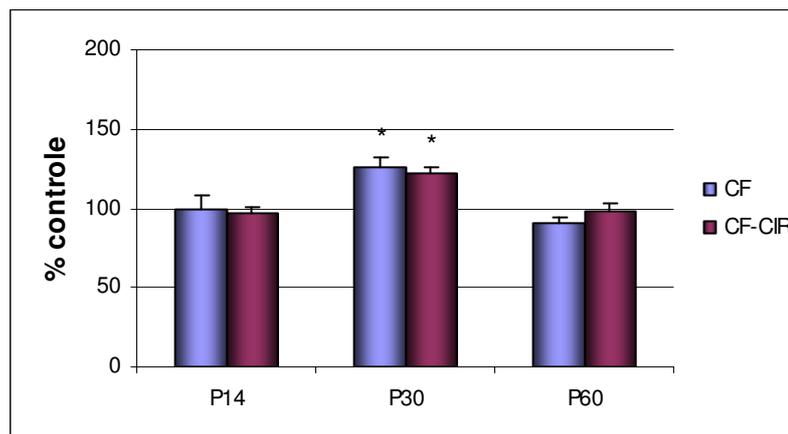
### VI.2.1 - Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta nociceptiva em P14, P30 e P60

Avaliou-se o efeito da administração de anestésicos gerais injetáveis (cetamina S+/fentanil), associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta nociceptiva, analisada no teste do TFL, em P14 (seis horas após a intervenção), P30 e P60.

Em P14, seis horas após a intervenção, não se observou diferença significativa entre os grupos no TFL (C: 100; CF: 99,48±8,58; CF-CIR: 96,62±4,14; ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n = 6-7$  animais/ grupo - Figura 23).

Quando a resposta nociceptiva foi avaliada dezesseis dias após a intervenção (P30), observou-se um aumento significativo do TFL nos animais que receberam cetamina S+/fentanil (grupo CF e CF-CIR) em relação ao grupo controle (C: 100; CF: 126,16±6,00; CF-CIR: 121,49±4,67; ANOVA de uma via,  $F_{(2,36)} = 12,046$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 11-14$  animais/ grupo - Figura 23).

Quando a resposta nociceptiva foi avaliada quarenta e seis dias após a intervenção (P60), não se observou diferença significativa entre os grupos no TFL (C: 100±10,63; CF: 89,94±3,97; CF-CIR: 98,12±4,62; ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n = 5-6$  animais/ grupo - Figura 23).



**Figura 23.** Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta nociceptiva, avaliada no aparato de TFL, em P14, P30 e P60. Dados apresentados em porcentagem do controle (média  $\pm$  EPM). As médias dos valores absolutos dos grupos controles utilizadas foram (P14)  $3,85 \pm 0,22$ ; (P30)  $5,15 \pm 0,26$ ; (P60)  $4,89 \pm 0,52$ .

\*Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA de uma via,  $F_{(2,36)} = 12,046$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 5-14$  animais/ grupo).

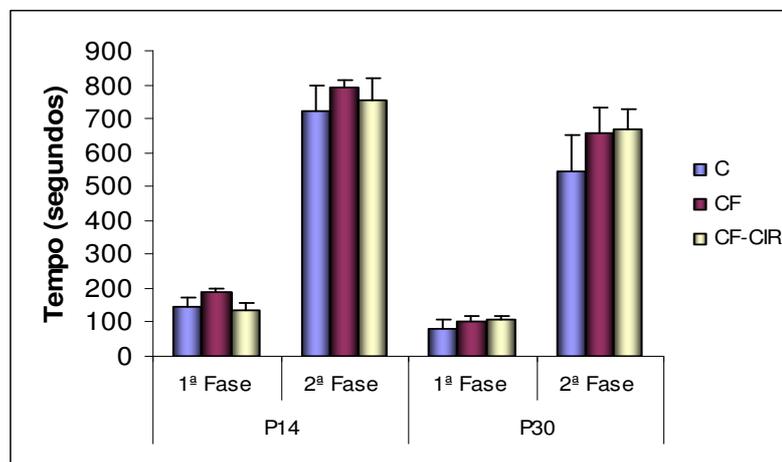
### VI.2.2 - Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas neurogênica e inflamatória em P14 e P30

Avaliou-se o efeito da administração de anestésicos gerais injetáveis (cetamina S+/fentanil), associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas neurogênica e inflamatória, analisadas no teste da formalina, em P14 (seis horas após a intervenção) e P30.

Quando foram analisadas as respostas neurogênica e inflamatória em P14, seis horas após a intervenção, não se observou diferença significativa entre os grupos experimentais, tanto na 1ª fase (C:  $148,20 \pm 25,51$ ; CF:  $186,86 \pm 14,06$ ; CF-CIR:  $137,14 \pm 20,05$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ); quanto na 2ª fase (C:  $720,60 \pm 75,78$ ; CF:  $793,14 \pm 22,92$ ; CF-CIR:  $755,29 \pm 66,32$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 5-7$  animais / grupo - Figura 24).

Quando foram analisadas as respostas neurogênica e inflamatória em P30, dezesseis dias após a intervenção, não se observou diferença significativa entre os grupos experimentais, tanto na 1ª fase (C:  $83,43 \pm 23,69$ ; CF:  $100,30 \pm 16,19$ ; CF-CIR:  $108,44 \pm 11,12$ ; ANOVA de uma

via,  $P>0,05$ ); quanto na 2ª fase (C:  $545,00\pm 107,73$ ; CF:  $655,10\pm 75,16$ ; CF-CIR:  $668,67\pm 59,12$ ; ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n = 7-10$  animais / grupo - Figura 24).



**Figura 24.** Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas neurogênica e inflamatória, avaliadas no teste da formalina, em P14. Dados apresentados como tempo em segundos de cada comportamento analisado e expressos em média  $\pm$  EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n = 5-10$  animais/grupo).

### VI.2.3 - Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta comportamental em P14, P30 e P60, no teste do campo aberto (CA)

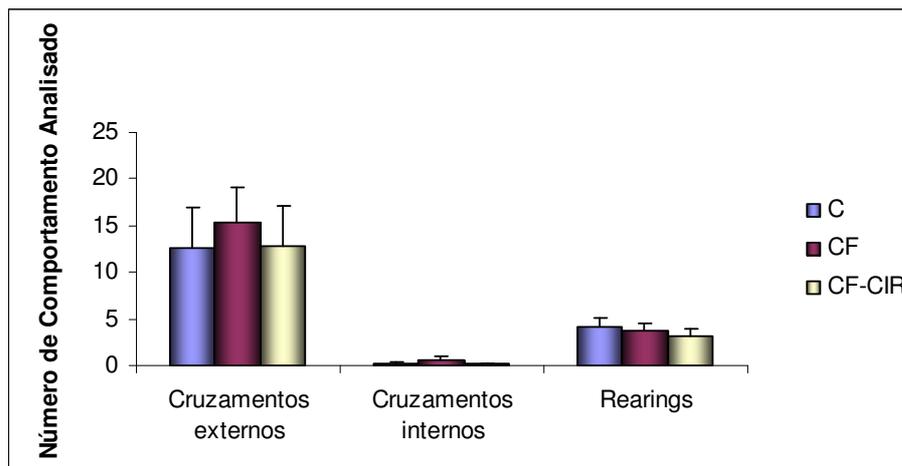
Avaliou-se o efeito da administração de anestésicos gerais injetáveis (cetamina S+/fentanil), associado ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas comportamentais analisadas no teste do CA, em P14 (seis horas após a intervenção), P30 e P60.

Quando foi analisado o número de cruzamentos externos, de cruzamentos internos e *rearings*, no P14, 6 horas após a intervenção, não se observou diferença significativa entre os grupos: cruzamentos externos (C:  $12,56\pm 4,45$ ; CF:  $15,36\pm 3,84$ ; CF-CIR:  $12,79\pm 4,27$ ); cruzamentos internos (C:  $0,22\pm 0,15$ ; CF:  $0,64\pm 0,27$ ; CF-CIR:  $0,14\pm 0,14$ ); *rearings* (C:  $4,11\pm 1,02$ ; CF:  $3,71\pm 0,74$ ; CF-CIR:  $3,21\pm 0,70$ ; ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n = 9-14$  animais

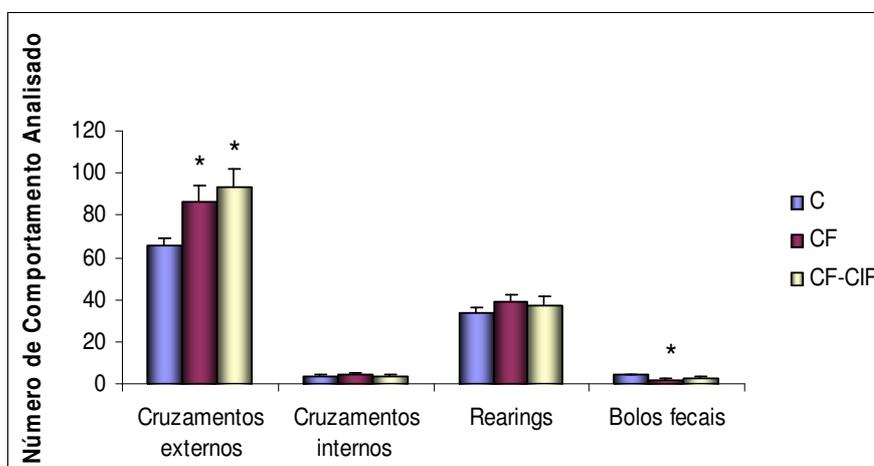
/ grupo - Figura 25). Os resultados relativos ao número de bolos fecais foram suprimidos, uma vez que os grupos não produziram bolos fecais durante o teste.

Quando foi analisado o número de cruzamentos externos, de cruzamentos internos, *rearings* e bolos fecais, dezesseis dias após a intervenção (P30), observou-se que os animais que receberam cetamina S+/fentanil (grupos CF e CF-CIR) mostraram um aumento significativo no número de cruzamentos externos, comparados aos do grupo controle (C:  $66,00 \pm 3,35$ ; CF:  $86,19 \pm 8,01$ ; CF-CIR:  $93,33 \pm 8,76$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,45)} = 4,047$ ;  $P < 0,05$  – Figura 26). Os animais que receberam cetamina S+/fentanil sem procedimento cirúrgico mostraram uma diminuição significativa nos bolos fecais, comparados aos do grupo controle (C:  $4,12 \pm 0,53$ ; CF:  $1,93 \pm 0,49$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,45)} = 3,345$ ;  $P < 0,05$  - Figura 26). No entanto, o grupo de animais que recebeu cetamina S+/fentanil com o procedimento cirúrgico (grupo CET-CIR) não apresentou diferença neste comportamento, em relação aos demais grupos (CET-CIR:  $2,60 \pm 0,80$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ). Nos demais comportamentos analisados, não foram observadas alterações significativas entre os grupos: cruzamentos internos (C:  $3,63 \pm 0,48$ ; CF:  $4,25 \pm 0,80$ ; CF-CIR:  $3,40 \pm 0,57$ ); *rearings* (C:  $33,75 \pm 2,30$ ; CF:  $38,81 \pm 3,55$ ; CF-CIR:  $36,80 \pm 4,23$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 15-16$  animais / grupo - Figura 26).

Quando se fez avaliação quarenta e seis dias após a intervenção (P60), não se observou diferença significativa entre os grupos nos comportamentos previamente citados: cruzamentos externos (C:  $83,18 \pm 6,48$ ; CF:  $75,43 \pm 4,74$ ; CF-CIR:  $83,67 \pm 4,69$ ); cruzamentos internos (C:  $6,55 \pm 0,69$ ; CF:  $7,21 \pm 0,72$ ; CF-CIR:  $7,17 \pm 0,86$ ); *rearings* (C:  $43,73 \pm 4,42$ ; CF:  $45,00 \pm 3,72$ ; CF-CIR:  $46,92 \pm 4,68$ ); bolos fecais (C:  $3,45 \pm 0,88$ ; CF:  $4,64 \pm 0,44$ ; CF-CIR:  $4,00 \pm 0,49$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 11-14$  animais / grupo - Figura 27).

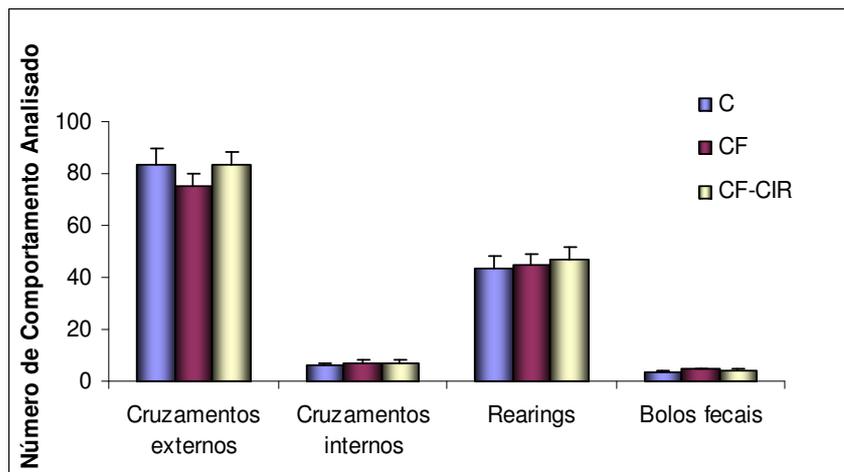


**Figura 25.** Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre o número de cruzamentos externos, de cruzamentos internos e de *rearings*, avaliados no CA, em P14. Dados apresentados em número de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos nos comportamentos analisados (ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 9-14$  animais/grupo).



**Figura 26.** Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre o número de cruzamentos externos, de cruzamentos internos, de *rearings* e de bolos fecais, avaliados no CA, em P30. Dados apresentados em número de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM.

\*Diferença significativa em relação ao controle (cruzamento externo: ANOVA de uma via,  $F_{(2,45)} = 4,047$ ;  $P < 0,05$ ; bolos fecais: ANOVA de uma via,  $F_{(2,45)} = 3,345$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 15-16$  animais / grupo).



**Figura 27.** Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre o número de cruzamentos externos, de cruzamentos internos, de *rearings* e de bolos fecais, avaliados no CA, em P60. Dados apresentados em número absoluto (média  $\pm$  EPM). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 11-14$  animais / grupo).

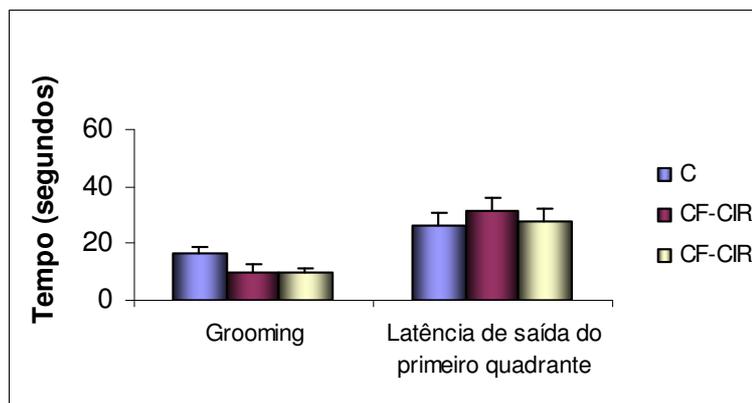
As demais respostas comportamentais avaliadas no teste do CA, em P14, seis horas após a intervenção, P30 e P60, foram latência de saída do primeiro quadrante e tempo de *grooming*.

No P14, 6 horas após a intervenção, não se observou diferença significativa nos comportamentos previamente acima: latência de saída do primeiro quadrante (C:  $26,11 \pm 4,95$ ; CF:  $31,57 \pm 4,12$ ; CF-CIR:  $27,57 \pm 4,86$ ) e *grooming* (C:  $16,22 \pm 2,56$ ; CF:  $9,93 \pm 3,16$ ; CF-CIR:  $9,43 \pm 1,94$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 9-14$  animais / grupo - Figura 28).

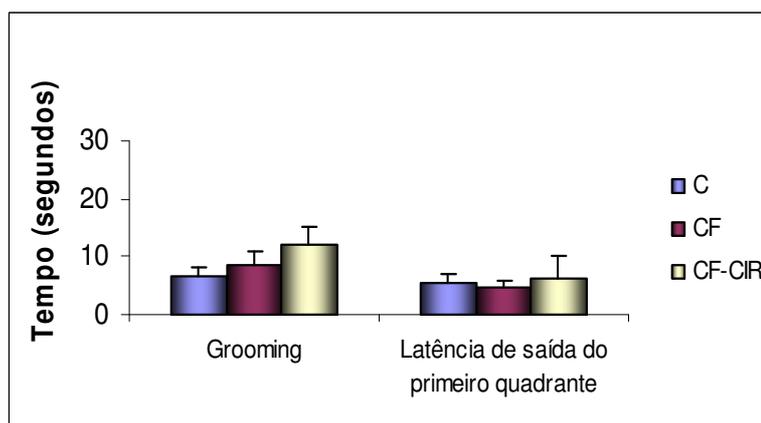
Quando se fez avaliação dezesseis dias após a intervenção (P30), não foram observadas alterações significativas entre os grupos nos comportamentos de latência de saída do primeiro quadrante (C:  $5,44 \pm 1,76$ ; CF:  $4,56 \pm 1,25$ ; CF-CIR:  $6,07 \pm 4,08$ ) e *grooming* (C:  $6,63 \pm 1,64$ ; CF:  $8,50 \pm 2,53$ ; CF-CIR:  $12,27 \pm 3,06$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 15-16$  animais / grupo - Figura 29).

Quando se fez avaliação quarenta e seis dias após intervenção (P60), não se observou diferença significativa entre os grupos nos comportamentos de: latência de saída do primeiro

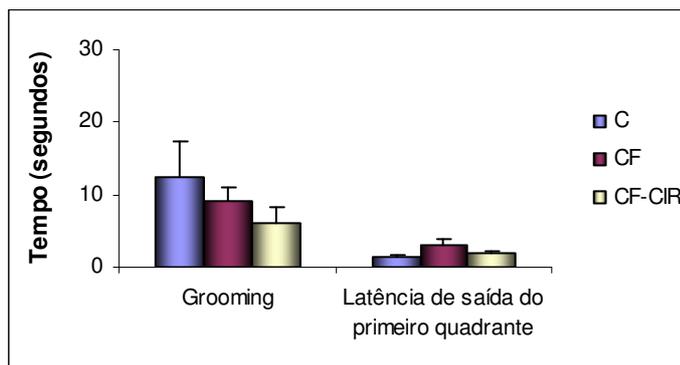
quadrante (C:  $1,45 \pm 0,31$ ; CF:  $3,00 \pm 0,89$ ; CF-CIR:  $1,92 \pm 0,42$ ) e *grooming* (C:  $12,27 \pm 5,13$ ; CF:  $9,21 \pm 1,85$ ; CF-CIR:  $6,08 \pm 2,15$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 11-14$  animais / grupo - Figura 30).



**Figura 28.** Efeito da administração de cetamina S+/fentamil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre a latência de saída do primeiro quadrante e o tempo (s) de *grooming*, avaliados no CA, em P14. Dados apresentados em tempo em segundos de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 9-14$  animais/grupo).



**Figura 29.** Efeito da administração de cetamina S+/fentamil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre a latência de saída do primeiro quadrante e o tempo (s) de *grooming*, avaliados no CA, no P30. Dados apresentados em tempo em segundos de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 15-16$  animais / grupo).



**Figura 30.** Efeito da administração de cetamina S+/fentânil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre a latência de saída do primeiro quadrante e o tempo (s) de *grooming* no CA, realizado no P60. Dados apresentados em tempo em segundos de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 11-14$  animais / grupo).

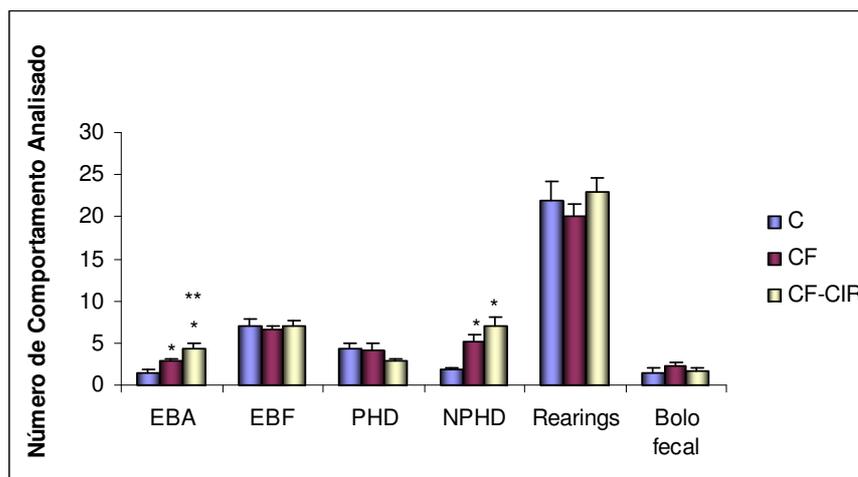
#### **VI.2.4. Efeito da administração de cetamina S+/fentânil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta comportamental em P30 e P60, no Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

Considerando os resultados comportamentais obtidos com o campo aberto, que sugeriram alteração no limiar de ansiedade dos animais que receberam cetamina S+/fentânil, associado ou não a procedimento cirúrgico, optou-se por utilizar LCE. Como os animais em P14 não apresentavam os comportamentos indicativos de ansiedade no LCE, optou-se por avaliar animais em P30 e em P60. Os comportamentos avaliados neste experimento foram: número de entradas nos braços abertos (EBA); número de entradas nos braços fechados (EBF); o tempo gasto nos braços abertos (TBA); o tempo gasto nos braços fechados (TBF); número de *protected head dipping* (PHD); número de *unprotected head dipping* (NPHD); tempo de *grooming* (em segundos); número de *rearings*; número de bolos fecais. Os resultados foram apresentados conforme as medidas utilizadas: número absoluto ou segundos.

Quando se analisou o efeito da administração de cetamina S+/fentânil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre a resposta comportamental no teste do LCE, dezesseis dias após a intervenção (P30), se observou que os animais que receberam cetamina S+/fentânil

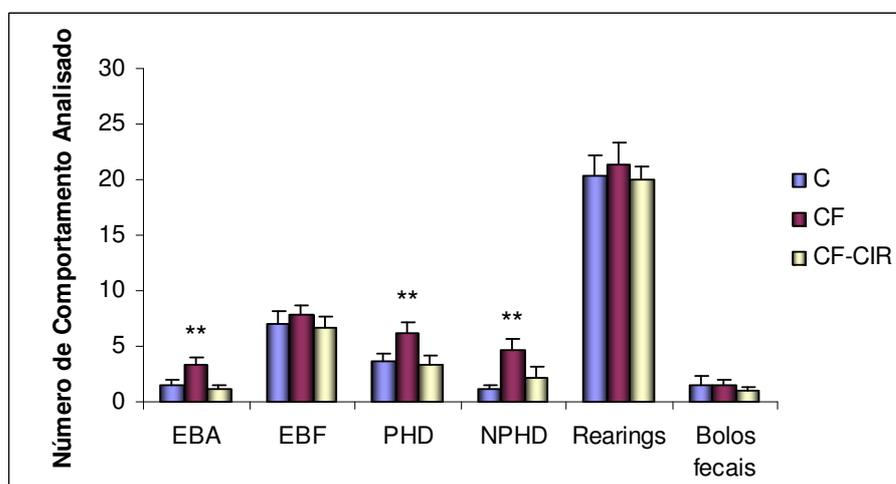
(grupos CF e CF-CIR) mostraram um aumento significativo no EBA, em relação aos do grupo controle, sendo que o aumento apresentado pelo grupo CF-CIR também foi significativamente diferente do grupo CF (C:  $1,53 \pm 0,24$ ; CF:  $2,94 \pm 0,25$ ; CF-CIR:  $4,39 \pm 0,57$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,51)} = 13,200$ ,  $P < 0,001$ - Figura 31). Foi observado um aumento significativo no NPHD nos grupos CF e CF-CIR, comparados ao grupo controle (C:  $1,82 \pm 0,32$ ; CF:  $5,22 \pm 0,68$ ; CF-CIR:  $6,94 \pm 1,11$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,51)} = 10,767$ ;  $P < 0,001$  - Figura 31). Nos demais comportamentos analisados, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos: EBF (C:  $7,12 \pm 0,072$ ; CF:  $6,56 \pm 0,46$ ; CF-CIR:  $6,94 \pm 0,66$ ); PHD (C:  $4,29 \pm 0,60$ ; CF:  $4,17 \pm 0,79$ ; CF-CIR:  $2,89 \pm 0,28$ ); *rearings* (C:  $22,00 \pm 2,26$ ; CF:  $20,00 \pm 1,44$ ; CF-CIR:  $22,94 \pm 1,66$ ); bolos fecais (C:  $1,53 \pm 0,54$ ; CF:  $2,28 \pm 0,42$ ; CF-CIR:  $1,61 \pm 0,49$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 17-18$  animais/grupo - Figura 31).

Quando se fez avaliação quarenta e seis dias após a intervenção (P60), observou-se que o grupo CF mostrou um aumento significativo no EBA em relação aos demais grupos (C:  $1,5 \pm 0,45$ ; CF:  $3,26 \pm 0,71$ ; CF-CIR:  $1,15 \pm 0,35$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,38)} = 4,368$ ;  $P < 0,05$ ), associado a aumento significativo no número de PHD (C:  $3,66 \pm 0,73$ ; CF:  $6,2 \pm 0,92$ ; CF-CIR:  $3,30 \pm 0,81$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,38)} = 3,668$ ;  $P < 0,05$ ) e de NPHD (C:  $1,16 \pm 0,40$ ; CF:  $4,66 \pm 0,97$ ; CF-CIR:  $2,23 \pm 0,89$ ; ANOVA de uma via,  $F_{(2,38)} = 4,712$ ;  $P < 0,02$ ), também em relação aos demais grupos ( $n = 12-15$  animais/grupo – Figura 32). Nos demais comportamentos analisados, não se observou diferença significativa entre os grupos: EBF (C:  $7,08 \pm 1,07$ ; CF:  $7,80 \pm 0,90$ ; CF-CIR:  $6,62 \pm 1,08$ ); *rearings* (C:  $20,42 \pm 1,83$ ; CF:  $21,27 \pm 2,11$ ; CF-CIR:  $20,00 \pm 1,10$ ); bolos fecais (C:  $1,58 \pm 0,77$ ; CF:  $1,53 \pm 0,52$ ; CF-CIR:  $0,92 \pm 0,49$ ; ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 12-15$  animais/grupo - Figura 32).



**Figura 31.** Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas comportamentais como EBA, EBF, PHD, NPHD, *rearing*s e bolos fecais, avaliadas no LCE, em P30. Dados apresentados em número de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM.

\*Diferença significativa em relação ao controle. \*\*Diferença significativa em relação aos demais grupos (EBA: ANOVA de uma via  $F_{(2,51)} = 13,200$ ;  $P < 0,001$ ; NPHD: ANOVA de uma via,  $F_{(2,51)} = 10,767$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 17-18$  animais/grupo).

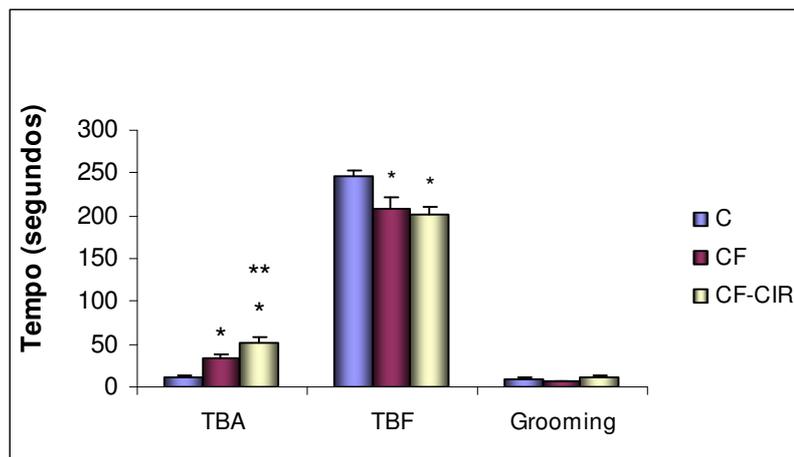


**Figura 32.** Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas comportamentais como EBA, EBF, PHD, NPHD, *rearing*s e bolos fecais, avaliadas no LCE, em P60. Dados apresentados em número de cada comportamento analisado e expressos como média  $\pm$  EPM.

\*\*Diferença significativa em relação aos demais grupos (EBA: ANOVA de uma via,  $F_{(2,38)} = 4,368$ ;  $P < 0,05$ ; PHD: ANOVA de uma via,  $F_{(2,38)} = 3,668$ ;  $P < 0,05$ ; NPHD: ANOVA de uma via,  $F_{(2,38)} = 4,712$ ;  $P < 0,02$ ;  $n = 12-15$  animais/grupo).

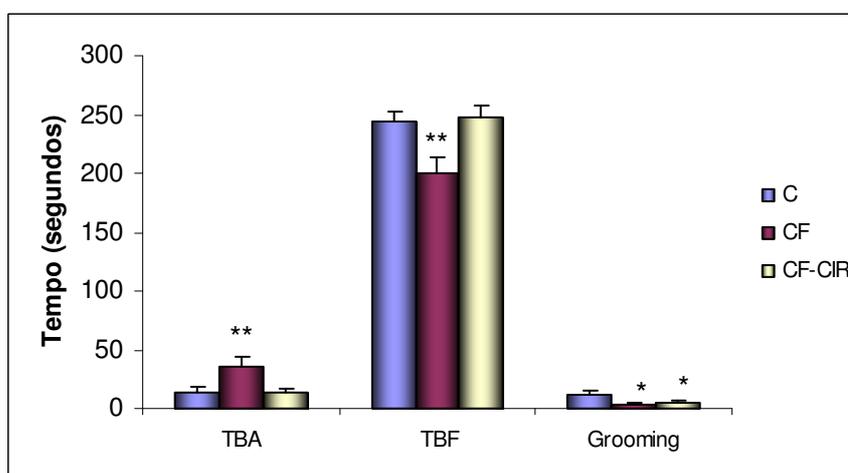
Quando se avaliou o efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre os comportamentos de TBA, TBF e *grooming* em P30, foi observado que os animais que receberam cetamina S+/fentanil (grupos CF e CF-CIR) mostraram um aumento significativo no TBA, em relação aos do grupo controle, sendo que o aumento apresentado pelo grupo CF-CIR foi também significativamente maior que o do grupo CF (C: 11,41±2,11; CF: 34,28±4,75; CF-CIR: 50,56±6,88; ANOVA de uma via,  $F_{(2,51)}=14,925$ ;  $P<0,001$ ). Quando avaliado o número de TBF, foi observada uma diminuição significativa nos grupos CF e CF-CIR, em relação ao grupo controle (C: 247,29±6,70; CF: 208,28±12,23; CF-CIR: 201,39±8,06; ANOVA de uma via,  $F_{(2,51)}=6,708$ ;  $P<0,01$  - Figura 33). No comportamento de *grooming*, não foi observada diferença significativa entre os grupos (C: 8,53±2,34; CF: 6,50±1,14; CF-CIR: 10,67±1,98; ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n=17-18$  animais/grupo - Figura 33).

Quando se verificou o efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre os comportamentos de TBA, TBF e *grooming* em P60, observou-se que os animais do grupo CF mostraram um aumento significativo no TBA, em relação aos dos demais grupos (C: 13,83±4,43; CF: 35,93±8,72; CF-CIR: 13,15±4,41; ANOVA de uma via  $F_{(2,38)}=4,048$ ;  $P<0,05$  - Figura 34), associado a uma diminuição significativa no TBF, em relação ao controle (C: 243,50±8,81; CF: 200,66±13,37; CF-CIR: 247,00±10,99; ANOVA de uma via,  $F_{(2,38)}=5,208$ ;  $P<0,02$  - Figura 34). Os animais que receberam cetamina S+/fentanil (grupos CF e CF-CIR) mostraram uma diminuição significativa no tempo de *grooming*, em relação ao controle (C: 11,58±3,61; CF: 3,73±0,80; CF-CIR: 4,38±1,70; ANOVA de uma via,  $F_{(2,38)}=3,858$ ;  $P<0,05$ ;  $n=12-15$  animais/grupo - Figura 34).



**Figura 33.** Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas comportamentais avaliadas no LCE, em P30. Dados apresentados como tempo em segundos de cada comportamento analisado e expressos em média  $\pm$  EPM.

\*Diferença significativa em relação ao grupo controle. \*\*Diferença significativa em relação aos demais (TBA: ANOVA de uma via,  $F_{(2,51)} = 14,925$ ;  $P < 0,001$ ; TBF: ANOVA de uma via,  $F_{(2,51)} = 6,708$ ;  $P < 0,01$ ;  $n = 17-18$  animais/grupo).



**Figura 34.** Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre as respostas comportamentais avaliadas no LCE, em P60. Dados apresentados como tempo em segundos de cada comportamento analisado e expressos em média  $\pm$  EPM.

\*Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA de uma via,  $F_{(2,38)} = 3,858$ ;  $P < 0,05$ );

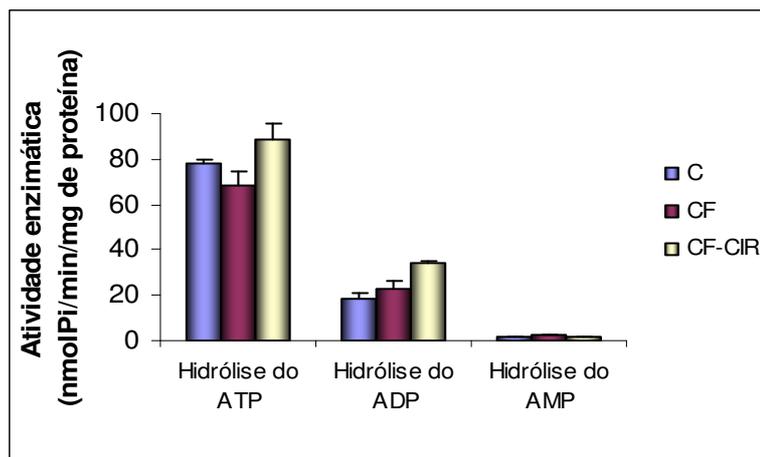
\*\*Diferença significativa em relação aos demais grupos (TBA: ANOVA de uma via,  $F_{(2,38)} = 4,048$ ;  $P < 0,05$ ; TBF: ANOVA de uma via,  $F_{(2,38)} = 5,208$ ;  $P < 0,02$ ;  $n = 12-15$  animais/grupo).

### **VI.2.5 - Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina em sinaptossomas de medula espinhal de ratos**

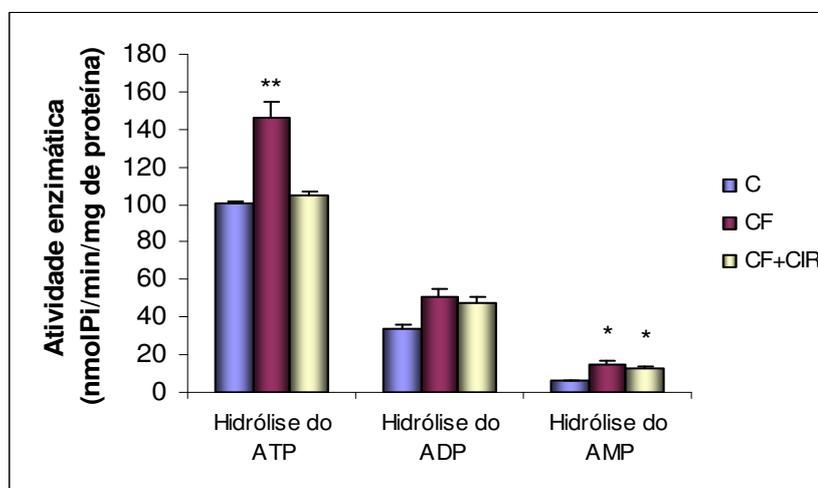
Avaliou-se o efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, em ratos com 14 dias, sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina em sinaptossomas de medula espinhal, imediatamente após a intervenção e em P30.

Imediatamente após a intervenção (P14), não foi observada diferença significativa na atividade enzimática entre os grupos analisados [ATP: C (77,73±2,36); CF (68,16±6,24); CF-CIR: (88,36±7,37); ADP: C (18,22±3,21); CF (22,38±3,52); CF-CIR (34,2±0,96); AMP: C (1,81±0,03); CF (2,31±0,44); CF-CIR (1,62±0,08); ANOVA de uma via,  $P>0,05$ ;  $n= 2-3$  animais/grupo - Figura 35].

Em P30, observou-se que os animais do grupo CF mostraram um aumento significativo na hidrólise do ATP, em relação aos demais grupos (C: 100,86±0,90; CF: 146,18±8,92; CF-CIR: 104,95±1,82; ANOVA de uma via,  $F_{(2,6)} = 17,344$ ;  $P<0,01$  - Figura 36), associado a um aumento significativo na hidrólise do AMP nos grupos CF e CF-CIR, em relação ao grupo controle (C: 6,00±0,08; CF: 14,97±1,71; CF-CIR: 12,71±0,79; ANOVA de uma via,  $F_{(2,6)} = 11,680$ ;  $P <0,02$  - Figura 36). Na hidrólise do ADP, não foi observada diferença significativa entre os grupos (C: 34,18±1,72; CET: 50,81±4,60; CET-CIR: 47,58±3,39;  $n = 2-3$  animais/grupo - Figura 36).



**Figura 35.** Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre a atividade enzimática de hidrólise dos nucleotídeos de adenina em medula espinhal, em P14. Dados apresentados em atividade enzimática e expressos em nmolPi/min/mg de proteína (média  $\pm$  EPM). Não houve diferença significativa na atividade enzimática entre os grupos analisados (ANOVA de uma via,  $P > 0,05$ ;  $n = 2-3$  animais/grupo).



**Figura 36.** Efeito da administração de cetamina S+/fentanil, associada ou não a procedimento cirúrgico, sobre a atividade enzimática de hidrólise dos nucleotídeos de adenina em medula espinhal, em P30. Dados apresentados em atividade enzimática e expressos em nmolPi/min/mg de proteína (média  $\pm$  EPM).

\*Diferença significativa, comparada ao controle (ANOVA de uma via,  $F_{(2,6)} = 11,680$ ;  $P < 0,02$ );

\*\*Diferença significativa, em relação aos demais grupos (ANOVA de uma via,  $F_{(2,6)} = 17,344$ ;  $P < 0,01$ ;  $n = 2-3$  animais/grupo).

---

## VII. DISCUSSÃO

## VII.1 – RESPOSTA COMPORTAMENTAL NOCICEPTIVA

Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram que a administração de anestésicos gerais, tanto inalatório quanto injetável, associados ou não a procedimento cirúrgico, podem produzir alterações de respostas nociceptivas, comportamentais e bioquímicas a curto, médio e longo prazos. Com relação à resposta nociceptiva, avaliada no aparato de *tail-flick*, foi observado que seis horas (P14) e quarenta e seis dias (P60) após o procedimento, os animais que receberam isoflurano apresentaram aumento de latência de retirada da cauda, comportamento indicativo de resposta analgésica. No entanto, em P14, o grupo ISO-CIR não foi significativamente diferente dos demais grupos, sugerindo que o procedimento cirúrgico reverteu parcialmente o efeito do isoflurano. Por outro lado, os animais que receberam cetamina S+/fentanil (grupos CF e CF/CIR) apresentaram aumento do limiar nociceptivo somente em P30. Estes resultados sugerem que, independentemente da via de administração, o uso de anestésicos gerais em neonatos pode promover alterações na resposta nociceptiva em curto, médio e longo prazo. Por outro lado, quando foi utilizado o teste da formalina não foram observadas alterações nas respostas neurogênicas e inflamatórias em todos os grupos estudados, o que pode ser indicativo de que a provável adaptação ocorrida no sistema nociceptivo seja relativo às fibras nociceptivas, pois os testes em questão promovem ativação de diferentes fibras, obtendo diferentes respostas de avaliação da nocicepção. A latência de retirada da cauda avaliada pelo *tail-flick* representa reflexo medular (Irwin *et al.*, 1951; Bonnycastle *et al.*, 1953; Sinclair *et al.*, 1988), estando sujeito ao controle de estruturas supra-espinais (Mitchell & Hellon, 1977). O teste de TFL avalia dor fásica, ou seja, um estímulo nociceptivo de curta duração está relacionado ao limiar nociceptivo e envolve estimulação de áreas de superfície mínimas. Este teste térmico envolve estimulação de fibras A $\delta$  (para revisão ver Le Bars *et al.*, 2001), e sabe-se que estas fibras estão presentes no nascimento (P0). Por outro lado, o teste da formalina envolve dor tônica, um estímulo de longa duração,

desencadeando a resposta nociceptiva, que envolve estímulo de fibras do tipo C (para revisão ver Le Bars *et al.*, 2001), que estão em processo de maturação nas três primeiras semanas de vida (Fitzgerald, 1995). A partir dos resultados obtidos, sugere-se que possíveis adaptações possam ter ocorrido em fibras do tipo A $\delta$ , sendo que uma possível *down-regulation* possa ter ocorrido a partir da administração de anestésicos gerais, como isoflurano e cetamina S+/fentanil. Nas três primeiras semanas de vida ocorre um aumento de fibras do tipo C na medula espinhal e a correspondente diminuição de fibras do tipo A $\delta$  não ocorre imediatamente. Portanto, nas três primeiras semanas de vida, ambas as fibras ocupam um mesmo espaço dentro da medula espinhal (Fitzgerald, 1995). Podemos sugerir que a administração de anestésicos gerais numa fase de maturação promove uma adaptação no sistema nociceptivo, decorrente de um desequilíbrio das fibras do tipo A $\delta$ , ocasionando uma diminuição no número dessas fibras e/ou em sua atividade nociceptiva.

É importante salientar que dados da literatura sugerem que o sistema inibitório descendente tem um papel essencial na clássica resposta bifásica produzida pela formalina (Guy & Abbott, 1992). Esta não é claramente observada até P15, devido à imaturidade deste sistema. Conseqüentemente, até o P15, os animais apresentam uma exagerada resposta à formalina (Teng & Abbott, 1998). Levando em consideração que o teste foi realizado em P14, não podemos descartar que este fato possa ter influenciado os resultados obtidos em P14, porém não em P30.

Adicionalmente, a analgesia observada no TFL, em animais que receberam anestesia geral, independentemente da via de administração, pode estar relacionada ao fato do sistema nervoso imaturo do neonato ser altamente sensível aos efeitos depressores dos anestésicos (Soriano & Anand, 2005). Os anestésicos são capazes de interagir com uma variedade de sistemas neuronais, incluindo sistemas GABAérgico, glicinérgico, colinérgico e glutamatérgico (Krasowski & Harrison, 1999; Dilger, 2002), e alterações em nível de receptores destes

sistemas em número e/ou afinidade podem estar contribuindo com a adaptação ocorrida no sistema nociceptivo. Importante salientar que a eficácia anestésica é medida pela ausência de resposta ao estímulo nocivo, que não é alterada por lesões no córtex parietal em ratos (Rampil *et al.*, 1993). Este dado é confirmado por estudos que demonstram que ratos descerebrados e intactos respondem à mesma concentração de anestésico no bloqueio da resposta a estímulos dolorosos (Todd *et al.*, 1993) e que mudanças provocadas pelos anestésicos ocorrem em maior proporção em nível medular que supramedular (Collins *et al.*, 1995).

Sabe-se que um dos mecanismos de ação sugeridos para os anestésicos inalatórios é o fato de provocarem alterações na fluidez de membranas celulares, o que nos leva a sugerir que esta ação possa estar envolvida nos efeitos observados em curto prazo; no entanto, não em longo prazo. Este último pode ser decorrente de um processo adaptativo na transmissão e/ou modulação do estímulo nociceptivo, desencadeado pela administração de isoflurano em P14. Sabe-se que isoflurano ativa tanto sistema glicinérgico quanto GABAérgico (Zhang *et al.*, 2003), modulando, em nível medular, a nocicepção. Co-sinapses glicinérgicas e GABAérgicas foram detectadas em medula espinhal de neonatos, mas não de adultos (Keller *et al.*, 2001). Estas co-sinapses podem representar um mecanismo inibitório intrínseco em nível de medula espinhal de neonatos, assim compensando a falta de modulação inibitória descendente. Isoflurano potencializa estas sinapses atuando no sistema nociceptivo intrínseco do neonato (Sanders *et al.*, 2005). Sinapses inibitórias sofrem alterações no período pós-natal até a terceira semana de vida. Os neonatos apresentam co-sinapses glicinérgicas/GABAérgicas, ocorrendo em animais de maior idade, sinapses glicinérgica e GABAérgica independentes (Pattinson & Fitzgerald, 2004). Nos resultados obtidos nesta dissertação, não é possível descartar a participação de receptores, como por exemplo, os gabaérgicos, importantes no desenvolvimento neuronal, pois estudos imuno-histoquímicos demonstram um aumento na reatividade destes receptores até P14, seguido de uma diminuição em todos os níveis, e uma re-

localização na superfície do corno dorsal (Ma *et al.*, 1994; Tran *et al.*, 2003). Outros mecanismos de ação sugeridos para o isoflurano, como o bloqueio de canais iônicos, inibição de neurotransmissores excitatórios, hiperpolarização celular e repercussão indireta no sistema nervoso autônomo, não podem ter sua participação descartada no processo de adaptação, ocorrido a partir de sua administração no período neonatal.

É importante salientar que os animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico apresentaram uma reversão parcial da analgesia induzida pelo isoflurano, seis horas após o procedimento. Dantas (2007), utilizando o modelo de Brennan modificado, demonstrou que ratos de 21 dias apresentavam aumento na latência de retirada da cauda, trinta minutos após a realização do procedimento cirúrgico. Esta analgesia foi caracterizada como predominantemente GABAérgica, com participação opióide. No presente estudo, a medida de TFL foi realizada seis horas após a intervenção cirúrgica, e não foi observada analgesia relacionada ao procedimento cirúrgico. Dor pós-operatória está associada à injúria tecidual periférica. Sabe-se que este dano resulta em aumento da atividade dos nociceptores e aumento da excitabilidade neuronal, induzindo sensibilização periférica e central (Woolf & Chong, 1993). Em outro estudo, utilizando o modelo de dor pós-operatória de Brennan, foi demonstrado que, três horas após o procedimento cirúrgico, há um pico de liberação de aminoácidos excitatórios, como aspartato e glutamato, e estes retornam ao seu nível basal somente um dia após a intervenção. Estes aminoácidos excitatórios estão envolvidos na sensibilização medular, mas não desempenham papel importante na manutenção da hiperalgesia (Yun *et al.*, 2007). Portanto, sugere-se que esta liberação de aspartato e glutamato possa ser responsável pela parcial reversão da analgesia relacionada à administração do isoflurano. Há poucos estudos relativos à nocicepção avaliada em animais adultos que sofreram procedimento cirúrgico em fase precoce pós-natal (Sternberg *et al.*, 2005; Dantas, 2007; Walker *et al.*, 2009). O modelo cirúrgico utilizado nesta dissertação é amplamente utilizado em

estudos que avaliam o efeito de hipóxia-isquemia neonatal, não havendo estudos que envolvam aspectos nociceptivos. Como perspectiva, pretende-se considerar os efeitos da hipóxia/isquemia em ratos, no P14, sobre os limiares nociceptivos destes animais e suas possíveis repercussões na vida adulta.

Em relação ao segundo desenho experimental, é importante salientar que dados da literatura são relacionados mais freqüentemente à mistura racêmica de cetamina, neste trabalho optou-se por utilizar cetamina S+, enantiômero mais efetivo como anestésico e analgésico que a mistura racêmica e que cetamina R- (Reich & Silvay, 1989). Em contraste com a cetamina, cetamina S+ é relatada por apresentar menos efeitos colaterais psicomiméticos, como alucinações e desrealização (Paul *et al.*, 2009). As vantagens potenciais da utilização de um enantiômero puro, ao invés da mistura racêmica, incluem um perfil farmacodinâmico menos complexo e mais seletivo, um maior índice terapêutico e menores complexidade farmacocinética, interações medicamentosas e relação dose-resposta (Joó *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a cetamina S+, um antagonista do receptor NMDA (Feldman *et al.*, 1997), administrada em ratos, no P14, provocou um aumento do limiar nociceptivo em médio prazo (P30). A atividade dos receptores NMDA desempenha importante papel no desenvolvimento e plasticidade das conexões no SNC imaturo (Garthwaite, 1989). A afinidade e densidade dos receptores NMDA são semelhantes em neonatos e adultos. No entanto, sua distribuição difere, sendo, em adultos, restrita à substância gelatinosa e, em neonatos, distribuídos por toda a medula, atingindo a distribuição do adulto somente em P28 (Kalb & Hockfield, 1991). No período pós-natal, até a terceira semana de vida, há uma reorganização das subunidades dos receptores NMDA e também uma relocalização destes na medula espinhal (Pattinson & Fitzgerald, 2004). A analgesia observada, nesta dissertação, no 16º dia após a utilização de cetamina S+, sinaliza para um possível processo adaptativo, decorrente do uso do fármaco, na transmissão e/ou modulação do sistema

glutamatérgico. Esta alteração na sensibilidade nociceptiva pode estar relacionada a alterações centrais e periféricas envolvendo receptores glutamatérgicos, em número e/ou afinidade; ou, ainda, pode ser decorrente de alterações em outros sistemas neurotransmissores capazes de interagir com este sistema, salientando-se a utilização da cetamina S+ e fentanil, o que reforça a hipótese de que diferentes sistemas de neurotransmissores podem estar envolvidos nesta alteração nociceptiva de médio prazo, decorrente de uma única manipulação farmacológica no período de maturação pós-natal.

O fentanil é um analgésico opióide amplamente utilizado como adjuvante na anestesia geral (Linneman *et al.*, 2000; Twite *et al.*, 2004), atuando como agonista específico do receptor  $\mu$  (Skaer, 2006). Os receptores opióides  $\mu$  estão presentes na primeira semana de vida, em neurônios do gânglio da raiz do corno dorsal, de pequeno e largo diâmetros. Durante o período pós-natal ocorre *down-regulation* na expressão destes receptores nas fibras de largo diâmetro (Sweitzer *et al.*, 2004). Os receptores  $\mu$  têm seu pico de ligação, em medula espinhal, em P7, com um padrão difuso de ligação na superfície do corno dorsal no processo de maturação (Zissen *et al.*, 2006). Considerando estas informações ontogênicas, pode-se sugerir que a intervenção farmacológica com fentanil em P14 possa ter desencadeado *up-regulation* dos receptores  $\mu$ , devido ao rápido declínio da concentração do fármaco no SNC imaturo, o que poderia estar envolvido com a resposta analgésica encontrada.

Além da medula, outras estruturas centrais, como a substância cinzenta periaquedutal (SCP), são ricas em terminações nervosas opioidérgicas (Reichling *et al.*, 1988). A SCP e suas projeções descendentes até o bulbo rostral ventromedial e corno dorsal da medula espinhal constituem um circuito primário para modulação descendente da dor (Basbaum & Fields, 1984). Sabe-se que a modulação inibitória descendente tem sua maturação nas três primeiras semanas de vida pós-natal e uma intervenção farmacológica envolvendo o sistema opióide pode promover alterações neste processo. As mudanças encontradas na resposta nociceptiva

podem estar relacionadas a alterações centrais promovidas pelo fentanil, envolvendo receptores opioidérgicos, em número e/ou afinidade.

Em estudo prévio do grupo de pesquisa, utilizando outro agonista opióide (morfina 5µg s.c./dia/7dias a partir do P8), observou-se que esses animais não apresentaram a clássica tolerância a opióide, associada a maior tempo de analgesia à morfina em P14, e este efeito se prolonga pelo menos até P80 (Rozisky *et al.*, 2008). Outro estudo envolvendo agonista opióide µ utilizou a infusão de 50 µg/kg/hora de fentanil por 72 horas (P14-P16), e os animais apresentaram tolerância ao fentanil no TFL em P17, associada à menor sensibilidade à morfina em P55 (Thornton & Smith, 1998). Estes dois estudos citados envolveram administração repetida de agonistas opióides, e foram observadas alterações de resposta nociceptiva importantes em longo prazo. Nesta dissertação utilizou-se uma única administração de fentanil em P14 e foi observada analgesia em médio prazo. No entanto, este fármaco foi associado à cetamina, o que nos leva a sugerir que diferentes sistemas de neurotransmissores podem estar envolvidos nesta alteração nociceptiva de médio prazo decorrente de uma única manipulação farmacológica no período de maturação pós-natal.

As técnicas utilizadas neste estudo não nos permitem determinar os reais mecanismos envolvidos nas alterações observadas na resposta nociceptiva em curto, médio e longo prazos de animais submetidos a anestésicos gerais, com e sem procedimento cirúrgico. Novos estudos são necessários para avaliar o número e a sensibilidade de receptores gabaérgicos, glutamatérgicos e opióides, para melhor elucidar os resultados obtidos.

## **VII.2 – RESPOSTA COMPORTAMENTAL: ATIVIDADE LOCOMOTORA E ANSIEDADE**

A exposição ao isoflurano em P14 promoveu alterações comportamentais observadas em CA em todas as idades analisadas. Foi observado um aumento da atividade locomotora em

P14 (grupo ISO) e P30 (grupos ISO e ISO-CIR). Além disto, em P30, os grupos ISO e ISO-CIR apresentaram redução na latência de saída do primeiro quadrante, indicativo de diminuição no nível de ansiedade. Em P60, somente o grupo ISO-CIR apresentou este efeito. No entanto, no LCE não foi observada diferença entre os grupos para todos os parâmetros comportamentais avaliados. Estes resultados, considerados em conjunto, sugerem que as alterações comportamentais observadas em campo aberto são relacionadas a aumento da atividade locomotora, sem envolvimento com o estado de ansiedade dos animais.

A atividade locomotora é resultado da interação de vários sistemas de neurotransmissores. A dopamina é destacada entre estes, uma vez que, na ausência de estimulação central de receptores de dopamina, a atividade locomotora pode não ocorrer ou não ser desempenhada de forma significativa (Irifune *et al.*, 1997). Mecanismos dopaminérgicos dentro do núcleo *accumbens* e do estriado desempenham um papel importante no controle da atividade locomotora e a estimulação destes neurônios provoca um aumento na atividade locomotora, enquanto que a diminuição dos níveis de dopamina provoca uma diminuição do comportamento espontâneo (Fishman *et al.*, 1983; Arnt, 1987). A dopamina é um dos primeiros neurotransmissores a ser encontrado no cérebro em desenvolvimento (Levitt & Rakic, 1982; Puelles & Verney, 1998). A enzima tirosina-hidroxilase é o passo limitante na síntese de dopamina, tornando-se assim um marcador útil para detecção de neurônios dopaminérgicos. Esta enzima encontra-se com reatividade positiva no período embrionário (E) de E12-13 em córtex cerebral (Frederick & Stanwood, 2009). A densidade de axônios que expressam a enzima tirosina-hidroxilase positiva no córtex apresenta um aumento gradual ao longo do desenvolvimento, que declina no período pós-natal, para atingir níveis do adulto durante a puberdade (Frederick & Stanwood, 2009). Os receptores de dopamina são expressos em regiões cerebrais corticais, no início do período embrionário, em ratos, bem como em primatas (Rao *et al.*, 1991; Jung & Bennett, 1996), e ambos receptores, D1 e D2, encontram-se

acoplados à proteína-G. Durante o período pré-natal e na fase precoce do período pós-natal, ocorre um aumento dos receptores D1 e D2, para somente alcançar os níveis de expressão em adultos entre P14 e P21 em roedores (Sales *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1991; Schambra *et al.*, 1994; Caille *et al.*, 1995). Estudos relatam que o isoflurano induz aumento significativo na liberação de dopamina em sinaptossomas de estriado de ratos (Mantz *et al.*, 1994) e também promove uma inibição da recaptação sinaptossomal de dopamina em cérebro de ratos (El-Maghrabi & Eckenhoff, 1993). Em um estudo de microdiálise *in vivo*, doses anestésicas de isoflurano promoveram um aumento da concentração extracelular de dopamina no estriado de ratos (Opacka-Juffry *et al.*, 1991). Portanto, considerando estes estudos, é plausível sugerir que os resultados obtidos em relação à alteração na locomoção de animais manipulados farmacologicamente, em P14, com isoflurano, em curto e em médio prazo, podem refletir alterações na transmissão e/ou modulação no sistema dopaminérgico imaturo. Futuros estudos utilizando fármacos que atuam em sistema dopaminérgico, no modelo em estudo, poderão melhor elucidar este efeito.

Por outro lado, observou-se que a administração de cetamina S+/fentanil (grupos CF e CF-CIR) promoveu diferenças comportamentais, tanto no CA quanto LCE. No P30, observou-se aumento da atividade locomotora no CA, associado a uma diminuição no número de bolos fecais, sendo este último efeito somente observado no grupo CF, ambos os comportamentos indicativos de menor nível de ansiedade. No LCE, os animais em P30 apresentaram um aumento no número de *unprotected head dipping* e de entrada nos braços abertos, associado a um maior tempo de permanência nos braços abertos. Salienta-se que os animais que receberam intervenção cirúrgica apresentaram um maior aumento nos comportamentos de entrada e tempo de permanência nos braços abertos, quando comparados aos do grupo que foi submetido apenas a cetamina S+/fentanil. Corroborando os resultados obtidos no CA, sugerem uma diminuição nos níveis de ansiedade em animais submetidos à intervenção farmacológica e

cirúrgica ocorrida em P14. Já em P60, a exposição dos animais ao LCE demonstrou que aqueles que receberam somente cetamina S+/fentanil apresentaram aumento no número de *protected head dipping*, de *unprotected head dipping* e de entradas nos braços abertos, associado a aumento do tempo de permanência nos braços abertos. Pode-se, então, inferir que a manipulação farmacológica promoveu alterações comportamentais indicativas de menor nível de ansiedade observada nos animais pelo menos até P60. Cabe salientar que não foram observadas diferenças, entre os grupos, entre os parâmetros comportamentais analisados no CA.

Estes resultados demonstram que a utilização de antagonista NMDA, como a cetamina S+, em P14, diminui os níveis de ansiedade em médio e longo prazos. Estudos anteriores demonstram que antagonistas de receptores NMDA possuem ação ansiolítica tanto em ratos e humanos (Barkus *et al.*, 2010). Nossos resultados corroboram estudo de Hayase e colaboradores (2006), que, utilizando o teste do LCE, demonstraram que a cetamina apresenta ação ansiolítica em ratos.

Para um melhor entendimento do quadro de ansiedade, possíveis mecanismos e regiões do cérebro têm sido estudados. Destacamos estruturas cerebrais como região dorsal da substância cinzenta periaquedutal (Guimarães *et al.*, 1991; Matheus *et al.*, 1994) e a porção ventral do hipocampo (Bannerman *et al.*, 2002, 2003). A administração de antagonista NMDA diretamente na região dorsal da substância cinzenta periaquedutal, em animais adultos, promoveu menor nível de ansiedade no LCE (Guimarães *et al.*, 1991), e sabe-se que subunidades do receptor NMDA localizado no hipocampo exercem papel importante na ansiedade (Bannerman *et al.*, 2002, Niewoehner *et al.*, 2007). No período de maturação pós-natal, receptores de diversos sistemas estão em processo de reorganização ou mesmo relocalização dentro do sistema nervoso, incluindo receptores NMDA. Portanto, diferentes períodos de exposição a anestésicos durante o desenvolvimento cerebral podem afetar

diferentes regiões do cérebro (Irifune *et al.*, 1991). O período de crescimento neuronal começa no último trimestre de gravidez em humanos e continua até dois anos de idade (Bayer *et al.*, 1993). Em ratos e camundongos, o período de crescimento neuronal compreende as três primeiras semanas de vida pós-natal (Davison & Dobbing, 1968; Byrnes *et al.*, 2001).

Cetamina, além de atuar em receptores NMDA, também atua em receptores do tipo AMPA (Maeng *et al.*, 2008), GABA<sub>A</sub> (Hevers *et al.*, 2008), opióides (Hirota *et al.*, 1999), colinérgicos (Abelson *et al.*, 2006), receptores da substância P (Okamoto *et al.*, 2003), dopaminérgicos (D2) e serotoninérgicos (5-HT<sub>2</sub>) (Kapur & Seeman, 2002). Cetamina provoca mudanças nos níveis cerebrais de monoaminas em ratos (Usuda *et al.*, 1981; Yamamoto *et al.*, 1982) e primatas (Bacopoulos *et al.*, 1979), aumentando liberação de dopamina e norepinefrina no estriado e fatias corticais, respectivamente (Smith *et al.*, 1975; Snell *et al.*, 1984). Cetamina também interage com os transportadores da recaptção de monoaminas, da mesma forma como os fármacos antidepressivos, aumentando concentrações sinápticas das monoaminas (Tso *et al.*, 2004), como dopamina e norepinefrina no estriado (Johnson & Snell, 1985) e sinaptossomas de córtex (Smith *et al.*, 1981), respectivamente. Na literatura, relata-se ainda que, a ansiedade pode estar relacionada com o desequilíbrio entre os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico (Tanaka *et al.*, 2000). Pode-se sugerir que alterações observadas nos níveis de ansiedade, após a utilização de cetamina S+ em P14, podem ser decorrentes de modulação no sistema glutamatérgico, em desenvolvimento neste período. Além disto, deve ser considerada a participação de diferentes sistemas de neurotransmissores, salientando-se que a cetamina foi associado ao fentanil.

O fentanil é um agonista específico de receptores  $\mu$  (Skaer, 2006) largamente utilizado em procedimentos anestésicos. Estudos ontogênicos demonstram que os receptores  $\mu$  e  $\kappa$  estão presentes no nascimento, enquanto que os receptores  $\delta$  aparecem somente depois da segunda semana pós-natal (Wohltmann *et al.*, 1892, Barg *et al.*, 1989). Sua

expressão e sua capacidade de ligação sofrem considerável reorganização no período pós-natal (Rahman *et al.*, 1998; Beland & Fitzgerald, 2001). Em adultos, é demonstrado que estruturas cerebrais, como o hipocampo e a SCP, expressam uma alta densidade de receptores opióides (Drake & Milner, 1999), que, como descrito acima, podem estar envolvidos em mecanismos relativos à ansiedade. Recente estudo demonstrou que alterações hipocampais, como maior excitabilidade, ocorrem após aguda administração de fentanil, em ratos adultos (Kouvaras *et al.*, 2008). Estudos anteriores demonstraram efeito anti-aversivo da morfina administrada diretamente na SCP. Este efeito foi antagonizado pela naltrexona (antagonista preferencialmente  $\mu$ ), sendo que os efeitos anti-aversivos foram mimetizados pelo DAMGO, agonista seletivo dos receptores  $\mu$  (Motta *et al.*, 1995; Anseloni *et al.*, 1999). A partir do nosso estudo, podemos sugerir que, numa fase, em que ocorre intensa sinaptogênese e rearranjos moleculares (em P14), exposição única a um agonista opióide, associado a um antagonista glutamatérgico, possa promover alterações que perdurem até a vida adulta, e que estes efeitos podem ser decorrentes da ação individual de cada fármaco e/ou da interação entre eles.

As técnicas utilizadas neste estudo não nos permitem determinar os reais mecanismos envolvidos nas alterações observadas na resposta comportamental de animais submetidos a anestésicos gerais, com e sem procedimento cirúrgico. Novos estudos são necessários para avaliar os sistemas citados acima, como os dopaminérgicos, glutamatérgicos e opióides, principalmente relativos ao receptor  $\mu$ ; avaliando adaptações que possam ter ocorrido em número e/ou sensibilidade dos receptores, para melhor elucidar os resultados obtidos.

### **VII.3 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA: HIDRÓLISE DOS NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA EM MEDULA ESPINHAL DE RATOS**

Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram que a administração de anestésicos gerais, associada ou não ao procedimento cirúrgico, no período neonatal, produz alterações nas

atividades de hidrólise de nucleotídeos da adenina em sinaptossomas de medula espinhal, em curto e médio prazo.

Quando se avalia o efeito da administração de isoflurano em P14, observa-se que os animais do grupo ISO apresentaram diminuição na hidrólise dos três nucleotídeos analisados (ATP, ADP e AMP). Dentre as oito NTPDases caracterizadas, as formas 1, 2, 3 e 8 estão ancoradas à membrana plasmática, com sua atividade catalítica voltada para o meio extracelular, e necessitam de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  em concentrações milimolar para atividade máxima, sendo inativadas na ausência desses íons (Zimmermann, 2001). Considerando que nosso estudo envolve sinaptossomas de medula espinhal, avaliando a atividade de ectonucleotidases, portanto localizadas em membranas celulares, pode-se sugerir que diferentes mecanismos de ação atribuídos ao isoflurano possam estar envolvidos nas alterações da funcionalidade destas enzimas, destacando-se sua interferência em volume e fluidez de membranas celulares, assim como, bloqueio de canais iônicos, aumento do tônus do sistema gabaérgico, inibição de neurotransmissores excitatórios e hiperpolarização celular.

Considerando que a NTPDase 1, também conhecida como ecto-apirase, hidrolisa igualmente os nucleotídeos trifosfatados e difosfatados (1:1), pode-se sugerir esta seja a enzima envolvida no efeito observado após a utilização de isoflurano no período neonatal. Esta enzima apresenta ampla distribuição nas superfícies celulares de todos os tipos de células do sistema nervoso central (Nagy, 1997; Zimmermann, 2001, 2006). Quando a NTPDase 1 está ativa, o ATP extracelular é convertido a AMP e, após, à adenosina pela ecto-5' nucleotidase. Com isto, o ADP não é um produto apreciável. Entretanto, quando a NTPDase 1 está inibida, como é o caso do sinaptossoma de medula espinhal, o ATP é convertido em ADP por outras ecto-ATPases, e o ADP pode se acumular transitoriamente no meio extracelular. Neste caso, o AMP, que é o substrato da ecto-5' nucleotidase, pode estar diminuído. Adicionalmente, a reação catalisada pela ecto-5' nucleotidase é passo limitante na via de conversão do ATP

extracelular em adenosina (Cunha & Ribeiro, 2000). É importante observar que esta enzima é inibida pelo ATP e/ou ADP (Cunha & Sebastião, 1991). Então, somente quando os níveis de ATP e ADP diminuem abaixo do limiar de inibição da ecto-5' nucleotidase, ocorre formação de adenosina em quantidade considerável. Pode-se sugerir, no caso de administração de isoflurano em P14, que o ATP e o ADP podem se acumular no meio extracelular de neurônios sensoriais da medula espinhal, devido à inibição das atividades NTPDásicas, e o aumento destes nucleotídeos inibe a atividade da ecto-5' nucleotidase. Entretanto, é difícil inferir se esse ensaio, realizado *in vitro*, resultará ou não em diminuição de adenosina extracelular *in vivo*.

A disponibilidade de ATP extracelular aumenta em decorrência de uma variedade de mecanismos, incluindo estimulação mecânica, liberação vesicular com outros neurotransmissores (ex: acetilcolina, noradrenalina, glutamato, GABA e neuropeptídeo Y) ou dano celular (ex: cirurgia, hipóxia) (Burnstock & Williams, 2000; North, 2002; Burnstock, 2007). A degradação metabólica do ATP leva ao aumento dos níveis extracelulares de ADP, AMP e adenosina, todos com atividades mediadas por receptores específicos. No contexto da transmissão nociceptiva, a ativação de receptores P1 pela adenosina diminui a nocicepção, a inflamação e a excitabilidade celular (McGaraughty & Jarvis, 2006), enquanto que a ativação de receptores P2 pelo ATP estimula a excitabilidade celular e aumenta a liberação de aminoácidos excitatórios, desencadeando respostas nociceptivas e podendo levar à apoptose. A injúria tecidual resulta em liberação de mediadores pró-nociceptivos, entre eles o ATP, que sensibilizam terminais nervosos periféricos e que podem levar a um aumento na excitabilidade neuronal nos neurônios do corno dorsal da medula espinhal. O procedimento cirúrgico utilizado nesta dissertação pode ser caracterizado como um evento lesivo, causando lise celular. Observou-se que apenas a administração de isoflurano produziu diminuição nas atividades NTPDásicas e esta foi revertida pela cirurgia. Portanto, pode-se sugerir que este seja um efeito compensatório, devido ao aumento da liberação de ATP causada pela cirurgia.

A administração de cetamina S+/fentanil não foi capaz de alterar a hidrólise dos nucleotídeos de adenina em P14; porém este efeito ocorreu em P30, como aumento nas hidrólises de ATP e AMP. E a cirurgia reverteu somente o aumento da hidrólise do ATP. Neste caso, o efeito foi mais tardio, mas não menos importante, pois demonstra que o uso destes fármacos interfere na sinalização purinérgica. Como este efeito é observado em médio prazo, pode-se sugerir que a associação de cetamina S+/fentanil em P14 gera um processo adaptativo no sistema purinérgico, mais especificamente na hidrólise dos nucleotídeos da adenina, que pode estar sendo refletido nas alterações nociceptivas observadas nestes animais.

Considerando que a NTPDase 2, também conhecida como ecto-ATPase, apresenta grande preferência pelos nucleotídeos trifosfatados sobre os difosfatados (30:1), pode-se sugerir como sendo esta a enzima responsável pelo efeito observado após a administração de cetamina S+/fentanil no período neonatal, tendo a função de modular o sinal do ATP em sinaptossomas de medula espinhal em P30. Esta enzima é expressa em SNC de ratos desde o período embrionário e, dessa maneira, não somente inativa os ligantes de receptores dos nucleotídeos trifosfatados, mas também gera ligantes para os receptores dos nucleotídeos difosfatados (Zimmermann, 2006). Está bem estabelecido que o ATP é um neurotransmissor facilitatório da nocicepção ao atuar em receptores P2X<sub>3</sub>; no entanto, estes receptores estão co-localizados com receptores P2Y<sub>1</sub>, inibitórios da nocicepção (Ruan & Burnstock, 2003). Além disto, outros receptores P2Y são capazes de inibir a adenilato ciclase (von Kügelgen, 2006) e, com isso, promover uma inibição da liberação de neurotransmissores (Hussl & Boehm, 2006).

A administração de cetamina S+/fentanil em P14 provocou analgesia observada no teste de *tail-flick* e aumento da hidrólise de ATP e AMP em sinaptossomas de medula espinhal, em P30. Considerando que estes resultados podem estar relacionados, é importante considerar que o aumento da hidrólise do ATP por ecto-ATPases tem como consequência aumento da concentração de ADP. Estudos prévios demonstram que o ADP, gerado pela degradação

enzimática de ATP, é um potente agonista P2Y (Burnstock, 2006; Zimmermann, 2006), diminuindo a neurotransmissão excitatória em neurônios sensoriais secundários e minimizando o efeito algogênico do ATP (Gerevich *et al.*, 2004). A ativação de receptores P2Y estimula vários mecanismos modulatórios intracelulares, tais como ativação de fosfolipase C e aumento de adenilato ciclase (von Kügelgen, 2006). Por outro lado, outros receptores P2Y são capazes de inibir esta enzima (von Kügelgen, 2006), promovendo a inibição da liberação de neurotransmissores (Hussl & Boehm, 2006). Embora a hipótese sugerida não tenha sido testada neste estudo, pode-se sugerir que o aumento na hidrólise do ATP, em medula espinhal de ratos jovens submetidos no período neonatal à administração de cetamina S+/fentanil, tem a função de remover o sinal do ATP, gerando um segundo sinal mediado pelo ADP.

Considerando que o aumento da hidrólise do AMP gera maiores concentrações de adenosina, pode-se sugerir que este efeito esteja colaborando com a analgesia observada nestes animais no TFL em P30. Os receptores de adenosina do subtipo A<sub>1</sub> estão associados com o efeito modulatório na transmissão da dor em nível espinhal (Keil & DeLander, 1996). Agonistas A<sub>1</sub> parecem atuar pré-sinápticamente, inibindo a liberação de neurotransmissores, como noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina e glutamato (Brundege & Dunwiddie, 1997); ou pós-sinápticamente, reduzindo a excitabilidade neuronal pelo aumento da condutância de K<sup>+</sup> (Hass & Greene, 1988; Lamber & Teyler, 1991). A adenosina formada endogenamente está envolvida no controle fisiológico da dor e com antinocicepção opióide (Bennet, 2000).

Em P30, o procedimento cirúrgico não reverteu o aumento na hidrólise do AMP, desencadeado pela administração da associação cetamina S+/fentanil realizada em P14; porém, reverteu o aumento da hidrólise de ATP. Pode-se sugerir que o aumento da disponibilidade de ATP extracelular decorrente da exposição a procedimentos invasivos citado na literatura (Burnstock & Williams, 2000; North, 2002; Burnstock, 2007) possa ser decorrente da inibição

da expressão da enzima de hidrólise do ATP e/ou da atividade ATPásica. Neste caso específico, o aumento observado pela administração de cetamina S+/fentanil foi revertido pelo procedimento cirúrgico, sendo observado como resultado final um nível de hidrólise do ATP igual ao do grupo controle. Pode-se inferir que houve um equilíbrio entre os efeitos decorrentes dos dois fatores (administração de cetamina S+/fentanil e cirurgia), que pôde ser observado dezesseis dias após a intervenção.

Como este estudo foi desenvolvido em animais no período neonatal e, portanto, em período em que o SNC está em processo de maturação, é importante salientar que, ao longo do desenvolvimento, alterações em receptores ativados por nucleotídeos e nucleosídeos da adenina podem ser acompanhadas por alterações nas ectonucleotidases (Zimmermann, 2006). Além disso, NTPDase 1 e 3 são encontradas em neurônios, enquanto que a NTPDase 2 está associada com imaturidade e células gliais satélites no gânglio da raiz dorsal (Braun *et al.*, 2004). Ressalta-se também que a ecto-5' nucleotidase encontra-se predominantemente na glia em SNC adulto, e evidências demonstram que esta enzima pode estar relacionada com desenvolvimento da superfície neural e plasticidade (Zimmemann, 2006).

Uma multiplicidade de receptores, transmissores, sistemas de segundos mensageiros, fatores de transcrição e outras moléculas sinalizadoras estão envolvidas nas vias de dor (Honore & Jarvis, 2006; Perl, 2007). É importante salientar que os efeitos das purinas na nocicepção são complexos, dependendo do subtipo de receptor ativado e sua localização. As técnicas utilizadas neste estudo não permitem determinar os reais mecanismos envolvidos nas alterações das hidrólises dos nucleotídeos da adenina observadas em decorrência da administração de anestésicos gerais no período neonatal. Novos estudos são necessários para avaliar o papel do sistema purinérgico na ação dos anestésicos gerais; avaliando adaptações que possam ter ocorrido em número e/ou sensibilidade das enzimas e até mesmo dos receptores, para melhor elucidar os resultados obtidos.

---

## **VIII. CONCLUSÕES**

## VIII.1 – CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

**Os resultados obtidos nesta dissertação nos permitem concluir que:**

1. a administração de isoflurano em P14 produziu:

1.1. diminuição na nocicepção em curto prazo (P14), parcialmente revertida pelo procedimento cirúrgico;

1.2. diminuição na nocicepção em longo prazo (P60);

1.3. aumento na atividade locomotora em curto prazo (P14), revertida pelo procedimento cirúrgico;

1.4. aumento da atividade locomotora em médio prazo (P30);

1.5. diminuição da hidrólise de ATP, ADP e AMP em curto prazo (P14), reversão da diminuição da hidrólise do ATP e ADP pelo procedimento cirúrgico.

2. a administração de cetamina-s/fentanil em P14 produziu:

2.1. diminuição na nocicepção em curto prazo (P30);

2.2. aumento na atividade locomotora em médio prazo (P30);

2.3. diminuição no nível de ansiedade em médio (P30) e longo prazos (P60);

2.4. aumento da hidrólise de ATP e AMP em médio prazo (P30), reversão do aumento da hidrólise do ATP pelo procedimento cirúrgico.

## VIII.2 - CONCLUSÃO GERAL

Considerando o conjunto dos resultados desta dissertação, pode-se concluir que a administração de anestésicos gerais, independentemente da via de administração, associado ou não a procedimento cirúrgico em ratos, no período neonatal (P14), promove alterações comportamentais e bioquímicas de curta, média e longa duração, portanto com repercussões na vida adulta. Isto nos leva a salientar a importância do conhecimento da neurobiologia de animais de menor idade, objetivando a escolha de adequado manejo fármaco-terapêutico nestes indivíduos.

## **IX - PERSPECTIVAS**

Devido às técnicas utilizadas neste estudo não permitirem determinar os reais mecanismos envolvidos nas alterações comportamentais e bioquímicas, são necessárias novas pesquisas envolvendo os diversos sistemas citados, como glutamatérgico, opioidérgico, gabaérgico, dopaminérgico, que permitam um melhor entendimento dos resultados obtidos. Para tanto, buscaremos a utilização de fármacos que atuem especificamente nos sistemas de neurotransmissores citados acima. Além disso, avaliaremos possíveis adaptações ocorridas em número e/ou sensibilidade de receptores destes neurotransmissores, utilizando técnicas específicas, bem como, a análise da expressão das E-NTPDases e concentrações de nucleotídeos e nucleosídeos da adenina em medula espinhal de ratos submetidos a administração de anestésicos gerais em P14.

---

## **X. REFERÊNCIAS**

Abbracchio, M.P.; Burnstock G.; Verkhratsky A.; Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 2009 Jan;32(1):19-29.

Abelson, K.S.P.; Goldkuhl, R.R.; Nylund, A.; Hoglund A.U. The effect of ketamine on intraspinal acetylcholine release: involvement of spinal nicotinic receptors. *Eur J Pharmacol.* 2006; 534:122–128.

Agteresch, H.J.; Dagnelie, P.C.; van den Berg J.W.; Wilson J.L. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 1999;58:211– 32.

Aloisi, A.M.; Albonetti M.E.; Carli G. Sex differences in the behavioural response to persistent pain in rats. *Neurosci Lett.* 1994 Sep 26;179(1-2):79-82.

Anand, K.J.; Hickey P.R. Pain and its effects in the human neonate and fetus. *N Engl J Med* 1987; 317:1321–1329.

Anand, K.J. Clinical importance of pain and stress in preterm neonates. *Biol Neonate* 1998; 73(1):1-9.

Anand, K.J.; Coskun, V.; Thirvikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Plotsky, P.M. Long-term behavioral effects of repetitive pain in neonatal rat pups. *Physiol. Behav.* 2009; 66, 627–637.

Andrews, K.; Fitzgerald M. Biological barriers to paediatric pain management. *Clin J Pain* 1997;13(2):138–43.

Anseloni, V.Z.; Morato, S.; Brandão, M.L. A comparative study of the effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray and nucleus accumbens of rats submitted to the elevated plus-maze test. *Exp. Brain Res.* 1999; 129, pp. 260–268.

Anseloni, V.C., He, F., Novikova, S.I., Turnbach Robbins, M., Lidow, I.A., Ennis, M., and Lidow, M.S. Alterations in stress-associated behaviors and neurochemical markers in adult rats after neonatal short-lasting local inflammatory insult. *Neuroscience* 2005; 131, 635–645.

Arnt, J. Behavioral studies of dopamine receptors: Evidence for regional selectivity and receptor multiplicity, *Dopamine Receptors*. Edited by Creese I, Fraser CM. New York, Alan R. Liss, 1987, pp 199-231.

Bacopoulos, N.G.; Redmond, D.E.; Roth, R.H. Serotonin and dopamine metabolites in brain regions and cerebrospinal fluid of primate species: effects of ketamine and fluphenazine. *J. Neurochem.* 1979; 32: 1215-1218.

Bannerman, D.M.; Deacon, R.M.; Offen, S.; Friswell, J.; Grubb, M.; Rawlins, J.N. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci.* 2002 Oct;116(5):884-901.

Bannerman, D.M.; Grubb, M.; Deacon, R.M.; Yee, B.K.; Feldon, J.; Rawlins, J.N. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res.* 2003 Feb 17;139(1-2):197-213.

Barg, J.; Levy, R.; Simantov, R. Expression of the three opioid receptor subtypes mu, delta and kappa in guinea pig and rat brain cell cultures and in vivo. *Int J Dev Neurosci.* 1989;7(2):173-9.

Barkus, C.; McHugh, S.B.; Sprengel, R.; Seeburg, P.H.; Rawlins, J.N.; Bannerman, D.M. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol.* 2010 Jan 10;626(1):49-56.

Basbaum, A.L.; Fields, H.L. 1984. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann Rev. Neurosci.* 7: 309-338.

Battastini, A.M.O.; da Rocha, J.B.T.; Barcellos, C.K.; Dias, R.D.; Sarkis, J.J.F. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res* 1991; 16:1303-10.

Bayer, S.A.; Altman, J.; Russo, R.J.; Zhang, X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 1993;14:83-144.

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

Bennett, G.J. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor. *J Pain Symptom Manage* 2000;19: S2-S6.

Berde, C.B.; Anand, K.S.; Sethna, N.F. Pediatric pain management. In: Gregory GA. *Pediatric anesthesia.* 2 ed. New York: Churchill Livingstone, vol. 2, p. 679-727, 1989.

Berde, C.B.; Sethna, N.F. Drug therapy: analgesics for the treatment of pain in children. *N Engl J Med* 347:1094-1103, 2002.

Bhutta, A.T.; Rovnaghi, C.; Simpson, P.M.; Gossett, J.M.; Scalzo, F.M.; Anand, K.J.; Interactions of inflammatory pain and morphine in infant rats. Long-term behavioral effects. *Physiol Behav* 2001;73(1-2):51-8

Bianchin, M.; Walz, R.; Ruschel, A.C.; Zanatta, M.S.; Da Silva, R.C.; Bueno e Silva M, *et al.* Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the amygdala up to 20 days after training. *Behav Neural Biol* 1993; 59(2):83-6.

Bonica, J.J.; Loeser, J.D. History of pain concepts and therapies. In: Loeser J.D. (Ed). *Bonica's management of pain*. 3ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2001. p. 3-16.

Bonnycastle, D.D.; Cook, L.; Ipsen, J. The action of some analgesic drugs in intact and chronic spinal rats. *Acta Pharmacol Toxicol* 1953;9:332–336.

Boucher, T.; Jennings, E.; Fitzgerald, M. The onset of diffuse noxious inhibitory controls in postnatal rat pups: A C-Fos study. *Neurosci. Lett.*1998; 257, 9–12.

Bradford, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem* 1976; 72:218-251.

Braun, N.; Sévigny, J.; Robson, S.C.; Hammer, K.; Hanani, M.; Zimmermann, H. Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia* 2004;45:124–132.

Britton, D.R.; Britton, K.T. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. *Pharmacol Biochem Behav* 1981;15(4):577-82.

Brundege, J.M.; Dunwiddie, T.V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 1997;39: 353-391.

Burnstock, G.; Williams, M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp* 2000;295:862–869.

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

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

Burnstock, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007;87:659–797.

Byrnes, M.L.; Reynolds, J.N.; Brien, J.F. Effect of prenatal ethanol exposure during the brain growth spurt of the guinea pig. *Neurotoxicol Teratol* 2001;23:355–64.

Caille, I.; Dumartin, B.; Le Moine, C.; Begueret, J.; Bloch, B. Ontogeny of the D1 dopamine receptor in the rat striatonigral system: an immunohistochemical study. *European Journal of Neuroscience* 1995;7:714–722.

Campagna, J.A.; Miller, K.W.; Forman, S.A. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* 2003;348:2110–24

Carbajal, R.; Rousset, A.; Danan, C. *et al.* Epidemiology and treatment of painful procedures in neonates in intensive care units. *JAMA* 2008;300:60–70.

Carlini, V.P.; Monzón, M.E.; Varas, M.M.; Cragnolini, A.B.; Schiöth, H.B.; Scimonelli, T.N. *et al.* Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299(5):739-43.

Castilho, V.M.; Macedo, C.E.; Brandão, M.L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002 Dec;165(1):77-85.

Castro, M.C.F.Z. Factores que contribuem para a indicação de analgesia com opióides em recém-nascidos em ventilação pulmonar mecânica. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola de Medicina; 2001 (Tese de Mestrado).

Caumo, W.; Ferreira, M.B.C. Perioperative anxiety: psychobiology and effects in postoperative recovery. *The Pain Clinic*, Holanda, 2003; v. 15, n. 2, p. 87-101.

Caumo, W.; Broenstrup, J.C.; Fialho, L.; Petry, S.M.G.; Brathwait, O.; Bandeira, D.; Loguercio, A.; Ferreira, M.B.C. Risk factors for postoperative anxiety in children. *Acta Anaesthesiol Scand* 2000; 44: 782–789.

Chadwick, B.P.; Frischauf, A.M. Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. *Mamm Genome* 1997;8:668–672.

Chan, K.; Delfert, D.; Junger, K.D. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157:375-80.

Chapman, C.R.; Nakamura, Y. A passion of the soul: An introduction to pain for consciousness researchers. *Conscious Cogn.* 1999;8, 391–422.

Chen, J. F.; Huang, Z.; Ma, J.; Zhu, J.; Moratalla, R.; Standaert, D.; Moskowitz, M.A.; Fink J.S.; Schwarzschild, M.A.. A2A adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J. Neurosci.* 1999;19: 9192–9200.

Chermont, A.G.; Guinsburg, R.; Balda, R.C.; Kopelman, B.I. What do pediatricians know about pain assessment and treatment in newborn infants? *J Pediatr (Rio J)* 2003;79(3):265-72.

Cohen, M.M.; Cameron, C.B.; Duncan, P.G. Pediatric anesthesia morbidity and mortality in the perioperative period. *Anesth Analg* 1990;70:160–7

Collins, J.G.; Kendig, J.J.; Mason, P. Anesthetic actions within the spinal cord: contributions to the state of general anesthesia. *Trends in Neurosciences* 1995;18(12): 549-553.

Craig, A.; Dostrovsky, J.O. Medulla to thalamus. In “*Textbook of Pain*” (P. Wall and R. Melzack, eds.), 1999;pp 183–214. Churchill, Edinburgh.

Cunha, R.A.; Sebastião, A.M. Extracellular metabolism of adenine nucleotides and adenosine in the innervated skeletal muscle of the frog. *Eur J Pharmacol* 1991;197 pp. 83–92.

Cunha, R.A.; Ribeiro, J.A. ATP as a presynaptic modulator. *Life Sci* 2000;68 pp. 119–137

Cunha, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 2001;38:107–25.

Danneman, P.J.; Mandrell, T.D Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats. *Lab Anim Sci.* 1997 Aug;47(4):386-95.

Dantas, G. Estudo dos efeitos de manipulações farmacológicas em ratos de 21 dias submetidos a um modelo de dor pós-cirúrgica. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001 (Tese de Doutorado).

Davison, A.N.; Dobbing, J. Applied neurochemistry. Oxford: Blackwell; 1968. p. 253–316.

DeMarco, G.J.; Pascoe, P.J. Anatomy, Physiology, and Effects of Pain. IN: Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. San Diego: Elsevier, 2008, p.3-25.

Deshpande, J.K.; Anand, K. Basic aspects of acute pediatric pain and sedation. IN: The Pediatric Pain Handbook. Deshpande JK, Tobias JD (eds). *The Pediatric Pain Handbook*. St. Louis: Mosby-Years Book, Inc., 1996, p.1-48.

Dickenson, A.H.; Suzuki, R.; Reeve, A.J. Adenosine as a potential analgesic target in inflammatory and neuropathic pains. *CNS Drugs* 2000;13, 77–85.

Dilger, J.P. The effects of general anaesthetics on ligand-gated ion channels. *Br J Anaesth* 2002;89:41–51.

Dobbing, J.; Sands, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 1979; 3(1):79–83.

Drake, C.T.; Milner, T.A. Mu opioid receptors are in somatodendritic and axonal compartments of GABAergic neurons in rat hippocampal formation, *Brain Res.* 1999;849 pp. 203–215.

El-Maghrabi, E.A.; Eckenhoff, R.G. Inhibition of dopamine transport in rat brain synaptosomes by volatile anesthetics. *Anesthesiology* 1993; 78:750-6.

Falcon, M.; Guendellman, D.; Stolberg, A.; Frenk, H. & Urca, G. Development of thermal nociception in rats. *Pain* 1996;67, 203–208.

Feldman, R.S.; Meyer, J.S.; Quenzer, L. F. Principles of Neuropsychopharmacology 1997. Sinauer Associates, Inc 629.

Ferreira, M.B.C. Dor crônica. In: Kapczinski FP, Quevedo JL, Izquierdo IA. *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos*. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 181-200.

Fiebich, B. L.; Biber, K.; Kacin, G.; Berger, M.; Bauer, J.; van Calker, D. Adenosine A2b receptors mediate an increase in interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astrogloma cells. *J. Neurochem.* 1996a; 66, 1426–1431.

Fields, H.L.; Heinricher, M.M.; Mason, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu. Rev. Neurosci.* 1991;14, 219–245.

Fields, R.D.; Burnstock, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jun;7(6):423-36.

Fishman, R.H.B.; Feigenbaum, J.J.; Yanai, J.; Klawans, H.L. The relative importance of dopamine and norepinephrine in mediating locomotor activity. *Prog Neurobiol* 1983; 20:55-88.

Fitzgerald, M.; Anand, K.J. Developmental neuroanatomy and neurophysiology of pain. In: Schechter NL, Berde CB, Yaster M, editors. *Pain in infant, children, and adolescents*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p. 11-31.

Fitzgerald, M. Developmental biology of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia* 1995;75:177-185.

Fitzgerald, M. The development of nociceptive circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005;6, 507–520.

Frederick, A.L.; Stanwood, G.D. Drugs, biogenic amine targets and the developing brain. *Dev Neurosci.* 2009;31(1-2):7-22.

Fredholm, B.B. Adenosine and neuroprotection. *Int. Rev. Neurobiol.* 1997; 40:259-80.

Freo, U.; Ori, C. Effects of anesthesia and recovery from ketamine racemate and enantiomers on regional cerebral glucose metabolism in rats. *Anesthesiology.* 2004 May;100(5):1172-8.

Garthwaite, J. NMDA receptors, neuronal development and neurodegeneration. In: Watkins JC, Collinridge GL (Eds). *The NMDA receptor*. Oxford: IRL Press, 1989; 187-205.

Gerevich, Z.; Borvendeg, S.J.; Schröder, W.; Franke, H.; Wirkner, K.; Nörenberg, W.; Fürts, S.; Gillen, C.; Illes, P. Inhibition of N-type voltage-activated calcium channels in rat dorsal root ganglion neurons by P2Y receptors is a possible mechanism of ADP-induced analgesia. *J Neurosci* 24(4):797-807, 2004.

Giordano, J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. *Pain Physician.* 2005;8, 277–290.

Goldim, J. R.; Raymundo, M. M. Pesquisa em saúde e os direitos dos animais: princípios gerais das pesquisas com animais. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

Grunau, R. Long-term consequences of pain in human neonates. In: Anand K, Stevens B, McGrath P. *Pain in Neonates*. Netherlands: Elsevier Science; 2000. p. 55-76.

Grunau, R.E.; Oberlander, T.F.; Whitfield, M.F.; Fitzgerald, C.; Lee, S.K. Demographic and therapeutic determinants of pain reactivity in very low birth weight neonates at 32 weeks' postconceptional age. *Pediatrics.* 2001;107:105-112.

Guimarães, F.S.; Carobrez, A.P.; de Aguiar, J.C.; Graeff, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 1991;103:91-94.

Guinsburg, C.A.P.; Branco de Almeida, M.F.; Balda R.C.X.; Berenguel, R.C.; Tonelotto, J.; Kopelman, B.I. Differences in pain expression between male and female newborn infants, *Pain* 2000;85, pp. 127–133.

Guy, E.R.; Abbott, F.V. The behavioral response to formalin in preweanling rats. *Pain* 1992;51, pp. 81–90.

Hass, H.L.; Greene, R.W. Endogenous adenosine inhibits hippocampal CA1 neurones: further evidence from extra- and intracellular recordings. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1988; 337, pp. 561–565.

Hayase, T.; Yamamoto, Y.; Yamamoto, K. Behavioral effects of ketamine and toxic interactions with psychostimulants. *BMC Neurosci.* 2006 Mar 16;7:25.

Hevers, W.; Hadley, S.H.; Luddens, H.; Amin, J. Ketamine, but not phencyclidine, selectively modulates cerebellar GABA<sub>A</sub> receptors containing alpha 6 and delta subunits, *J Neurosci* 2008; 28, pp. 5383–5393.

Hirota, K.; Okawa, H.; Appadu, B.L.; Grandy, D.K.; Devi, L.A.; Lambert, D.G. Stereoselective interaction of ketamine with recombinant mu, kappa, and delta opioid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells, *Anesthesiology* 1999; 90, pp. 174–182.

Holton, F.A.; Holton, P.J. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role for adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol* 1954;126:124–140.

Holton, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol* 1959;145:494–504.

Hohmann, A.G.; Neely, M.H.; Pina, J.; Nackley, A.G. Neonatal chronic hind paw inflammation alters sensitization to intradermal capsaicin in adult rats: A behavioral and immunocytochemical study. *J. Pain* 2005;6, 798–808.

Honore, P.; Jarvis, M.F. Acute and chronic pain, in *Comprehensive Medicinal Chemistry II* (Triggle DJ and Taylor JB eds) 2006; Vol. 6, pp. 327–349, Elsevier, Oxford.

Howard, R.; Carter, B.; Curry, J. *et al.* Special issue: good practice in postoperative and procedural pain management. *Paediatr Anaesth* 2008;18(S1):1–81.

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

Ikonomidou, C.; Bosch, F.; Miksa, M.; Bittigau, P.; Vöckler, J.; Dikranian, K.; Tenkova, T.I.; Stefovská, V.; Turski, L.; Olney, J.W. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 1999 Jan 1;283 (5398):70-4.

Irifune, M.; Shimizu, T.; Nomoto, M. Ketamine-induced hyperlocomotion associated with alteration of presynaptic components of dopamine neurons in the nucleus accumbens of mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991 Oct;40(2):399-407.

Irifune, M.; Sato, T.; Nishikawa, T.; Masuyama, T.; Nomoto, M.; Fukuda, T.; Kawahara, M. Hyperlocomotion during recovery from isoflurane anesthesia is associated with increased dopamine turnover in the nucleus accumbens and striatum in mice. *Anesthesiology*. 1997 Feb;86(2):464-75.

Irwin, S.; Houde, R.W.; Bennett, D.R.; Hendershot, L.C.; Steevers, M.H. The effects of morphine, methadone and meperidine on some reflex responses of spinal animals to nociceptive stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 1951;101:132–143.

Jahr, C.E.; Jessell, T.M. ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature* 1983;304:730–733.

Johnson, K.M.; Snell, L.D. Effects of phenciclidine (PCP)- like drugs on turning behaviour, 3H-dopamine up-take, and 3H-PCP binding. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1985; 22: 731-735.

Joó, G.; Horvath, G.; Klimscha, W.; Kekesi, G.; Dobos, I.; Szikszay, M.; Benedek, G. Effects of Ketamine and Its Enantiomers on the Morphine- or Dexmedetomidine-induced Antinociception after Intrathecal Administration in Rats. *Anesthesiology* 2000; 93(1):231-241.

Jung, A.B.; Bennett Jr, J.P. Development of striatal dopaminergic function. Preand postnatal development of mRNAs and binding sites for striatal D1 (D1a) and D2 (D2a) receptors. *Dev Brain Res* 1996;94:109–20.

Kalb, R.G.; Hockfield, S. The distribution of spinal cord N-methyl-D-aspartate receptors is developmentally regulated. *Society for Neuroscience Abstracts* 1991; 17: 1534

Kapur, S.; Seeman, P. NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D-2 and serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors—implications for models of schizophrenia, *Mol Psychiatry* 2002; 7, pp. 837–844.

Kegel, B.; Braun, N.; Heine, P. *et al.* An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 1997;36:1189–1200.

Keil, G.J.; DeLander, G.E. Altered sensory behaviors in mice following manipulation of endogenous spinal adenosine neurotransmission. *Eur J Pharmacol* 1996;312(1), pp. 7–14.

Keller, A.F.; Coull, J.A.; Chery, N.; Poisbeau, P.; De Koninck, Y. Region-specific developmental specialization of GABA-glycine cosynapses in laminae I-II of the rat spinal dorsal horn. *J Neurosci* 2001; 21: 7871–80.

Kostovic, I.; Rakic, P. Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol.* 1990 Jul 15;297(3):441-70.

Kouvaras, E.; Asproдини, E.K.; Asouchidou, I.; Vasilaki, A.; Kilindris, T.; Michaloudis, D.; Koukoutianou, I.; Papatheodoropoulos, C.; Kostopoulos, G. Fentanyl treatment reduces GABAergic inhibition in the CA1 area of the hippocampus 24 h after acute exposure to the drug. *Neuropharmacology.* 2008 Dec;55(7):1172-82. Epub 2008 Jul 26.

Krasowski, M.D.; Harrison, N.L. General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1278–1303.

Kukulski, F.; Lévesque, S.A.; Lavoie E.G. *et al.* Comparative hydrolysis of P<sub>2</sub> receptor agonists by NTPDase 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signalling* 2005;1:193–204.

Lamber, N.A.; Teyler, T.J. Adenosine depresses excitatory but not fast inhibitory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1991; 122, pp. 50–52.

Lavoie, E.G.; Kukulski, F.; Lévesque, S.A.; Lecka, J.; Sévigny, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(10):1917-26.

Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S.W. Animal Models of Nociception *Pharmacol Rev* 53:597–652, 2001.

Levitt, P.; Rakic, P. The time of genesis, embryonic origin and differentiation of the brain stem monoamine neurons in the rhesus monkey. *Brain Res* 1982;256(1):35–57.

Levy, D.M. The infant's earliest memory of inoculation: a contribution to public health procedures. *J Gen Psychol* 1960; 96:3-46.

de Lima, A.D.; Opitz, T.; Voigt, T. Irreversible loss of a subpopulation of cortical interneurons in the absence of glutamatergic network activity. *Eur J Neurosci* 2004;19:2931–43.

Lin, C.; Al-Chaer, E.D. Long-term sensitization of primary afferents in adult rats exposed to neonatal colon pain. *Brain Res.* 2003;971, 73–82.

Linneman, P.K.; Terry, B.E.; Burd, R.S. The efficacy and safety of fentanyl for the management of severe procedural pain in patients with burn injuries. *J. Burn Care Rehabil.* 2000; 21: 519-522.

Linton, S.J.; Skevington, S.M. Psychological factors. In: Crombie IK, Croft PR, Linton SJ, Leresche L, Korff MV (eds). *Epidemiology of Pain*. New York: IASP press, 1999. p. 25-42.

Lister, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 1990; 46(3):321-40.

Loeser, J.D.; Butler, S.H.; Chapman, C.R.; Turk, D.C (eds). *Bonica's Management of Pain*. 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

Lynn, D.A.; Brown, G.R. The ontogeny of exploratory behavior in male and female adolescent rats (*Rattus norvegicus*). *Dev Psychobiol.* 2009 Sep;51(6):513-20.

Ma, W.; Behar, T.; Chang, L.; Barker, J.L. Transient increase in expression of GAD<sub>65</sub> and GAD<sub>67</sub> mRNAs during postnatal development of rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1994; 346: 151-160.

Madigan, S.R.; Raj, P.P. Historia y estado actual del tratamiento del dolor. In: Raj P.P. (Ed). *Tratamiento práctico del dolor*. Madrid: Mosby-Doyma, 2000. p.3-15.

Maeng, S.; Zarate, C.A.; Du, J.; Schloesser, R.J.; McCammon, J.; Chen, G.; Manji, H.K. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors, *Biol Psychiatry* 2008; 4, pp. 349–352.

Mantz, J.; Varlet, C.; Lecharny, J-B.; Henzel, D.; Lenot, P.; Desmots, J-M. Effects of volatile anesthetics, thiopental, and ketamine on spontaneous and depolarization-evoked dopamine release from striatal synaptosomes in the rat. *Anesthesiology* 1994; 80:352-63.

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

Matheus, M.G.; Nogueira, R.L.; Carobrez, A.P.; Graeff, F.G.; Guimarães, F.S. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 1994;113: 565.569.

McGaraughty, S.; Jarvis, M.F. Purinergic control of neuropathic pain. *Drug Dev Res* 2006; 67:376–388.

McGraw, M.D. The neuromuscular maturation of the human infant. New York: Columbia University Press, 1943.

de Mendonça, A.; Sebastião, A.M.; Ribeiro, J.A. Adenosine — does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Rev* 2000; 33:258–274.

Menescal-de-Oliveira, L. As Dores. In: Lent R. *Neurociência da Mente e do Comportamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.184-200.

Merskey, H.; Bogduk, N. “Classification of Chronic Pain Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms.” 1994; pp 1–215. IASP press, Seattle,WA.

Millan, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999;57:1–164.

Mitchell, D.; Hellon, R.F. Neuronal and behavioral responses in rats during noxious stimulation of the tail. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1977; 197:169–194.

Moore, K.L.; Persaud, T.V.N. *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects* (5th edition), W.B. Saunders Company, Philadelphia (1998).

Morgan, G.E.; Mikhail, M.S. Pain Management. In: Morgan GE, Mikhail MS (eds). *Clinical Anesthesiology*. 2ed. Stamford: Appleton & Lange, 1996. p. 274-316.

Moriyama, T.; Iida, T.; Kobayashi, K.; Higashi, T.; Fukuoka, T.; Tsumura, H.; Leon, C.; Suzuki, N.; Inoue, K.; Gachet, C. *et al.* Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci* 2003; 23:6058–6062.

Motta, V.; Penha, K.; Brandão, M.L., Effects of microinjections of  $\mu$  and  $\kappa$  receptor agonists into the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus-maze test. *Psychopharmacology* 1995; 120 (4), pp. 470–474.

Nagy, A.K.; Houser, C.; Delgado-Escueta, A.V. Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isosmotic gradient (Percoll) *J. Neurochem* 1984; 43 1114-1123.

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

Netto, C.A.; Siegfried, B.; Izquierdo, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of a concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol* 2004; 48:304-309.

Niewoehner, B.; Single, F.N.; Hvalby, Jensen, V.; Meyer zum Alten Borgloh, S.; Seeburg, P.H.; Rawlins, J.N.; Sprengel, R.; Bannerman, D.M. Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 2007 Feb;25(3):837-46.

North, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82:1013–1067.

Okamoto, T.; Minami, K.; Uezono, Y.; Ogata, J.; Shiraishi, M.; Shigematsu, A.; Ueta, Y. The inhibitory effects of ketamine and pentobarbital on substance P receptors expressed in *Xenopus* oocytes, *Anesth Analg* 2003; 97, pp. 104–110.

Opacka-Juffry, J.; Ahier, R.G.; Cremer, J.E. Nomifensine-induced increase in extracellular striatal dopamine is enhanced by isoflurane anaesthesia. *Synapse* 1991; 7:169-71.

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

Paul, R.; Schaaff, N.; Padberg, F.; Möller, H.J.; Frodl, T. Comparison of racemic ketamine and S-ketamine in treatment-resistant major depression: report of two cases. *World J Biol Psychiatry*. 2009;10(3):241-4.

Peakman, M.C.; Hill, S.J. Adenosine A2B-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 1994; 111, 191–198.

Pellow, S.; File, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986 Mar;24(3):525-9.

Perl, E.R. Ideas about pain, a historical view. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8:71–80.

Peters, J.W.B.; Schouw, R.; Anand, J.K.S.; van Dijk, M.; Duivenvoorden, H.J.; Tibboel, D. Does neonatal surgery lead to increased pain sensitivity in later childhood? *Pain* 2005; 114: 444-454.

Puelles, L.; Verney, C. Early neuromeric distribution of tyrosine-hydroxylase immunoreactive neurons in human embryos. *J Comp Neurol* 1998;394: 283–308.

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

Rampil, I.J.; Mason, P.; Singh, H. Anesthetic potency (MAC) is independent of forebrain structures in the rat. *Anesthesiology* 1993; 78: 707-712.

Randich, A.; Uzzell, T.; DeBerry, J.J.; Ness, T.J. Neonatal urinary bladder inflammation produces adult bladder hypersensitivity. *J. Pain* 2006; 7, 469–479.

Rao, P.A.; Molinoff, P.B.; Joyce, J.N. Ontogeny of dopamine D1 and D2 receptor subtypes in rat basal ganglia: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res Dev Brain Res* 1991;60(2):161–77.

Reich, D.L.; Silvay, G. Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Can J Anaesth* 1989; 36:186-197.

Reichert, A.P.S.; Silva, S.L.F.; Oliveira, J.M. Dor no recém-nascido: uma realidade a ser considerada. *Rev. Nursing* 2000 Ago; 3 (30): 28-30.

Reichling, D.B.; Kwiat, G.C.; Basbaum, A.I. Anatomy, physiology and pharmacology of the periaqueductal gray contribution to antinociceptive controls. *Progress in Brain Research* 1988; 77:31–46.

Rhee, J.S.; Wang, Z.M.; Nabekura, J.; Inoue, K.; Akaike, N. ATP facilitates spontaneous glycinergic IPSC frequency at dissociated rat dorsal horn interneuron synapses. *J Physiol* 2000;524:471–83.

Rice, J.E.; Vannucci, R.C.; Brierley, J.B. The influence of immaturity on hypoxic–ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 1981; 9, pp. 131–141.

Robson, S.C.; Sévigny, J.; Zimmermann, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* 2006; 2:409-430.

Rodgers, R.J.; Cole, J.C. Influence of social isolation, gender, strain and prior novelty on plus-maze behaviour in mice. *Physiol. Behav.* 1993; 54, 729–736.

Rodgers, R.J., Cole, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J., Hendrie, C.A. (Eds.), *Ethology and Psychopharmacology*. Wiley, Chichester, 1994 pp. 9–44.

Rodgers, R.J.; Johnson, N.J.T.; Carr, J.; Hodgson, T.P. Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. *Behav. Brain Res.* 1997; 86, 71–77.

Rozisky, J.R.; Dantas, G.; Adachi, L.S.; Alves, V.S.; Ferreira, M.B.; Sarkis, J.J.; Torres, I.L. Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life. *Int J Dev Neurosci.* 2008 Oct;26(6):561-5.

Ruan, H.Z.; Burnstock, G. Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat. *Histochem Cell Biol* 2003; 120(5):415-26.

Ruda, M.A.; Ling, Q.D.; Hohmann, A.G.; Peng, Y.B.; Tachibana, T. Altered nociceptive neuronal circuits after neonatal peripheral inflammation. *Science* 2000; 289, 628–631.

Saab, C.Y.; Park, Y.C.; Al-Chaer, E.D. Thalamic modulation of visceral nociceptive processing in adult rats with neonatal colon irritation. *Brain Res.* 2001; 1008, 186–192.

Sales, N.; Martres, M.P.; Bouthenet, M.L.; Schwartz, J.C. Ontogeny of dopaminergic D-2 receptors in the rat nervous system: characterization and detailed autoradiographic mapping with [125I]iodosulpride. *Neuroscience* 1989;28:673–700.

Sanders, R.D.; Patel, N.; Hossain, M.; Ma, D.; Maze, M. Isoflurane exerts antinociceptive and hypnotic properties at all ages in Fischer rats. *British Journal of Anaesthesia* 2005 95(3):393-399.

Sanders, R.D.; Ma, D.; Brooks, P.; Maze, M. Balancing paediatric anaesthesia: preclinical insights into analgesia, hypnosis, neuroprotection, and neurotoxicity. *Br J Anaesth* 2008; 101:597–609.

Sawynok, J. Adenosine receptor activation and nociception. *Eur. J. Pharmacol.* 1998; 317, 1–11.

Sawynok, J. Purines in pain management. *Curr. Opin. Cent. Periph. Nerv. Syst. Invest. Drugs* 1999; 1, 27–38.

Schambra, U.B.; Duncan, G.E.; Breese, G.R.; Fornaretto, M.G.; Caron, M.G.; Freneau, R.T. Jr. Ontogeny of D1A and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. *Neuroscience* 1994;62:65–85.

Sebastiao, A.M.; Ribeiro, J.A. Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Prog Neurobiol* 1996; 48: 167–189.

Sherman, S.M.; Guillery, R.W. Functional organization of thalamocortical relays. *J. Neurophysiol.* 1996; 76, 1367–1395.

Sherman, S.M.; Guillery, R.W. The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2002; 357,1695–1708.

Silveira, P.P.; Portella, A.K.; Clemente, Z.; Gamaro, G.D.; Dalmaz, C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23(1):93-9.

Sinclair, J.G.; Main, C.D.; Lo, G.F. Spinal vs supraspinal actions of morphine on the rat tail-flick reflex. *Pain* 1988; 33:357–362.

Skaer, T.L. Transdermal opioids for cancer pain. *Health. Qual. Outcomes* 2006; 4: 24.

Smith, D.J.; Azzaro, A.J.; Turndorf, H.; Abbott, S.B. The effect of ketamine HCl on the in vitro metabolism of norepinephrine in rat cerebral cortex tissue. *Neuropharmacol.* 1975; 14: 473-481.

Smith, D.J.; Azzaro, A.J.; Zaldivar, S.B.; Palmer, S.; Lee, H.S. Properties of the optical isomers and metabolites of ketamine on the high affinity transport and catabolism of monoamines. *Neuropharmacol.* 1981; 20: 391-396.

Smith, J.C.; Corbin, T.J.; McCabe, J.G. Bolon, B. Isoflurane with morphine is a suitable anaesthetic regimen for embryo transfer in the production of transgenic rats. *Lab Anim.* 2004 Jan;38(1):38-43.

Snell, L.D.; Mueller, Z.L.; Gannon, R.L.; Silverman, P.B.; Johnson, K.M. A comparison between classes of drugs having phencyclidine-like behavioural properties on dopamine efflux in vitro and dopamine metabolism in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1984; 231: 261-269.

Soriano, S.G.; Anand, K.J.S. Anesthetics and brain toxicity. *Current Opinion in Anaesthesiology* 2005; 18(3): 293-297.

Spruijt, B.M.; Van Hoof, J.A.; Gipsen, W.H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev* 1992; 72:825-52.

Sternberg, W.F.; Smith, L.; Scorr, L. Nociception and antinociception during the first week of life in mice: sex differences and test dependence. *The journal of Pain*, 2004, 5 (8) p. 420-426.

Sternberg, W.F.; Scorr, L.; Smith, L.D.; Ridgway, C.G.; Stout, M. Long-term effects of neonatal surgery on adulthood pain behavior. *Pain* 2005; 113: 347-353.

Swafford, L. I.; Allen, D. Pain relief in the pediatric patient. *Medical Clinics of North America*, 1968; 52 (1), 131-136.

Sweitzer, S.M.; Allen, C.P.; Zissen, M.H.; Kendig, J.J. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia upon acute opioid withdrawal in the neonatal rat. *Pain.* 2004 Jul;110 (1-2):269-80.

Taddio, A.; Katz, J.; Ilersich, A.L.; Koren, G. Effect of neonatal circumcision on pain response during subsequent routine vaccination. *Lancet.* 1997 Mar 1;349(9052):599-603.

Tai, Y.H.; Wang, Y.H.; Wang, J.J.; Tao, P.L.; Tung, C.S.; Wong, C.S. Amitriptyline suppresses neuroinflammation and up-regulates glutamate transporters in morphine-tolerant rats. *Pain* 2006; 124(1-2):77-86.

Tanaka, M.; Yoshida, M.; Emoto, H.; Ishii, H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol.* 2000 Sep 29;405(1-3):397-406.

Teixeira, M.J.; Okada, M. Dor: evolução histórica dos conhecimentos. IN: da Costa O.C. *Dor - Princípios e prática.* Porto Alegre: Artmed, 2009, p.27-56.

Teng, C.J.; Abbott, F.V. The formalin test: a doseresponse analysis at three developmental stages. *Pain* 1998; 76, pp. 337–347.

Thornton, S.R.; Smith, F.L. Long-term alterations in opiate antinociception resulting from infant fentanyl tolerance and dependence. *Eur J Pharmacol* 363(2-3):113-9, 1998.

Tjølsen, A.; Berge, O.G.; Hunskaar, S.; Rosland, J.H.; Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51(1):5-17.

Todd, M.M.; Weeks, J.B.; Warner, D.S. A focal cryogenic brain lesion does not reduce the minimum alveolar concentration for halothane in rats. *Anesthesiology* 1993; 79: 139-143.

Torres, I.L.S.; Buffon, A.; Silveira, P.P.; Duarte, M.Z.D.; Bassani, M.G.; Oliveira, S.S.; Battastini, A.M.O.; Sarkis, J.J.F.; Dalmaz, C.; Ferreira, M.B.C. Effect of chronic and acute stress on ectonucleotidase activities in spinal cord. *Physiology & Behavior* 2002,75: 1-5.

Tran, T.S.; Alijani, A.; Phelps, P.E. Unique developmental patterns of GABAergic neurons in rat spinal cord. *J Comp Neurol* 2003; 456-112-126.

Treit, D.; Menard, J.; Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1993; 44, pp. 365–370.

Tso, M.M.; Blatchford, K.L.; Callado, L.F.; McLaughlin, D.P.; Stamford, J.A. Stereoselective effects of ketamine on dopamine, serotonin and noradrenaline release and uptake in rat brain slices. *Neurochem Int.* 2004 Jan;44(1):1-7.

Twite, M.D.; Rashid, A.; Zuk, J.; Friesen, R.H. Sedation, analgesia, and neuromuscular blockade in the pediatric intensive care unit: survey of fellowship training programs. *Pediatr. Crit. Care Med* 2004; 5: 521-532.

Usuda, S.; Nishikori, K.; Noshiro, O.; Maeno, H. Neuroleptic properties of cis-N-(1-benzyl-2-methylpyrrolidin-3-yl)-5-chloro-2-methoxy-4-methylaminobenzamide (YM-09151-2) with selective antidopaminergic activity. *Psychopharmacol.* 1981; 73: 103-109.

van Praag, H.; Frenk, H. The development of stimulation-produced analgesia (SPA) in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1991; 64, 71–76.

Varju, P.; Katarova, Z.; Madarasz, E.; Szabo, G. GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res* 2001;305:239–46.

von Lubitz, D.K. Adenosine and cerebral ischemia: Therapeutic future or death of a brave concept?, *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 371, pp. 85–102.

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

Walker, S.M.; Meredith-Middleton, J.; Cooke-Yarborough, C.; Fitzgerald, M. Neonatal inflammation and primary afferent terminal plasticity in the rat dorsal horn. *Pain* 2003; 105, 185–195.

Walker, S.M.; Tochiki, K.K.; Fitzgerald, M. Hindpaw incision in early life increases the hyperalgesic response to repeat surgical injury: critical period and dependence on initial afferent activity. *Pain.* 2009 Dec 15;147(1-3):99-106.

Wang, T.F.; Guidotti, G. CD39 is an ecto-(Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>)-apyrase. *J Biol Chem* 1996; 271:9898–9901.

Wang, G.; Ji, Y.; Lidow, M.S.; Traub, R.J. Neonatal hind paw injury alters processing of visceral and somatic nociceptive stimuli in the adult rat. *J. Pain* 2004; 5, 440–449.

Wells, C.E.; Krikke, B.; Saunders, J.; Whittington, A.; Lever, C. Changes to open field surfaces typically used to elicit hippocampal remapping elicit graded exploratory responses. *Behav Brain Res.* 2009 Jan 30;197(1):234-8. Epub 2008 Aug 22.

Westlund, K. Neurophysiology of nociception. In “*The Neurobiological Basis of Pain.*” (M. Pappogallo, ed.), 2005, pp 4–19. McGraw Hill, NewYork.

Wohltmann, M.; Roth, B.L.; Coscia, C.J. Differential postnatal development of mu and delta opiate receptors. *Brain Res.* 1982 Apr;255(4):679-84.

Woolf, C.J.; Chong, M.S. Preemptive analgesia--treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. *Anesth Analg.* 1993 Aug;77(2):362-79.

Woolf, C.J. Pain: Moving from symptom control toward mechanism specific pharmacologic management. *Ann. Intern. Med.* 2004; 140, 441–451.

Yamamoto, M.; Usuda S.; Tachikawa S.; Maeno, H. Pharmacological studies on a new benzamide derivative. YM-09151-2, with potential neuroleptic properties. *Neuropharmacol.* 1982; 21:945-951.

Yegutkin, G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta.* 2008 May;1783(5):673-94.

Yon, J-H.; Carter, L.B.; Reiter, R.J.; Jevtovic-Todorovic, V. Melatonin reduces the severity of anesthesia-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neurobiol. Dis.* 2006; 21: 522–530.

Yun, W.; Yun, Y.; Lin, S.; An-shi, W.; Chun-sheng, F.; Cheng, N.I. Spinal release of the amino acids with a time course in a rat model of postoperative pain. *Chinese Medical Journal* 2007; 120(22):1969-1974.

Zhang, Y.; Laster, M.J.; Hara, K. *et al.* Glycine receptors mediate part of the immobility produced by inhaled anesthetics. *Anesth Analg* 2003; 96: 97–101.

Zimmermann, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J.* 1992 Jul 15;285 ( Pt 2):345-65. Review.

Zimmermann, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 2001; 52:44–56.

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

Zissen, M.H.; Zhang, G.; Kendig, J.J.; Sweitzer, S.M. Acute and chronic morphine alters formalin pain in neonatal rats. *Neurosci Lett.* 2006 May 29;400(1-2):154-7.



## XI.1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



### HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 08-149

**Pesquisadores:**

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES  
ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI  
WOLNEI CAUMO  
IONARA RODRIGUES SIQUEIRA  
CARLOS ALEXANDRE NETTO  
MARIA PAZ LOAYZA HIDALGO  
LICIANE FERNANDES MEDEIROS

**Título:** EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANESTÉSICOS GERAIS E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO SOBRE AS ATIVIDADES NTPDÁSICA E DE 5'-NUCLEOTIDASE EM MEDULA ESPINHAL RATOS INFANTES

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Porto Alegre, 09 de junho de 2008.

Prof. Nadine Clausell  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

## **XI.2 - DIVULGAÇÕES**

Apresentações e publicações em anais de congressos relacionadas à Dissertação:

**MEDEIROS LF; ROZISKY JR; SANTOS VS; SOUZA A; NETTO CA; TORRES ILS.** Efeito da intervenção farmacológica e/ou cirúrgica sobre o comportamento de ratos infantis **In: XXIV Reunião Anual da federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2009, Águas de Lindóia-SP.**

**MEDEIROS LF; ROZISKY JR; SOUZA A; SANTOS VS; NETO AS; NETTO CA; TORRES ILS.** Avaliação da resposta nociceptiva em ratos infantis após intervenção farmacológica e/ou cirúrgica **In: XXIV Reunião Anual da federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2009, Águas de Lindóia-SP.**

**MEDEIROS LF; ROZISKY JR; SANTOS VS; SOUZA A; NETTO CA; TORRES ILS.** Intervenção farmacológica e/ou cirúrgica promove alteração comportamental em ratos infantis **In: 29ª Semana Científica do Hospital de clínicas de Porto Alegre, 2009, Porto Alegre-RS.**

**CARVALHO AM; MEDEIROS LF; ROZISKY JR; SANTOS VS; SOUZA A; NETTO CA; TORRES ILS.** Resposta nociceptiva em ratos após intervenção farmacológica e/ou cirúrgica **In: 29ª Semana Científica do Hospital de clínicas de Porto Alegre, 2009, Porto Alegre-RS.**

**CARVALHO AM; MEDEIROS LF; ROZISKY JR; SANTOS VS; SOUZA A; NETTO CA; TORRES ILS.** Avaliação da resposta nociceptiva em ratos infantis após intervenção farmacológica e/ou cirúrgica **In: XXI Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009, Porto Alegre-RS.**

**NETO AS; MEDEIROS LF; ROZISKY JR; SANTOS VS; SOUZA A; NETTO CA; TORRES ILS.** Impacto do procedimento cirúrgico e/ou anestesia geral no comportamento de ratos infantis **In: XXI Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009, Porto Alegre-RS.**