



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FACULDADE DE FARMÁCIA

Nair Correia de Freitas Castro

**NOCICEPÇÃO EM PROLE ADULTA DE CAMUNDONGO EM
EXPOSIÇÃO À MORFINA NO PERÍODO GESTACIONAL E
LACTAÇÃO**

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia

BELÉM – PA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FACULDADE DE FARMÁCIA

Nair Correia de Freitas Castro

**NOCICEPÇÃO EM PROLE ADULTA DE CAMUNDONGO EM
EXPOSIÇÃO À MORFINA NO PERÍODO GESTACIONAL E
LACTAÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, como requisito de avaliação para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação da professora Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia.

BELÉM – PA

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nair Correia de Freitas Castro

Nocicepção em prole adulta de camundongo em exposição à morfina no período gestacional e lactação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora

Prof^a. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia (UFPA)

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Carolina Heitmann Mares Azevedo (UFPA)

Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger (UFSC)

Aprovado em:

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha mãe, Constantina Correia, que não teve a oportunidade de ver mais esta conquista, Deus a chamou no Céu, mas ela assistirá tudo lá do alto. Sendo assim, nada mais justo do que hoje dar esse presente a ela, como forma de agradecer toda a dedicação e amor, pois mesmo sem nunca ter cursado uma faculdade, foi uma farmacêutica nata, minha inspiração para me tornar farmacêutica.

Dedico também ao meu irmão, que cedo perdeu a vida, vítima da toxicodependência.

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, a Deus, que me presenteou com o dom da vida, por colocar pessoas maravilhosas em minha vida e por me abençoar sempre com tantas coisas boas;

À minha mãe, Constantina Correia, pelo amor, amizade, confiança e fidelidade;

Ao meu marido e sempre companheiro, Toni por me apoiar durante este trabalho; aos meus filhos Mathews e Lucas pelo amor e compreensão nos momentos de ausência;

À minha ilustríssima orientadora, Prof^ª. Dr^ª Cristiane do Socorro Ferraz Maia, pela orientação, estímulo, apoio e confiança em mim depositados;

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Enéas Fontes, pela sua contribuição e direcionamento para melhor entendimento dos resultados obtidos;

Aos professores Carolina Heitmann e Ademir Júnior, que contribuíram com sugestões de grande importância no momento da qualificação.

À Andressa Santa Brígida, pela amizade, pelos seus ensinamentos, pela sua disponibilidade, presteza e colaboração;

Aos amigos da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial à Izabelle Camões, parceira amiga e irmã, muito obrigada pelo apoio a este trabalho, pelo auxílio sempre que necessário; obrigada ao colega Ivaldo pela simpatia e presteza.

Obrigada à Luana Fernandes pela oportunidade de conviver com uma pessoa iluminada e sábia; obrigada aos colegas Gedeão, Fábio, Karen, Fernando, Sabrina e Josiane. Meus agradecimentos à Paulinha, Mayara, Diandra, Jhonatan

Agradeço às minhas amigas e colegas de trabalho Izameire, Edêmia, Terezinha, Ana Paula e Claudinéia pelo incentivo, apoio e confiança;

À Coordenadora de Laboratório do CPC Renato Chaves Dr^ª Ana Lúcia Moraes pela compreensão e apoio;

Aos Diretores do Centro de Perícias Científicas Renato Chaves, Orlando Salgado Gouvêa e Paulo Roberto Bentes por permitirem que continuasse nesta jornada; e assim agradeço à todos que contribuíram para a realização deste estudo.

RESUMO

NOCICEPÇÃO EM PROLE ADULTA DE CAMUNDONGO EXPOSTA À MORFINA NO PERÍODO GESTACIONAL E LACTAÇÃO

O uso de morfina como droga de abuso durante a gravidez e lactação induz à efeitos no desenvolvimento do feto que ainda não estão bem elucidados, no qual a exposição perinatal à morfina demonstrou aumento da sensibilidade ao efeito de reforço da morfina na prole adulta. O presente estudo investigou se a exposição à morfina durante a gravidez e lactação pode alterar a nocicepção em prole adulta descendentes de mães tratadas com morfina. Camundongos fêmeas grávidas foram expostas à morfina (10 mg/Kg/dia) por via subcutânea durante 42 dias (21 dias de prenhez e 21 dias de lactação). Ao completar 21 dias, a prole foi sexada em machos e fêmeas, posteriormente, aos 75 dias de vida, submetida aos testes do campo aberto e de nocicepção, pelos métodos da contorção abdominal induzida por ácido acético, placa quente e formalina. No teste da locomoção total, os animais não apresentaram alterações motoras. Nos ensaios de nocicepção, foi observado aumento da resposta nociceptiva de camundongos machos e fêmeas do grupo morfina submetidos ao teste da contorção. Os machos que foram expostos no período perinatal à morfina apresentaram redução do limiar nociceptivo na segunda fase (fase inflamatória) da formalina. Na placa quente, os animais machos e fêmeas apresentaram alteração na sensibilidade à dor, invertendo os perfis de sensibilidade dos seus controles, no qual o grupo de machos exposto no período perinatal à morfina apresentou aumento da sensibilidade ao estímulo térmico aos 120 min do teste e o grupo de fêmeas exposto no período perinatal à morfina apresentou redução da sensibilidade térmica quando comparados aos seus controles. Estes resultados sugerem que exposição à morfina no período intrauterino e lactação afeta os limiares nociceptivos na prole na vida adulta e que esta alteração é depende do tipo e do tempo de exposição ao estímulo nociceptivo.

Palavras chave: Morfina; Hiperalgisia; Nocicepção; Gravidez; Placa quente; Formalina.

ABSTRACT

NOCICEPTION OFFSPRING IN MOUSE ADULT EXPOSED TO MORPHINE DURING PREGNANCY AND LACTATION

The use of morphine as a drug of abuse during pregnancy and lactation induces effects on the developing fetus are still not well elucidated, in which the perinatal exposure to morphine showed increased sensitivity to morphine reinforcement effect in the adult offspring. The present study investigated whether exposure to morphine during pregnancy and lactation can change nociception in adult offspring offspring of mothers treated with morphine. Pregnant female mice were exposed to morphine (10 mg / kg / day) subcutaneously for 42 days (21 days of pregnancy to 21 days of lactation). Upon completion 21 days, the progeny is sexed in males and females, then at 75 days of age, subjected to the open field test and nociception by the methods of writhing induced by acetic acid, hot plate and formalin. In the test of the total locomotion, the animals showed no motor changes. In nociception tests, we observed increased nociceptive response in male mice and female morphine group tested for contortion. Males who have been exposed perinatally to morphine decreased the nociceptive threshold in the second phase (inflammatory phase) of formalin. In the hot plate, the male and female animals showed abnormalities in pain sensitivity, reversing the sensitivity profiles of its controls, in which the group of males exposed perinatally to morphine showed increased sensitivity to thermal stimulus at 120 min test and the group of females exposed perinatally to morphine decreased thermal sensitivity when compared to their controls. These results suggest that exposure to morphine in the intrauterine period and lactation affects nociceptive thresholds in the offspring in later life and that this change is dependent on the type and length of exposure to noxious stimuli.

Key words: Morphine, Hyperalgesia, Nociception, Pregnancy; Hot plate test; Formalin test

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura química da morfina.....	15
Figura 02 – Mecanismo de ação da morfina	17
Figura 03 – Nocicepção periférica e central.....	21
Figura 04 – Estímulo Nociceptivo.....	24
Figura 05 – Prole de camundongos Swiss.....	36
Figura 06 – Desenho ilustrativo da arena utilizada para teste de campo aberto.....	38
Figura 07 – Teste da contorção abdominal.....	41
Figura 08 – Teste de placa quente.....	42
Figura 09 – Animais submetidos ao teste da formalina.....	43
Figura 10 – Teste de atividade locomotora.....	46
Figura 11 – Teste da contorção abdominal.....	47
Figura 12 – Teste da placa quente.....	48
Figura 13 – Teste da formalina.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos receptores opióides e seus efeitos.....	15
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
a.C	antes de Cristo
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
APA	Associação Americana de Psiquiatria
ANOVA	Análise de variância
ASICs	Canais Iônicos Sensíveis ao Cálcio
ATV	Área Tegmentar Ventral
BK	Bradicinina
BHE	Barreira Hematoencefálica
5-HT	5-Hidroxitriptamina (serotonina)
COX	Ciclooxigenase
COX 1	Ciclooxigenase 1
COX 2	Ciclooxigenase 2
CPP	Preferência Condicionado de lugar
DAT	Transportador de dopamina
e.p.m	Erro Padrão da Média
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC	Glicocorticoide
FDA	Food and Drug Administration
i.p	Intraperitoneal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL 1	Interleucina 1
IL 1β	Interleucina 1 β
IL 8	Interleucina 8
K	Kappa
K+	Íon Potássio
LCR	Líquido céfallo-raquidiano

M3G	Morfina-3-glucuronídeo
M6G	Morfina-6-glucuronídeo
Nacc	Núcleo accumbens
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
nM	Nanomolar
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PKPD	<i>pharmacokinetic-pharmacodynamic</i>
PGE 2	Prostaglandina E2
PGF 2	Prostaglandina F2
SAMHSA	Serviço de Administração de Substância de Abuso e Saúde Mental
s.c	Via subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TRP	Receptores de Potencial Transitório
TRPV1	Receptores de Potencial Transitório Vanilóide 1
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
μ	Mu
μL	Microlitro
δ	Delta
κ	Kappa

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	13
1.1 Opióides	14
1.2 Mecanismo de Ação da Morfina	16
1.3 Farmacocinética.....	17
1.4 Uso de Morfina Durante a Gravidez e Lactação.....	19
1.5 Nocicepção.....	20
1.6 Tolerância e dependência.....	26
1.7 Neurobiologia da adição.....	27
1.8 Dados epidemiológicos da adição.....	30
II OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
III MATERIAL E MÉTODO.....	34
3.1 Animais e Tratamento	36
3.2 Grupos experimentais.....	37
3.3 Ensaio Comportamental	38
3.3.1 TESTE DA LOCOMOCÃO TOTAL	38
3.4 Ensaios Farmacológicos.....	39
3.4.1 ESTUDO DA ATIVIDADE NOCICEPTIVA.....	39
3.4.1.1 ATIVIDADE ANALGÉSICA PERIFÉRICA	39
3.4.1.2 ATIVIDADE ANALGÉSICA CENTRAL.....	41
Teste da placa quente.....	41
Teste da formalina.....	42
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
IV RESULTADOS	45
Teste da locomoção total.....	46
Teste da contorção abdominal.....	47
Teste da placa quente.....	48
Teste da formalina.....	49
V DISCUSSÃO	50

VI CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO.....	83
Anexo A.....	84

I INTRODUÇÃO

1.1 Opióides

Os opióides são derivados da espécie de papoula denominada *Papaver somniferum* (LE MERRER et al. 2009). No século III a.C., Teofrasto referiu-se ao látex obtido da cápsula da papoula como ópio (BOOTH, 1998), no qual este possui mais de 40 alcalóides, entre eles a morfina, o mais potente composto analgésico conhecido, na planta (ZHANG; CHEN; YU, 2008).

A nomenclatura dos componentes dos opióides tem se alterado no decorrer do tempo, inicialmente foram denominados narcóticos, posteriormente passou-se a designar os derivados naturais de opiáceos e os derivados sintéticos de opióides. Todavia, todo o grupo foi generalizado como agentes opióides (JAFFE e MARIN, 1985).

O extrato de papoula é a apresentação de opióide mais antiga utilizada na medicina. Inicialmente foi empregado para controlar diarréias, entretanto suas propriedades analgésicas logo foram observadas (SAMUELSON, 1991).

Atualmente o uso de opióides, particularmente a prescrição de analgésicos, aumentou substancialmente na última década (BACK et al. 2011). Isto porque os analgésicos opióides são considerados a classe terapêutica mais efetiva no tratamento de dores agudas e crônicas (CHIANG et al. 2010) e seu uso de modo racional derivou do conhecimento dos receptores e portanto esclarecimento de seu principal mecanismo de ação (GOZZANI, 1994).

Os efeitos farmacológicos dos opióides são mediados por receptores Mu (μ), Delta (δ) e Kappa (κ) expressos no Sistema Nervoso Central (SNC) (encéfalo e medula espinhal) e na periferia (LANG et al. 2010). Estes receptores são associados com múltiplas respostas fisiológicas e psicológicas desencadeadas por ligantes endógenos e exógenos (ver tabela 1). Os opióides e seus receptores são conhecidos pelos seus potentes efeitos analgésicos, sedativos e hipnóticos; porém com tendência a produzir tolerância e dependência. Estes dois últimos fatores se constituem em limitações para uso em tratamentos prolongados (CROFFORD, 2010).

Tabela 1: Classificação dos receptores opióides e seus efeitos

Receptor	Efeito	Agonista	Antagonista
μ (mu)	Analgesia supra-espinhal Depressão ventilatória Euforia Dependência Miose	β endorfina Dinorfina A1-13 Morfina e derivados	Naloxona
δ (delta)	Modulação μ Analgesia Depressão ventilatória	Leu-encefalina β endorfina Dinorfina A1-8	Naloxona Naltrindol
κ (kapa)	Analgesia espinhal Depressão ventilatória Sedação e miose	Dinorfina Morfina Nalbufina	Naloxona Nor-binaltorfimina
σ (sigma)*	Disforia Alucinação Estimulação vasomotora Midríase	Pentazocina? Fenciclidina?	-

*O receptor sigma não parece ser um receptor opióide verdadeiro. Suas reações não são revertidas pela Naloxona. Há algumas evidências que seria um receptor de Fenciclidina.

Fonte: Adaptado de Gozzani (1994) e Emmerson et al. (1994).

Entre os analgésicos opióides, a morfina (C₁₇ H₁₉ O₃ N), um derivado fenantreno é considerado como protótipo e o opióide de referência quanto à potência analgésica (GOZZANI, 1994; DUARTE, 2005; ZHANG; CHEN; YU, 2008).

A morfina foi descoberta em 1806 pelo alemão Freidrich Sertuner através da extração do ópio, e passou a ser largamente utilizada por médicos da época (Figura 1).



Figura 1: Estrutura química da morfina
Fonte: Adaptado de Trescot et al. 2008

Em 1850, a morfina tornou-se a droga padrão para redução de dores durante e após cirurgias (PASSAGLI, 2011). Atualmente é classificada como agonista opióide de escolha no manejo de dor aguda intensa e no controle de dor moderada a intensa relacionada ao câncer, assim como na indução e manutenção da anestesia para garantir potência à sedação e no pós-operatório para obtenção de analgesia. No entanto, quando administrada na ausência de dor, pode induzir disforia e aumento de efeitos adversos como náuseas, vômitos, depressão respiratória e agitação ocasional (BRASIL, 2010). Os adictos de morfina procuram na droga os efeitos característicos da depressão cerebral, como estado de torpor, imensa calma e fuga da realidade (PASSAGLI, 2011).

1.2 Mecanismo de Ação da Morfina

Apesar da morfina ter sido extraída do ópio em 1806, ainda é considerada o “padrão ouro” no tratamento da dor aguda e crônica grave, embora não tenha clara superioridade na eficácia e tolerabilidade sobre outros opiáceos (BEKKERING et al. 2011). Sua ação mimetiza os opióides endógenos por agir em receptores opióides (CRUZ et al. 2010), apresentando fortes propriedades analgésicas, exercendo seus efeitos principalmente no SNC (YAKSH, 1997), por ativação dos receptores μ -opióide localizados a nível espinhal e supraespinhal, levando à diminuição da liberação de neurotransmissor das fibras aferentes e atenuação da mensagem na transmissão da dor espinhal e supraespinhal, também interagindo com vias de controle descendente (YAKSH, 1997). A partir da sensibilização de receptores opióides, há redução na produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), induzindo ao aumento do efluxo de potássio e diminuição do influxo de cálcio, ocasionando inibição da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (GOZZANI, 1994).

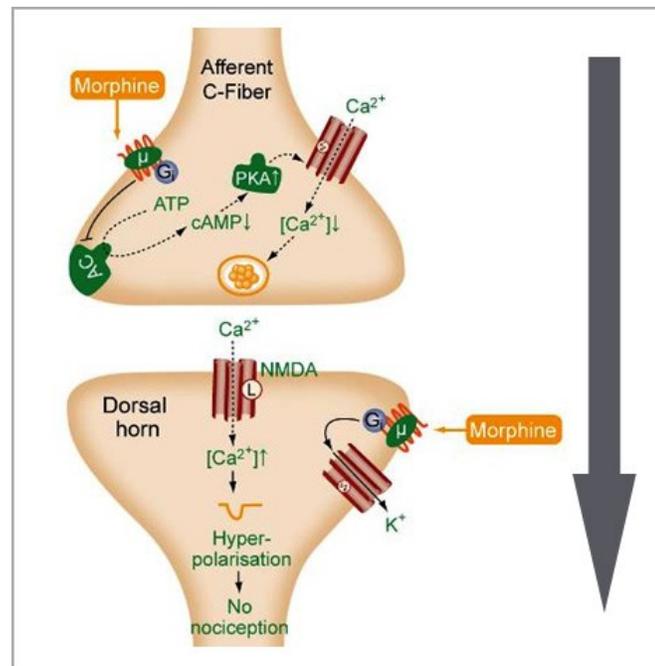


Figura 2: Mecanismo de ação da morfina.

Fonte: www.changepain-emodules.com, acesso em 10/07/2014.

Os efeitos da morfina ocorrem através de receptores expressos tanto a nível central quanto periférico (CROFFORD, 2010). Estes receptores são associados com uma gama de eventos psicológicos e fisiológicos que são diretamente relacionados à abertura de canais de potássio, visto que, a condutância aumentada a íons K^+ leva à hiperpolarização da membrana, reduzindo a excitabilidade neuronal (HAESLER et al. 2006). O receptor opioide presente no sistema nervoso periférico pode modular a excitabilidade do pequeno terminal aferente e exercer uma ação anti-hiperalgésica (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001).

1.3 Farmacocinética

A morfina é rapidamente metabolizada no fígado, gerando o metabolito inativo morfina-3-glicuronídeo (M3G) e o metabolito ativo morfina-6-glicuronídeo (M6G), no qual uma pequena quantidade de morfina-3,6-diglicuronídeo também é formada. Os estudos em animais indicam que a M6G é um agonista do receptor μ -opioide com maior potência que o fármaco original e rapidamente atravessa a barreira hematoencefálica–

BHE (DAHAN et al. 2008). Quando absorvida, as concentrações de morfina no líquido cefalorraquidiano (LCR) são em média três vezes mais baixas que os níveis plasmáticos; e a concentração de seus metabólitos M3G e M6G são em média 10 vezes mais baixos que suas concentrações no plasma. Além disso, verificou-se que no estado de equilíbrio a infusão de morfina subcutânea resultou numa proporção elevada de M3G/Morfina, mas não de M6G/Morfina no LCR (WOLFF et al. 1996). Este estudo de WOLFF et al. (1996) também demonstrou que a administração subcutânea de morfina, no estado de equilíbrio, em certa medida prediz as concentrações de morfina no LCR, mas não no plasma. Ocorre passagem dos principais metabólitos M3G e M6G através da BHE, resultando em índices de LCR/plasma médio de 0,08 e 0,10, respectivamente. Há razões para acreditar que as concentrações de M3G e M6G no plasma são influenciadas pela função renal. Além disso, não foi encontrada nenhuma evidência clínica de que M3G prejudica ou que M6G aumenta a analgesia induzida por morfina ou influencia a severidade dos efeitos colaterais na dor do câncer após a administração subcutânea contínua (WOLFF et al. 1996).

Após uso de heroína ou de morfina em seres humanos, tanto a morfina quanto seus metabólitos M3G e M6G são encontrados no sangue, ao mesmo tempo (KILPATRICK e SMITH, 2005). Em camundongos C57BL, as meias-vidas de morfina, M6G e M3G são reportadas como sendo de 28, 25 e 27 minutos, respectivamente, e a biodisponibilidade subcutânea é de aproximadamente um minuto (HANDAL et al. 2002).

Para determinar a contribuição de M6G na analgesia à morfina, foi administrado em voluntários saudáveis, por via intravenosa, morfina e M6G para construir um modelo farmacocinético-farmacodinâmico (do inglês “*pharmacokinetic-pharmacodynamic-PKPD*”) do metabolismo da morfina em M6G. A fração de morfina metabolizado em M6G foi de $6,0 \pm 0,2\%$ (valor médio \pm erro padrão) e a formação de M6G foi sexo independente (ROMBERG et al. 2004).

Estudos de simulação demonstraram que a infusão contínua de morfina (0,1 mg/kg a intervalos de 8 horas) resultou em efeito local estável de M6G (SNC), no qual as concentrações de 10-20 nM, contribuíram com aproximadamente 15% (homens) e 8% (mulheres) para a resposta analgésica (MARTINI et al. 2011).

1.4 Uso de Morfina Durante a Gravidez e Lactação

A grande preocupação quanto o uso de morfina como droga de abuso e uso terapêutico, durante a gravidez e lactação se deve aos efeitos ocasionados no desenvolvimento do feto que ainda não estão bem elucidados (BROUSSARD et al. 2011).

O principal opiáceo de abuso é a heroína, que é rapidamente convertida em morfina no organismo. Como muitas drogas de abuso, a morfina pode atravessar a placenta, BHE e ser eliminada através do leite materno. Os opiáceos parecem se acumular seletivamente nos tecidos nervosos da prole, presumivelmente devido a um aumento da permeabilidade da BHE fetal, e parece afetar o desenvolvimento do SNC e causar uma série de atrasos na ontogenia (PETERS; TURNBOW; BUCHENAUER. 1972; SHAH e DONALD, 1979).

De acordo com os resultados de Timar et al. (2010), a exposição perinatal à morfina demonstrou aumento da sensibilidade ao efeito de reforço da morfina na prole adulta. Sabe-se que o uso de morfina no terceiro trimestre de gravidez pode causar depressão respiratória neonatal, estase gástrica, e prolongamento do trabalho de parto, sendo classificada de acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA), como categoria de risco C se utilizado por períodos prolongados ou D quando em doses elevadas (BRASIL, 2010).

Em virtude da capacidade em atravessar a barreira placentária e BHE, além de ser excretada no leite materno, a exposição pré-natal proporciona o acúmulo de níveis significativos de morfina no tecido nervoso do feto, ocasionando retardo no desenvolvimento do SNC (KLAUSZ et al. 2011). Após o nascimento, o neonato pode adquirir a síndrome de abstinência à morfina, além de deficiência de crescimento pós-natal, e aumento na ocorrência da síndrome de morte súbita infantil (CHOOA et al. 2004; MINOZZI et al. 2008; TAO et al. 2011).

Em longo prazo, os efeitos da morfina estão relacionados às alterações neurofisiológicas que geram déficits na habilidade intelectual e controle emocional em crianças durante o período escolar, incluindo hiperatividade e comportamento antissocial (WILSON et al. 1979; ORNOY, 2003).

No aspecto molecular, a exposição pré-natal à morfina está relacionada ao aumento da densidade do receptor mu-opiídeo na região do núcleo accumbens e amígdala central, ambas envolvidas no comportamento de ansiedade e depressão (HARRIS et al. 2006; VATHY et al. 2003). Outros comportamentos podem ser alterados pela exposição intrauterina à morfina. De acordo com Dohler (1991), proles expostas à morfina durante a vida intrauterina apresentam alterações no ciclo ovariano e comportamento sexual.

Considerando a nocicepção, resultados controversos foram apresentados em diferentes estudos. Tempel et al. (1988) evidenciaram que a administração crônica de agonistas opiídeos durante o período pré- e/ou pós-natal promoveu dessensibilização dos receptores opiídeos por mecanismos de regulação negativa (*down-regulation*), induzindo um comportamento de tolerância, responsável pela diminuição de analgesia induzida por morfina. Contrariamente, Tao (2011) afirma que proles expostas à morfina intrauterina apresentam maior sensibilidade à dor, evidenciado mais significativamente em fêmeas, porém machos e fêmeas apresentam-se suscetíveis ao desenvolvimento de efeitos adversos, tais como a hiperalgesia inflamatória. Sabe-se que em humanos, a hiperalgesia inflamatória também pode ser afetada por condições físicas adquiridas e fatores sociais ao longo da vida (ORNOY et al. 1996).

Apesar dos significativos avanços relacionados principalmente à síntese de novos compostos e ao aparecimento de novos derivados, apesar dos riscos de abuso, os opiídeos e os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), mesmo com seus efeitos adversos, continuam sendo os fármacos de primeira escolha para o tratamento da dor (MILANO, 2008).

1.5 Nocicepção e Dor

Nocicepção é a detecção de um estímulo nocivo por terminais sensoriais e transmissão de informações quanto à presença e qualidade deste estímulo pelas conexões sinápticas das células nervosas transmissoras, do local estimulado até o cérebro. Essas informações passam por uma cadeia de três neurônios: i) neurônio de primeira ordem, originado na periferia e projetando-se para medula espinhal; ii)

neurônio de segunda ordem, que ascende pela medula espinhal até o cérebro; iii) e o neurônio de terceira ordem, que projeta-se para o córtex cerebral (COSTIGAN e WOOLF, 2000; MESSLINGER, 1997) (Figura 3).

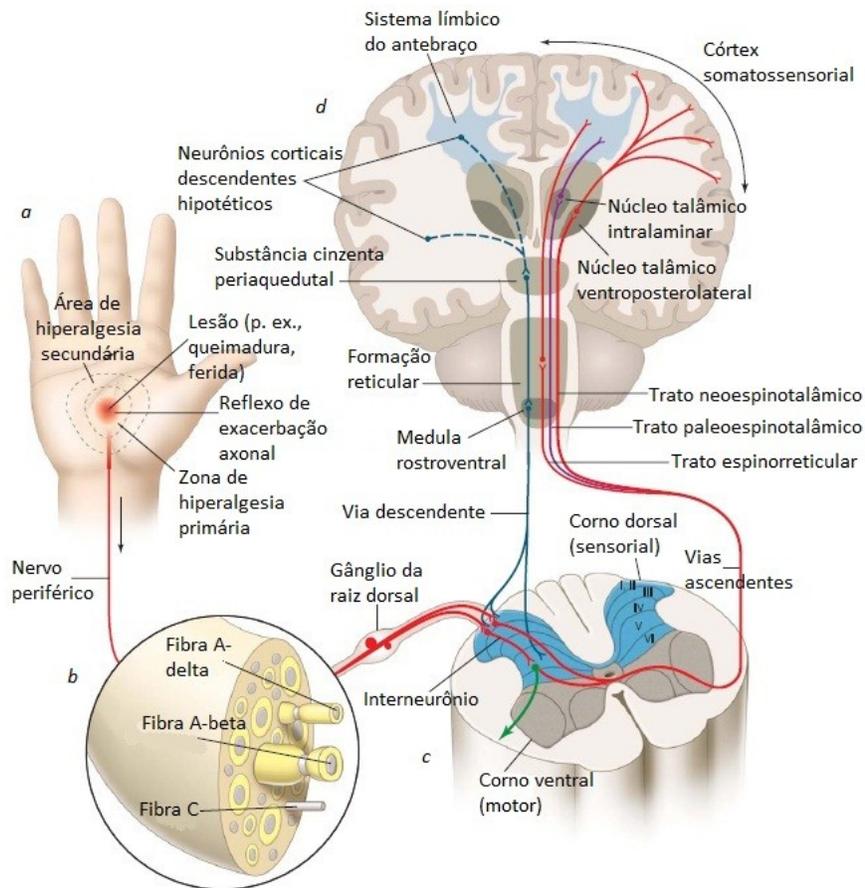


Figura: 03 - Nocicepção Periférica e Central.
Fonte: Adaptado de Oaklander, 2011.

Dor, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é definida como uma experiência sensorial ou emocional desagradável associada à lesão real ou potencial dos tecidos (PIETROVSKI, 2004). A etiologia da dor precisa ser mais bem compreendida, pois nem sempre ocorre lesão do tecido como no caso da cefaleia e dor

pélvica crônica, que de acordo diagnóstico clínico parece não ocorrer lesão do tecido (BRAVIM, 2008).

O estudo da dor é dividido em termos anatômicos, fisiológicos e farmacológicos. Por ser uma experiência humana singular, no qual a dor é influenciada por diversos elementos como emoção, cognição, memória e o próprio meio social. Desta forma, muitos fatores estão envolvidos na dor exigindo uma abordagem multifatorial para estudar a analgesia (FARQUHAR-SMITH, 2007). Além disso, em condições patológicas, podem ocorrer alterações na capacidade de percepção de estímulos nocivos, no qual estímulos inócuos são percebidos como nocivos (alodínia) ou há o desenvolvimento de uma sensibilidade aumentada para estímulos dolorosos - hiperalgesia (LOESER e TREEDE, 2008).

A transdução do estímulo doloroso ocorre nas terminações nervosas das fibras C não-mielinizadas e nas fibras A δ mielinizadas. A maioria dos nociceptores responde a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, razão pela qual são chamados de nociceptores polimodais (LEE et al. 2005).

Os estímulos térmicos, mecânicos ou químicos geram sinais nociceptivos de alta intensidade sobre os nociceptores, que são terminações nervosas livres das fibras amielínicas do tipo C ou mielínicas finas do tipo A δ . Os corpos celulares destas fibras localizam-se nos gânglios da raiz dorsal adjacente à medula espinhal e os prolongamentos centrais destas células penetram na medula espinhal fazendo sinapse com neurônios de segunda ordem, principalmente, na substância gelatinosa (lâminas II) do corno dorsal (GRUBB, 1998).

Muitas moléculas de transdução da nocicepção têm sido identificadas na última década, e o maior grupo de detectores de estímulos nocivos é a família dos receptores de potencial transitório (TRP) (CHENG e JI, 2008; PATAPOUTIAN et al. 2009). O receptor de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1), é comumente referido como receptor da capsaicina e foi o primeiro descrito como receptor polimodal ativado por três estímulos dolorosos: pelos compostos vanilóides (capsaicina, resiniferatoxina), calor nocivo (> 43 °C) e pH baixo ($< 5,9$) (CATERINA e JULIUS, 2001; TOMINAGA, 2007).

Os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs), que são canais de cátions insensíveis à voltagem, são outros receptores que participam da transdução da

nocicepção (PETROFF et al. 2008). Os prótons extracelulares ativam os ASICs e alguns estudos demonstraram que a sua expressão é aumentada por mediadores pró-inflamatórios, como fator de crescimento do nervo (NGF), serotonina (5-HT), interleucina 1 (IL-1) e bradicinina (BK) (MAMET et al. 2002; VOILLEY et al. 2001).

Ocorrendo lesão tecidual, existe um sistema especializado na percepção da dor, pois há transferência de informação da lesão tecidual ao SNC, local da percepção. Após a lesão, a sensibilização periférica é primária e a central é secundária que é formada por um conjunto de mediadores químicos que agem na periferia e na medula espinhal, que em complexidade são semelhantes aos neurotransmissores do encéfalo (FARQUHAR-SMITH, 2007).

Vários são os mediadores químicos que podem estimular os nociceptores resultando em dor. Entre eles estão os mediadores inflamatórios histamina e BK. A ação da BK ocorre através de receptores ligados à proteína G, produzindo vários efeitos pró-inflamatórios que inclui vasodilatação e edema (MAYER et al. 2007). A BK também estimula atividade enzimática da fosfolipase A2 ligada à membrana que, conseqüentemente, causa desesterificação da membrana produzindo liberação do ácido araquidônico livre (ácido eicosatetraenóico) e biossíntese subsequente de prostaglandinas (PGE2 e prostaciclina, PGI2) pela cicloxigenase (COX) (Figura 4). Por serem potentes vasodilatadoras, as prostaglandinas são importantes mediadores na dor inflamatória (WIENECKE et al. 2008).

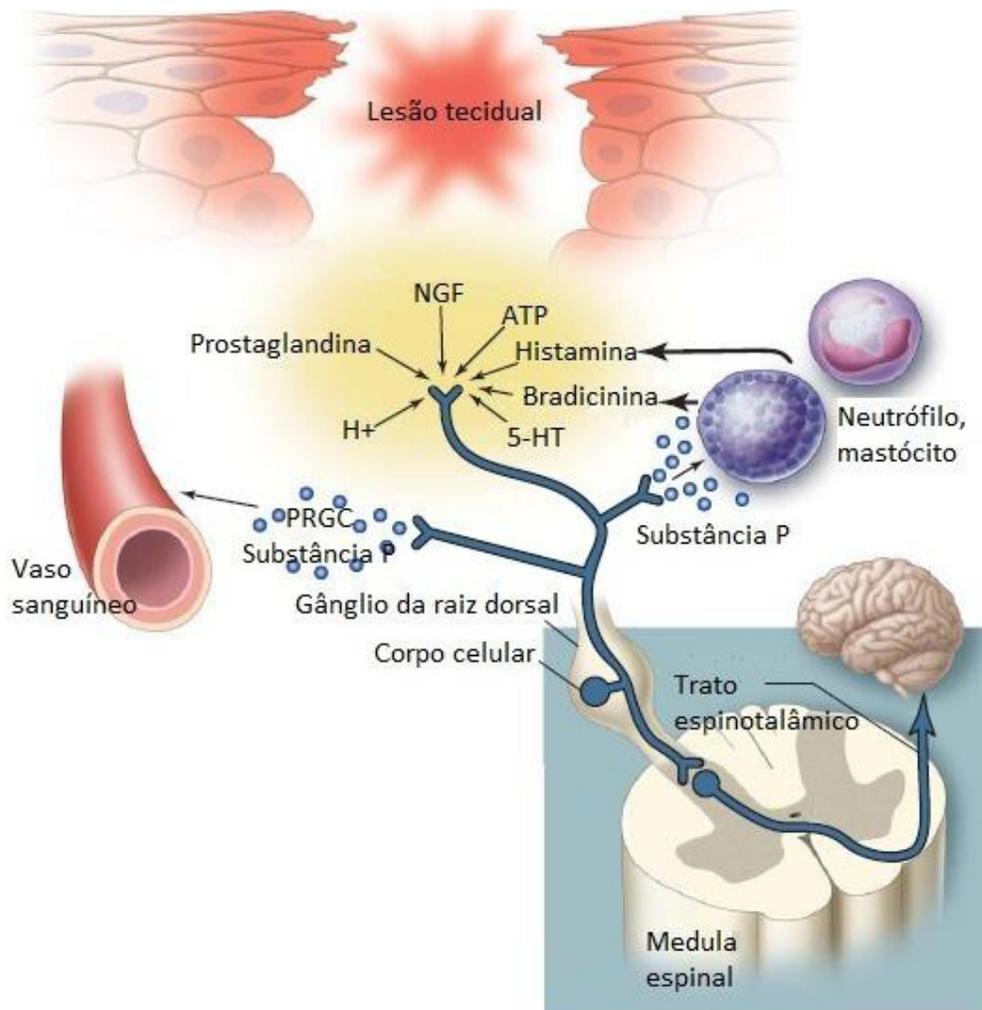


Figura 4: Estímulo Nociceptivo
Fonte: Adaptado de Oaklander, 2011.

A Figura 4 demonstra um estímulo nociceptivo provocado por lesão tecidual com síntese de substâncias como prostaglandinas, BK, NGF, 5-HT, H⁺, histamina entre outras.

Os sinais de dor neuropática e inflamatória originam predominantemente em terminais sensoriais periféricos, mas são mantidos por sensibilização central. Mutações dos canais de sódio, ou expressão desregulada nos aferentes periféricos primários e neurônios do SNC ao longo do eixo da dor, demonstraram contribuir para o estabelecimento e manutenção de estados de dor (WAXMAN e HAINS, 2006; DIB-HAJJ et al. 2007; 2009).

Além deste complexo sistema de transmissão e reconhecimento da dor, os organismos, especialmente os mamíferos, possuem mecanismos capazes de suprimi-la. Em 1965, foi sugerido por Melzack e Wall um mecanismo modulatório descendente (Teoria da Comporta). A hipótese é a existência de uma espécie de comporta no corno dorsal da medula espinhal, que, quando aberta, permitiria a passagem dos impulsos nociceptivos e, quando fechada, bloquearia a passagem destes impulsos.

A neuromodulação da dor é o último passo do processamento do estímulo nociceptivo. Este evento representa alterações que ocorrem no SNC em resposta ao estímulo nocivo e permite que sinais de danos na periferia recebidos pelo corno dorsal da medula espinhal sejam seletivamente inibidos. Desta maneira, sinais de danos que deveriam ultrapassar a medula para os centros superiores não serão mais transmitidos (YAKSH, 2006).

O sistema de modulação da dor consiste de interneurônios inibitórios presentes nas camadas superficiais da medula espinhal e tratos neuronais descendentes, os quais podem inibir a transmissão do sinal de dor (YAKSH, 2006), e elementos neuronais presentes no tronco encefálico, tálamo, estruturas subcorticais, córtex cerebral e, possivelmente, sistema nervoso periférico (XIE et al. 2009).

O sistema supressor é composto por neurotransmissores, os opióides endógenos, além da 5-HT. A ativação do controle inibitório descendente pode ter a participação de estruturas corticais, como córtex cingulado anterior, córtex insular, córtex somatosensorial primário e secundário e córtex orbito-ventrolateral. Estas regiões atuam aumentando a síntese dos neurotransmissores, os quais pelos tratos descendentes se projetam à substância cinzenta da medula espinhal e tratos ascendentes para estruturas encefálicas, exercendo atividade inibitória sobre os componentes do sistema nociceptivo (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998).

Os medicamentos opióides são utilizados terapêuticamente para o alívio da dor por milhares de anos. Na década de 1940, opióides foram restritos para serem usados legalmente quando fosse prescrito por um médico. Um dilema ético surgiu, pois o tratamento de pacientes com opióides para doenças crônicas, controle da dor e da qualidade de vida, apresentava risco de dependência química e tolerância às drogas opióides (DAITCH et al. 2012).

1.6 Tolerância e Dependência à Opióides

A tolerância é definida farmacologicamente como redução da potência dos efeitos analgésicos da morfina após a sua administração repetida. Do mesmo modo, a ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) na medula espinhal demonstrou desempenhar um papel crucial no desenvolvimento de tolerância aos efeitos analgésicos da morfina. A co-administração de morfina com MK-801, um antagonista não competitivo do receptor de NMDA, evita eficazmente o desenvolvimento de tolerância à morfina em vários modelos animais, incluindo ratos, camundongos e cobaias (MAREK et al.1991; TANGANEILI et al. 1991; TRUJILLO e AKIL, 1991; BEN ELIYAHU et al. 1992).

Para além dos seus efeitos preventivos sobre o desenvolvimento de tolerância à morfina, o uso de LY274614, um antagonista competitivo do receptor NMDA, administrado gradualmente (durante vários dias) reverteu a tolerância aos efeitos antinociceptivos da morfina em ratos que se tornaram tolerantes após tratamento crônico (TISEO e INTURRISI, 1993).

Assim, é claro que a ativação do receptor de NMDA na medula espinhal desempenha um papel importante no desenvolvimento de tolerância à morfina (WILCOX, 1993), embora seja possível que outras regiões do SNC também podem estar implicadas nos mecanismos de tolerância à morfina mediada por receptores NMDA (MAO et al. 1995).

Por outro lado, a ativação de receptores ionotrópicos não-NMDA (ex: cainato/alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico -AMPA) no interior da medula espinhal tem sido implicada no desenvolvimento de hiperalgesia em ratos com dor neuropática experimental (MAO et al. 1992) e inflamação periférica (REN et al. 1992), mas a função dos receptores cainato/AMPA na tolerância à morfina não é clara (MAO et al. 1994).

Atualmente, o que está claro é que a ativação central dos receptores NMDA está estrategicamente envolvida em ambos, hiperalgesia resultante de várias etiologias patológicas e o desenvolvimento de tolerância à morfina (MAO et al. 1995).

A dependência às drogas é caracterizada pela perda de controle sobre o seu uso, mesmo sob condições adversas intensas (VOLKOW e LI, 2005). De acordo com a Associação Americana de Psiquiatria (APA, 1994), o termo adição é preferencialmente

utilizado ao termo dependência, uma vez que este pode ser equivocadamente relacionado à dependência física, referente às adaptações às quais ocasionam a síndrome de abstinência, quando há interrupção abrupta do uso de uma droga. No padrão de comportamento abusivo, as consequências negativas do uso da droga são recorrentes e significativas, porém ainda não há presença de tolerância, síndrome de abstinência e perda do controle sobre o uso (KAPLAN e SADOCK, 1995).

1.7 Neurobiologia da Adição

De acordo com a APA, a adição a drogas é definida como um comportamento compulsivo, determinado por um padrão mal-adaptativo de uso de substâncias. Esse comportamento ocasiona prejuízos clínicos significativos evidenciados por tolerância, abstinência e abandono ou redução de importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas em virtude do uso da substância (APA, 2000).

A toxicodependência ou adição é uma doença crônica recidivante que tem sido caracterizada por (i) compulsão de procurar e consumir a droga; ii) perda de controle em limitar o consumo; e (iii) aparecimento de estado emocional negativo (por exemplo, disforia, ansiedade, irritabilidade), refletindo uma síndrome de abstinência motivacional quando há o impedimento ao acesso à droga (definida como Dependência de Substâncias pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais [DSM-5] da Associação Americana de Psiquiatria) (KOOB e VOLKOW, 2010).

O uso prolongado de drogas de adição gera alterações em regiões cerebrais envolvidas em funções cognitivas essenciais, incluindo aprendizado, memória, atenção, raciocínio e controle dos impulsos. Nestas áreas ocorrem mudanças cognitivas, desencadeadas pelo uso de drogas, consequência da adição (GOULD, 2010).

Está bem estabelecido que todas as drogas de adição convergem para uma circuitaria comum no sistema límbico cerebral, sendo a via dopaminérgica, que tem início na área tegmentar ventral (ATV) no mesencéfalo e se projeta diretamente para o núcleo accumbens (NAcc), a principal responsável pelos efeitos recompensadores agudos destas substâncias. O aumento dos níveis de dopamina, tanto no sistema de

recompensa encefálico, representado pelos feixes prosencefálicos mediais e ATV, quanto nas vias dopaminérgicas provenientes de várias áreas do córtex, hipocampo, tálamo e amígdala, e dos núcleos serotoninérgicos podem mediar o aprendizado e a associação relacionados à recompensa, a qual é responsável pela adição a drogas (NESTLER, 2005).

Há estudos que mostram que o abuso de uma droga pode aumentar a sensibilidade à outra droga. Este efeito é chamado de sensibilização cruzada (BARTOLETTI et al. 1985; HE et al. 2004; VALVASSORI et al. 2007). Esta sensibilização pode ser induzida não só entre drogas afins, tais como cocaína e anfetaminas (psicoestimulantes), mas também entre as drogas não relacionadas, como entre opióides e cocaína (LERI et al. 2003; HE et al. 2004) ou entre os endocanabinóides e cocaína (ARNOLD, 2005) ou opiáceos (FATTORE et al. 2005), respectivamente.

Malanga e Kosofsky (2003) demonstraram que roedores expostos às várias drogas de abuso no útero, tornaram-se sensibilizados para os efeitos de recompensa de drogas na idade adulta. Por exemplo, os animais objeto do estudo tornaram-se mais responsivos à doses mais baixas de droga que os animais controle.

Estudos prévios e mais recentes evidenciaram que o aumento da predisposição de abuso de drogas na idade adulta foi resultante da exposição na fase pré-natal de proles à cocaína (HEYSER et al. 1992; ROCHA et al. 2002; ESTELLES et al. 2006), canabinóides (VELA et al. 1998) e morfina (GAGIN et al. 1997), observado pelo aumento de comportamento de procura de droga nos testes de auto-administração e de preferência condicionado de lugar (CPP), que é um dos testes de recompensa de drogas mais difundidos (TZSCHENTKE, 1998).

Em relação ao gênero, estudos sugerem que as mulheres progridem mais rapidamente do uso à dependência do que os homens, assim como sofrem mais graves consequências físicas e emocionais. O conhecimento destas diferenças, torna-se muito importante, pois podem auxiliar no desenvolvimento de abordagens de tratamento multimodal necessários para mulheres com dependência à opióides (BACK et al. 2011).

Para o tratamento da dependência de drogas um dos aspectos mais importantes como estratégia terapêutica é destinada a reduzir o síndrome de abstinência (ARACIL-

FERNANDEZ et al. 2013). Importante ressaltar que o objetivo do tratamento de um modo geral é a redução de danos e geralmente, os compostos que se ligam aos receptores, mas não produzem respostas como agonistas, atuam como antagonistas e são utilizados para o tratamento (LAMEH et al. 2010).

Seguindo esta linha, vários compostos são utilizados para este fim, como por exemplo, a metadona que é um opiáceo sintético de longa ação, utilizado no tratamento da dependência à opióides e dor crônica. Este fármaco impede os sintomas de abstinência de opióides, reduz o desejo quanto ao uso e bloqueia os efeitos eufóricos dos opióides de ação curta, como a heroína e morfina (THE COLLEGE OF PHYSICIANS AND SURGEONS OF ONTARIO, 2006).

O tratamento com metadona para a dependência de opióides, muitas vezes é uma terapia de longo prazo, administrada normalmente uma vez por dia. Este tratamento é dividido em três fases: estabilização precoce, estabilização tardia e fase de manutenção. Durante os primeiros dois meses de tratamento, a metadona deve ser administrada sob supervisão direta de profissional de saúde. Após dois meses de tratamento, os pacientes clinicamente estáveis, podem começar receber metadona para administração sem supervisão. Neste caso, o paciente estabilizado pode receber a dose para um dia, e levar consigo para administração sem supervisão. Exigirá seis meses de comportamento estável para adquirir seis doses que é a dose máxima permitida para utilização sem supervisão (THE COLLEGE OF PHYSICIANS AND SURGEONS OF ONTARIO, 2006).

Há também relato sobre os efeitos da pregabalina para o alívio dos sintomas de abstinência em paciente dependente à opióides (KAMMERER et al, 2012). Neste caso, houve uma preocupação inicial sobre o potencial deste fármaco, para causar dependência. Naquele momento, na base de dados de estudos clínicos, não havia nenhuma evidência do desejo, desvio, uso indevido, dependência ou adição em relação à pregabalina (PAPAZISIS e TZACHANIS, 2014).

No entanto, deve ser notado que desde que a pregabalina entrou em uso clínico difundido nos últimos anos, os relatos de abuso começaram a aparecer, geralmente envolvendo indivíduos com um histórico de abuso de outros medicamentos (PAPAZISIS e TZACHANIS, 2014).

A naloxona é um outro antagonista do receptor μ -opióide utilizada na prática clínica para reverter depressão respiratória e tratamento da dependência induzida por opióides. Ao contrário da metadona, a naloxona desde que foi sintetizada pela primeira vez em 1960 por Jack Fishman, e desenvolvido através da década de 1970 por Harold Blumberg (GARFIELD, 1983), pouco progresso tem sido feito sobre as políticas para administrar as doses adequadas de naloxona para provocar reversão rápida dos efeitos morfínicos, com uma possibilidade limitada de renarcotização em quadros de adição (MARTINI et al. 2011).

1.8 Dados Epidemiológicos da Adição

A prevalência de abuso de opióides é alta em todo o mundo, especialmente em pessoas jovens. Como a morfina é uma droga que causa dependência, na sociedade isto resulta na crescente perda de produtividade, morbidade e morte (NESTLER, 2004)

A problemática do uso difundido destes fármacos advém dos mecanismos de tolerância e dependência física e psíquica os quais propiciam o abuso dessa classe terapêutica, ocasionando sérios problemas sociais e econômicos ao redor do mundo (CHIANG et al. 2010).

Na população mundial o consumo de substâncias psicoativas se constitui em um dos fenômenos mais frequentes (ELLIOTT e BOWER, 2008; KHALSA et al. 2008; SANCHIS e ARAGON, 2007; UHART e WAND, 2009). Estados de uso abusivo, dependência e adição são gerados por autoadministração de drogas psicoativas que apresentam propriedades reforçadoras (ALMEIDA, 2006).

De acordo com dados do Serviço das Nações Unidas em Drogas e Crimes, o consumo global de maconha no mesmo ano, entre pessoas de 15 a 64 anos, foi de 2,8-4,5%; opióides de 0,3-0,5%; anfetaminas 0,3-1,3%; e cocaína 0,3-0,5%. A avaliação do consumo por país evidenciou que as regiões de maior uso de drogas de abuso com opióides foram as regiões norte e central da África (0,8-1,4%) e leste da Europa (0,9% a 1%) (DEGENHARDT e HALL, 2012).

Resultados da Avaliação Nacional de Uso de Drogas e Saúde (NSDUH), realizada pela Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) estimaram que no ano de 2006, 20,4 milhões (8,3%) dos norte-americanos entre 12 anos ou mais, utilizavam drogas ilícitas como maconha/haxixe, cocaína, heroína, alucinógenos, inalantes ou medicamentos prescritos para fins não terapêuticos como tranquilizantes, analgésicos, estimulantes ou sedativos. Maconha e haxixe apresentaram maior consumo, cerca de 14,8 milhões de pessoas, o que corresponde a 6% da população dos EUA. O abuso de cocaína e alucinógenos foi observado em 2,4 milhões e 1 milhão de pessoas, respectivamente (MANCHIKANTI e SINGH, 2008).

O uso de analgésicos opióides para fins não terapêuticos foi estimado em 4,7 milhões de pessoas em 2005, sendo que em 2006 este número foi de 5,2 milhões, evidenciando o aumento do uso indiscriminado de medicamentos prescritos com potencial de abuso (MANCHIKANTI e SINGH, 2008).

No Brasil, foi realizado um estudo sobre o uso de drogas psicotrópicas (2º Levantamento Domiciliar) e revelou que 22,8% da população pesquisada em 108 cidades com mais de 200 mil habitantes já fizeram uso na vida de drogas exceto tabaco e álcool, o que corresponde a uma população de 10.746.991 pessoas. Observou-se que na faixa etária de 12 a 17 anos já existem relatos de uso de diversas drogas, bem como facilidade de acesso às mesmas e vivência de consumo próximo. Dentre estes, os jovens (7,8%) relataram haverem sido abordados para venda de drogas, dado este que enfatiza a necessidade de aprimoramento de programas de prevenção nesta faixa etária (BRASIL, 2005).

Entre a população entrevistada, a maconha aparece em primeiro lugar em consumo com 8,8% entre as drogas ilícitas, e o solvente em segundo lugar com 6,1% de uso. A prevalência sobre o uso de Cocaína, Crack e Merla foi, respectivamente, 2,9%, 0,7% e 0,2%. Quanto aos estimulantes anfetamínicos e opióides, o uso foi de 0,1% e 1,3%, respectivamente (BRASIL, 2005).

Os dados epidemiológicos do Inquérito Nacional do NSDUH em 2006 demonstrou que as pessoas iniciam o uso indiscriminado de drogas mais por analgésicos do que qualquer outra substância. Além disso, os censos de início do tratamento refletem a importância da dependência de opiáceos entre os indivíduos que

procuram os serviços em SAMHSA. O Serviço de Tratamento Episódio e Conjunto de Dados (TEDS) revelou que 18% das 1,8 milhões de internações anuais para drogas e álcool nos centros de tratamento de abuso foram contabilizados por transtornos por uso de opióides (SAMHSA, 2007). Admissões de tratamento para a dependência de opióides foram menores apenas que as admissões para transtornos por uso de álcool (BACK et al. 2011)

O custo anual estimado de abuso de opióides de prescrição nos EUA é de US \$ 9,2 bilhões (BIRNBAUM et al. 2006). Maior custo social também pode ser visto nos serviços de emergência do hospital onde aos pacientes com dor, são por vezes, negado o acesso a estes medicamentos devido às preocupações quanto à responsabilidade pelo abuso de opióides (TAMAYO-SARVER et al. 2004).

Como citado anteriormente, o abuso de drogas opióides por mulheres apresentam características especiais, além de acarretar riscos aos neonatos expostos à droga no período pré-natal, há dificuldade da mulher se afastar do uso da morfina no período da gravidez (BACK et al. 2011).

Até o momento, pouca atenção tem sido dada às diferenças de gênero em transtornos por uso de opióides, mais especificamente em mulheres que fazem uso tanto terapêutico, quanto aditivo durante gravidez e lactação. E considerando, que o crescente número de usuários de drogas de abuso, é nocivo para a saúde pública, um fator muito complexo para a justiça e de modo geral danoso para a sociedade atual, resultando em crescentes custos sociais, espera-se que este trabalho, contribua de forma valiosa para o conhecimento dos reais efeitos desta substância na vida adulta e as possíveis intervenções para minimizar preventivamente os danos, visto que estudos desta natureza são escassos em nosso país.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as alterações nociceptivas de camundongos adultos após exposição crônica à morfina, durante o período intrauterino e na lactação.

2.2 Objetivos Específicos

- ✚ Observar na prole possíveis alterações na locomoção espontânea por meio do modelo do Campo Aberto;
- ✚ Analisar na prole a nocicepção através:
 - Do teste de Contorção Abdominal induzida por Ácido Acético;
 - Do teste da Placa Quente;
 - Do teste da Formalina.

III MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Tratamento

Para realização dos testes foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas (n=10) e machos (n=5) provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC), os quais foram mantidos em caixas plásticas (39x32x16 cm) sob condições padronizadas de temperatura ($26\pm 1^\circ\text{C}$), exaustão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas às 7:00 h), água e comida *ad libitum*.

Antes da execução, o projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Animais da Universidade Federal do Pará (CEPAE), obedecendo-se aos critérios das normas estabelecidas pelo Guia de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais e foi aprovado segundo o parecer nº CEPAE-UFPA: BIO 049-12 (Anexo A). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento (LAFICO) da Faculdade de Farmácia.

No período da manhã, os casais foram colocados para copular em caixas isoladas, sem serragem, protegidas internamente por grade metálica, para proteção dos animais do contato das fezes e urina e facilitar a localização dos tampões vaginais expelidos pelas fêmeas após a cópula, o que indica a possível prenhez. As fêmeas potencialmente prenhas foram isoladas em caixas para roedores, devidamente identificadas com a data de nascimento da prole.

De acordo com o protocolo de Klausz et al. (2011), no primeiro dia de prenhez, as fêmeas receberam uma vez ao dia, pela via s.c, sulfato de morfina (10 mg/kg), sendo o tratamento continuado durante toda a gravidez até o último dia da amamentação da prole aos 21 dias. Os animais controles receberam solução salina (0,1 ml/kg) também pela mesma via.

No primeiro dia pós-natal, todos os recém-natos foram retirados individualmente de suas caixas e pesados em uma balança previamente forrada com toalhas de papel, para favorecer uma condição de conforto. Foram utilizadas luvas para evitar o contato direto das mãos com os animais, reduzindo assim a possibilidade de rejeição das proles por parte das mães. As proles foram mantidas junto às mães até o 21º dia pós-natal, sendo realizados os desmames e sexagem (separação por sexo), para evitar o cruzamento entre machos e fêmeas da mesma ninhada.

Após este período, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (39x32x16 cm), 05 animais por grupo, com forração de serragem, sob condições padronizadas de temperatura, exaustão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, água e comida *ad libitum* até completarem 75 dias (n = 8-14 por grupo), idade na qual foram realizados os experimentos (Figura 5).



Figura 5 - Prole de camundongos Swiss.
Fonte: CASTRO, 2013

Para realização dos testes de nocicepção, os grupos de animais foram separados exclusivamente para cada experimento, visto que um mesmo grupo não pode ser submetido à diferentes testes. Os animais foram conduzidos ao laboratório 1 hora antes de cada experimento para habituação e os testes foram realizados entre 08 e 14 h, com o objetivo de evitar as variações circadianas, que poderiam interferir nos resultados experimentais. Nas salas onde foram realizados os ensaios, foram utilizadas lâmpadas fluorescentes para iluminação e com mínimo nível de ruído.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupos experimentais:

- ✚ Controle macho (CM)- prole (camundongos Swiss) no qual as mães foram expostas à solução salina (0,9%, s.c.) durante os 21 dias de gravidez e por mais 21 dias de amamentação;

- ✚ Controle fêmea (CF) - prole (camundongos Swiss) no qual as mães foram expostas à solução salina (0,9%, s.c.) durante os 21 dias de gravidez e por mais 21 dias de amamentação;
- ✚ Morfina Macho (MM) - prole (camundongos Swiss) no qual as mães foram expostas à morfina (10 mg/kg/dia, s.c.) durante os 21 dias de gravidez e por mais 21 dias de amamentação;
- ✚ Morfina Fêmea (MF) - prole (camundongos Swiss) no qual as mães foram expostas à morfina (10 mg/kg/dia, s.c.) durante os 21 dias de gravidez e por mais 21 dias de amamentação.

3.3 ENSAIO COMPORTAMENTAL

Teste da Locomoção Total (Campo aberto)

O teste do campo aberto consiste de um aparato com uma área central aversiva, que avalia tanto o nível de ansiedade, quanto parâmetros de deambulação ou atividade locomotora de animais de pequeno porte (Figura 6).

Sabe-se que naturalmente camundongos, assim como os seres humanos, poderão reagir ao ambiente considerado “novo” e apresentar uma resposta aversiva, característica de congelamento (do inglês “*freezing*”), que é um comportamento inerente ao animal, e que muitas vezes o utilizam como forma de diminuir as detecções visuais e auditivas por parte dos predadores. No entanto, em uma segunda instância, há a exploração do ambiente onde se encontra.

Para realização deste experimento, todos os animais foram conduzidos à sala de teste por um período de, no mínimo, uma hora para aclimatação e habituação ao ambiente do teste. Para o teste, foi utilizada uma arena em madeira (100x100x40cm), pintada com material não permeável preto, onde o chão foi dividido em 25 quadrantes iguais de 20x20 cm. Após habituação, os animais foram colocados individualmente no quadrante central do campo aberto e foi permitido o livre deslocamento dentro do

aparato por 5 minutos. Foi contabilizado o número total de quadrantes cruzados do animal para avaliar a aptidão motora e subsidiar os testes de nocicepção.

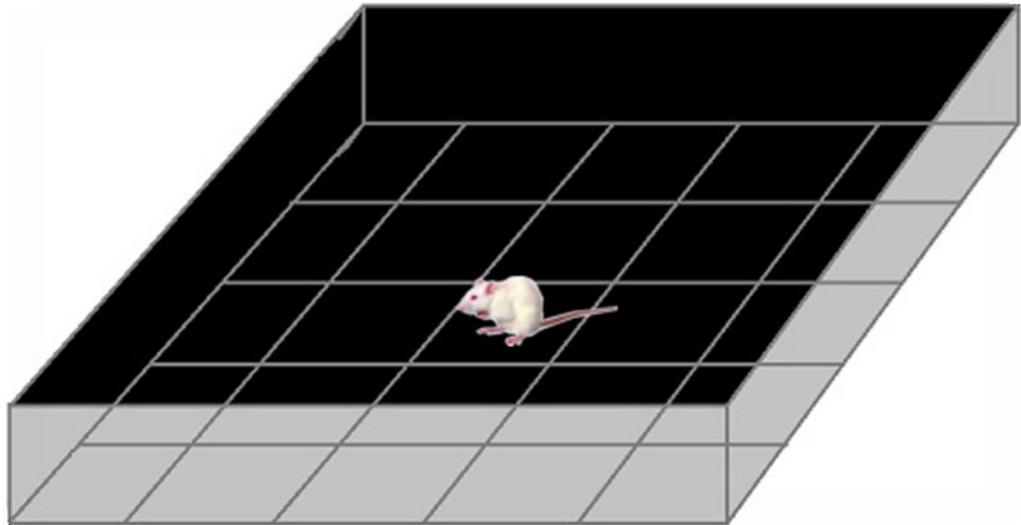


Figura 6 – Desenho ilustrativo da arena utilizada para o teste do Campo Aberto.

3.4. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

3.4.1 Estudo da Atividade Nociceptiva

3.4.1.1. ATIVIDADE ANALGÉSICA PERIFÉRICA

Teste de Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético

O teste da contorção abdominal foi descrito por Koster et al. (1959) e é utilizado como um modelo de dor visceral, no qual consiste na administração de ácido acético na concentração de 0,6% v/v (0,1 mL/10g de peso) por via intraperitoneal (i.p) em camundongos (LE BARS et al. 2001).

O ácido acético provoca irritação na membrana do peritônio, visto que é um agente flogístico, apresentando ação nociceptiva através da liberação de substâncias

endógenas as quais estimulam as terminações da dor. Estas contorções consistem em movimentos estereotipados como contração da parede abdominal, rotação do corpo e extensão das patas traseiras (LE BARS et al. 2001; AMABEOKU e KABATENDE, 2011).

O ácido acético, na concentração utilizada neste teste, avalia efeitos nociceptivos periféricos de natureza inflamatória, por induzir dor indireta, resultado de uma inflamação aguda no peritônio (IKEDA et al. 2001).

A resposta ao teste de contorção induzida por ácido acético é amplamente usado para avaliar e comparar a eficácia de novos medicamentos no tratamento da dor visceral (MIRANDA e PINARDI, 1998; LE BARES et al. 2001; FENG et al. 2003; MEYMANDI e SEPEHRI, 2008; STEPANOVIC-PETROVIC et al. 2008; ROMERO et al. 2010), porém neste trabalho será utilizado para avaliar possíveis alterações na nocicepção de proles de camundongos expostos à morfina durante o período intrauterino e pós-natal (lactação).

Nesse modelo de nocicepção, macrófagos e mastócitos sinalizam a presença de material estranho, liberando citocinas e mediadores inflamatórios clássicos (prostaglandinas, histamina, 5-HT e BK). A hiperalgesia é provocada pela liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 8 (IL-8) por macrófagos e mastócitos residentes na cavidade peritoneal (RIBEIRO et al. 2000). Estas citocinas liberadas pelas células residentes medeiam as contorções, principalmente através da proliferação de produtos da ciclo-oxigenase (COX), tais como prostaglandinas, assim como mediadores simpatomiméticos, os mediadores finais de hiperalgesia (BRITO et al. 2001).

Neste teste, os camundongos previamente avaliados no campo aberto, foram colocados sob um funil de vidro de aproximadamente 22 cm de diâmetro e após 10 minutos da administração do agente irritante, foi contabilizado o número total de contorções abdominais em um período de 20 minutos.



Figura 7 – Injeção Intraperitoneal de Ácido Acético para Teste de Contorção Abdominal
Fonte: www.lookfordiagnosis.com, acesso em 28/10/2014.

3.4.1.2 ATIVIDADE ANALGÉSICA CENTRAL

Teste da Placa Quente

Em 1946, MacDonald et al. descreveram um protocolo experimental para avaliar o limiar térmico de nocicepção a partir da utilização de uma placa metálica aquecida à temperatura fixa ($55 \pm 0,5$ °C), o qual foi denominado teste da placa quente (Figura 7).

Este teste avalia o envolvimento do SNC no efeito nociceptivo, indicando resposta ao estímulo térmico associado à neurotransmissão central (HUNSKAAR et al. 1996), por ativação das fibras A δ e C, e condução do estímulo ao corno dorsal e posteriormente aos centros corticais (DICKENSON e BENSON, 1997). Assim, avalia receptores vanilóides e opióides ao estímulo térmico que produz efeito supraespinhal (MARCHIORO et al. 2005).

O teste de placa quente é considerado seletivo para compostos analgésicos de ação central, como a morfina, enquanto analgésicos periféricos são conhecidos por serem inativos neste tipo de estímulo doloroso (CHU et al. 2008).

Para realização do teste, os animais previamente avaliados no campo aberto, foram colocados na placa aquecida (modelo Ugo Basile, Itália) e foi avaliado o tempo em segundos em que o animal levou para apresentar os componentes comportamentais de retirada de qualquer uma das patas, lambe as patas ou saltar sobre a placa, que são consideradas respostas supraespinhais, indicando dor ao estímulo térmico (LE BARS et al. 2001). Segundo KURAISHI et al. (1983), observa-se a resposta ao estímulo em cinco tempos para cada animal: 0, 30, 60, 90 e 120 minutos (LE BARS et al. 2001).

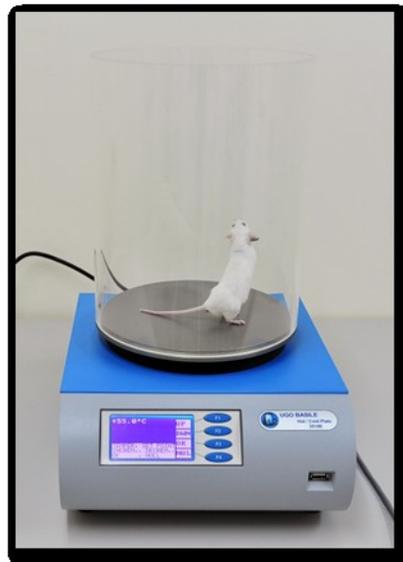


Figura 8 – Teste da placa quente.
Fonte: Castro, 2013.

Teste da Formalina

O teste da formalina (Figura 8) foi realizado conforme protocolo descrito por Hunskaar et al. (1987), para avaliação da dor neurogênica e dor inflamatória.

A formalina consiste de uma solução de formaldeído na concentração de 1% em solução fisiológica. Esta solução, após ser injetada na pata traseira do animal, produz estímulo subsequente, bem caracterizado por comportamento de dor bifásico, que são dependentes da ativação química direta de nociceptores (fase I ou neurogênica), inibição descendente (quiescência), e posteriormente ocorre sensibilização central (fase

II ou inflamatória) (TJOLSEN et al. 1992). A primeira e segunda fase acredita-se refletir excitação de nociceptores aferentes periféricos e sensibilização central, respectivamente (DICKSON e SULLIVAN, 1987; YAKSH et al. 2001).

Neste teste, foi administrado o volume de 20 μ L de uma solução de formalina na superfície plantar da pata traseira direita dos animais. Em seguida, os animais foram colocados individualmente sob um funil de vidro com diâmetro de aproximadamente 22 cm e foram observados e anotado o tempo no qual o animal permaneceu lambendo a pata na qual foi injetado formalina. Este período foi dividido em duas fases: 0 a 5 minutos caracterizando a fase neurogênica, na qual se observa um efeito direto sobre os nociceptores, imediatamente após a injeção da formalina; de 15 à 30 minutos, fase inflamatória, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios os quais representam papel importante na dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR et al. 1987).



Figura 9 - Animais submetidos ao Teste de Formalina
Fonte: CASTRO, 2013.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram através da Análise de Variância de duas vias (ANOVA) com comparações múltiplas *post hoc* utilizando o teste de Bonferroni. Os dados de cada grupo experimental foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 7-14 animais. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes foi de $p < 0,05$. Para as análises estatística foi utilizado o *software* GraphPad Prism versão 5.0.

IV RESULTADOS

TESTE DA LOCOMOÇÃO TOTAL

No teste da atividade locomotora espontânea foi observado que os grupos controle e grupo exposto à morfina no período perinatal e lactação não apresentaram alterações em relação aos seus controles, porém o grupo das fêmeas expostas à morfina no período perinatal apresentaram maior deambulação que o grupo macho exposto à morfina, representado pelo aumento do número de quadrantes cruzados (Figura 10). Este teste permitiu a realização dos demais testes nociceptivos, uma vez que ficou demonstrado que os animais em estudo não apresentavam deficiências motoras que inviabilizassem os testes de nocicepção.

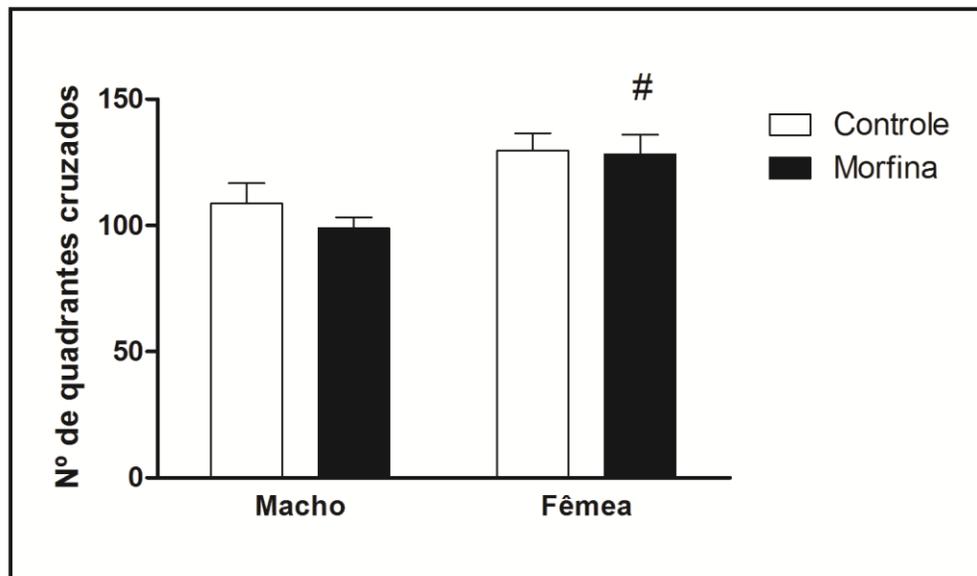


Figura 10- Teste da atividade locomotora espontânea. Comportamento locomotor da prole de mães tratadas com morfina (10mg/Kg/dia) ou solução salina (0,1mL/Kg/dia) na fase pré-natal e lactação. Cada coluna representa média \pm EPM (n = 7-10 por grupo). $\#P < 0,05$ em relação ao grupo de morfina machos, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni.

TESTE DA CONTORÇÃO ABDOMINAL

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram o efeito do uso de morfina no período pré-natal e lactação sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Foi observado que o número de contorções dos grupos tratados com morfina foi maior que as contorções apresentadas pelos seus grupos controle. Na análise dentro os gêneros observa-se que as fêmeas expostas à morfina apresentaram maior número de contorções comparadas aos machos também expostos àquela droga ($P < 0,05$; ANOVA duas vias; Figura 11).

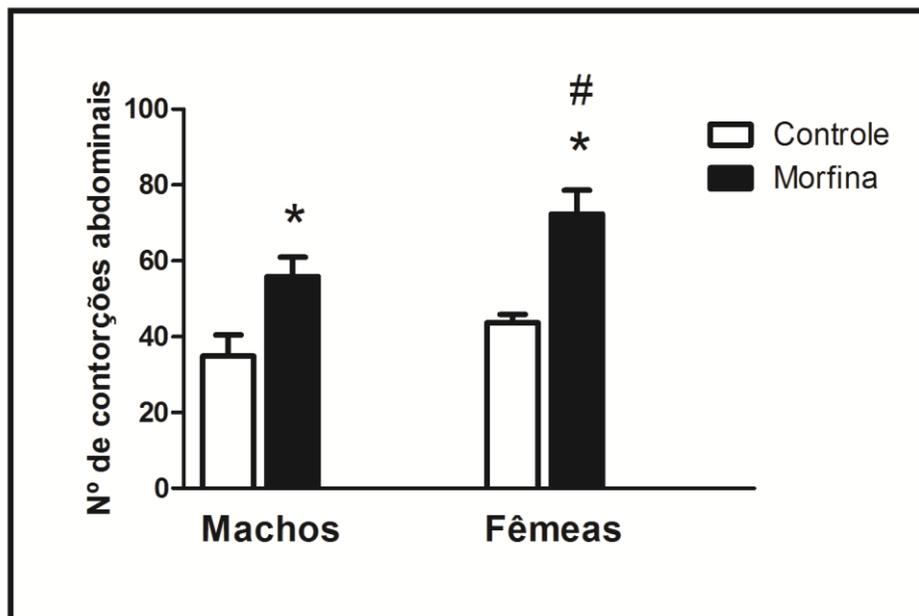


Figura 11- Teste de contorção abdominal. Comportamento de dor da prole de mães tratadas com morfina (10mg/Kg/dia) ou solução salina (0,1mL/Kg/dia) na fase pré-natal e lactação. Cada coluna representa média \pm EPM ($n = 8-14$ animais por grupo). * $P < 0,05$ em relação aos seus respectivos grupos controle. # $P < 0,05$ em relação ao grupo de morfina machos, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni.

TESTE DA PLACA QUENTE

O prévio tratamento das mães com morfina na dose de 10 mg/Kg/dia durante o período perinatal e lactação demonstrou que todos os grupos analisados apresentaram o mesmo comportamento nociceptivo nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos do teste. Porém, no último estágio do ensaio (120 min), o grupo macho exposto à morfina no período perinatal apresentou aumento na sensibilidade ao estímulo térmico em relação ao seu respectivo controle ($p < 0,01$) e ao grupo controle fêmea ($p < 0,001$). De forma contrária, o grupo de fêmeas expostas à morfina no período perinatal aumentou a resistência ao estímulo térmico em relação ao seu controle fêmea ($p < 0,01$), apresentando comportamento similar ao limiar nociceptivo apresentado pelo grupo controle macho, observado pelo aumento no tempo de início de resposta ao estímulo (Figura 12).

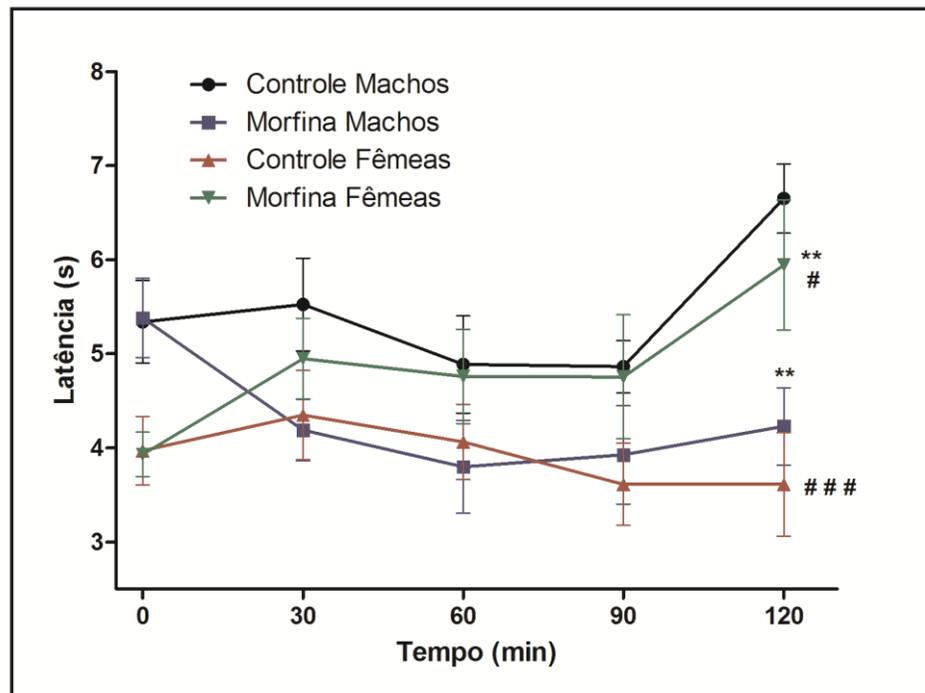


Figura 12- Teste da placa quente. Comportamento de dor pelo estímulo nociceptivo térmico ($55 \pm 0,5^\circ\text{C}$) da prole de mães tratadas com morfina (10mg/Kg/dia) ou solução salina (0,1mL/Kg/dia) na fase pré-natal e lactação em camundongos. Cada linha representa média \pm EPM ($n = 8-11$ animais por grupo). $**P < 0,01$ em relação aos seus respectivos grupos controle. $###P < 0,001$ e $\#P < 0,05$ em relação aos respectivos grupos de machos, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni.

TESTE DA FORMALINA

A figura 13 evidencia os resultados obtidos no teste da formalina, no qual o painel A é referente à primeira fase (0-5 min) que avalia a dor neurogênica, e o painel B (15-30 min) é referente à segunda fase que avalia a dor inflamatória. Na primeira fase, os animais apresentaram respostas semelhantes tanto nas avaliações intergrupos quanto intertratamentos. Entretanto, na segunda fase do teste, o grupo macho exposto à morfina no período perinatal apresentou diminuição no tempo de lambida na pata após o estímulo químico em relação ao seu controle, o que não ocorreu com o grupo das fêmeas expostas à morfina no período perinatal. Deve-se ressaltar que o grupo controle fêmea também apresentou diminuição do tempo de lambida na pata na segunda fase do teste em relação ao grupo controle macho.

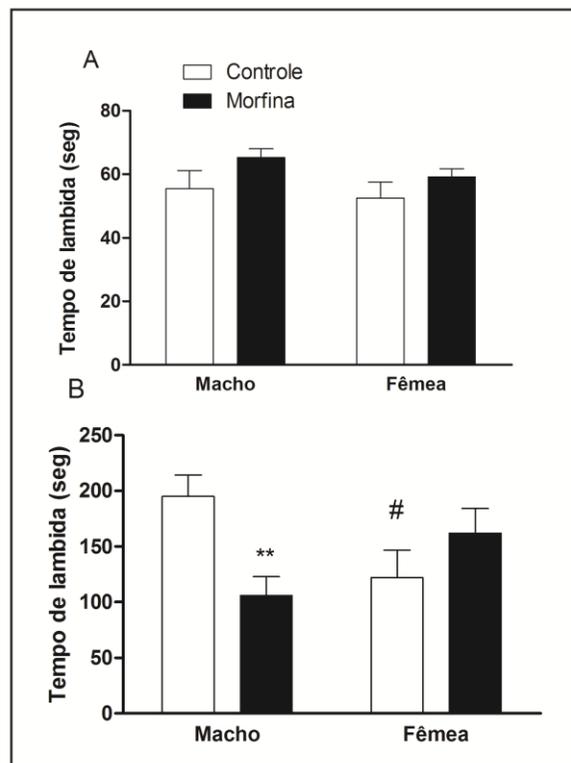


Figura 13- Teste da formalina. Comportamento de dor pelo estímulo nociceptivo químico (formalina 1% intraplantar) na 1ª fase (dor neurogênica, 0-5 min; painel A) e 2ª fase (dor inflamatória, 15-30 min; painel B) da prole de mães tratadas com morfina (10mg/Kg/dia) ou solução salina (0,1mL/Kg/dia) na fase pré-natal e lactação em camundongos. Cada linha representa média \pm EPM ($n = 7-10$ animais por grupo). ** $P < 0,01$ em relação ao seu respectivo grupo controle. # $P < 0,05$ em relação ao respectivo grupo de machos, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni.

V DISCUSSÃO

Este estudo investigou se a exposição à morfina no período perinatal induzia à alterações nos limiares nociceptivos da prole na vida adulta. Foi avaliada a atividade locomotora espontânea, utilizando o modelo de campo aberto; resposta nociceptiva através dos testes de contorção abdominal, da placa quente e injeção intraplantar da formalina, os quais foram conduzidos nas proles machos e fêmeas com setenta e cinco dias de vida correspondente à idade adulta (KLAUSZ et al. 2011).

Inicialmente, os animais em estudo foram submetidos ao teste locomotor para verificar qualquer prejuízo motor que pudesse inviabilizar os ensaios de nocicepção. Os resultados não apontaram para alterações motoras que interferissem nos resultados obtidos.

Dentre os ensaios nociceptivos, os testes de contorção abdominal foram realizados para avaliar os efeitos da intoxicação crônica com morfina em terminais periféricos da prole das mães tratadas. Os resultados demonstraram que fêmeas oriundas de mães tratadas com morfina no período perinatal apresentaram maior sensibilidade à dor ao expressar maior número de contorções em relação ao grupo controle fêmea, assim como em relação à prole de machos no qual as mães receberam morfina no período perinatal.

O peritônio parietal recebe inervação somática, assim a injeção intraperitoneal de ácido acético é útil como um modelo visceromotor somático de dor. Embora este teste seja de baixa especificidade pode ser considerado um modelo misto, equivalente à peritonite aguda, que ativa diretamente nociceptores viscerais e somáticos que inervam o peritônio e induz à inflamação em órgãos sub-diafragmáticos, mas também está presente na parede do músculo. Portanto, este modelo de dor somático-visceral é considerado um modelo simples, prático da dor intestinal clinicamente relevante que pode prever as respostas em humanos (LE BARS et al. 2001; STEPANOVIC-PETROVIC et al. 2008).

Nas vísceras, os nociceptores consistem de mecanorreceptores de alto e baixo limiar, e durante a dor visceral, transmissões de um grande componente destas fibras aferentes que normalmente estão silenciados são estimuladas pela presença de inflamação ou lesão tecidual (SENGUPTA, 2009).

Dor visceral em animais pode ser produzida por substâncias irritantes, tais como ácido trinitrobenzenosulfônico, formalina, glicerol e óleo de mostarda administrado diretamente no intestino, cólon, bexiga ou no útero de roedores (LE BARS et al. 2001; OHASHI-DOI et al. 2010).

A transmissão da dor visceral é caracterizada por fibras aferentes que normalmente não respondem a estímulos, mas tornam-se ativadas no processo inflamatório (SENGUPTA, 2009). Injeção intraperitoneal de ácido acético representa um modelo misto e ativa nociceptores viscerais e somáticos, induz à inflamação na camada sub-cutânea e muscular da parede abdominal e sub-diafragmática de órgãos viscerais (SATYANARAYANA et al. 2004). A SP e seu receptor NK1 desempenham papéis significativos na dor inflamatória e visceral ativando nervos aferentes sensíveis com origens gastrointestinais (LAIRD et al. 2000; GREENWOOD-VAN MEERVELD et al. 2003).

A morfina afeta a SP na coluna vertebral, no qual como agonista μ -opióide, diminui a liberação da SP através da ativação direta de fibras aferentes primárias, que reduz o número de neurónios c-fos-positivos na lâmina superficial (BEAUDRY et al. 2011). Desta forma, os resultados obtidos, sugerem que a exposição indireta à morfina no período perinatal altera a via nociceptiva ao longo prazo, tornando-a mais reativa aos estímulos nociceptivos na vida adulta onde não há mais a presença da droga circulante e que estas alterações são mais evidentes nas fêmeas, tornando-as mais susceptíveis à percepção da dor neste protocolo de nocicepção.

O teste de contorção é um modelo de dor usado para detectar tanto analgesia central como periférica e apresenta um resultado inespecífico que necessita de testes complementares para elucidar quais mediadores foram afetados pela exposição à morfina de forma crônica (VAZ et al. 1996; DU et al. 2007).

O teste da sensibilidade térmica no modelo da placa quente foi realizado com o objetivo de identificar as possíveis alterações na nocicepção central. Os resultados demonstram que nos tempos iniciais do teste, os animais não apresentaram diferenças no limiar nociceptivo entre os grupos de tratamento ou entre os gêneros. Porém, após sucessivas exposições ao agente térmico, as fêmeas e machos do grupo exposto à morfina apresentaram alterações no último estágio do teste (120 min). As fêmeas do

grupo exposto à morfina apresentaram aumento da resistência na sensibilidade à dor em relação ao seu controle, que neste teste apresenta limiar basal de maior sensibilidade ao estímulo térmico que machos. Porém, contraditoriamente, os animais machos, que foram mais resistentes que as fêmeas neste modelo (controle macho vs controle fêmea), quando expostos à morfina apresentaram aumento na sensibilidade à dor (efeito hiperalgésico), apresentando um padrão de sensibilidade similar ao comportamento basal das fêmeas controle, inclusive com maior percepção de dor que o grupo fêmea exposta à morfina sob o mesmo protocolo de tratamento. Estes resultados sugerem que ocorreram alterações do limiar térmico de nocicepção ou nas vias de condução da dor em proles fêmeas e machos de camundongos tratados com morfina no período perinatal e lactação.

De forma inversa, ficou demonstrado que ocorreram alterações decorrentes do uso crônico de morfina, e que estes efeitos são diferentes em função do gênero. Além de tudo, é importante ressaltar que os efeitos da exposição à morfina foram observados na vida adulta da prole (75 dias de vida), mesmo após um longo período sem o contato com a droga. Neste estudo foi mimetizado o uso abusivo de morfina por mães humanas com comportamento aditivo em relação à morfina.

De acordo com Tao et al. (2011), o sistema opióide contribui para a maior vulnerabilidade à hiperalgesia. Isto pode ser devido à alteração nas concentrações ou sensibilidade de peptídeos opióides endógenos e pela facilitação na ativação dos receptores opióides, ocasionado pela exposição pré-natal à morfina. A exposição crônica à morfina pode levar à diminuída potência analgésica e dependência, e mais recentemente os opióides foram reportados por aumentar paradoxalmente a nocicepção (BODNAR e KEST, 2010). Neste sentido, Csaba e Tekes (2005) apontaram que uma única exposição aguda à opióides pode promover alterações no sistema sensorial, durante esta fase determinante para desenvolvimento neonatal, tanto em moléculas endógenas quanto exógenas, e que pode ser capaz de provocar alterações em regiões específicas do SNC, mesmo a longo prazo.

É importante ressaltar que além de exposição às substâncias neurotóxicas, uma lesão pode alterar o desenvolvimento sináptico normal produzindo mudanças no processamento somatossensorial (FABER et al. 1997; ANAND et al.1999; RUDA et al.

2000). De fato, em humanos, a exposição precoce aos estímulos dolorosos tem consequências em longo prazo (TADDIO et al. 1997; OBERLAND et al. 2000).

Durante o período neonatal ocorre profunda reorganização estrutural e funcional nos sistemas sensórioespinais (ALVARES e FITZGERALD, 1999; FITZGERALD e BEGGS, 2001) e isto é fortemente influenciado por atividade anormal ou excessiva para a maturação das fibras nociceptivas do tipo C no período neonatal (FITZGERALD; BUTCHER; SHORTLAND, 1994; BEGGS et al. 2002;). Com isso, interferências neste período podem gerar mudanças na atividade do aferente primário, no processamento da medula espinhal e no controle descendente da dor (ZHANG e SWITZER, 2008).

Além disso, a exposição crônica à morfina durante o período neonatal pode alterar a maturação normal do circuito nociceptivo em diferentes níveis do neuroeixo, principalmente na aferência primária e sinapse da medula espinhal, no qual a maturação pós-natal inclui alterações estruturais e funcionais em neurônios aferentes C, A δ e A β e conseqüentemente na sensibilidade à dor (FITZGERALD et al. 1994), o que até o momento ainda não foram elucidadas.

A dor neurogênica e a dor inflamatória foram avaliadas através do teste da formalina, que desenvolve um comportamento de dor estereotipado e bifásico, que são dependentes diretamente de ativação química dos nociceptores, característicos da fase I. Em seguida, ocorre inibição descendente das vias, período conhecido por quiescência e posteriormente ativação dos nociceptores acoplados à sensibilização central, conhecida como fase II (TJOLSEN et al.1992). A primeira fase corresponde à dor neurogênica aguda, enquanto a segunda fase corresponde à dor inflamatória. A primeira e segunda fase acredita-se refletir a excitação de nociceptores periféricos aferentes e sensibilização central, respectivamente (DICKENSON e SULLIVAN, 1987; YAKSH et al. 2001).

Este teste avaliou a estimulação química direta nos nociceptores, predominantemente a fibra C, associada à liberação de aminoácidos excitatórios, como glutamato; SP, óxido nítrico e outros, resultando em extravasamento plasmático, vasodilatação de capilares vizinhos, ativação de fibras simpáticas, mastócitos e macrófagos. Como citado anteriormente, a solução de formaldeído a 1% (formalina)

injetada na pata induz resposta em duas fases distintas, a fase neurogênica e a inflamatória (LE BARS et al. 2001).

A SP, óxido nítrico e BK participam da primeira fase, enquanto 5-HT, histamina, BK, e as prostaglandinas estão envolvidas na segunda fase (GARCÍA et al. 2004). Farmacologicamente, diferentes mecanismos mostram envolvimento na primeira e segunda fase de comportamento nociceptivo. Por exemplo, enquanto o comportamento da segunda fase é seletivamente atenuado por inibidores da COX, o comportamento de primeira e segunda fase é atenuado por opióides (YAKSH et al. 2001).

Um aumento do comportamento nociceptivo na fase II induzido por formalina, após exposição à morfina de em dose semelhante à terapêutica, no período equivalente ao terceiro trimestre da gravidez em roedores, sugerem que as alterações observadas na prole gerada podem ocorrer no aferente primário e a sinalização em curso tem demonstrado contribuir, em parte, para comportamentos de sensibilização central na fase II do teste da formalina (ZISSEN et al. 2006). O estudo de Zissen et al. (2006) corrobora com os resultados do presente estudo, porém este trabalho sugere ainda que os machos foram mais suscetíveis às mudanças no padrão de sensibilidade da dor por estímulo químico, aumentando a sensibilidade ao estímulo nociceptivo em relação ao seu controle, onde os animais foram expostos à morfina por setenta e duas horas na idade de cinco dias pós-natal.

Estudos anteriores sugerem que o receptor μ -opióide tem um papel central em mediar mudanças de nocicepção induzida por formalina, após a exposição à morfina neonatal e este efeito pode ser em decorrência de: (1) uma maior percentagem de neurônios do gânglio da raiz dorsal, tanto de pequeno e grande diâmetro, que expressam o receptor μ -opióide durante a primeira semana de vida; (2) a expressão do receptor μ -opióide é regulada nos neurônios de maior diâmetro, com a maturação pós-natal (BELAND e FITIGERALD, 2001); e (3) mudanças na ligação ao receptor μ -opióide nas porções apicais da medula espinhal no sétimo dia após o nascimento em um padrão difuso de ligação que se localiza, com a maturação, no corno dorsal superficial (RAHMAN et al. 1998).

O aumento da expressão de receptores μ sugere uma ação mais ampla de atividade da morfina diretamente na medula espinhal e, indiretamente, através das

largas terminações dos aferentes primários em ratos jovens (07 dias pós-natal) em comparação com ratos mais velhos (NANDI et al. 2004). Este achado associado com a supraexpressão de vias excitatórias no aferente primário da sinapse medular espinhal tem um papel vital para expressão de receptores μ na maturação normal do circuito nociceptivo e, portanto, a ruptura deste por administração exógena de agonistas opióides podem ter consequências prejudiciais na maturação dos circuitos da dor (THORNTON e SMITH, 1998; THORNTON et al. 2000). Processos dependentes de atividade opióide conduzem à maturação de fibras-C nociceptivas, durante este período crítico de maturação (FITZGERALD et al. 1994; BEGGS et al. 2002). O aferente primário sofre importantes alterações anatômicas e funcionais durante as três primeiras semanas pós-natal em rato. Em ratos adultos, fibras aferentes primárias A δ e C transmitem estímulos dolorosos, o que não ocorre com as fibras A β . Em contraste, no sétimo dia pós-natal em ratos, as fibras A β aferentes primárias também podem transmitir estímulos dolorosos (FITZGERALD e JENNINGS, 1999).

Existe uma hipótese que a atividade aumentada das fibras A β no início do desenvolvimento pode ser modulado pelas despolarizações sub-limíares da fibra C (DICKENSON e RAHMAN, 1999). Funcionalmente, em roedores adultos, agonistas opióides inibem seletivamente fibras A δ e C, mas não fibras A β (RAHMAN e DICKENSON, 1999). Em contraste, a morfina em ratos jovens pode inibir a atividade mediada por fibras A β e C na medula espinhal lombar (RAHMAN et al. 1998), que é paralela à expressão de receptores μ em células do gânglio da raiz dorsal, de pequeno (A δ e C) e grande (A β) diâmetro (BELAND e FITZGERALD, 2001).

Em roedores adultos, receptores μ pré-sinápticos residem predominantemente em fibras C de aferentes primários (ABBADIE et al. 2002; JONES et al. 2003; LU et al. 1997). Em ratos jovens, a expressão aumentada de receptores μ em uma população diversa de aferentes primários sugere que a especialização de fibras C desenvolve transversalmente à maturação pós-natal (RAHMAN et al. 1998) e, portanto, pode ser influenciada por precoce exposição aos opióides.

Em relação à adição de drogas, estudos tem demonstrado importantes consequências cognitivas da exposição pré-natal à morfina (CHE et al. 2005; SARKAKI et al. 2008; WANG e HAN, 2009), porém os efeitos na nocicepção é negligenciada.

Sabe-se que a morfina induz à tolerância e que este efeito foi correlacionado com a ocorrência de apoptose neuronal no corno dorsal da medula espinhal superficial (MAO et al. 2002), que na fase de neurodesenvolvimento poderia produzir modificações fisiológicas de longo prazo na sensibilidade e/ou condução da dor (KYLE, 2006; BERMAN et al. 2008;).

Uma vez que a exposição prolongada de morfina intrauterina pode causar vasoconstrição fetal e placentária (COLLINS et al. 2005), parece que os efeitos prejudiciais de morfina são em parte devido ao estresse oxidativo provocado no tecido placentário. Demonstrou-se que a hipóxia pode estimular a apoptose nos tecidos da placenta, e o aumento no nível de apoptose placentária pode levar à restrição do crescimento fetal (CHEN e DAI, 2008; GUDE et al. 2000; MYATT e CUI, 2004), assim a transferência de morfina através da placenta e seu efeito direto sobre desenvolvimento do embrião seria a parte mais importante de seu papel prejudicial (NASIRAEI-MOGHADAM et al. 2010).

Estudos de Nasiraei-Moghadam et al. (2010) demonstraram que aumento da atividade da caspase 3, reforça a conclusão que a morfina pode desencadear a cascata molecular que leva à apoptose no desenvolvimento do tubo neural. Considerando o papel importante da apoptose no desenvolvimento normal do sistema nervoso, é provável que o aumento da susceptibilidade à apoptose seja de fundamental importância no desenvolvimento de anormalidades fetais e embrionárias induzida por morfina (NASIRAEI-MOGHADAM et al. 2010).

As diferentes alterações fisiológicas entre machos e fêmeas decorrentes da exposição à morfina são ainda pouco conhecidas. Estudos anteriores demonstraram que o surgimento de receptores opióides em ratos é paralelo ao aparecimento de receptores esteróides no cérebro, que gira em torno de 14 dias da vida fetal, quando o final da divisão celular do hipotálamo se completa (CLEDENINN et al. 1976; JACOBSON e GORSKI, 1981). Este período também coincide com o início da secreção de esteróides das gônadas no feto macho (DOHLER, 1991) e tais eventos podem servir como sinais para o início do "período crítico" de diferenciação sexual em nível central (VITO e FOX, 1981). A observação de que a maior concentrações de receptores opióides neuronais estão no sistema límbico, tálamo, estriado, hipotálamo,

mesencéfalo, e na medula espinal (SIMON e MILLER, 1978; SNYDER, 1978) sugere que os mecanismos fisiológicos que não seja a analgesia e percepção da dor, podem ser afetados por narcóticos (SIDDIQUI et al, 1995), assim como opióides podem induzir a uma condição de hipogonadismo masculino, tanto em humanos quanto em roedores (ALOISI et al. 2009).

Um fator importante que necessita profundamente ser estudada é a resposta à dor, considerando o gênero, visto que as diferenças na percepção da dor entre os sexos são, frequentemente, de uma magnitude substancial (PALMEIRA; ASHMAWI e POSSO, 2011).

As influências do ciclo estral sobre o desempenho comportamental de ratos são conhecidas desde o início do século XX, mas apenas a partir da década de 70 estudos sistemáticos sobre diferenças de gênero em modelos animais de ansiedade passaram a ser feitos em larga escala (BREEDLOVE, 1993).

O conhecimento das diferenças na morfologia e na função do SNC entre os sexos se torna mais detalhado a cada dia, tanto em humanos quanto em animais (MCEWEN, 1999; ALOISI, 2000). Consideram-se diversos fatores responsáveis pelas diferenças na percepção entre os sexos e assim como a grande prevalência de dor crônica nas mulheres (TOUSIGNANT-LAFLAMME e MARCHAND, 2009).

Acredita-se que fatores biológicos, como, por exemplo, hormônios sexuais, representam um dos principais mecanismos que explicam as diferenças na percepção da dor entre os sexos. Essa hipótese é apoiada por diversos achados em estudos realizados com animais (FILLINGIM e GEAR, 2004; GAUMOND, ARSENAULT e MARCHAND, 2005; THOMPSON, ANGELOTTI, NAG, HAGIWARA, KIMURA, MITSUSHIMA, 2010) e humanos (BERKLEY, 1997; FILLINGIM e GEAR, 2004), assim como os resultados deste trabalho, que apontam neste sentido.

Em ratas, o ciclo hormonal dura de quatro a cinco dias e tem quatro fases, denominadas de Estro, Metaestro, Diestro e Proestro. O Estro corresponde à ovulação e nesta fase a progesterona encontra-se em seu nível máximo. O Metaestro corresponde à fase entre os ciclos, na qual não há ação hormonal identificável. O Diestro corresponde à ação inicial do estradiol sobre o organismo, com níveis de estradiol correspondentes à metade da taxa máxima. O Proestro corresponde ao pico

da ação do estradiol (SCHWATZ, 1969; CARTER, 1993; KANDELI, SCHWATZ & JESSEL, 1995).

Fazendo uma correlação entre ciclo hormonal e receptores opióides, alguns estudos evidenciaram que o sistema opióide do tronco espinhal é em muitos aspectos mais robusto e eficiente no sexo masculino do que em roedores do sexo feminino (GUPTA et al. 2007; MITROVIC et al. 2003). No núcleo parabraquial da ponte, a expressão do receptor μ -opióide flutua durante o ciclo estral e há uma redução significativa na expressão deste receptor em ratas proestro, quando comparados com os ratos (MURPHY et al. 2009). Na substância cinzenta periaquedutal (PAG), as diferenças entre os gêneros no número de receptores μ foi também demonstrada (LOYD et al. 2008). Assim, as fêmeas apresentaram níveis mais baixos de receptor μ - opióides em várias regiões do cérebro envolvidas na transmissão da dor (AMANDUSSON e BLOMQVIST, 2013).

Em humanos, a ativação do receptor μ -opióide no cérebro em resposta aos estímulos dolorosos em mulheres é dependente de estradiol (SMITH et al. 2006) e mulheres em um estado de baixo nível de estradiol, demonstram menor capacidade de ativar o sistema opióide em resposta à dor sustentada em relação aos homens e, conseqüentemente, apresentam índices mais elevados de dor (ZUBIETA et al. 2002). Desta forma, estes achados podem justificar a maior sensibilidade à dor devido ao estímulo nociceptivo químico, porém não é capaz de explicar o aumento na resistência ao estímulo térmico (dor central). Outros estudos apontam que o abuso de opióides pode levar a uma interrupção na ciclicidade normal devido ao aumento da atividade opióide (GENAZZANI et al. 1993; DANIELL, 2008;). Este fato pode ter um fundo biológico plausível para menor expressão basal de opióides endógenos em mulheres (AMANDUSSON e BLOMQVIST, 2013).

A via da dor espino-tálamo-cortical é somente vista em primatas; espécies subprimatas exibem uma via menos específica e maior integração com o prosencéfalo (CRAIG, 2003). Em humanos, há uma relação recíproca entre o sistema opióide e eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal tal que os estrogênios modulam opióides e opióides endógenos, que por sua vez, controlam a ciclicidade hormonal e a ovulação (AMANDUSSON e BLOMQVIST, 2013).

Outro ponto importante é que as vias analgésicas opióide espinhal são sexualmente dimórficas, tanto que a ativação de receptores μ esclarece analgesia em machos, mas nas fêmeas é necessária a combinação da ativação dos receptores μ e κ para produzir analgesia, que parece ser devido aos hormônios sexuais ovarianos e não à mera ausência de hormônios testiculares (LIU et al. 2007).

Em relação aos machos, o estudo de Siddiqui et al. (1995) evidenciou que proles expostos à morfina apresentaram alta sensibilidade ao efeito supressor de morfina, nestes animais a função testicular foi quase abolida com aspermatogênese e muito baixa atividade esteroidogênica.

Neste sentido, os resultados obtidos neste trabalho, demonstram que ocorreu uma inversão da resposta nociceptiva das proles, com as fêmeas apresentando comportamento nociceptivo similar aos machos, assim como machos apresentando comportamento nociceptivo semelhante às fêmeas, quando as mães foram tratadas com morfina no período perinatal e lactação, demonstrando diferenças na resposta analgésica em função da diferença entre os gêneros. Desta forma, este estudo revela as possibilidades de novos trabalhos com o intuito de determinar qual o mecanismo induzido pela morfina foi responsável pelas mudanças observadas.

VI CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que a exposição contínua à morfina na dose de 10mg/Kg/dia durante o período da gravidez e lactação gerou alterações na sensibilidade nociceptiva nas proles na idade adulta. Pela primeira vez, este estudo demonstra que esta alteração foi contraditória em função do gênero, visto que fêmeas apresentaram modificações duais na sensibilidade, que foi dependente do estímulo nociceptivo, tornando-a mais sensível à percepção da dor para estímulos químicos intraperitoneais, porém mais resistente ao estímulo térmico de nocicepção central. Os machos expostos à morfina no período perinatal também apresentaram aumento da sensibilidade à dor pelo estímulo químico intraperitoneal, porém com menor intensidade que as fêmeas. Além disso, contrariamente às fêmeas, os machos foram mais sensíveis ao estímulo térmico (nocicepção central) e mais resistentes à dor inflamatória, que não foi afetada nas fêmeas.

Dessa forma, há necessidade de maiores investigações acerca dos possíveis mecanismos e vias afetadas pela morfina nestas proles que justifiquem a permanência das alterações encontradas na vida adulta, assim como avaliar quais áreas neurais foram modificadas, mesmo após um longo período sem o contato com a droga, gerando as alterações na percepção da dor observada neste estudo.

REFERÊNCIAS

ABBADIE, C.; LOMBARD, M.C.; BESSON, J.M.; TRAFTON, J.A.; BASBAUM, A.I. Mu and delta opioid receptor-like immunoreactivity in the cervical spinal cord of the rat after dorsal rhizotomy or neonatal capsaicin: an analysis of pre- and postsynaptic receptor distributions, **Brain Res**. Amsterdam. v.930, p. 150–162, 2002.

ALOISI, A.M; CECCARELLI, I; HERDEGEN,T. Gonadectomy and persistent pain differently affect hippocampal c-Fos expression in male and female rats. **Neurosci Lett**. v.28, p.29-32, 2000.

ALOISI, A.M.; AURILIO, C.; BACHIOCCO, V.; BIASI, G.; FIORENZANI, P.; PACE, M.C.; PACI, V.; PARI, G.; PASSAVANTI, G.; RAVAIOLI, L.; SINDACO, G.; VELLUCCI, R.; CECCARELLI, I. Endocrine consequences of opioid therapy. **Psychoneuroendocrinology**. Oxford v.34, Supl 1, p.162-168, 2009

ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia**: Fundamentos práticos. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2006. 384 p.

ALVARES, D.; FITZGERALD, M. Building blocks of pain: the regulation of key molecules in spinal sensory neurones during development and following peripheral axotomy, **Pain**. Amsterdam. Suplemento 6, p. 71–85, 1999.

AMABEOKU, G.J.; KABATENDE, J. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Leaf Methanol Extract of *Cotyledon orbiculata* L. (Crassulaceae). **Adv Pharmacol Sci**. New York, v.2012, p.1-6, 2012.

AMANDUSSON, Å.; BLOMQVIST, A. Estrogenic influences in pain processing. **Front Neuroendocrinol**. Orlando. v.34, p.329-49, 2013

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 4ª ed. Washington. 1994.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**: text revised. 4ª ed. Washington. 2000.

ANAND, K.J.; COSKUN, V.; THRIVIKRAMAN, K.V.; NEMEROFF, C.B.; PLOTSKY, P.M. Long-term behavioral effects of repetitive pain in neonatal rat pups. **Physiol Behav**. Oxford, v.66(4), p.627-37, 1999.

ARACILI-FERNANDEZ, A, ALMELA, P, MANZANARES, J. Pregabalin and topiramate regulate behavioural and brain gene transcription changes induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice. **Addict. Biol**. v18, p 252–562, 2013.

ARNOLD, J. C. The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. **Pharmacol. Biochem. Behav**. Phoenix, v. 81, p. 396–406, 2005.

BACK, S.E.; PAYNE, R.A.; SIMPSON, A.N.; BRADY, K.T. Gender and prescription opioids: Findings from the National Survey on Drug Use and Health. **Addict Behav.** Oxford, v. 35, p. 1001–1007, 2010.

BACK, S.E.; PAYNE, R.L.; WAHLQUIST, A.H.; CARTER, R.E.; STROUD, Z.; HAYNES, L.; HILLHOUSE, M.; BRADY, K.T.; LING, W. Comparative Profiles of Men and Women with Opioid Dependence: Results from a National Multisite Effectiveness Trial. **Am J Drug Alcohol Abuse.** New York. v.37(5), p.313–323, 2011.

BARTOLETTI, M., GAIARDI, M., GUBELLINI, C., BACCHI, A., BABBINI, M. Cross-sensitization to the excitatory effect of morphine in post-dependent rats. **Neuropharmacology.** Oxford, v. 24, p. 889–893, 1985.

BEAUDRY, H.; DUBOIS, D.; GENDRON, L. Activation of spinal mu- and delta-opioid receptors potentially inhibits substance P release induced by peripheral noxious stimuli. **J Neurosci.** Washington, v. 31(37), p.13068-77, 2011.

BEGGS, S.; TORSNEY, C.; DREW, L.J.; FITZGERALD, M. The postnatal reorganization of primary afferent input and dorsal horn cell receptive fields in the rat spinal cord is an activity-dependent process. **Eur. J. Neurosci.** Oxford, v. 16, p. 1249–1258, 2002.

BEKKERING, G.E.; SOARES-WEISER, K.; REID, K.; KESSELS, A.G.; DAHAN, A.; TREEDE, R.D.; KLEIJNEN, J. Can morphine still be considered to be the standard for treating chronic pain? A systematic review including pair-wise and network meta-analyses. **Curr. Med. Res. Opin.** London, v. 27(7), p.1477–1491, 2011.

BERKLEY, K.J. Sex differences in pain. **Behav Brain Sci.** v.20, p.371- 380, 1997.

BELAND, B.; FITZGERALD, M. Mu and delta-opioid receptors are downregulated in the largest diameter primary sensory neurons during postnatal development in rats. **Pain.** Amsterdam, v. 90, p. 143–150, 2001.

BEN ELIYAHU, S.; MAREK, P.; VACCARINO, A.L.; MOGIL, J.S.; STERNBERG, W.F.; LIEBESKIND, J.C. The NMDA receptor antagonist MK-801 prevents long-lasting non-associative morphine tolerance in the rat. **Brain Res.** Amsterdam, v. 575, p. 304-308, 1992.

BERMAN, S.; O'NEILL, J.; FEARS, S.; BARTZOKIS, G.; LONDO, E.D. Abuse of amphetamines and structural abnormalities in the brain. **Ann N Y Acad Sci.** New York, v. 1141, p. 195–220, 2008.

BIRNBAUM, H.G.; WHITE, A.G.; REYNOLDS, J.L.; GREENBERG, P.E.; ZHANG, M.; VALLOW, S.; SCHEIN, J.R.; KATZ, N.P. Estimated costs of prescription opioid analgesic abuse in the United States in 2001: a societal perspective. **Clin J Pain.** New York, v. 22(8), p.667–676, 2006.

BODNAR, R.J.; KEST, B. Sex differences in opioid analgesia, hyperalgesia, tolerance and withdrawal: central mechanisms of action and roles of gonadal hormones. **Horm Behav.** v.58, p.72-81, 2010.

BOOTH, M. **Opium: a History.** 1ª ed. New York: St Martin's Griffin, 1998. 380 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Formulário terapêutico nacional/ Rename.** Brasília, 2ª ed, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas psicotrópicas no Brasil:** Estudo envolvendo as 108 maiores cidades do País. 2005.

BRAVIM, L.S. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Antiinflamatória do Óleo Essencial de *Hyptiscrenata* (Pohl) ex Benth.** 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

BREEDLOVE, S.M. Sexual differentiation of the brain and behavior. *Behav. Endocrinology*, Cambridge, p.71-96, 1993.

BRITO, G. A. C.; SARAIVA, N. R. S.; FALCÃO, J. L. A. A.; VALE, M. L.; LIMA, A. A.M.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Dual effect of cAMP on the writhing response in mice. **Eur. J. Pharmacol.** Amsterdam, v. 416, p.223–230, 2001.

BROUSSARD, C.S.; RASMUSSEN, S.A.; REEFHUIS, J.; FRIEDMAN, J.M.; JANN, M.W.; RIEHLE-COLARUSSO, T.; HONEIN, M.A; NATIONAL BIRTH DEFECTS PREVENTION STUDY. Maternal treatment with opioid analgesics and risk for birth defects. **Am J Obstet Gynecol.** St. Louis, v. 204, p. 1-11, 2011.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Centrais de Transmissão e de Modulação da Dor: Atualização Terapêutica. **Rev Bras Anestesiol.** Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p.221-241, 1998.

CARTER, C. S. Neuroendocrinology of sexual behavior in the female. Em J. B. Becker; S. M. Breedlove & D. Crews (Orgs.). **Behavioral Endocrinology**, p.71-96. Cambridge, Mass, 1993.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu. Rev. Neurosci.** Palo Alto, v. 24, p. 487-517, 2001.

CHE, Y.; SUN, H.; TAN, H.; PENG, Y.; ZENG, T.; MA, Y. The effect of prenatal morphine exposure on memory consolidation in the chick. **Neurosci Lett.** Amsterdam, v. 380, p. 300–304, 2005.

CHEN, H.; DAI, Z.Y. Roles of placental cellular apoptosis and bcl-2 expression in fetal growth restriction with unclear etiologies. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**. Beijing, v. 43, p. 510–513, 2008.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemical Research**. New York, v. 33, n. 10, p. 1970-1978, 2008.

CHENG, J.K.; JI, R.R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochem Res**. New York, v.33(10), p.1970-8, 2008.

CHIANG, Y.C.; HUNG, T.W.; LEE, C.W.S.; YAN, J.Y.; HO, I.K. Enhancement of tolerance development to morphine in rats prenatally exposed to morphine, methadone, and buprenorphine. **Journal of Biomedical Science**. New York, v. 17, p. 46, 2010.

CHOOA, R. E.; HUESTIS, J. R.; SCHROEDER, A. S.; SHIN, A. S.; JONES, H. E. Neonatal abstinence syndrome in methadone-exposed infants is altered by level of prenatal tobacco exposure. **Drug Alcohol Depend**. Lausanne , v. 75, p. 253-260, 2004.

CHU, C.; HUANG, Y.; CHEN, Y.F.; WU, J.H.; RAHMAN, K.; ZHENG, H.C.; QIN, L.P. Anti-nociceptive activity of aqueous fraction from the MeOH extracts of *Paederia scandens* in mice. **J. Ethnopharmacol**. Lausanne, v. 118, p.177–180, 2008.

CLENDENINN, N.J.; PETRAITIS, M.; SIMON, E.J. Ontological development of opiate receptors in rodent brain. **Brain Res**. Amsterdam. v.118, p.157-60, 1976..

COLLINS, L.R.; HALL, R.W.; DAJANI, N.K.; WENDEL, P.J.; LOWERY, C.L.; KAY, H.H. Prolonged morphine exposure in utero causes fetal and placental vasoconstriction: a case report. **J Matern Fetal Neonatal Med**. Boca Raton, v.17, p.417–421, 2005.

COSTIGAN, M.; WOOLF, J. Pain: molecular mechanisms. **J Pain**. Philadelphia, v. 1 p. 35-44, 2000.

CROFFORD, L. J. Adverse effects of chronic opioid therapy for chronic musculoskeletal pain. **Nature Reviews Rheumatology**. New York, v. 6, p.191-197, 2010.

CRUZ, A.M.; MAIORKA, P.C.; CANTERAS, N.S.; SUKIKARA, M.H.; FELICIO, L.F. Morphine treatment during pregnancy modulates behavioral selection in lactating rats. **Physiology & Behavior**. Oxford, v.101, p.40-44, 2010.

CRAIG, A.D. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. **Annu Rev Neurosci**. Palo Alto. v.26, p.1-30, 2003.

CSABA, G.; TEKES, K. Is the brain hormonally imprinted? **Brain Dev.** Tokyo, v.27, p.465-471 2005.

DAHAN, A.; VAN DORP, E.; SMITH, T.W.; YASSEN, A. Morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief. **Eur. J. Pain.** London, v.12, p.403-411, 2008.

DAITCH, J.; FREY, M.E.; SILVER, D.; MITNICK, C.; DAITCH, D.; PERGOLIZZI JR, J. Conversion of Chronic Pain Patients from Full- Opioid Agonists to Sublingual Buprenorphine. **Pain Physician.** Paducah, v. 15, suplemento 3, p. 59-66, 2012.

DANIELL, H.W. Opioid endocrinopathy in women consuming prescribed sustained-action opioids for control of nonmalignant pain. **J Pain.** Philadelphia, v.9, p.28-36, 2008.

DEGENHARDT, L.; HALL, W. Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. **Lancet,** London, v. 379, p.55-70, 2012.

DIB-HAJJ, S.D.; CHOI, J.S.; MACALA, L.J.; TYRRELL, L.; BLACK, J.A.; CUMMINS, T.R.; WAXMAN, S.G. Transfection of rat or mouse neurons by biolistics or electroporation. **Nat. Protoc.** London, v.4, p.1118-26, 2009.

DIB-HAJJ, S.D.; CUMMINS, T.R.; BLACK, J.A.; WAXMAN, S.G. From genes to pain: Nav1.7 and human pain disorders. **Trends Neurosci.** Amsterdam, v. 30, p.555-63, 2007.

DICKENSON, A.; BESSON, J. M. **The pharmacology of pain.** Berlin: Springer, 1997. 479 p.

DICKENSON, A.; RAHMAN W. Mechanisms of chronic pain and the developing nervous system. In: MCGRATH, P. (Ed.). **Chronic and recurrent, pain in children and adolescents,** vol. 13, Seattle: IASP Press, 1999, p. 5-38.

DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurons. **Neurosci. Lett.** Amsterdam, v. 83, p. 207-211, 1987.

DOHLER, K.D. The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. **Int. Rev. Cyt.** New York, v. 131, p. 1 -75, 1991.

DU, J.; YUA, Y.; KEA, Y.; WANG, C.; ZHUA, L.; QIAN, Z. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. **Journal of Ethnopharmacology.** Lausanne, v.112, p. 211-214, 2007.

DUARTE, D. F. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Rev Bras Anestasiol.** Rio de Janeiro, v. 55(1), p. 135-146, 2005.

ELLIOTT, E.J.; BOWER, C. Alcohol and pregnancy: the pivotal role of the obstetrician. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**. Melbourne, v. 48, p. 236-239, 2008.

EMMERSON P.J.; LIU M.R.; WOODS J.H.; et al. Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. **J Pharmacol Exp Ther**. Vol. 271, no. 3, p. 1630-7, 1994.

ESTELLES, J.; RODRIGUEZ-ARIAS, M.; MALDONADO, C.; AGUILAR, M. A.; MINARRO, J. Gestational exposure to cocaine alters cocaine reward. **Behav. Pharmacol**. London, v. 17, p. 509–515, 2006.

FABER, E.S.; CHAMBERS, J.P.; BRUGGER, F.; EVANS, R.H. Depression of A and C fibre-evoked segmental reflexes by morphine and clonidine in the in vitro spinal cord of the neonatal rat. **Br. J. Pharmacol**. London, v.120, p.1390–1396, 1997.

FARQUHAR-SMITH, W.P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine-Pain**. Abingdon , v. 9, n° 1, p.3-7, 2007.

FATTORE, L.; DEIANA, S.; SPANO, S. M.; COSSU, G.; FADDA, P.; SCHERMA, M.; FRATTA, W. Endocannabinoid system and opioid addiction: behavioural aspects. **Pharmacol. Biochem. Behav**. Phoenix, v.81, p. 343–359, 2005.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W.D. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**. Philadelphia, v. 98, p.729–33, 2003.

FILLIGIM, R.B; GEAR, R.W. Sex differences in opioid analgesia: clinical and experimental findings. **Eur J Pain**. v.8, p.413-425, 2004.

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

FITZGERALD, M.; BUTCHER, T.; SHORTLAND, P. Developmental changes in the laminar termination of A fibre cutaneous sensory afferents in the rat spinal cord dorsal horn. **J Comp Neurol**. Philadelphia, v.348(2), p.225-33, 1994.

FITZGERALD, M.; JENNINGS, E. The postnatal development of spinal sensory processing, **Proc. Natl. Acad Sci**. U S A. Washington, v. 96, p. 7719–7722, 1999.

GAGIN, R.; KOOK, N.; COHEN, E.; SHAVIT, Y. Prenatal morphine enhances morphine-conditioned place preference in adult rats. **Pharmacol Biochem Behav**. Phoenix, v.58, p.525–528, 1997.

GARCIA, M.A.; FERNANDEZ, A. A.; SAENZ, M.T. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extracts from leaves of *Pimenta racemosa varozua* (Mirtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. Lausanne, v. 91, p. 69-73, 2004.

GAUMOND, I; ARSENAULT, P; MARCHAND, S. Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. **Brain Res.** v.1052, p.105-111, 2005.

GARFIELD, E. Current Comments: The 1982 John Scott Award goes to Jack Fishman and Harold Blumber for synthesis and investigation of naloxone. **Essays of an information scientist.** v.6, p.121-130, 1983.

GAZERANI, P.; WANG, K.; CAIRNS, B.E.; SVENSSON, P.; ARENDT-NIELSEN, L. Effects of subcutaneous administration of glutamate on pain, sensitization and vasomotor responses in healthy men and women. **Pain.** Amsterdam. v.124, p.338-48, 2006.

GOULD, T. J. Addiction and cognition. **Addict Sci Clin Pract.** Bethesda. v.5(2), p.4-14, 2010.

GOZZANI, J. L. Opióides e antagonistas. **Rev Bras Anestasiol.** Rio de Janeiro, v. 44 (1), p. 65-73, 1994.

GREENWOOD-VAN MEERVELD, B.; GIBSON, M.S.; JOHNSON, A.C.; VENKOVA, K.; SUTKOWSKI-MARKMANN, D. NK1 receptor-mediated mechanisms regulate colonic hypersensitivity in the guinea pig. **Pharmacol Biochem Behav.** Phoenix, v.74, p.1005-13, 2003.

GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.** London, v. 81, p. 8-11, 1998.

GUDE, N.M.; STEVENSON, J.L.; MOSES, E.K.; KING, R.G. Magnesium regulates hypoxia-stimulated apoptosis in the human placenta. **Clin Sci.** London, v.98, p. 375-380, 2000.

GUPTA, D.S.; VON GIZYCKI, H.; GINTZLER, A.R. Sex-/ovarian steroid-dependent release of endomorphin 2 from spinal cord. **J Pharmacol Exp Ther.** Baltimore. v.321, p.635-41, 2007.

HAESLER, G.; FOADI, N. A.; AHRENS, J. A.; DENGLER, R. B.; HECKER, H. C.; LEUWER, M. D. Tramadol, fentanyl and sufentanil but not morphine block voltageoperated sodium channels. **Pain.** Amsterdam, v.126, p.234-244, 2006.

HAGIWARA, H; KIMURA, F; MITSUSHIMA, D. Formalin-induced nociceptive behavior and c-Fos expression in middle-aged female rats. **Physiol Behav.** v.100, p.101-104, 2010.

HANDAL, M.; GRUNG, M.; SKURTVEIT, S.; RIPEL, A.; MORLAND, J. Pharmacokinetic differences of morphine and morphine-glucuronides are reflected in locomotor activity. **Pharmacol Biochem Behav.** Phoenix , v.73, p.883-92, 2002.

HARRIS, A. C.; ATKINSON, D. M.; AASE, D. M.; GEWIRTZ, J. C. Double dissociation in the neural substrates of acute opiate dependence as measured by withdrawal potentiated startle. **Neuroscience**. Oxford, v.139, p. 1201–1210, 2006.

HE, S.; LI, N.; GRASING, K. Long-term opiate effects on amphetamine-induced dopamine release in the nucleus accumbens core and conditioned place preference. **Pharmacol. Biochem. Behav.** Phoenix, v. 77, p.327–335, 2004.

HEYSER, C. J.; GOODWIN, G. A.; MOODY, C. A. Spear, L. P. Prenatal cocaine exposure attenuates cocaine induced odor preference in infant rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** Phoenix, v.42, p.169–173, 1992.

HUNSKAAR, S.; BERGE, O.G.; HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. **Behavioural Brain Research**. Amsterdam, v. 21, p.101-108, 1996.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**. Amsterdam, v. 14, p. 69-76, 1987.

HUNT, R.W.; TZIOUMI, D.; COLLINS, E.; JEFFERY, H.E. Adverse neurodevelopmental outcome of infants exposed to opiate in utero. **Early Hum Dev.** Amsterdam, v.84, p.29–35, 2008.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acidinduced writhing responses of mice. **Life Science**. Oxford , v.69, p. 2911-2919, 2001.

JACOBSON, C.D.; GORSKI, R.A. Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. **J Comp Neurol**. Philadelphia. v,196, p.519-29, 1981.

JAFFE, J.H.; MARIN, W.R. Opioid analgesics and antagonists In: GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York, Macmillan, p.491-531, 1985.

JONES, T.L.; SWEITZER, S.M.; WILSON, S.P.; YEOMANS, D.C. Afferent fiber-selective shift in opiate potency following targeted opioid receptor knockdown. **Pain**. Amsterdam, v.106, p. 365-371, 2003.

KAMMERER, N., LEMENAGER, T., GROSSHANS, M., KIEFER, F., HERMANN, D. Pregabalin for the reduction of opiate withdrawal symptoms. **Psychiatr. Prax.** v.39, p.351–352, 2012.

KANDEL, E. R; SCHWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. (Orgs.) Essentials in neural sciences and Behavior. Londres, UK: **Prentice Hall International**, Inc. 1995.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. S. (ed.) **Comprehensive textbook of psychiatry**. 6^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1995. 2169 p.

KHALSA, J.H.; TREISMAN, G.; MCCANCE-KATZ, E.; TEDALDI, E. Medical consequences of drug abuse and co-occurring infections: research at the National Institute on Drug Abuse. **Subst Abus**. Providence, v.29(3), p.5-16, 2008.

KILPATRICK, G.J.; SMITH, T.W. Morphine-6-glucuronide: actions and mechanisms. **Med Res Rev**. New York, v. 25, p. 521–44, 2005.

KLAUSZ, B.; PINTÉR, O.; SOBOR, M.; GYARMATI, Z.; FÜRST, Z.; TÍMÁR, J.; ZELENA, D. Changes in adaptability following perinatal morphine exposure in juvenile and adult rats. **European Journal of Pharmacology**. Amsterdam, v.654, p.166-72, 2011.

KOOB, G.F.; VOLKOW, N.D. Neurocircuitry of Addiction. **Neuropsychopharmacology**. New York, v.35, p. 217-238, 2010.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc**. Washington, v.18, p. 412-416, 1959.

KURAIISHI, Y.; HARADA, Y.; ARATANI, S.; SATOH, M.; TAKAGI, H. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal analgesic tests. **Brain Res**. Amsterdam, v.273 (2), p.245-52, 1983.

KYLE, P.M. Drugs and the fetus. **Curr Opin Obstet Gynecol**. Philadelphia, v.18, p.93–99, 2006.

LAIRD, J.M.; OLIVAR, T.; ROZA, C.; DE FELIPE, C.; HUNT, S.P.; CERVERO, F. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene. **Neuroscience**. Oxford, v. 98, p.345–52, 2000.

LAMEH J, BERTOZZI F, KELLY N, JACOBI P, NGUYEN D, BAJPAI A, GAUBERT G, OLSSON R, GARDELL L. Neuropeptide FF receptors have opposing modulatory effects on nociception. **J. Pharmacol Exp. Ther**. Baltimore, v.334 (1) p.244–254, 2010 <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.109.164384>.

LANG, L. J.; PIERER, M.; STEIN, C.; BAERWALD, C. Opioids in rheumatic diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**. New York, v. 1193, p.111–116, 2010.

LE BARS, D.; GOZARIUM, M; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**. Baltimore, v. 53, p. 597-652, 2001.

LE MERRER, J.; BECKER, J. A. J.; BEFORT, K.; KIEFFER, B. L. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. **Physiology Reviews**. Washington, v. 89, p.1379–1412, 2009.

LEE, Y.; LEE, C.H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Molecular and Cells**. Seoul, v. 20, n.3, p. 315-324, 2005.

LERI, F.; FLORES, J.; RAJABI, H.; STEWART, J. Effects of cocaine in rats exposed to heroin. **Neuropsychopharmacology**. New York, v.28, p.2102–2116, 2003.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**. Amsterdam, v.137, p. 473-477, 2008.

LIU, N.J.; VON GIZYCKI, H.; GINTZLER, A.R. Sexually dimorphic recruitment of spinal opioid analgesic pathways by the spinal application of morphine. **J Pharmacol Exp Ther**. Baltimore. v. 322, p.654-60, 2007.

LOTSCH, J. Opioid metabolites. **J Pain Symptom Manage**. Madison, v.29, p.10–24, 2005.

LOYD, D.R.; WANG, X.; MURPHY, A.Z. Sex differences in micro-opioid receptor expression in the rat midbrain periaqueductal gray are essential for eliciting sex differences in morphine analgesia. **J Neurosci**. Baltimore. v.28, p.14007-17, 2008.

LU, Y.; PIREC, V.; YEOMANS, D.C. Differential antinociceptive effects of spinal opioids on foot withdrawal responses evoked by C fibre or A delta nociceptor activation. **Br. J. Pharmacol**. London, v.121, p.1210–1216, 1997.

MCEWEN, B.S. Permanence of brain sex differences and structural plasticity of the adult brain. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.96, p.7128- 7130, 1999.

MALANGA, C. J.; KOSOFSKY, B. E. Does drug abuse beget drug abuse? Behavioral analysis of addiction liability in animal models of prenatal drug exposure. **Brain Res. Dev. Brain Res**. Amsterdam, v.147, p. 47–57, 2003.

MAMET, J.; BARON, A.; LAZDUNSKI, M.; VOILLEY, N. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acidsensing ion channels. **Journal of Neuroscience**. Baltimore, v. 22, n. 24, p. 10662-10670, 2002.

MANCHIKANTI, L.; SINGH, A. Therapeutic Opioids: A ten-year perspective on the complexities and complications of the escalating use, abuse, and nonmedical use of opioids. **Pain Physician, Opioid special issue**. Paducah, v. 11, p. 63-88, 2008.

MAO, J.; MAYER, D.J.; HAYES, R.L.; LU, J.; PRICE, D.D. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rat with painful peripheral mononeuropathy. **Brain Res**. Amsterdam, v.598, p.271–278, 1992.

MAO, J.; PRICE, D.D.; MAYER, D.J. Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. **Pain**. Amsterdam, v.62, p. 259–274, 1995.

MAO, J.; PRICE, D.D.; MAYER, D.J. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. **J. Neurosci**. Baltimore, v.14, p. 2301–2312, 1994.

MAO, J.; SUNG, B.; JI, R.R.; LIM, G. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. **J Neurosci**. Baltimore, v. 22, p.7650–7661, 2002.

MARCHIORO, M.; BLANK, M. de F.; MOURÃO, R.H.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive activity of the aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. **Fitoterapia**. Milano, v.76, p. 637-642, 2005.

MAREK, P.; BEN-ELIYAHU, S.; GOLD, M.; LIEBESKIND, J. C. Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. **Brain Res**. Amsterdam, v.547, p.77–81, 1991.

MARTINI, C.; OLOFSEN, E.; AARTS, L.; DAHAN, A. Pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling in acute and chronic pain: an overview of the recent literature. **Expert Rev. Clin. Pharmacol**. London, v. 4(6), p.719–728, 2011.

MAYER, S.; IZYDORCZYK, I.; REEH, P. W.; GRUBB, B. D. Bradykinin-induced nociceptor sensitisation to heat depends on cox-1 and cox-2 in isolated rat skin. **Pain**. Amsterdam, v.130, p.14–24, 2007.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**. New York, v.150, n. 699, p. 971-79, 1965.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthesist**. Berlin, v. 46, n. 2, p.142-153, 1997.

MEYMANDI, M.S.; SEPEHRI, G. Gabapentin action and interaction on the antinociceptive effect of morphine on visceral pain in mice. **Eur J Anaesthesiol**. Oxford, v.25, p.129–34, 2008.

MILANO, J. **Avaliação do potencial antinociceptivo de 5-trialometil-4,5-diidro-1H-pirazol metil ésteres inéditos em camundongos**. 2008. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

MINOZZI, S.; AMATO, L.; VECCHI, S.; DAVOLI, M. Maintenance agonist treatments for opiate dependent pregnant women. **Cochrane Database Syst Rev**. Oxford, v.16,n. 2, 2008.

MIRANDA, H.F.; PINARDI, G. Antinociception, tolerance, and physical dependence comparison between morphine and tramadol. **Pharmacol Biochem Behav.** Phoenix, v.61, p.357–60, 1998.

MITROVIC, I.; MARGETA-MITROVIC, M.; BADER, S.; STOFFEL, M.; JAN, L.Y.; BASBAUM, A.I. Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and alpha 2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Washington, v.100, p.271-6, 2003.

MURPHY, A.Z.; SUCKOW, S.K.; JOHNS, M.; TRAUB, R.J. Sex differences in the activation of the spinoparabrachial circuit by visceral pain. **Physiol Behav.** Oxford, v.97, p.205-12, 2009.

MYATT, L.; CUI, X. Oxidative stress in the placenta. **Histochem Cell Biol.** Berlin, v.122, p.369–382, 2004.

NANDI, R.; BEACHAM, D.; MIDDLETON, J.; KOLTZENBURG, M.; HOWARD, R.F.; FITZGERALD, M. The functional expression of mu opioid receptors on sensory neurons is developmentally regulated; morphine analgesia is less selective in the neonate. **Pain.** Amsterdam, v.111, p. 38–50, 2004.

NASIRAEI-MOGHADAM, S.; KAZEMINEZHAD, B.; DARGAHI, L.; AHMADIANI, A. Maternal oral consumption of Morphine Increases Bax/Bcl-2 Ratio and Caspase 3 Activity During Early Neural System Development in Rat Embryos. **J Mol Neurosci.** Boston, v.41, p.156-164, 2010.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? **Nature neuroscience.** New York, v. 8, n° 11, p. 1445-1449, 2005.

NESTLER, E.J. Historical review: molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. **Trends Pharmacol Sci.** Amsterdam, v.25, p.210-218, 2004.

OAKLANDER, A.L. Chronic pain. **ACP Medicine.** p.1-19. 2011. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5249/dor_cronica_%E2%80%93anne_louise_oaklander.htm>. Acesso em: 10 jun. 2012.

OBERLANDER, T.F.; GRUNAU; R.E.; WHITFIELD, M.F.; FITZGERALD, C.; PITFIELD, S.; SAUL, J.P. Biobehavioral pain responses in former extremely low birth weight infants at four months' corrected age. **Pediatrics.** Springfield, v.105, n. 1, p.1-10, 2000.

OHASHI-DOI, K.; GALE, J.D.; KUREBAYASHI, Y. Pregabalin inhibits accelerated defecation and decreased colonic nociceptive threshold in sensitized rats. **Eur J Pharmacol.** Amsterdam, v.643, p.107-12, 2010.

ORNOY, A. The impact of intrauterine exposure versus postnatal environment in neurodevelopmental toxicity: long-term neurobehavioral studies in children at risk for developmental disorders. **Toxicol Lett.** Amsterdam, v.140-141, p.171-181, 2003.

ORNOY, A.; MICHAILEVSKAYA, V.; LUKASHOV, I.; BAR-HAMBURGER, R.; HAREL, S. The developmental outcome of children born to heroin-dependent mothers, raised at home or adopted. **Child Abuse Negl.** Oxford, v.20, p. 385-396, 1996.

PALMEIRA, C.C.A; ASHMAWI, H.A e POSSO, I.P. Sexo e Percepção da Dor e Analgesia, Artigo de Revisão. **Rev Bras Anesthesiol.** v.61(6), p.814-828, 2011.

PAPAZISIS, G., TZACHANIS, D. Pregabalin's abuse potential: a mini review focusing on the pharmacological profile. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.** v 52, p.709–716, 2014.

PASSAGLI, M. **Toxicologia forense: teoria e prática.** 3ª ed. Campinas: Millennium Editora, 2011. 496 p.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C.J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat Rev Drug Discov.** London, v.8(1), p.55-68, 2009.

PETERS, M.A.; TURNBOW, M.; BUCHENAUER, D. The distribution of methadone in the nonpregnant, pregnant and fetal rat after acute methadone treatment. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** Baltimore. v.181, p.273-278, 1972.

PETROFF, E.Y.; PRICE, M.P.; SNITSAREV, V.; GONG, H.; KOROVKINA, V.; ABOUD, F.M.; WELSH, M.J. Acid-sensing ion channels interact with and inhibit BK K⁺ channels. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Washington, v.105(8), p.3140-4, 2008.

PIETROVSKI, E. F. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos das flores de *Combretum Leprosum* Mart.** 2004. 71 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **Eur J Pharmacol.** Amsterdam, v.429, p.79-91, 2001.

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. **Brain Res. Dev. Brain Res.** Amsterdam, v.108, p. 239–254, 1998.

RAHMAN, W.; BAUER, C.S.; BANNISTER, K.; VONSY, J.L.; DOLPHIN, A.C.; DICKENSON, A.H. Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive

effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. **Mol Pain**. London, v.5. n.45, p. 1-17, 2009.

RAHMAN, W.; DICKENSON, A.H. Development of spinal opioid systems. **Reg. Anesth. Pain Med**. Secaucus, v.24, p.383–385, 1999.

RAVNEFJORD, A.; BRUSBERG, M.; LARSSON, H.; LINDSTROM, E.; MARTINEZ, V. Effects of pregabalin on visceral pain responses and colonic compliance in rats. **Br J Pharmacol**. London, v.155, p.407-16, 2008.

REN, K.; HYLDEN, J.L.; WILLIAMS, G.M.; RUDA, M.A.; DUBNER, R. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. **Pain**. Amsterdam, v.50, p. 331-344, 1992.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**. Amsterdam, v. 387, p.111–118, 2000.

ROCHA, B. A.; MEAD, A. N.; KOSOFSKY, B. E. Increased vulnerability to self-administer cocaine in mice prenatally exposed to cocaine. **Psychopharmacology**. Berlin. v.163, p. 221–229, 2002.

ROMBERG, R.; OLOFSEN, E.; SARTON, E.; DEN HARTIG, J.; TASCHNER, P.E.; DAHAN, A. Pharmacokinetic–pharmacodynamic modeling of morphine-6-glucuronide-induced analgesia in healthy volunteers: absence of sex differences. **Anesthesiology**. Philadelphia, v.100, p.120–133, 2004.

ROMERO, A.; MIRANDA, H.F.; PUIG, M.M. Analysis of the opioid-opioid combinations according to the nociceptive stimulus in mice. **Pharmacol Res**. London, v.61, p.511-8, 2010.

RUDA, M.A.; LING, Q.D.; HOHMANN, A.G.; PENG, Y.B.; TACHIBANA, T. Altered nociceptive neuronal circuits after neonatal peripheral inflammation. **Science**. New York, v.289, p.628–631, 2000.

SAMUELSON, P.N. Current status of opioid used for anesthesia. **Anesth Analg**. Cleveland, v.70, p.131-6, 1991.

SANCHIS, C.; ARAGON, C.M. What we drink when we drink? The role of the acetaldehyde in the alcohol consumption. **Adicciones**. Palma de Mallorca, v.19, p. 5-11, 2007.

SARKAKI, A.; ASSAEI, R.; MOTAMEDI, F.; BADAVIDI, M.; PAJOUHI, N. Effect of parental morphine addiction on hippocampal long-term potentiation in rat's offspring. **Behav Brain Res**. Amsterdam, v.186, p.72–77, 2008.

SATYANARAYANA, P.S.; JAIN, N.K.; SINGH, A.; KULKARNI, S.K. Isobolographic analysis of interaction between cyclooxygenase inhibitors and tramadol in acetic acid-induced writhing in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. Oxford, v.28(4), p.641-9, 2004.

SCHWARTZ, N. B. A model for the regulation of ovulation in the rat. Em E. B. Astwood (Org.), Recent progress in hormones research – Proceeding of the 1968 **Laurentian hormones Conference**. Nova York, NJ: Academic Press, v. 25. 1969.

SENGUPTA, J.N. Visceral pain: the neurophysiological mechanism. **Handb Exp Pharmacol**. Berlin. v.194, p.31-74, 2009.

SHAH, N.S.; DONALD, A.G. Pharmacological effects and metabolic fate of levomethadone during postnatal development in rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** Baltimore, v.208, p.491-497, 1979.

SIMON, E.J.; HILLER, J.M. The opiate receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. Palo Alto. v.18, p.371-94, 1978.

SMITH, Y.R.; STOHLER, C.S. NICHOLS, T.E. BUELLER, J.A. KOEPPE, R.A. ZUBIETA, J.K. Pronociceptive and antinociceptive effects of estradiol through endogenous opioid neurotransmission in women. **J Neurosci**. Baltimore. v.26, p.5777-85, 2006.

SNYDER, S.H. The opiate receptor and morphine-like peptides in the brain. **Am J Psychiatry**. Arlington. v.135, p.645-52, 1978.

STEPANOVIC-PETROVIC, R.M.; TOMIC, M.A.; VUCKOVIC, S.M.; PARANOS, S.; UGRESIC, N.D.; PROSTRAN, M.S.; MILOVANOVIC, S.; BOSKOVIC B. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. **Anesth Analg**. Cleveland, v.106(6), p.1897-903, 2008.

SUBSTANCE ABUSE AND MENTAL HEALTH SERVICES ADMINISTRATION. **Treatment Episode Data Set (TEDS): 1995-2005**. National Admissions to Substance Abuse Treatment Services. Rockville: Office of Applied Studies. 2007. (Série DASIS, 37).

TADDIO, A.; KATZ, J.; ILERSICH, A.L.; KOREN, G. Effect of neonatal circumcision on pain response during subsequent routine vaccination. **Lancet**, London, v.349, p.599–603, 1997.

TAMAYO-SARVER, J.H.; DAWSON, N.V.; CYDULKA, R.K.; WIGTON, R.S.; BAKER, D.W. Variability in emergency physician decision making about prescribing opioid analgesics. **Ann Emerg Med**. Lansing, v.43(4), p.483–493, 2004.

TANGANELLI, S.; ANTONELLI, T.; MORARI, M.; BIANCHI, C.; BEANI, L. Glutamate antagonists prevent morphine withdrawal in mice and guinea pigs. **Neurosci. Lett.** Amsterdam, v.122, p.270-272, 1991.

TAO, P.L.; CHIEN, C.F.; HUANG, E.Y.K. Dextromethorphan attenuated the higher vulnerability to inflammatory thermal hyperalgesia caused by prenatal morphine exposure in rat offspring. **Journal of Biomedical Science.** Basel, v.18, p. 64, 2011.

TEMPEL, A.; HABAS, J.E.; PAREDES, W.; BARR, G. A. Morphine-induced down-regulation of μ -opioid receptors in neonatal rat brain. **Brain Res.** Amsterdam, v.469, n.1-2, p.129-33, 1988.

THE COLLEGE OF PHYSICIANS AND SURGEONS OF ONTARIO. Methadone maintenance guidelines [report on the Internet]. November 2005. Toronto, Ontario: The College of Physicians of Ontario. [cited 2006 Oct. 12]. Available at: <http://www.cpsso.on.ca/Publications/MethadoneGuideNov05.pdf>

THOMPSON, A.D; ANGELOTTI, T; NAG, S. Sex-specific modulation of spinal nociception by alpha-adrenoceptors: differential regulation by estrogen and testosterone. **Neuroscience.** v.153, p.1268-1277, 2008.

THORNTON, S.R.; SMITH, F.L. Long-term alterations in opiate antinociception resulting from infant fentanyl tolerance and dependence. **Eur. J. Pharmacol.** Amsterdam, v. 363, p.113–119, 1998.

THORNTON, S.R.; LOHMANN A.B; NICHOLSON R.A; SMITH, F.L. Fentanyl self-administration in juvenile rats that were tolerant and dependent to fentanyl as infant. **Pharmacol. Biochem. Behav.** Amsterdam, v. 65, p.563–570, 2000.

TIMAR, J.; SOBOR, M.; KIRALY, K.P.; GYARMATI, S.; RIBA, P.; AL-KHRASANI, M.; FURST, S. Peri, pre and postnatal morphine exposure: exposure-induced effects and sex differences in the behavioural consequences in rat offspring, **Behav. Pharmacol.** London, v.21, p. 58-68, 2010.

TISEO, P. J.; INTURRISI, C. E. Attenuation and reversal of morphine tolerance by the competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, LY 274614. **J. Pharmac. exp. Ther.** Baltimore v.264, p.1090-1096, 1993.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.** Amsterdam, v.51, p. 5–17, 1992.

TOMINAGA, M. Nociception and TRP channels. **Handb Exp Pharmacol.** Berlin, v.179, p.489-505, 2007.

TOUSIGNANT-LAFLAMME, Y; MARCHAND, S. Excitatory and inhibitory pain

mechanisms during the menstrual cycle in healthy women. **Pain**, v.146, p.47-55, 2009.

TRUJILLO, K.A.; AKIL, H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by de the NMDA receptor antagonist MK-801. **Science**. New York, v.251, p. 85-87, 1991.

TZSCHENTKE, T.M. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. **Prog Neurobiol**. New York, v.56, p.613–672, 1998.

UHART, M.; WAND, G.S. Stress, alcohol and drug interaction: an update of human research. **Addict Biol**. Abingdon, v.14, p.43-64, 2009.

VALVASSORI, S. S.; FREY, B. N.; MARTINS, M. R.; REUS, G. Z.; SCHIMIDTZ, F.; INACIO, C. G.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Sensitization and cross-sensitization after chronic treatment with methylphenidate in adolescent Wistar rats. **Behav. Pharmacol**. London, v.18, p.205–212, 2007.

VATHY, I.; SLAMBEROVA, R.; RIMANOCZY, A.; RILEY, M. A.; BAR, N. Autoradiographic evidence that prenatal morphine exposure sex-dependently alters mu-opioid receptor densities in brain regions that are involved in the control of drug abuse and other motivated behaviors. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. Oxford, v.27, p. 381–393, 2003.

VAZ, Z. R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofura, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociceptive in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. Baltimore, v. 278, p. 304-312, 1996.

VELA, G.; MARTIN, S.; GARCIA-GIL, L.; CRESPO, J. A.; RUIZ-GAYO, M.; FERNANDEZ-RUIZ, J.; , GARCIA-LECUMBERRI, C.; PELAPRAT, D.; FUENTES, J. A.; RAMOS, J. A.; AMBROSIO, E. Maternal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol facilitates morphine self-administration behavior and changes regional binding to central mu opioid receptors in adult offspring female rats. **Brain Res**. Amsterdam. v.807, p.101–109, 1998.

VITO, C.C.; FOX, T.O. Androgen and estrogen receptors in embryonic and neonatal rat brain. **Brain Res**. v.254, p.97-110, 1981.

VOILLEY, N.; de WEILLE, J.; MAMET, J.; LAZDUNSKI, M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **J Neurosci**. Baltimore, v.21(20), p.8026-33, 2001.

VOLKOW, N.; LI, T. The neuroscience of addiction. **Nature neuroscience**. New York, v. 8, n. 11, p. 1429-1430, 2005.

WAXMAN, S.G.; HAINS, B.C. Fire and phantoms after spinal cord injury: Na⁺ channels and central pain. **Trends Neurosci. Amsterdam**, v.29, p.207–15, 2006.

WIENECKE, T.; OLESEN J.; PETER S.; OTURAI B.; ASHINA, M. Prostacyclin (epoprostenol) induces headache in healthy subjects. **Pain**. Amsterdam, v.139(1), p.106-16, 2008.

WILCOX, G.L. Spinal mediators of nociceptive neurotransmission and hyperalgesia: relationships among synaptic plasticity, analgesic tolerance, and blood flow. **APS Journal**. New York, v.2, p.265-275. 1993.

WILSON G. S.; MCCREARY, R.; KEAN, J.; BAXTER, JC. The development of preschool children of heroin-addicted mothers: a controlled study. **Pediatrics**. Springfield, v.63, p. 135-141, 1979.

WOLFF, T.; SAMUELSSON, H.; HEDNER, T. Concentrations of morphine and morphine metabolites in CSF and plasma during continuous subcutaneous morphine administration in cancer pain patients. **Pain**. Amsterdam, v.68, p. 209-216, 1996.

XIE, Y.; HUO, F.; TANG, J. Cerebral cortex modulation of pain. **Acta Pharmacologica Sinica**. Beijing, v. 30, n.1, p.31–41, 2009.

YAKSH, T. L. Calcium Channels As Therapeutic Targets in Neuropathic Pain. **The Journal of Pain**. Philadelphia, v. 7, n.1, p.13-30, 2006.

YAKSH, T.L.; OZAKI, G.; MCCUMBER, D.; RATHBUN, M.; SVENSSON, C.; MALKMUS, S.; YAKSH, M.C. An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay. **J. Appl. Physiol**. Washington, v.90, p.2386–2402, 2001.

YAKSH, T.L. Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. **Acta Anaesthesiol Scand**. Aarhus, v.41, p.94-111, 1997.

ZHANG, G.H.; SWEITZER, S.M. Neonatal morphine enhances nociception and decreases analgesia in young rats. **Brain Res**. Amsterdam, v. 1199, p.82-90, 2008.

ZHANG, Y.; CHEN, Q.; YU, L.C. Morphine: a protective or destructive role in neurons? **Neuroscientist**. Baltimore, v.14, p. 561-570, 2008.

ZISSEN, M.H.; ZHANG, G.; KENDING, J.J.; SWEITZER, S.M. Acute and chronic morphine alters formalin pain in neonatal rats. **Neurosci Lett**. Amsterdam, v.400(1-2), p.154-7, 2006.

ZUBIETA, J.K.; SMITH, Y.R.; BUELLER, J.A.; XU, Y.; KILBOURN, M.R.; JEWETT, D.M.; MEYER, C.R.; KOEPPE, R.A.; STOHLER, C.S. Mu-opioid receptor-mediated

antinociceptive responses differ in men and women. **j. neurosci.** Baltimore. v.22, p.5100–5107, 2002.

ANEXO

ANEXO A

**PARECER BIO049-12**

Projeto: Uso da morfina no período gestacional e lactação: efeitos sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central, comportamento e nocicepção

Coordenador: Professora. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia

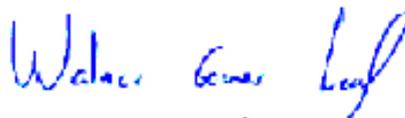
Área Temática: Farmácia

Vigência: 03/2011 a 03/2013

Nº no CEPAE-UFPA: BIO049-12

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 02 fevereiro de 2011



Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Presidente CEPAE-UFPA