



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Avenida Jovino Fernandes Sales, 2600, Santa Clara, Alfenas/MG.
CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1380. Fax: (35) 3299-1381



RAVENA CAROLINA DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO DE ANIMAIS ADULTOS
NASCIDOS A TERMO OU PRÉ-TERMO SUBMETIDOS A ESTÍMULO
PINPRICK NO PERÍODO NEONATAL**

ALFENAS/MG

2019

RAVENA CAROLINA DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO DE ANIMAIS ADULTOS
NASCIDOS A TERMO OU PRÉ-TERMO SUBMETIDOS A ESTÍMULO
PINPRICK NO PERÍODO NEONATAL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva.

Alfenas/MG
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Carvalho, Ravena Carolina de.
C331a Avaliação do limiar nociceptivo de animais adultos nascidos a termo ou pré-termo submetidos a estímulo *pinprick* no período neonatal. / Ravena Carolina de Carvalho. - Alfenas/MG, 2019.
88 f.: il. --
Orientador: Marcelo Lourenço da Silva.
Tese (Doutorado em Biociências aplicadas à Saúde) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Dor. 2. Triagem Neonatal. 3. Terapia Intensiva Neonatal. 4. Recém-Nascido Prematuro. 5. Prematuridade. I. Silva, Marcelo Lourenço da. II. Título.

CDD-612.88

RAVENA CAROLINA DE CARVALHO

"AVALIAÇÃO DO LIMAR NOCICEPTIVO DE ANIMAIS ADULTOS NASCIDOS A TERMO OU PRÉ-TERMO SUBMETIDOS A ESTIMULO PINPRICK NO PERÍODO NEONATAL."

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas . Área de concentração: Neurociências e Comportamento

Aprovado em: 29/03/2019

Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Priscila de Medeiros
Instituição: Universidade de São Paulo
– USP

Assinatura: Priscila de Medeiros

Profa. Dra. Profa. Dra. Luciana Maria dos Reis
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: Luciana Maria dos Reis

Prof. Dr. Marcos dos Santos de Almeida
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves
Instituição: Universidade Federal de Lavras-MG
-UFLA

Assinatura: Fernando Henrique Ferrari Alves

Alfenas, 2019

Dedico este trabalho aos meus pais,
Leila e José Murta, que acreditarem no
meu sonho e compreenderem as
minhas ausências em função dele.
Ao meu irmão, Rafael, minha
inspiração diária.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Lourenço Silva, não só por me orientar no desenvolvimento da tese na, mas por me orientar na vida. Agradeço por acreditar na minha proposta, me incentivar e motivar. A você, meu respeito e admiração.

A Professora Josie Resende Silva, uma amiga iluminada com a sensibilidade de perceber minhas inseguranças e ter sempre uma palavra reconfortante.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões para enriquecimento do conteúdo do trabalho.

A Michele, pelo trato e cuidado com os animais do biotério. Aos funcionários, Luiz Thomas, Luciana e Adriana, por me auxiliarem desde o mestrado.

As alunas de Iniciação Científica, Lara Prado e Naynne Rissardo, que compraram a ideia e assumiram o compromisso tanto no desenvolvimento do estudo quanto no cuidado com os animais. E também, a aluna Laura Pereira por toda a ajuda e disponibilidade, um verdadeiro presente.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo código de fomento 001.

A todos os mestres que tive o privilégio de encontrar em minha empreitada, desde a graduação, e que contribuíram para meu crescimento.

E principalmente a Deus, que esteve comigo em todos os momentos, me protegendo, me guiando e amparando nos momentos mais difíceis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Dor e neurodesenvolvimento.....	11
1.2	Prematuridade.....	16
1.3	Avaliação da dor neonatal.....	18
1.4	Manejo da dor neonatal.....	19
1.5	Consequências da exposição à dor no período neonatal.....	21
2.	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo Geral.....	30
3.2	Objetivos Específicos.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Animais.....	32
4.2	Determinação do ciclo estral	33
4.3	Cesárea.....	32
4.4	Técnica para adoção das proles.....	35
4.5	Hiperalgesia induzida por estímulo mecânico.....	35
4.6	Avaliação do comportamento materno.....	37
4.7	Peso da Ninhada	37
4.8	Testes nociceptivos.....	37
4.8.1	Limiar Nociceptivo Químico.....	38
4.8.2	Limiar Nociceptivo Mecânico.....	39
4.9	Análise estatística.....	40
5	RESULTADOS	41
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	68
	REFERENCIAS	69
	ANEXOS	79

LISTA DE ABREVIATURAS

CFA : *Adjuvante Completo de Freund*

TRPV1: Receptor potencial do tipo vanilóide 1

NMgR: Núcleo Magno da Rafe

RVM: Ventro Media Rostral

LC: Locus Ceruleus

NDR: Núcleo Da Raiz Dorsal

PAG: Substância Cinzenta Periaquedutal

GABA: Ácido Gama-Aminobutírico

5HT: Serotonina

NA: Noradrenalina

PND: Dia Pós Natal

RESUMO

Introdução. Os recém-nascidos, sob cuidados em terapia intensiva, são submetidos ao estresse da exposição a procedimentos nociceptivos nas primeiras semanas de vida sem qualquer analgesia. O período neonatal é crítico para o desenvolvimento de vias nociceptivas, sensoriais, emocionais e sociais; exposição a estímulos nocivos, nesse período, podem levar a alterações que permanecem por toda a vida.

Objetivos. Avaliar, na vida adulta, o limiar nociceptivo de animais pré-termo e a termo, machos e fêmeas, submetidos à procedimento doloroso no período neonatal.

Materiais e Métodos. Foram utilizados animais *Wistar* para acasalamento e obtenção das proles pré-termo (19 dias de prenhes) e a termo (21 dias de prenhes). As proles pré-termo nasceram por cesárea e, na sequência, entregues a lactantes adotivas. As proles a termo nasceram de parto natural e foram criadas pelas mães biológicas. Os filhotes foram submetidos ao *pinprick* do segundo (PND2) ao décimo quinto dia (PND15) de vida, período em que foi analisado o comportamento materno, tanto das mães adotivas (proles pré-termo) quanto das mães biológicas (proles a termo), e o peso da ninhada foi mensurado. Para avaliação do limiar nociceptivo na vida adulta, os animais foram submetidos aos testes da formalina (químico) e *von Frey* eletrônico precedido de *Adjuvante Completo de Freund (CFA)* (mecânico). A análise estatística foi através do teste *t Student* e *Two-way ANOVA* seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*.

Resultados. O comportamento materno e o peso da ninhada não foram alterados pelo estímulo *pinprick* durante o PND 2-15 tanto para as ninhadas pré-termo quanto para as nascidas a termo. No entanto, estímulo *pinprick* levou a redução no limiar de retirada da pata nos animais injetados com CFA, demonstrando maior sensibilidade a estímulos nociceptivo mecânicos, independente do gênero. Os animais adultos, machos e fêmeas, nascidos pré-termo, apresentam limiar nociceptivo mais baixo quando comparados aos nascidos a termo e, não parecem sensíveis ao teste da formalina. No teste de formalina, nos os animais a termo houve diferença entre os gêneros. Ratas são estaticamente mais sensíveis à formalina demonstrado por maior tempo de lambida tanto na fase inicial como na fase tardia.

Conclusão. Em conclusão, tanto uma estimulação nociceptiva precoce, com estímulo *pinprick*, quanto a prematuridade reduzem o limiar nociceptivo na vida adulta, de machos e fêmeas. Essa redução do limiar não é

influenciada por alteração no comportamento materno ou ganho de peso das ninhadas.

Palavras-chave: Dor. Triagem Neonatal. Terapia Intensiva Neonatal. Recém-Nascido Prematuro. Prematuridade.

ABSTRAT

Background and aims: Newborn infants are vulnerable to procedural stress and pain exposure on the first weeks of life that represents a critical period for the development of nociceptive, sensory, emotional, and social functions. We evaluated the nociceptive behavior of adult male and female rats that were submitted to nociceptive experience in the neonatal period and the maternal behavior in the postnatal period. **Methods:** The animals were submitted to repetitive needle pricking from the second to the fifteenth postnatal day (PND 2–15). Maternal behavior and litter weight were evaluated during this period. Mechanical sensitivity to pain was assessed in offsprings during the adulthood by exposing them to inflammatory stimuli, including formalin test or the Freund's complete adjuvant (CFA) injection followed by the electronic von Frey test at 0, 3, 6 and 24 h later. **Results:** Maternal behavior and litter weight were not altered by pinprick stimuli during PND 2–15 in both groups. Additionally, pinprick stimulation reduced the paw withdrawal threshold in CFA-injected animals compared to control in preterm and term offspring. In the formalin test, there was a difference between the genders in term offspring but preterm there wasn't difference. Female rats are statically more sensitive to formalin stimulation and showed an increased licking time in both the first and second phases and increased number of flinches in second phase. **Conclusions:** Experiencing early life repetitive pain exposure increased inflammatory pain sensitivity in adult offspring rats and female rats are more sensitive to chemical stimulation. Implications: **Future** investigations of the mechanisms involved in this effect may contribute to the improvement of the understanding of inflammatory pain sensitivity differences.

Keywords: Pain. Newborn. Neonatal Pain. Repetitive Pain. Rat Pups.

1 INTRODUÇÃO

A prematuridade apresentou um crescimento exponencial, mas últimas décadas, o desenvolvimento científico e tecnológico proporcionou uma maior qualidade de recursos na assistência à saúde permitindo que prematuros com idades gestacionais cada vez menores sobrevivam (OMS, 2018).

A sobrevivência de prematuros extremos leva a uma maior permanência nas unidades de terapia intensiva neonatal, onde são expostos diariamente a procedimentos dolorosos sem qualquer analgesia. A exposição contínua a estímulos nocivos pode levar a repercussões na vida adulta, ainda pouco conhecidas (BOISSE et al., 2005 ; HOHMANN et al., 2005).

Sendo assim, vamos investigar, não só o limiar nociceptivo, através de teste químico e mecânico, de animais machos e fêmeas adultos, que foram expostos a estímulo nocivo no período neonatal mas também a relação da prematuridade com o limiar nociceptivo do animal adulto.

1.1 Dor e neurodesenvolvimento

A dor é uma experiência desagradável e subjetiva acompanhada de uma lesão real ou potencial, que pode ser classificada de diferentes formas dependendo da intensidade, duração e comportamento da doença (IASP, 2014). Considerando a janela temporal e sua duração, a dor pode ser definida como aguda ou crônica (VERHAAK et al., 1998) e, alguns autores, sugerem um terceiro grupo classificado como dor subaguda (ANDERSEN et al., 2009; LIZIER et al., 2012).

A dor consiste na combinação de componentes sensoriais e emocionais, envolve um reconhecimento cortical do estímulo como desagradável. Para definir apenas o componente sensorial da dor é designado o termo nocicepção.

De fato, a nocicepção pode ser caracterizada por movimento reflexo em resposta a um estímulo nocivo, sem envolvimento cortical, ou seja, não ocorre

percepção consciente da dor. A estimulação nociva química, térmica ou mecânica de nociceptores (receptores sensoriais) periféricos faz com que a informação seja conduzida por fibras aferentes até o sistema nervoso central. Na medula espinhal, o estímulo é conduzido aos interneurônios que enviam sinal aos neurônios motores que desencadeiam a contração muscular, causando uma resposta motora longe do estímulo conforme figura 1 (LEE et al., 2005).

Em relação ao gênero, há diferença entre o limiar nociceptivo de machos e fêmeas, sobretudo sobre a influência hormonal de acordo com as fases do ciclo estral das fêmeas. Na fase estro, as fêmeas apresentam limiar nociceptivo reduzido, esta alteração de resposta pode ser atribuída às alterações morfofuncionais que ocorrem em regiões específicas do SNC, como, por exemplo, no hipotálamo. Além dos baixos níveis de hormônios ovarianos característicos dessa fase (JORGE, 2002).

No adulto, a percepção consciente da dor ocorre por vias e estruturas como receptores periféricos, vias aferentes conectadas à medula espinhal, feixes que conduzem a informação nociceptiva até ao tálamo (espino-talâmico) e na sequência até o córtex somatossensorial (tálamo-cortical) (GONÇALVES et al., 2010), como pode ser visto na figura 1.

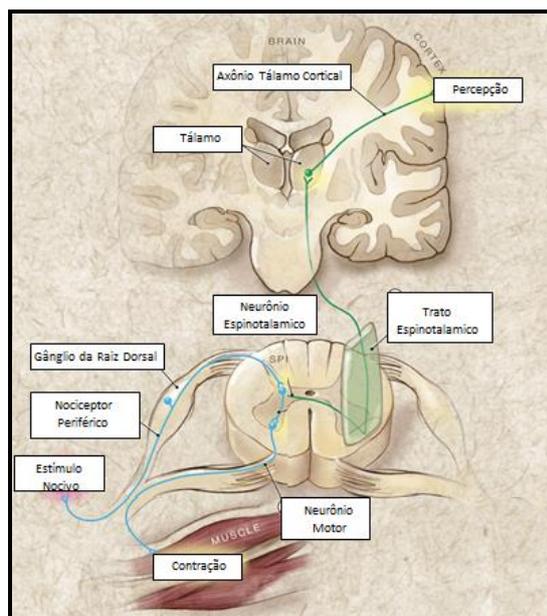


Figura 1- Nocicepção e percepção da dor

Fonte: modificado de Lee et al., 2005.

A estrutura e o mecanismo de percepção da dor em neonatos diferem do adulto por imaturidade do desenvolvimento do sistema somatossensorial. Do ponto de vista do neurodesenvolvimento, o estabelecimento de vias anatômicas relacionadas à nocicepção ocorre em idades gestacionais variáveis, não correspondendo, necessariamente, ao início de sua funcionalidade (GONÇALVES et al., 2010).

Tais vias anatômicas se desenvolvem a partir de determinada idade gestacional. Entre a sétima e vigésima semana gestacional ocorre o início do desenvolvimento das fibras do tipo C e tipo A δ . As fibras do tipo C são finas (0,4 a 1,2 mm de diâmetro), não mielinizadas, de condução lenta (0,5 a 2m/s) e responsáveis pela dor de longa duração e difusa. Já as fibras do tipo A δ são médias (2 a 6mm de diâmetro), pouco mielinizadas, de condução intermediária (2 a 30 m/s), responsável pela dor de curta duração e aguda. As fibras C atingem o corno posterior da medula espinal posteriormente às fibras A (BASBAUM et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010).

Outras importantes vias ascendentes tem seu desenvolvimento no período fetal, são as vias espino-talâmicas, que se desenvolvem entre a décima quarta e vigésima semana e as tálamo-corticais, que por sua vez, desenvolvem-se entre a décima sétima e vigésima semana (GONÇALVES et al., 2010).

Em uma idade gestacional precoce, já é possível detectar muitas das características das fibras nociceptivas do tipo C como, por exemplo, a expressão do receptor de neurotrofina TrkA (fibras C peptidérgicas), glicoproteína que se liga ao fator de crescimento do nervo, e a ligação seletiva de B4 (IB4) (fibras C não-peptidérgicas), utilizada para marcação do receptor purinérgico (FITZGERALD, 2005).

As fibras C podem ser classificadas, de acordo com seu conteúdo como peptidérgicas e não-peptidérgicas. As fibras C peptidérgicas sintetizam e liberam substância P e peptídeos relacionados à calcitonina, enquanto as fibras C não-peptidérgicas expressam o receptor purinérgico (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Além de expressar o receptor TrkA, as fibras C expressão o receptor de capsaicina, chamado de receptor de potencial transitório do tipo vanilóide 1

(TRPV1), que desempenha papel fundamental na detecção de estímulos térmicos e químicos dolorosos. A expressão do TRPV1 ocorre em porcentagem similar à expressão de neurônios sensoriais dos gânglios da raiz dorsal, tanto no primeiro dia pós-natal, como no adulto (FITZGERALD, 2005).

Antes mesmo de formarem contatos com seus futuros alvos periféricos ou centrais, os neurônios nociceptivos já são especificados, logo no início do desenvolvimento. Diferentes classes de neurônios sensoriais são gerados nos gânglios da raiz dorsal: primeiro surgem neurônios de maior diâmetro, e posteriormente, os neurônios de menor diâmetro (FITZGERALD, 2005).

Mecanismos de transdução nociceptiva são funcionais desde os primeiros dias de vida pós-natal, evidente por registros fisiológicos de nociceptores polimodais neonatais que revelam respostas a estímulos químicos, mecânicos e térmicos nocivos características de fibras C maduras (FITZGERALD, 2005).

Além das vias ascendentes para percepção da sensação dolorosa, existem também, as vias descendentes de modulação da dor. As vias descendentes provenientes do mesencéfalo exercem forte efeito modulador sobre a transmissão nociceptiva no corno posterior da medula espinal. A via moduladora engloba diversos núcleos incluindo o núcleo magno da rafe (NMgR), bulbo ventromedial rostral (RVM), núcleo magno reticular, além do locus ceruleus (LC). Estes núcleos recebem projeções provenientes da substância cinzenta periaquedutal (PAG) e/ou do núcleo dorsal da rafe (NDR). Essa via possui duas projeções descendentes diretas. Uma oriunda do NMgR e mediada por serotonina (5-HT), que inibe a descarga de neurônios espinotalâmicos. E outra via partindo do LC, dependente de noradrenalina (NA), que promove a inibição direta sobre a transmissão no corno dorsal da medula espinal. Ainda na medula, as duas vias agem através de interneurônios inibindo a nocicepção, esse processo é mediado principalmente por encefalinas, acetilcolina e ácido gama-aminobutírico (GABA), como demonstrado na figura 2 (BENARROCH, 2008).

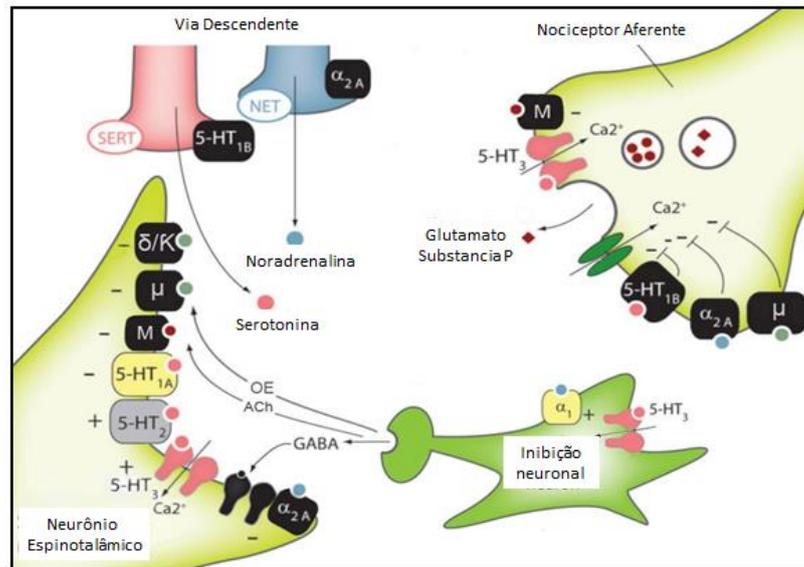


Figura 2- Receptores e neurotransmissores envolvidos na via descendente da modulação da dor

Fonte: modificado de Benarroch, 2008.

Nos primeiros dias após o nascimento, a via descendente responsável pela modulação da dor ainda está pouco desenvolvida. Em contrapartida, há o desenvolvimento de vias ascendentes, que leva a uma percepção da dor com maior intensidade comparada ao adulto. Isso pode ser, em parte, devido à deficiência de neurotransmissores 5-HT e NA, e também à maturação tardia dos interneurônios (FITZGERALD; BEGGS, 2001).

A via serotoninérgica tem sido considerada o sistema modulador primário da dor endógena. A 5-HT exerce efeito modulador complexo na transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinal. A ativação pós-sináptica de receptores de 5-HT exerce um efeito antinociceptivo através da excitabilidade dos neurônios espinotalâmicos e interneurônios excitatórios; enquanto a ativação pré-sináptica inibe a liberação de neurotransmissores aferentes primários. A via serotoninérgica também exerce efeito pró-nociceptivo. Já a NA inibe a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinal via receptores pré-sinápticos em terminações nociceptivas primárias, além de mediar a inibição pós-sináptica de neurônios espinotalâmicos (BENARROCH, 2008).

1.2 Prematuridade

É considerado prematuro, ou pré-termo, o nascimento que ocorre antes de 37 semanas de idade gestacional em humanos. A prematuridade é dividida em subcategorias de acordo com o número de semanas de nascimento, os recém-nascido com menos de 28 semanas é denominado pré-termo extremo; de 28 a 32 semanas, pré-termo; e de 32 a 37 semanas, pré-termo moderado a tardio (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018).

A prematuridade tem etiologia multifatorial variando entre atendimento assistencial inadequado, idade e escolaridade materna, tipo de parto, cuidado familiar deficiente e falta de acompanhamento especializado (RAMOS, CUMAN, 2009; OLIVEIRA et al., 2016).

Nos últimos 20 anos, a incidência do nascimento pré-termo (<37 semanas) tem aumentado globalmente, sendo considerada uma das principais causas da mortalidade infantil em países desenvolvidos, configurando um importante problema de saúde pública (OMS, 2018).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2015) estima-se que, ao ano, cerca de 15 milhões de crianças nascem prematuramente, sendo que o Brasil está entre os dez países com maior número de nascimento pré-termo. Os avanços científicos e tecnológicos, relacionados a assistência a saúde, aumentaram a sobrevivência de neonato pré-termo com idade gestacional cada vez menor e com melhor prognóstico. Essa população com nascimento pré-termo apresenta características ainda pouco conhecidas, o que desperta o interesse de diversos pesquisadores (ZOMIGNANI et al., 2009).

Em relação ao funcionamento do organismo do recém-nascido pré-termo, são encontradas características semelhantes as do feto no que envolve a maturação e organização neurocomportamental. Porém, fora do útero, o recém-nascido pré-termo se depara com um ambiente desprotegido e está sujeito a inúmeros estímulos nocivos. Sendo necessária intervenção externa para controle de temperatura, suprimento nutricional e regulação dos diversos sistemas corporais (GORZÍLIO, 2013).

Os estudos desenvolvidos para investigar as alterações presentes no recém-nascido pré-termo, envolvem desde a investigação do sistema respiratório, pouco desenvolvido, até a maturação das vias de condução e controle da dor (FRIEDRICH; CORSO; JONES, 2005; BUENO et al., 2014; LIMA; HERMONT; FRICHE, 2013). Até pouco tempo, acreditava-se que o neonato não sentia dor, o que era atribuído à imaturidade do sistema nervoso central e à ausência de memória para dor associada ao receio em relação aos efeitos colaterais da utilização de analgésicos e anestésicos (BUENO; KIMURA; DINIZ, 2009).

Nos anos 70, um recém-nascido pré-termo, sob cuidado de terapia intensiva era manipulado cerca de 130 vezes em um único dia. Já na década de 80, com a implantação da manipulação mínima, com manipulações monitoradas, controladas e em conjunto, esses recém-nascidos passaram a ser manipulados 60 vezes ao dia (GORZÍLIO, 2013).

Na primeira semana de vida estima-se que 134 procedimentos que envolvem dor são realizados nos recém-nascidos sejam eles prematuros ou a termo. Durante apenas um único dia um neonato pré-termo, sob cuidados em uma unidade de terapia intensiva, recebe cerca de 14 procedimentos dolorosos e a maioria deles sem qualquer analgesia. Somente a partir da década de 90 foi observada a importância da dor na abordagem do neonato (PINHEIRO et al., 2015).

Após anos de negligência, o estudo da dor neonatal evoluiu como uma importante área de pesquisa seja clínica ou experimental. Um forte comportamento de dor é evidenciado nos neonatos, no entanto um estudo sobre o desenvolvimento de vias nociceptivas mostra que a dor dessa população envolve vias de sinalização funcionais que não são encontradas no sistema nervoso maduro de indivíduos a termo (FITZGERALD, 2005).

A plasticidade cerebral no período neonatal (via descendente pouco desenvolvida) aumenta a vulnerabilidade em relação a experiências adversas (estresse ou instabilidade) precoces, o que pode gerar o desenvolvimento e comportamento distintos do que seria considerado fisiológico levando a ajustes necessários para a sobrevivência e adaptação imediatas, mas que podem ter um impacto significativo a longo prazo na aprendizagem, comportamento, saúde e longevidade (SHONKOFF et al., 2011). Entre as alterações no desenvolvimento

associado com a dor neonatal, estão a hiperalgesia (JOHNSTON & STEVENS, 1996), alterações na neurodesenvolvimento, aprendizagem e memória (SU et al., 2015), déficit de atenção e desordens de ansiedade (PERLMAN, 2001), modificação na memória e na função motora (HACK et al., 2002).

A incapacidade de verbalização associada à ausência de resposta específica à dor torna imprescindível a análise de parâmetros comportamentais e fisiológicos no neonato para identificação e compreensão da dor (BUENO et al., 2014).

1.3 Avaliação da dor neonatal

A ocorrência de dor leva a respostas comportamentais e fisiológicas que são tidas como indicadores válidos passíveis de serem inferidos por um observador.

Apesar de serem utilizados com frequência para avaliar a dor em neonatos, os comportamentos de reflexos de retirada e os movimentos faciais não representam necessariamente a percepção consciente da dor. Considerando que respostas como o reflexo de retirada tem característica não-cortical e pode ser apresentado, inclusive, por neonatos com anencefalia ou por indivíduos em estado vegetativo persistente que não apresentam função cortical (LEE et al., 2005).

Por outro lado, mecanismos compensatórios do sistema nervoso autônomo são ativados pela dor e produzem respostas fisiológicas como alterações das frequências cardíaca e respiratória, pressão arterial, saturação de oxigênio, vasoconstrição periférica, sudorese, dilatação de pupilas e aumento da liberação de catecolaminas e hormônios adrenocorticosteróides (SILVA et al., 2007).

Para mensuração da dor neonatal alguns indicadores fisiológicos e comportamentais são utilizados. Os indicadores comportamentais englobam a mímica facial, movimentos corporais e choro, enquanto os indicadores fisiológicos englobam a frequência cardíaca e respiratória, pressão arterial, saturação de oxigênio, tônus vagal, nível plasmático de cortisol e catecolaminas (MARTINS, 2014).

Diante dessas características apresentadas na presença de dor, além de avaliar dor por parâmetros fisiológicos na população neonatal, são propostas algumas escalas que consideram o choro, expressão facial, movimento de pernas e braços, agitação e/ou tônus.

Para recém-nascidos a termo, as escalas mais utilizadas são a Escala de Dor no Recém-Nascido e no Lactente (Neonatal Infant Pain Scale - NIPS) e o Sistema de Codificação da Atividade Facial Neonatal (Neonatal Facial Coding System - NFCS). Outras escalas, considerando a resposta comportamental também são utilizadas como a escala de dor neonatal, agitação e sedação (N-PASS); Escala de sedação CONFORT e Escore para a Avaliação da Dor Pós-Operatória do Recém-Nascido (CRIES). Para os recém-nascidos pré-termo é utilizado um sistema de pontuação de dor validado para essa população, a Escala Perfil de Dor do Prematuro (Premature Infant Pain Profile – PIPP) (SILVA et al., 2007; WITT et al., 2016).

É importante ressaltar que essas escalas são utilizadas no ambiente hospitalar e que não há validação ou escalas amplamente estudadas para avaliar a dor fora desse ambiente (WITT et al., 2016).

Existe ainda um software desenvolvido para reconhecimento das expressões faciais da dor em recém-nascidos. Embora não consiga definir a intensidade da dor, esse software detecta com precisão a ausência de dor (estado de repouso) e a presença de dor (realização de procedimentos dolorosos) em recém-nascidos a termo e pré-termo expostos à dor aguda (HEIDERICH et al., 2014).

Embora existam diversos métodos para avaliação da dor neonatal, é importante ressaltar que até o momento não existe uma técnica que seja amplamente aceita e de fácil aplicação que sirva em todas as situações.

1.4 Manejo da dor neonatal

O manejo inadequado da dor pode acarretar efeitos negativos sobre o desfecho do desenvolvimento neurológico. Ao ser identificada a presença de dor,

uma intervenção deve ser proposta seja ela não-farmacológica, farmacológica, ou ambas.

O neurodesenvolvimento pode ser afetado tanto pelo subtratamento da dor quando pelo uso excessivo de analgésicos e anestésicos. Embora, a partir da década de 80 a utilização de fármacos tenha se tornado mais segura para a população neonatal, muitos efeitos deletérios ainda são observados (MANCUSO et al., 2009).

Almejando realizar um manejo adequado da dor neonatal e ao mesmo tempo evitar possíveis efeitos deletérios da utilização farmacológica, são propostas diversas medidas, de caráter não-farmacológico, para o manejo da dor.

Os riscos e benefícios de medidas farmacológicas como o uso de opióides, de anestésico local e anti-inflamatório não hormonal (NEMERGUT et al., 2013) e não farmacológicas, como por exemplo o enrolamento, a contenção (MCNAIR et al., 2013), o uso de solução adocicada (SHEN et al., 2015; ALVES et al., 2011), da sucção não nutritiva (JOUNG e CHO, 2010) e a posição Canguru (LOTTO et al., 2018) para o alívio da dor devem ser considerados individualmente, dentro do contexto, do tipo e da severidade do estímulo doloroso. A escolha da analgesia farmacológica deverá ser baseada na condição clínica do recém-nascido, priorizando a eficácia, segurança e experiência da equipe no uso do fármaco de escolha.

O método canguru que consiste no contato pele a pele entre a mãe e o recém-nascido, tem se mostrado eficaz no controle da dor em procedimento como a punção do calcâneo e punção venosa. Ao colocar o recém-nascido na posição canguru por 30 minutos, permanecendo nessa posição durante e após o procedimento doloroso, observa-se alterações em indicadores de dor como choro do recém-nascido, mímica facial (fronte saliente, olhos apertados e o sulco nasolabial franzido) e frequência cardíaca, indicando controle da dor (LOTTO et al., 2018).

A administração de solução adocicada administrada dois minutos antes do procedimento doloroso tem se demonstrado eficaz no controle da dor em recém-nascidos. Tanto a sacarose (SHEN et al., 2015; ALVES et al., 2011) quanto a glicose

(ALVES et al., 2011) diluída em água (2 ml a 20%) pode reduzir a dor durante a punção do calcanhar.

A amamentação cinco minutos antes e durante procedimentos considerados dolorosos, como a coleta de sangue, pode reduzir a dor no recém-nascido. Confirmado por alteração nos valores da escala NIPS e latência e duração do choro durante a coleta de sangue (ZHU et al., 2015).

Além das medidas não-farmacológicas já consolidadas, diversas outras que propõem o controle da dor tem sido alvo de investigação como acupressão (TEKINDAL et al., 2015), vibração (BABA et al., 2010; MCGINNIS et al. 2016), aromaterapia (BELLINI et al., 2001; CIGNACCO et al., 2007) e musicoterapia (ZHU et al., 2015).

1.5 Consequências da exposição à dor no período neonatal

A estimulação nociceptiva neonatal leva a alterações persistentes na estrutura e função somatossensoriais, além de afetar sua ativação até a idade adulta (BOISSE et al., 2005 ; HOHMANN et al., 2005). Essa mudança diferencial na idade adulta depende dos estímulos nociceptivos aplicados durante o período sensível.

Em humanos, estimulação nociceptiva repetida durante a infância provoca alterações no processamento sensorial e nociceptivo que perdura por muitos meses ou anos após a lesão (TADDIO et al., 1997 ; HERMANN et al., 2006 ; BEGGS et al., 2012 ; JONES et al., 2017) .

Enquanto em estudos desenvolvidos em ratos, a nível medular, é possível observar alterações do processamento nociceptivo (RIRIE et al., 2008), alterações nos circuitos do corno dorsal da medula (BEGGS et al., 2002) e alteração da expressão gênica (REN et al., 2005 ; van den HOOGEN et al., 2018b). Já a nível cerebral ocorrem mudanças duradouras na função cerebral, como exploração e motivação (LOW; FITZGERALD, 2012), memória (NUSEIR et al., 2017) e na estrutura cerebral, como aumento da atividade glial em áreas corticais que

processam comportamentos de dor (SANADA et al., 2014), tais alterações também foram descritas em ratos adultos após experiência nociceptiva no início da vida.

Do ponto de vista translacional, uma maior sensibilidade nociceptiva a estímulos nocivos repetidos é observada nos recém-nascidos pré-termo quando comparado àqueles nascidos a termo. Vários meses após serem submetidos a procedimentos dolorosos os prematuros apresentam redução no limiar nociceptivo, não só no local da lesão prévia, mas também nas áreas adjacentes. E ainda pode-se observar uma alteração persistente na estrutura e função somatossensorial e ativação ascendente excessiva na vida adulta. Tais alterações estão diretamente relacionadas ao tipo de estímulo nocivo (térmico, mecânico ou químico) ao qual foi submetido no período neonatal (LAPRAIRIE; MURPHY, 2010).

As repercussões na vida adulta dependem do período sensível em que o estímulo nocivo foi aplicado, quando a lesão ocorre mais precocemente, na primeira semana de vida, há uma tendência ao desenvolvimento de hiperalgesia na vida adulta, o que não ocorre quando o estímulo é mais tardio (14 dias) (LAPRAIRIE; MURPHY, 2009).

Em estudo com experimentação animal, foi demonstrado que as conexões anatômicas para modulação nociceptiva estão presentes desde o nascimento, porém os controles inibitórios descendentes são funcionalmente imaturos. Uma maturação tardia da via descendente pode levar ao aumento da vulnerabilidade do sistema somatossensorial imaturo à estimulação nociva neonatal. A exposição a estímulos nocivos no início da vida pode resultar em aumento da condução nociceptiva e consequente ativação de circuitos inibidores endógenos, que se mantêm na vida adulta. Esse aumento significativo na liberação de peptídeo opióide endógeno na vida adulta poderia levar a hipoalgesia (LAPRAIRIE; MURPHY, 2010).

Por outro lado, a ocorrência de hiperalgesia em animais adultos, que foram expostos a estímulo nociceptivo no período neonatal já foi demonstrada anteriormente (KNAEPEN et al., 2012).

O estímulo nociceptivo no início da vida leva ao aumento da atividade de células gliais em locais específicos do córtex cerebral. No córtex somatossensorial, motor, pré-frontal, insular e cingulado ocorre maior atividade astrocitária persistente

até a vida adulta. A estimulação nociva repetida no neonato leva a maior sensibilidade nociceptiva ao teste do limiar de retirada da pata no adulto bem como a alterações no padrão da marcha. Ou seja, a maior ativação de células gliais por estimulação nociceptiva no período neonatal leva a alterações motoras e sensoriais no adulto (SANADA et al., 2014).

As experiências sensoriais durante o desenvolvimento desempenham um papel crítico no refinamento de conexões corticais. A dor no período neonatal altera diferentes áreas do encéfalo, incluindo o tronco cerebral, o hipocampo, os córtex frontal, parietal, sensorial e motor permanentes até a vida adulta (SANADA et al., 2014).

Após uma lesão tecidual, ocorre sensibilização periférica, ou seja, uma série de respostas são imediatamente desencadeadas pelo organismo através da liberação de substâncias químicas, tais como a bradicinina, prostaglandinas, substância P, íon potássio, ácido láctico, íons hidrogênio, ATP, óxido nítrico, citocinas, fator de crescimento neural, serotonina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, histamina, entre outras. Estas substâncias interagem com elementos celulares envolvidos na inflamação, como, por exemplo, os neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos, fibroblastos, células de Schwann, entre outras, atraindo-os ou ativando-os, o que resulta em vasodilatação e instalação de processo inflamatório de origem neurogênica (SEDIVÉC, 1983). Estes eventos e mecanismos descritos acima acarretam em alterações neuroplásticas periféricas e centrais (COLLOCA et al., 2017).

De fato, a sensibilização é um fenômeno do sistema nervoso que pode ocorrer em conjunto com a dor. Quando ocorre a sensibilização, a informação nociceptiva, normalmente inócua, é percebida como dolorosa devido ao aumento da nocicepção (DRAY, 1995; ARENDT-NIELSEN et al., 2018). Quando a sensibilização está presente, o limiar necessário para ativar os nociceptores é reduzido, levando a uma maior transmissão e percepção da dor. Além da diminuição dos limiares nociceptivos, o aumento da percepção da dor também pode resultar da ativação prolongada de receptores, assim como da ativação de receptores polimodais. Essa intensificação da informação nociceptiva resulta na percepção da dor durante

atividades ou movimentos que normalmente não seriam dolorosos, sendo chamada de sensibilização periférica (STAUD, 2010).

Na maioria dos casos, esta é uma resposta normal à lesão como um mecanismo para proteger o tecido lesionado de danos adicionais. A sensibilização periférica indica que a expansão da nocicepção ocorre em tecidos inervados pelo sistema nervoso periférico. Com a sensibilização periférica prolongada, as alterações do sistema nervoso central também podem ocorrer e resultar em sensibilização central (WOLF, 2011). A sensibilização central refere-se a limiares neurais alterados na medula espinal, assim como em nível do córtex. A hipótese é de que a sensibilização central é um provável mecanismo para o desenvolvimento de síndromes de dor crônica (ARENDRT-NIELSEN et al., 2015).

De fato, quanto à localização das alterações dos limiares nociceptivos, há diferenças entre a sensibilização periférica e central. Tanto a sensibilização periférica quanto a central são ativadas por meio das alterações e mudanças na percepção e na intensidade da dor. Quando a sensibilização está presente, o limiar nociceptivo é reduzido de tal forma que um estímulo de menor intensidade é doloroso, que é definida como alodinia (dor em resposta a um estímulo anteriormente não doloroso). Quando a sensibilização ocorre, a mesma intensidade de estímulo resulta em maiores níveis de dor, fenômeno definido como hiperalgesia (dor desproporcionalmente alta em comparação com o nível de estímulo) (JENSEN; FINNERUP, 2014).

De maneira semelhante à sensibilização periférica, o aumento da liberação dessas substâncias químicas na sinapse entre as fibras periféricas e os neurônios do subnúcleo caudal, ou do corno dorsal da medula espinal, podem ocasionar um aumento na excitabilidade, no campo receptivo e na atividade espontânea desses neurônios, levando ao processo chamado de sensibilização central (SESSLE, 1995; ARENDRT-NIELSEN et al., 2017).

A IASP (Internatinal Association for Study of Pain) define sensibilização central como “aumento da responsividade dos neurônios nociceptivos no sistema nervoso central à sua entrada aferente normal ou sub-limiar”. Este termo descreve um estado induzido de hipersensibilidade espinal, impulsionado pela entrada de fibra C após ativação por sinais nociceptivos periféricos persistentes. Uma vez

estabelecida a hiperativação das vias e mecanismos intra-espinais, a sensibilização central aumenta todas as respostas neuronais, inclusive, ocorrendo a ativação em baixos limiares, sinais que normalmente gera sensações não dolorosas (WOOLF, 2011; BARON et al., 2013).

A ativação persistente e repetitiva das fibras C aferentes, em particular as fibras C nociceptivas sensíveis à capsaicina, fazem sinápsse no corno dorsal da medula espinal, e resulta em potenciação heterossináptica, através dos quais, os sinais aferentes resultantes da ativação não apenas de fibras C nociceptivas, mas também da ativação de fibras A β e A δ , são amplificados (WOOLF, 2011; BARON et al., 2013). Na patogênese da sensibilização central, os nervos periféricos geralmente funcionam normalmente, mas mudanças na função ocorrem nos neurônios centrais. Esses neurônios espinais hipersensibilizados tiveram seus limiares de disparo reduzidos, e conseqüentemente, há aumento do tamanho dos campos receptivos e ativação independente do estímulo, assim como maior intensidade de respostas induzidas em comparação com neurônios centrais saudáveis (BARON et al., 2013). Esse processo, na verdade, facilita os sinais ou potenciais de ação normalmente sublimar das fibras aferentes A β e A δ , elevando-os para potenciais de ação supra máximos, levando à ativação dos circuitos neurais centrais.

Devido à convergência de circuitos neurais e à integração de campos maiores em nível espinal, a hipersensibilidade associada à sensibilização central pode se estender a áreas distantes do estímulo da fibra C, potencialmente contribuindo para a disseminação dos sintomas (BARON et al., 2013). Projeções ascendentes e descendentes para o cérebro integram esses mecanismos espinais com maior função do SNC, o que pode modular ainda mais a sensibilização central, resultando na ativação de mecanismos de facilitação direta e/ou indireta (por inibição diminuída) da transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinal. Como os processos centrais descendentes tendem a serem mais difusos, bilaterais e não segmentares do que os circuitos espinais sensibilizados, a facilitação aferente descendente associada à sensibilização central pode, portanto, conferir efeitos mais difundidos que ocorrem em conjunção com mudanças contínuas no nível da coluna vertebral (BARON et al., 2013).

No nível celular e molecular, múltiplos fatores parecem estar envolvidos no desenvolvimento da sensibilização central, embora nossa compreensão desses mecanismos fisiopatológicos seja limitada e continue a evoluir. O desenvolvimento da sensibilização central geralmente reflete uma transição da dor aguda para a crônica, através de mecanismos que envolvem a plasticidade neural, similar aos mecanismos mais bem estabelecidos de potencialização de longo prazo (LTP) ou mesmo de memória, e foi amplamente revisado na literatura científica (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009; KUNER, 2010; MIFFIN; KERR, 2014; KANDASAMY; PRICE, 2015).

O recrutamento e a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) no corno dorsal da medula espinal parecem ser um dos principais mediadores da sensibilização central (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009; MIFFIN; KERR, 2014). Os receptores NMDA respondem diretamente ao glutamato, o neurotransmissor excitatório primário envolvido na nocicepção, mas também são indiretamente estimulados pela substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que são liberados dos terminais nervosos sensoriais na medula espinal em resposta a estimulação periférica (KUNER, 2010; MIFFIN; KERR, 2014). Fatores neurotróficos, como o fator de crescimento nervoso (NGF) (MIZUMURA; MURASE, 2015) e o BDNF em particular, desempenham papel importante no desencadeamento e manutenção da sensibilização central por meio de interações com projeções aferentes espinais primárias e secundárias e células microgliais no corno dorsal da medula espinal (BEGGS et al., 2012; SMITH, 2014) e gânglio da raiz dorsal (MIFFIN; KERR, 2014). Recentemente, há evidências do papel proeminente das células da glia na fisiopatologia da sensibilização central (BEGGS et al., 2012; OLD et al., 2015).

A sensibilização depende da atuação dos aminoácidos (ácido glutâmico, ácido aspártico) e das taquicininas (SP). Os receptores AMPA (ativados pelo ácido 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasole-propiónico) e os cainato são acionados imediatamente após a liberação de aminoácidos excitatórios e estão envolvidos no mecanismo de localização têmica-espaial e na quantificação da dor (COLLINGRIDGE & SINGER, 1990). Os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), ativados por aminoácidos e modulados por neuropeptídeos (SP) atuam centenas de milisegundos após a chegada do estímulo. Os receptores de neurocininas ativados

pelas neurocininas estão relacionados com o mecanismo da sensibilização dos neurônios da medula espinhal (dor crônica) e com a modulação da nocicepção.

Estímulos leves e moderados liberam pequena quantidade de ácido glutâmico e de SP que despolarizam a membrana neuronal e geram sensação dolorosa momentânea. Estímulos intensos e prolongados resultam em deslocamento dos íons Mg^{++} dos receptores NMDA e em penetração de íons Ca^{++} para o interior do citoplasma. Os íons Ca^{++} extracelulares somam-se aos das reservas intracelulares e ativam sistemas enzimáticos que sintetizam segundos mensageiros, incluindo o AMPcíclico que causa fosforilação das membranas neuronais que se tornam hiperexcitáveis e neurotransmissores retrógrados (óxido nítrico, prostaglandinas) que, do interior dos neurônios escoam-se para o interstício e acarretam liberação de maior quantidade de neurotransmissores excitatórios dos aferentes primários ou creatinofosfocinase (PKC), que modifica a expressão genética (pró-oncogens), resultando na síntese de RNA mensageiro que induz a produção de receptores excitatórios que se adaptam à superfície neural (regulação ascendente) (LUND et al, 2002).

A sensibilização dos neurônios do corno posterior da substância cinzenta da medula espinhal (CPME), a ativação das sinapses inativas e o reforço das sinapses fracas de colaterais de aferentes primários que veiculam informações das áreas vizinhas ou distantes daquelas em que a dor foi originalmente induzida são, entre outras, as causas da hiperalgesia mecânica secundária, da alodínea e da dor referida e difusa, associadas à injúria tecidual ou à inflamação de tecidos profundos (HU, et al, 1994; TEIXEIRA, 2000). O reconhecimento da complexidade do problema é o primeiro passo para auxiliar os pacientes.

Sendo assim, propomos as seguintes hipóteses: a) proles, nascidas a termo, expostas a estímulo nocivo (pinprick) no início da vida apresentam limiar nociceptivo reduzido quando atingem a idade adulta ao serem avaliados pelo teste de von Frey eletrônico e teste da Formalina; b) proles, nascidas pré-termo, expostas a estímulo nocivo (pinprick) no início da vida apresentam limiar nociceptivo reduzido quando atingem a idade adulta ao serem avaliados pelo teste de von Frey eletrônico e teste da Formalina, além de apresentarem um limiar basal mais baixo comparado a proles nascidas a termo; c) mães de proles nascidas a termo, bem como mães adotivas de

proles pré-termo, não apresentam alteração de comportamento materno quando seus filhotes são expostos a estímulo nocivo (pinprick) no início da vida; e d) proles, nascidas a termo ou pré-termo, não tem alteração no ganho de peso corporal quando exposta a estímulo nocivo (pinprick) no início da vida.

Diante do exposto, é de suma importância a investigação das respostas apresentadas por animais adultos, que receberam estímulos nociceptivos repetidos durante o período neonatal, seja pré-termo ou a termo. Desta maneira, em nosso avaliamos o limiar nociceptivo, pelos testes de *von Frey* eletrônico e Formalina, de animais adultos, fêmeas e machos, que foram expostos a estímulo nocivo no período neonatal.

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de estudos experimentais é de grande importância para um melhor entendimento da dor em recém-nascidos e seus reflexos na vida adulta. Estímulos nocivos que são claramente dolorosos em seres humanos também aumentam a percepção nociceptiva em modelos animais. Faz-se necessário investigar possíveis alterações na percepção nociceptiva de animais adultos que tiveram um nascimento pré-termo e foram expostos a estímulos nocivos no período neonatal.

A ocorrência de nocicepção no período pós-natal de animais pré-termo pode alterar a sensibilidade nociceptiva na idade adulta. No entanto, não existem dados na literatura correlacionando a prematuridade, em associação, a exposição a estímulos nocivos no período neonatal e possíveis alterações nociceptivas na vida adulta. A condução do estudo em animais com idade adulta, faz-se necessária, uma vez que não existem estudos correlacionando prematuridade e resposta nociceptiva em animais adultos. Além disso, a utilização de filhotes, machos e fêmeas, se justifica para verificar a ocorrência de diferenças desta correlação entre os sexos, bem como animais cujo nascimento foi a termo para possível comparação com os pré-termo.

Espera-se que os animais prematuros ou não que foram expostos a experiências nociva no período neonatal tenham um menor limiar de dor. Sendo que é esperado ainda que os pré-termo apresentem um limiar ainda menor quando comparados com os nascidos a termo. E que a partir desses resultados seja verificado a importância do cuidado e manejo da dor durante o período neonatal para possível prevenção de alterações nociceptivas na vida adulta.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o limiar nociceptivo em ratos, machos e fêmeas, nascidos prematuros ou a termo, submetidos a procedimento doloroso no período neonatal.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são os listados a seguir:

- a) Avaliar o efeito do estímulo nocivo na prole pré-termo sobre o comportamento materno de ratas lactantes adotivas;
- b) Avaliar o efeito do estímulo nocivo na prole a termo sobre o comportamento materno de ratas lactantes biológicas;
- c) Avaliar a influência da adoção de proles pré-termo sobre o comportamento materno de ratas lactantes adotivas;
- d) Avaliar a influência efeito do estímulo nocivo no período neonatal sobre o ganho de peso em proles pré-termo;
- e) Avaliar a influência efeito do estímulo nocivo no período neonatal sobre o ganho de peso em proles a termo;
- f) Avaliar a influência de estímulos nocivo, no período neonatal, em ratos machos e fêmeas, pré-termo, sobre limiar nociceptivo no teste de formalina na idade adulta;
- g) Avaliar a influência de estímulos nocivo, no período neonatal, em ratos machos e fêmeas, a termo, sobre limiar nociceptivo no teste de formalina na idade adulta;
- h) Avaliar a influência dos estímulos nocivo, no período neonatal, em ratos machos e fêmeas, pré-termo, sobre o limiar nociceptivo no teste de von Frey após desafio inflamatório na idade adulta;

- i) Avaliar a influência dos estímulos nocivo, no período neonatal, em ratos machos e fêmeas, a termo, sobre o limiar nociceptivo no teste de von Frey após desafio inflamatório na idade adulta.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* adultos (aproximadamente 8 semanas de idade) de ambos os sexos, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas-MG. Os animais foram acondicionados em caixas acrílicas em um ambiente com temperatura controlada (22°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Comida e água foram oferecidas *ad libitum*.

Para obtenção da prole os animais foram alojados em uma relação de 2 fêmeas para cada macho para experiência sexual e acasalamento. O dia do parto foi considerado como dia pós-natal 0 (PND 0). No PND1, as proles foram padronizadas com 8 filhotes (4 machos e 4 fêmeas). No período entre PND2 e PND15 os filhotes do grupo experimental (PP) receberam o estímulo por *pinprick* e o grupo controle foi manipulado por tempo similar. Durante esse período, o comportamento materno foi avaliado bem como o peso das proles. Após o desmame no PND 22, os filhotes foram separados por sexo em 4 animais por gaiola até a idade adulta (PND60), quando foram realizados os testes nociceptivos (teste da formalina e *von frey* eletrônico).

Foi utilizado um grupo de filhotes nascidos a termo (21 dias de prenhes) e um grupo cujo nascimento foi pré-termo. Para obtenção dos filhotes pré-termo, as ratas prenhes, ao completarem 19 dias de prenhes, dois a três dias antes do esperado para o nascimento, pré-termo segundo AYAR (2002), foram anestesiadas e submetidas a cirurgia cesárea para nascimento pré-termo dos animais.

Os experimentos seguiram as normas técnicas de experimentação animal após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas-MG, protocolo 48/2016 (ANEXO 1). Foi feito o possível para minimizar o número de animais utilizados.

4.2 Determinação do ciclo estral

O ciclo estral de ratas é determinado pelo tipo de célula encontrado no esfregaço vaginal, tem duração média de quatro ou cinco dias e é caracterizado por quatro fases, proestro, estro, metaestro e diestro.

O proestro é a fase em que ocorre o pico de hormônios luteinizantes, progesterona e estradiol (TANNO et al., 2002). O estro é a fase em que a fêmea está receptiva ao macho, caracterizada por intensa queratinização e descamação vaginal. O metaestro e diestro são fases não férteis caracterizadas pela presença predominante de leucócitos (MARCONDES et al., 2002).

Sendo que diestro apresenta menores níveis de progesterona (TANNO et al., 2002) e estrogênio (VILELA et al., 2007).

A técnica empregada para determinação do ciclo estral foi a do esfregaço vaginal. Consistiu na introdução de solução salina (0,9%) na abertura vaginal da rata utilizando um conta-gotas e uma pipeta de 10µl, na sequência a solução salina foi retirada da abertura vaginal e espalhada sobre uma lâmina para a identificação do tipo celular predominante. Logo após o esfregaço, foi feita a visualização microscópica para identificação da fase do ciclo estral (MARCONDES et al., 2002).

A técnica do esfregaço vaginal foi utilizada em dois momentos ao longo do experimento, para identificar com exatidão a data de prenhes e para identificar o ciclo estral das fêmeas submetidas aos testes de limiar nociceptivo.

4.3 Cesárea

Para realização do parto pré-termo, foi realizada uma cirurgia cesárea. Para esse procedimento, as fêmeas prenhes, foram anestesiadas com isoflurano 2% por cone nasal ao completarem 19 dias de prenhes para realização da retirada dos filhotes (SU et al., 2015; CELIK; AYAR, 2002; KLAWITTER et al., 2007). A figura 3 demonstra o local de realização da cesárea e do cuidado pós-natal da prole.

Após anestesia, foi realizado um corte de três centímetros na linha média no abdômen inferior, em seguida foi realizado um corte longitudinal de dois centímetros.

A partir desses cortes foi realizada uma incisão ao longo da fronteira antimesentérica na porção média de cada trompa uterina. Os filhotes e placenta foram extraídos suavemente através da histerectomia (BOWERS et al., 2001; WANG et al., 2010). Na sequência, o cordão umbilical foi cortado logo abaixo da placenta, e os filhotes foram lavados em água à 28 °C, retirando qualquer resquício de sangue, e secos para serem entregues as mães de adotivas (de aluguel). Esse procedimento de adoção foi utilizado para evitar que a mãe operada apresentasse comportamento inadequado devido ao procedimento cirúrgico e eventual dor, influenciando no comportamento adulto do filhote. Para evitar o canibalismo por parte da mãe adotiva, fez-se necessária a realização do banho para limpeza dos filhotes (Figura 4).. Inicialmente a prole adotiva foi misturada à prole biológica, quando constatado a adoção efetiva, a prole biológica foi eutanasiada (APPLEBY; TOWNER, 2001).



Figura 3- Campo para realização da cesárea e cuidado com a prole pré-termo no pós-parto.
Fonte: Autora.



Figura 4- Demonstração do local onde foram realizados os cortes para cesárea e prole pré-termo.

Fonte: Autora.

4.4 Técnica para adoção das proles

Toda a prole nascida por cesáreas foi entregue a mãe adotiva no primeiro dia após o nascimento. Durante este procedimento, as mães foram removidas de suas caixas por um curto período de tempo (BARROS et al., 2006).

A prole pré-termo foi colocada na caixa da mãe adotiva, fora do ninho. A adoção era confirmada quando a mãe adotiva levava os filhotes pré-termo para dentro do ninho onde estava sua prole biológica nascida a termo no mesmo dia de nascimento da prole pré-termo (adotiva). No dia da padronização da ninhada (PND1) a prole biológica foi eutanasiada.

4.5 Nociceção induzida por estímulo mecânico

O estímulo nociceptivo no período neonatal foi induzido por estímulo mecânico realizado por meio do método *pinprick*, que consistiu em induzir a dor através de uma alfinetada na pele com objeto não penetrante a partir do segundo dia pós-natal (PND2) ao décimo quinto dia pós-natal (PND15). A ponta de uma agulha 22G de anestesia espinal foi aplicada na região central plantar da pata com força suficiente para recuar a pele, mas não perfurá-la (Figura 5). Este modelo foi aplicado por cinco repetições separadas por pelo menos 10 segundos, o que foi repetido

após dois minutos, perfazendo um total de 10 toques (TAL; BENNETT, 1994; HOGAN et al., 2004).



Figura 5- Posicionamento do filhote para aplicação do *pinprick*.

Fonte: Autora.

4.6 Avaliação do comportamento materno

As observações dos comportamentos maternos foram feitas do segundo dia pós-natal (PND2) ao décimo quinto dia pós-natal (PND15) no período da manhã, às 8:00 horas, sempre antes dos filhotes serem submetidos ao *pinprick* e, no período da tarde, às 15:00 horas, período após o *pinprick*. O comportamento materno também foi avaliado para as proles de filhotes do grupo controle. A análise consistiu em observar e registrar as seguintes manifestações: 1) posição de cifose; 2) posição passiva; 3) sobre a ninhada; 4) lambendo os filhotes; 5) *self-grooming* maternal (estimulação das mamas através de auto-limpeza); 6) *self-grooming* não maternal; 7) fora do ninho alimentando; 8) fora do ninho explorando e, 9) fora do ninho não explorando. A figura 6 demonstra em forma esquemática algumas manifestações do comportamento materno. As observações foram feitas a cada 3 minutos totalizando 60 observações diárias (COSTA et al., 2013; VILELA et al., 2013).

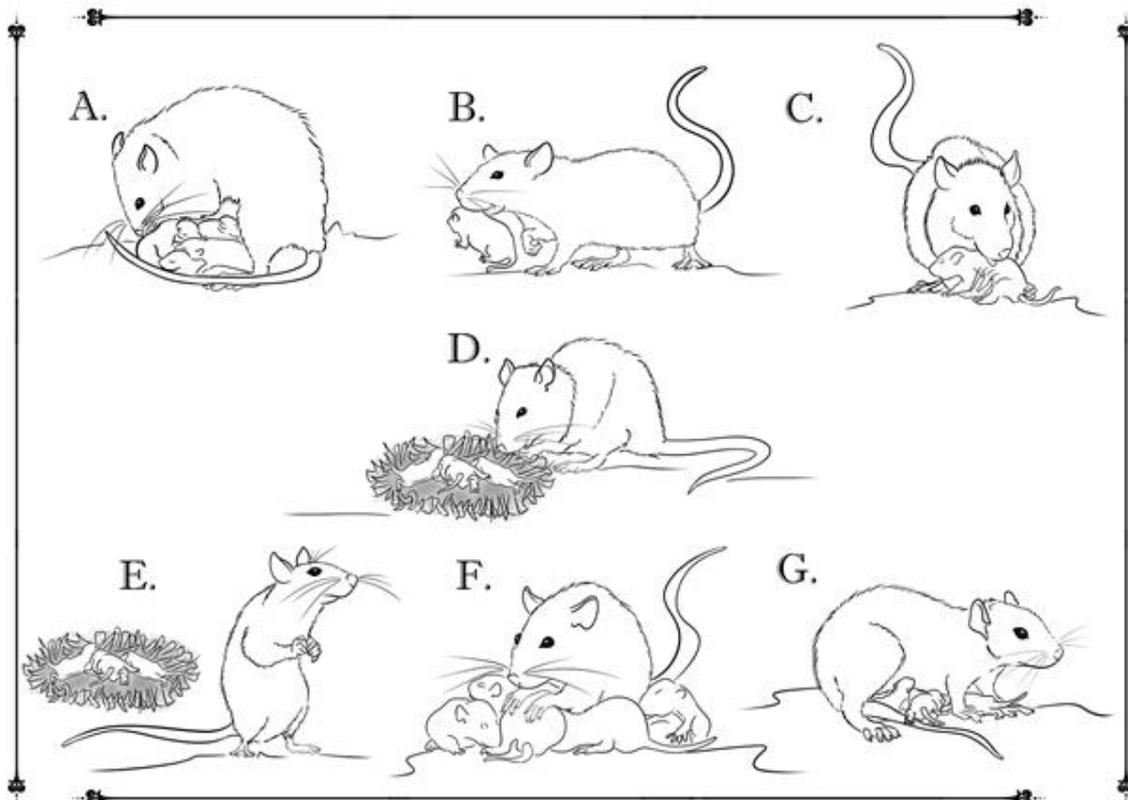


Figura 6- Representação esquemática de algumas manifestações analisadas no comportamento materno de roedores. Posição de cifose (A), carregando os filhotes (B), lambendo os filhotes (C), construindo o ninho (D), fora do ninho (E), agrupando os filhotes (F), sobre os filhotes (G).

Fonte: VERONESI, 2016.

4.7 Peso da ninhada

O peso das ninhadas foi monitorado durante o período de estimulação nociceptiva (PND 2-15) tanto nas proles do grupo *pinprick* quanto nas do grupo controle e registrado para posterior análise.

4.8 Testes nociceptivos

Os testes nociceptivos foram realizados em machos e fêmeas nascidos a termo e naqueles cujo nascimento foi pré-termo. Anteriormente aos testes, foi realizado o esfregaço do lavado vaginal de cada fêmea para verificar qual fase do ciclo estral cada uma se encontrava com a finalidade de evitar interferência

hormonal na nocicepção (VILELA et al., 2017). A figura 7 trás uma representação esquemática do experimento.

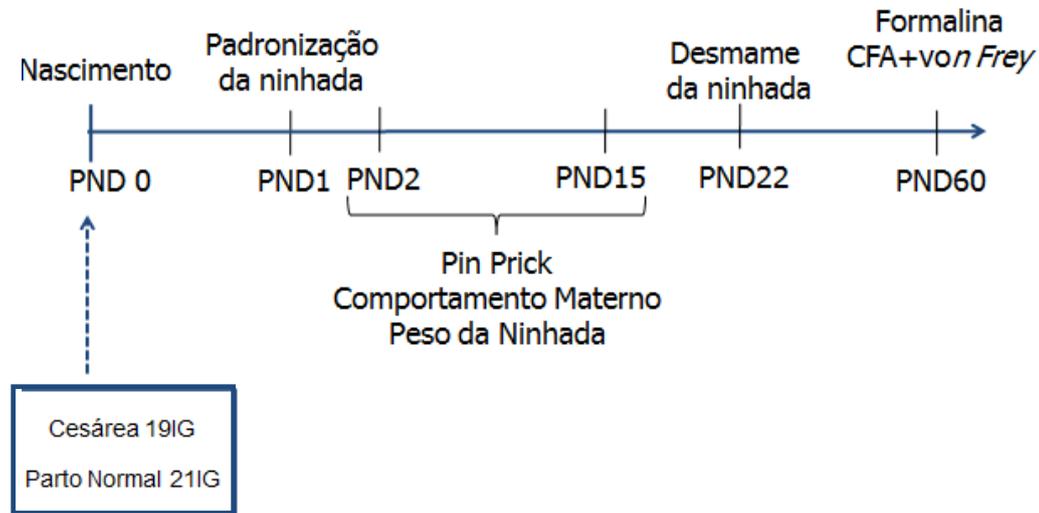


Figura 7- Esquema explicativo: linha do tempo para cesárea, *pinprick*, comportamento materno, peso da ninhada e testes nociceptivos

Fonte: Autora

4.8.1 Limiar nociceptivo químico

O limiar nociceptivo químico foi induzido pela administração de 20 μ L de solução de formalina a 1% na região dorsal da pata posterior direita. Antes da administração, os animais foram colocados em uma caixa acrílica transparente por 20 minutos para reconhecimento e ambientação. Posteriormente, foram removidos para a administração da formalina e recolocados na caixa acrílica. Para facilitar a observação da resposta nociceptiva, foi colocado um espelho atrás da caixa acrílica. Os animais foram observados logo após a administração da formalina durante 30 minutos. A resposta nociceptiva foi caracterizada pelo número de retirada (rápida e breve) ou flexão da pata injetada e pelo tempo de lambida. Esse comportamento relacionado foi analisado em duas fases: fase inicial (0-5min) e fase tardia (20-30min) conforme esquematizado na figura 8 (TSIKLAURI et al., 2017; VILELA et al., 2017; TABATA- IMAI et al., 2014). O ciclo das fêmeas foi monitorado para que o teste fosse realizado somente durante o período diestro.

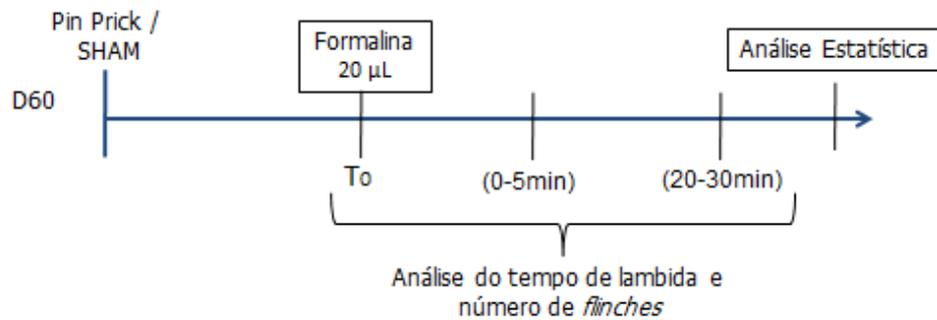


Figura 8- Esquema explicativo: linha do tempo teste da formalina
 Fonte: Autora

4.8.2 Limiar nociceptivo mecânico

Para avaliação do limiar nociceptivo mecânico dos animais na vida adulta, foram utilizados 100 µL de Adjuvante Completo de Freund (CFA) (Sigma, Estados Unidos da América) injetado na superfície plantar da pata direita quatro horas após a indução da hiperalgisia inflamatória os animais foram avaliados. Os animais foram acondicionados em caixas acrílicas (42 × 24 × 15 cm) com pisos de grade de arame por 15 a 30 minutos antes do início do teste. Após ambientação, o pesquisador inferia uma aplicação de um transdutor adaptado com uma ponta de polipropileno de 0,5 mm³ (Electronic *von Frey*) de forma perpendicular sobre a região plantar externa da pata traseira direita dos animais, até que apresentassem comportamento nociceptivo (retirada da pata seguida de lambida na mesma e/ou “flinch”) (CUNHA et al., 2004; VILELA et al., 2017).

Para as fêmeas, foi monitorado o ciclo para que o teste fosse realizado no dia do diestro. As avaliações ocorreram 4, 7, 10 e 24 horas após a injeção do CFA conforme esquematizado na figura 9. Os resultados foram expressos pelo limiar de retirada (em gramas, g) que foi calculado pela média de três medidas (CUNHA et al., 2004).

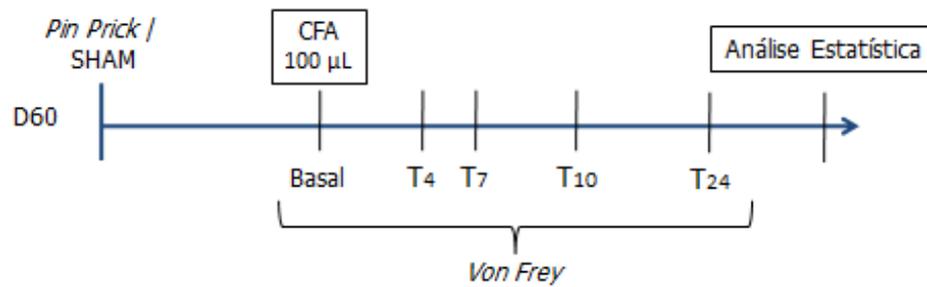


Figura 9: Esquema explicativo: linha do tempo teste *von Frey*

Fonte: Autora.

4.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism* versão 6.0. Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar se há distribuição normal em todos os dados. Os dados expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) e quando apresentaram uma curva normal, foram analisados pelo teste *t Student* para comparação de 2 grupos e para comparação de mais de 2 grupos e *Two-way ANOVA* seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. Se os dados apresentassem uma distribuição não normal, seriam analisados através do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de *Bonferroni*. Foram considerados estatisticamente diferentes grupos analisados com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

No presente estudo não foram observadas diferenças entre o comportamento maternal e o não maternal das mães cujos filhotes foram submetidos à experimentação com *pinprick* no período neonatal, independente de a prole ser pré-termo ou a termo. A figura 10 mostra o total de registros de comportamento maternal e não maternal do PND2-PND15 nas avaliações realizadas no período da manhã (8h, figura. 10A e B, para comportamento maternal e não-maternal, respectivamente) e no período da tarde (15h00, Figura. 10C e D, para comportamento maternal e não-maternal, respectivamente) das proles nascidas a termo.

Enquanto a figura 11 mostra os dados referentes às mães adotivas de proles pré-termo quanto as avaliações realizadas no período da manhã (8h, figura. 11A e B, para comportamento maternal e não-maternal, respectivamente) e no período da tarde (15h00, Figura. 11C e D, para comportamento maternal e não-maternal, respectivamente). As avaliações do comportamento materno foram realizadas tanto nas mães cujos filhotes receberam o estímulo *pinprick* (grupo PP) quanto nas mães dos filhotes do grupo CC.

Em relação ao comportamento materno das mães de proles a termo, a análise de variância two-way ANOVA mostrou que houve um efeito do PND, mas não houve efeitos de estímulos *pinprick* ou qualquer interação entre os dois fatores na avaliação do comportamento maternal observado às 8 da manhã [fator PND: $F_{(13, 182)} = 10,71$, $p < 0,001$; fator de estímulo *pinprick*: $F_{(1, 182)} = 3,11$, $p = 0,07$; interação de estímulo *pinprick* x PND: $F_{(13, 182)} = 0,33$, $p = 0,98$; Figura. 10A] ou às 3 da tarde [fator PND: $F_{(13, 182)} = 13,83$, $p < 0,001$; fator de estímulo *pinprick*: $F_{(1, 182)} = 3,74$, $p = 0,05$; interação estímulo *pinprick* x PND: $F_{(13, 182)} = 0,57$, $p = 0,87$; Figura. 10C]. Com relação ao comportamento não-maternal, houve um efeito do PND, mas não houve efeitos significativos de estímulos *pinprick* ou interação entre os dois fatores às 8 da manhã [fator PND: $F_{(13, 182)} = 7,47$, $p < 0,001$; fator estímulo *pinprick*: $F_{(1, 182)} = 3,47$, $p = 0,06$; interação estímulo *pinprick* x PND: $F_{(13, 182)} = 0,34$, $p = 0,98$; Figura. 10B] ou às 3 da tarde [fator PND: $F_{(13, 182)} = 13,82$, $p < 0,001$; fator de estímulo *pinprick*:

$F_{(1,182)}=3,78$, $p = 0,05$; interação estímulo *pinprick* x PND: $F_{(13, 182)} = 0,56$, $p = 0,87$; Figura. 10D] (resultados publicados, Anexo 2).

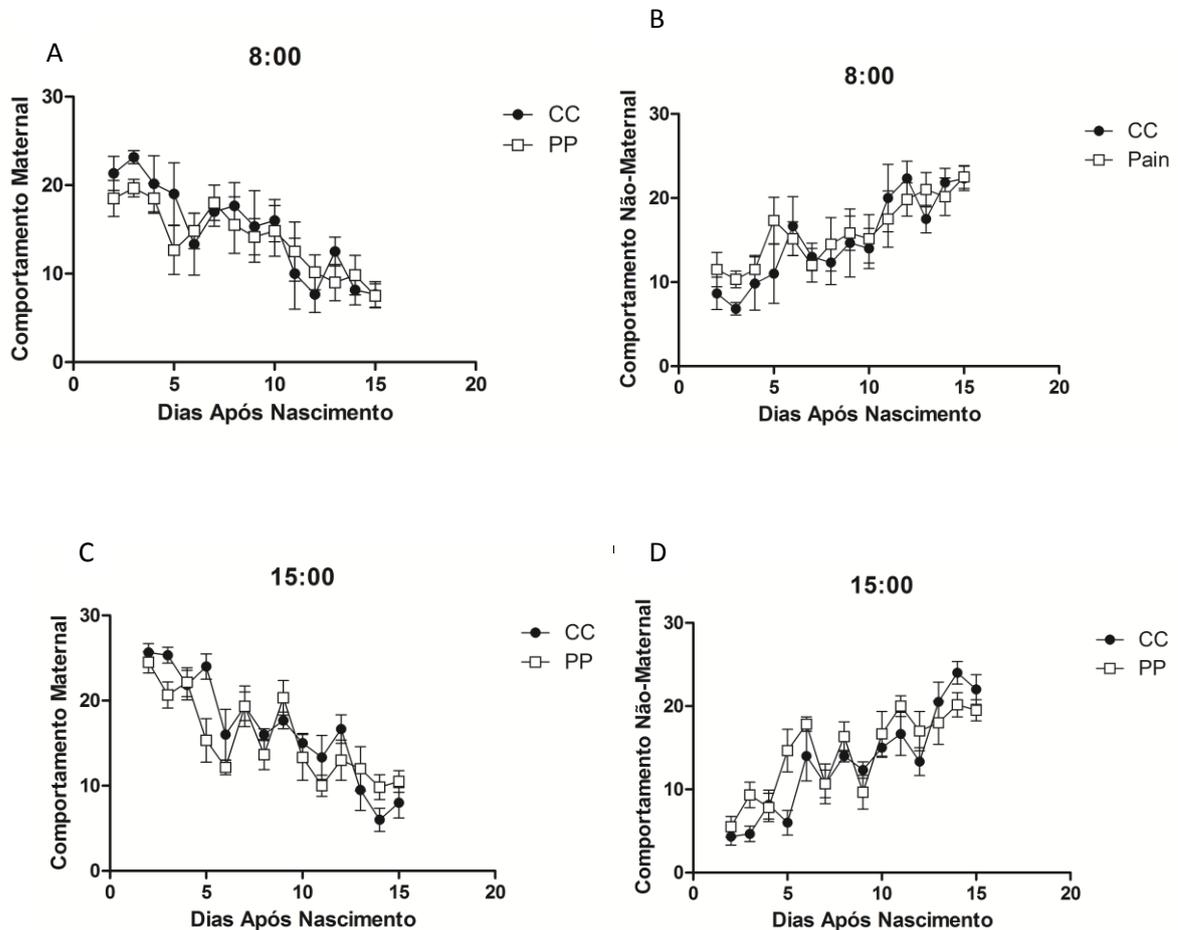


Figura 10- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15) sobre o comportamento materno de mães de proles nascidas a termo.

Legenda: A Número registrado de comportamento materno avaliado às 8:00 horas;
 B Número registrado de comportamento não materno avaliado às 8:00 horas;
 C Número registrado de comportamento materno avaliado às 15:00 horas;
 D Número registrado de comportamento não materno avaliado às 15:00 horas. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.)

Fonte: Autora.

Em relação ao comportamento materno das mães adotivas das proles pré-termo, a análise de variância two-way ANOVA mostrou que houve um efeito do PND, mas não houve efeitos de estímulos *pinprick* ou qualquer interação entre os dois fatores na avaliação do comportamento materno observado às 8 da manhã [fator PND: $F_{(13, 140)} = 6,31$, $p < 0,001$; fator de estímulo *pinprick*: $F_{(1, 140)} = 1,04$,

$p=0,30$; interação de estímulo *pinprick* x PND: $F_{(13, 140)} = 0,55$, $p = 0,88$; Fig. 11A] ou às 3 da tarde [fator PND: $F_{(13,140)} = 16,97$, $p <0,001$; fator de estímulo *pinprick*: $F_{(1,140)}=3,27$, $p = 0,07$; interação estímulo *pinprick* x PND: $F_{(13,140)} = 1,82$, $p = 0,04$; Figura. 11C]. Com relação ao comportamento não-maternal, houve um efeito do PND, mas não houve efeitos significativos de estímulos *pinprick* ou interação entre os dois fatores às 8 da manhã [fator PND: $F_{(13, 140)} = 6,31$, $p <0,001$; fator estímulo *pinprick*: $F_{(1,140)} = 1,04$, $p = 0,30$; interação estímulo *pinprick* x PND: $F_{(13, 140)} = 0,55$, $p = 0,88$; Figura. 11B] ou às 3 da tarde [fator PND: $F_{(13,140)}= 16,97$, $p <0,001$; fator de estímulo *pinprick*: $F_{(1, 140)} = 3,27$, $p = 0,07$; interação estímulo *pinprick* x PND: $F_{(13, 140)} = 1,82$, $p = 0,04$; Figura. 11D].

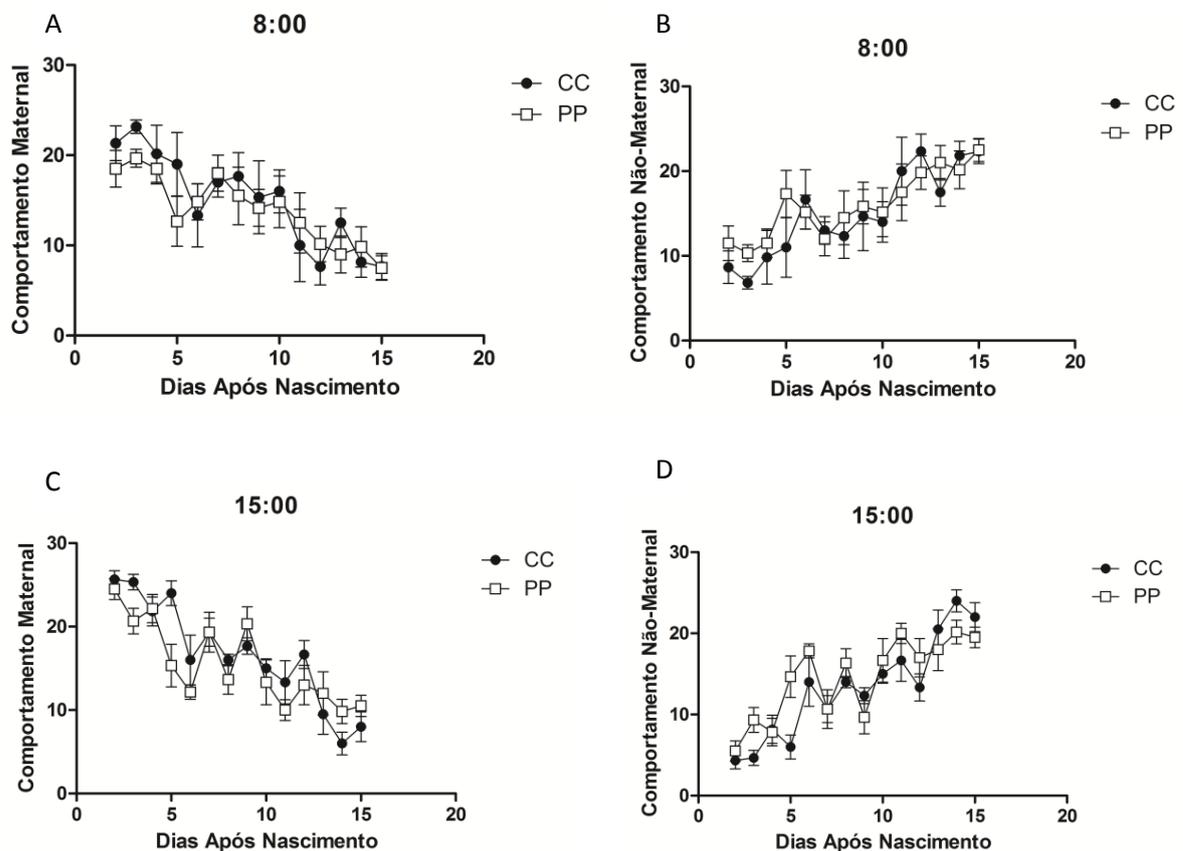


Figura 11- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15) sobre o comportamento materno de mães adotivas de proles nascidas pré-termo.

Legenda: A Número registrado de comportamento materno avaliado às 8:00 horas;
 B Número registrado de comportamento não materno avaliado às 8:00 horas;
 C Número registrado de comportamento materno avaliado às 15:00 horas;
 D Número registrado de comportamento não materno avaliado às 15:00 horas. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.).

Fonte: Autora.

A figura 12 mostra o ganho de peso da ninhada a termo durante o período em que o estímulo *pinprick* foi aplicado (PND 2-15). Não foram observadas alterações no peso da ninhada quando comparado o grupo CC e o PP (*pinprick*). A análise com two-way ANOVA mostrou que houve um efeito significativo do PND, mas não houve efeitos significativos de estímulo *pinprick* ou interação entre os dois fatores sobre o peso da ninhada [fator PND: $F_{(13, 182)} = 148,7$, $p < 0,001$; fator de estímulo *pinprick*: $F_{(1,182)} = 1,27$, $p = 0,26$; interação dos estímulos *pinprick* x PNP: $F_{(13, 182)} = 0,16$, $p = 0,99$] (resultados publicados, Anexo 2).

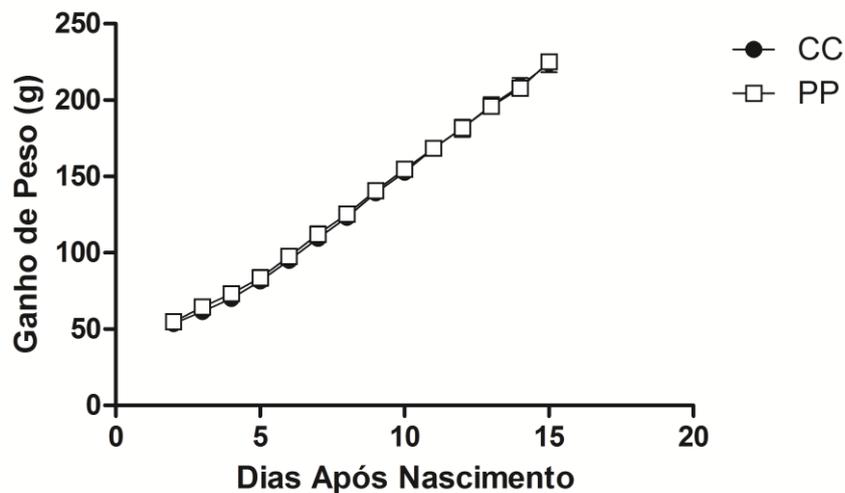


Figura 12- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15) sobre o peso da ninhada a termo em gramas. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 8 animais.
Fonte: Autora.

A figura 13 mostra o ganho de peso da ninhada a pré-termo durante o período em que o estímulo *pinprick* foi aplicado (PND 2-15). Não foram observadas alterações no peso da ninhada quando comparado o grupo CC e o PP (*pinprick*). A análise com two-way ANOVA mostrou que houve um efeito significativo do PND, mas não houve efeitos significativos de estímulo *pinprick* ou interação entre os dois fatores sobre o peso da ninhada [fator PND: $F_{(13, 140)} = 247,5$, $p < 0,001$; fator de estímulo *pinprick*: $F_{(1,140)} = 0,89$, $p = 0,34$; interação dos estímulos *pinprick* x PNP: $F_{(13,140)} = 0,05$, $p = 1,00$].

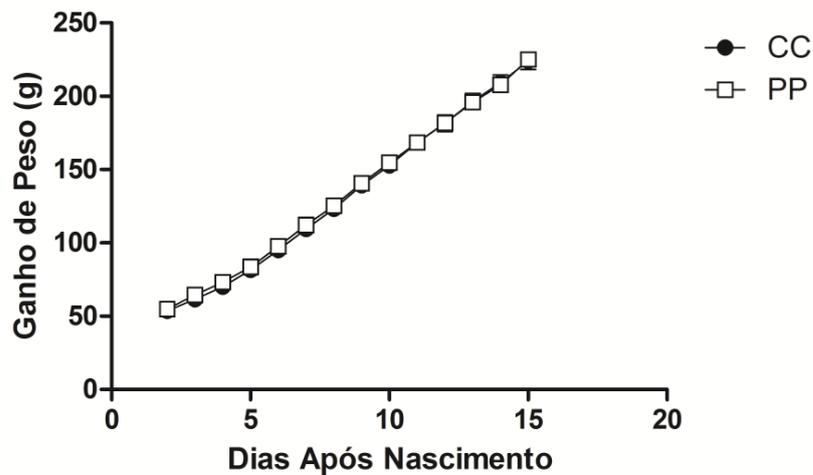


Figura 13- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15) sobre o peso da ninhada pré-termo em gramas. Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 8 animais.
Fonte: Autora.

Ao avaliarmos o limiar nociceptivo, de ninhadas a termo, pelo *von Frey* eletrônico após a injeção de CFA ou salina observamos uma redução no limiar de retirada nos machos do grupo CC / CFA e grupo PP/ CFA em todos os momentos (Figura. 14A, $p < 0,001$ para ambos os grupos). Após a injeção de CFA foi possível observar uma redução acentuada no limiar de retirada no grupo PP / CFA quando comparado ao grupo CC / CFA [fator CFA: $F_{(1,28)} = 993,6$, $p < 0,001$; fator estímulo *pinprick*: $F_{(1,28)} = 7,04$, $p < 0,05$; interação estímulos *pinprick* x CFA: $F_{(1, 28)} = 4,86$, $p < 0,05$]. Nas fêmeas foi observado redução do limiar de retirada em todos os momentos, tanto no grupo CC / CFA como no grupo PP / CFA (Figura. 14B, $p < 0,001$ para ambos grupos). Após injeção de CFA, uma redução acentuada no limiar de retirada foi observado no grupo PP / CFA quando comparado ao grupo CC / CFA [fator CFA: $F_{(1,28)} = 1069$, $p < 0,001$; estímulo *pinprick* fator: $F_{(1, 28)} = 13,43$, $p < 0,01$; interação estímulos *pinprick* x CFA: $F_{(1,28)} = 12,42$, $p < 0,01$] (resultados publicados, Anexo 2).

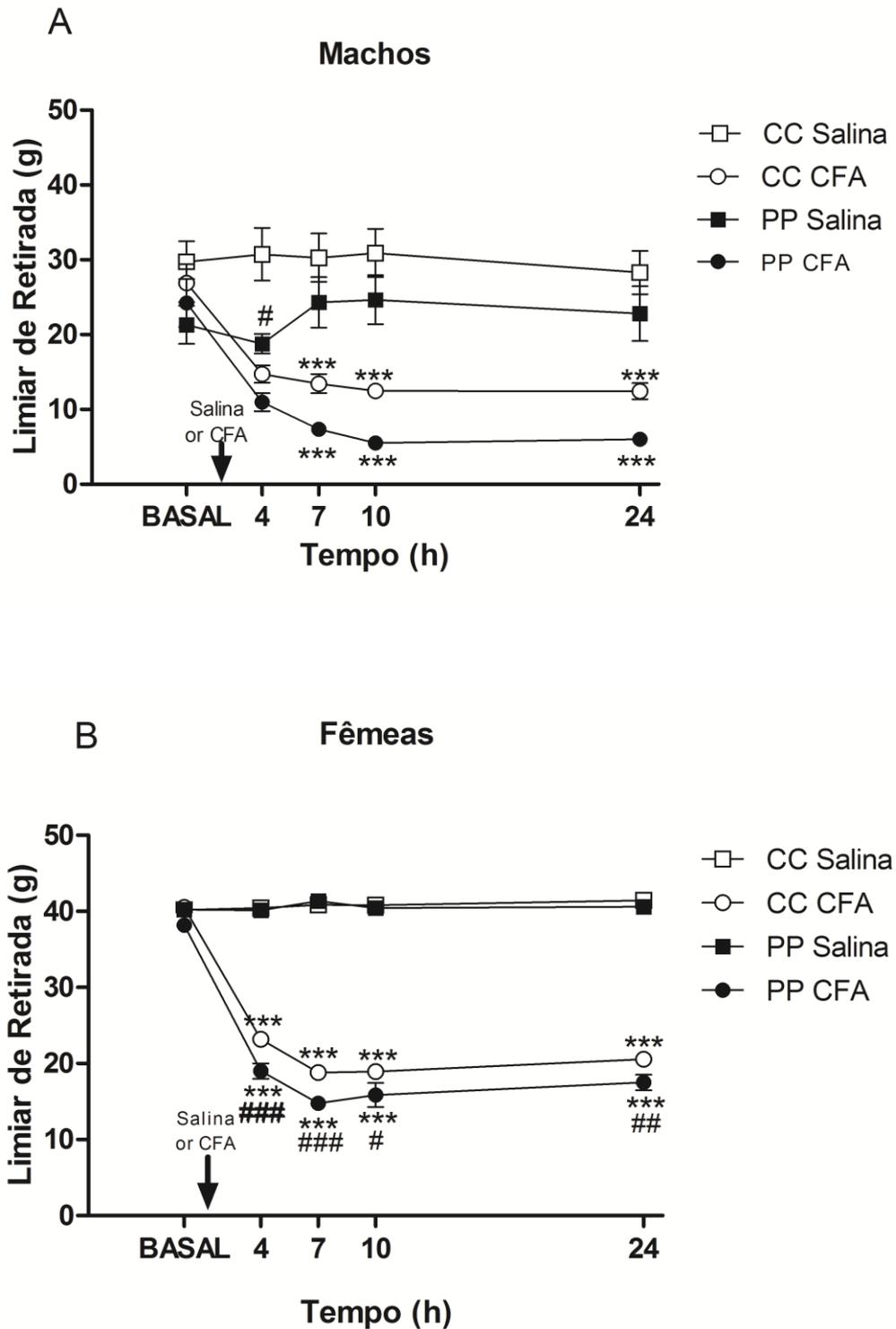
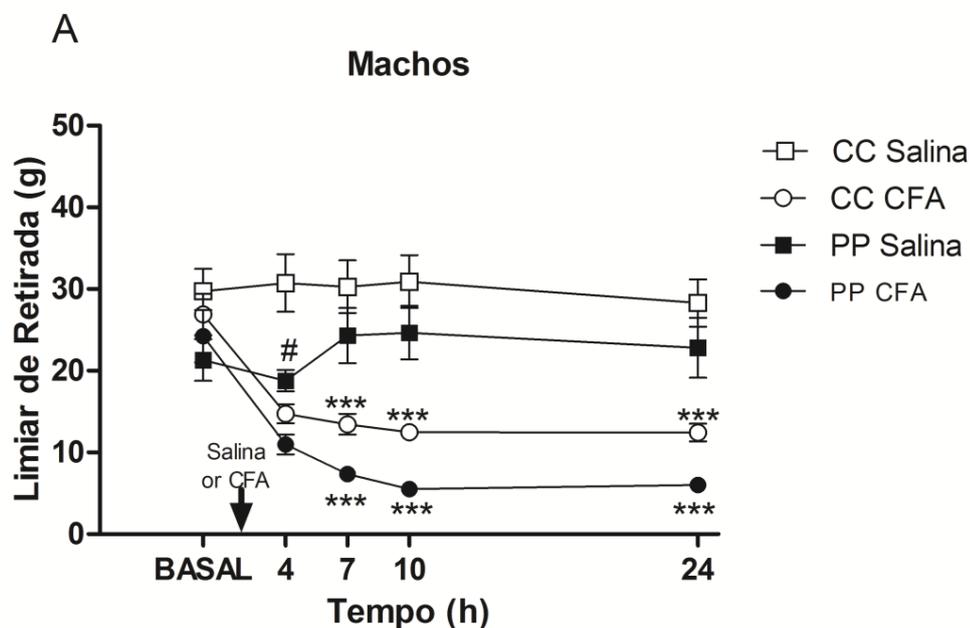


Figura 14- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15), em ninhadas pré-termo, sobre a nociceção no teste de von Frey antes e após injeção de CFA ou salina ou intraplantar. Limiar de retirada da pata, em gramas, em ratos machos (A) ou fêmeas (B). Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 8 animais. *** $p < 0.001$ comparando Controle/CFA e PP/CFA; # $p < 0.05$, # $p < 0.01$ e ### $p < 0.001$ comparado ao grupo Controle/CFA BASAL é a mensuração do limiar nociceptivo anteriormente a injeção intraplantar de CFA ou salina. A seta indica o momento de aplicação da injeção intraplantar de CFA ou salina.

Fonte: Autora.

Ao avaliarmos o limiar nociceptivo, de ninhadas pré-termo, pelo von Frey eletrônico após a injeção de CFA ou salina observamos uma redução no limiar de retirada da pata tanto para o grupo CC/CFA quanto para o grupo PP/CFA. De acordo com nossos resultados, observamos que houve uma redução no limiar de retirada da pata ($p < 0,001$) nos filhotes machos dos grupos controle / CFA e PP / CFA em todos os momentos quando comparados àqueles do grupo CC / Sal e PP / Sal. grupos (Figura. 15A). Após 4 horas da injeção de CFA, uma redução acentuada no limiar de retirada da pata ($p < 0,001$) foi observada no grupo PP / CFA quando comparado com o grupo CC / CFA [fator CFA: $F_{(4,112)} = 19,32$, $p < 0,001$; fator estímulo de *pinprick*: $F_{(3,112)} = 16,45$, $p < 0,05$; CFA x estímulo *pinprick*: $F_{(12,112)} = 6,892$, $p < 0,05$]. Em relação aos filhotes fêmeas (Figura. 15B), houve redução no limiar de retirada ($p < 0,001$) nos grupos CC / CFA e PP / CFA em todos os momentos quando comparados aos grupos CC / Sal e PP / Sal (Figura. 15B). Após 4 horas da injeção de CFA, uma redução no limiar de retirada ($p < 0,05$) foi observada no grupo PP / CFA quando comparado com o grupo CC / CFA [fator CFA: $F_{(4, 112)} = 81,36$, $p < 0,001$; fator estímulo de *pinprick*: $F_{(3,112)} = 12,62$, $p < 0,01$; CFA x estímulo *pinprick*: $F_{(12,112)} = 28,93$, $p < 0,01$].

Tanto os adultos do sexo masculino como os adultos do sexo feminino, mantiveram uma redução no limiar de retirada entre o grupo PP / CFA e o grupo CC / CFA em todos os tempos a partir do tempo de 4 horas.



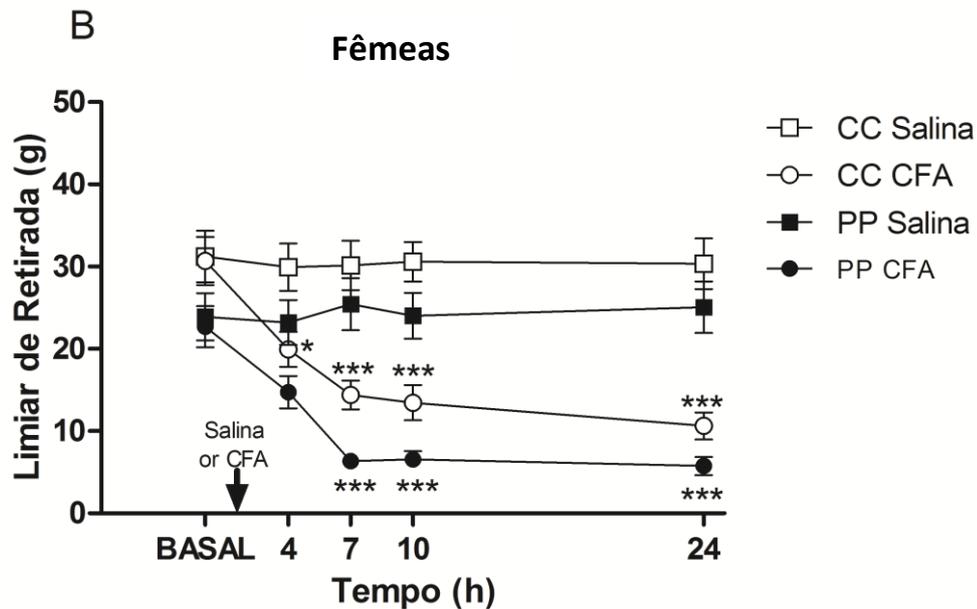


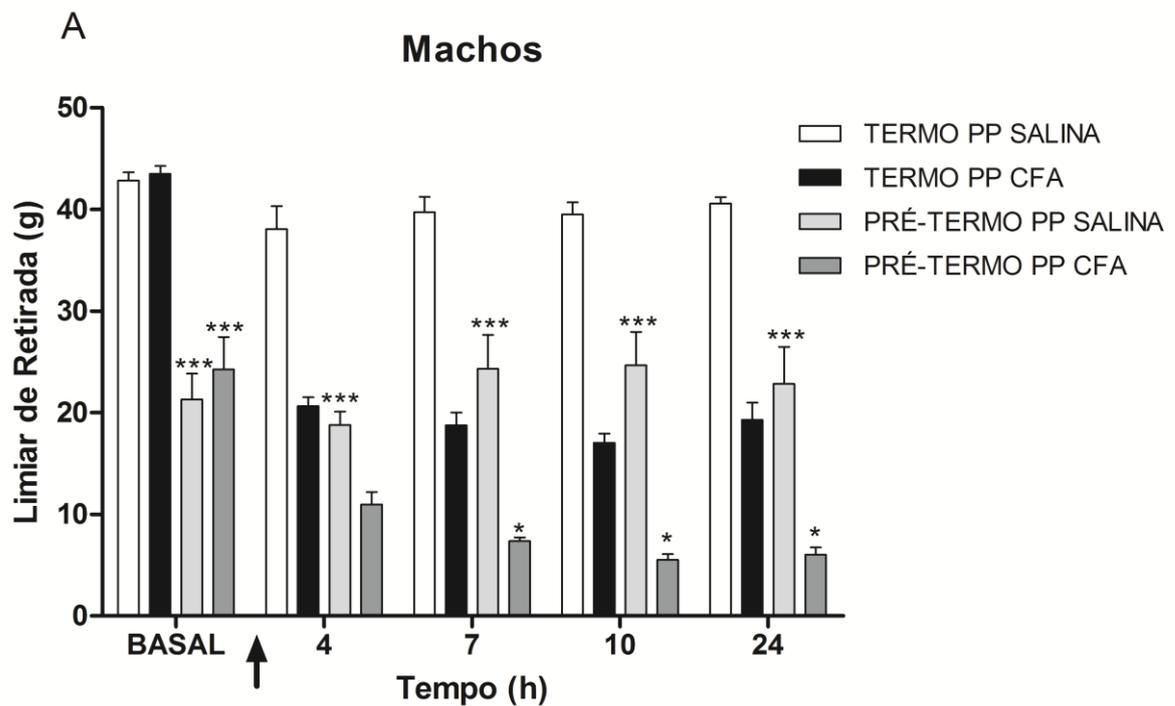
Figura 15- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15), em ninhadas pré-termo, sobre a nociceção no teste de von Frey antes e após injeção de CFA ou salina ou intraplantar. Limiar de retirada da pata, em gramas, em ratos machos (A) ou fêmeas (B). Cada ponto representa a média (\pm S.E.M.) de 8 animais. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparando ao Grupo Controle e PP / Salina aos Grupos Controle e PP / CFA; # $p < 0,01$ comparando Grupo Controle CFA ao Grupo PP / CFA. BASAL é a mensuração do limiar nociceptivo anteriormente a injeção intraplantar de CFA ou salina. A seta indica o momento de aplicação da injeção intraplantar de CFA ou salina.

Fonte: autora.

Ao compararmos a avaliação do limiar nociceptivo pelo von Frey eletrônico nos animais do grupo nascidos a termo e do grupo pré-termo observamos um limiar reduzido nos animais pré-termo independente do sexo. Os filhotes machos do grupo PP / Sal pré-termo em todos os momentos quando comparados àqueles do grupo PP / Sal termo apresentaram limiar de retirada da pata estatisticamente menor ($p < 0,001$) e na comparação entre os grupos PP/CFA termo e PP/CFA pré-termo a redução do limiar foi mais acentuada na primeira medida ($p < 0,001$), porém permaneceu nos tempos 4, 7 e 24 horas após injeção de CFA ($p < 0,05$) representado na figura 16A. A análise com two-way ANOVA mostrou que houve um efeito significativo dos fatores CFA e prematuridade além de interação entre fatores os dois fatores sobre o limiar de retirada [fator CFA: $F_{(4,140)} = 25,87$, $p < 0,001$; fator prematuridade: $F_{(3,140)} = 199,4$, $p = 0,001$; interação CFA x prematuridade: $F_{(12,140)} = 8,91$, $p = 0,001$].

Em relação aos filhotes fêmeas (Figura. 16B), houve redução no limiar de retirada ($p < 0,001$) no grupo PP / Sal pré-termo em todos os momentos quando

comparados aos grupos PP / Sal termo, permanecendo nos tempos 4 e 7 ($p < 0,01$) e no tempo 24 ($p < 0,001$). A análise com two-way ANOVA mostrou que houve um efeito significativo dos fatores CFA e prematuridade além de interação entre fatores os dois fatores sobre o limiar de retirada [fator CFA: $F_{(4,140)} = 20,45$, $p < 0,001$; fator prematuridade: $F_{(3,140)} = 234,8$, $p = 0,001$; interação CFA x prematuridade: $F_{(12,140)} = 9,00$, $p = 0,001$].



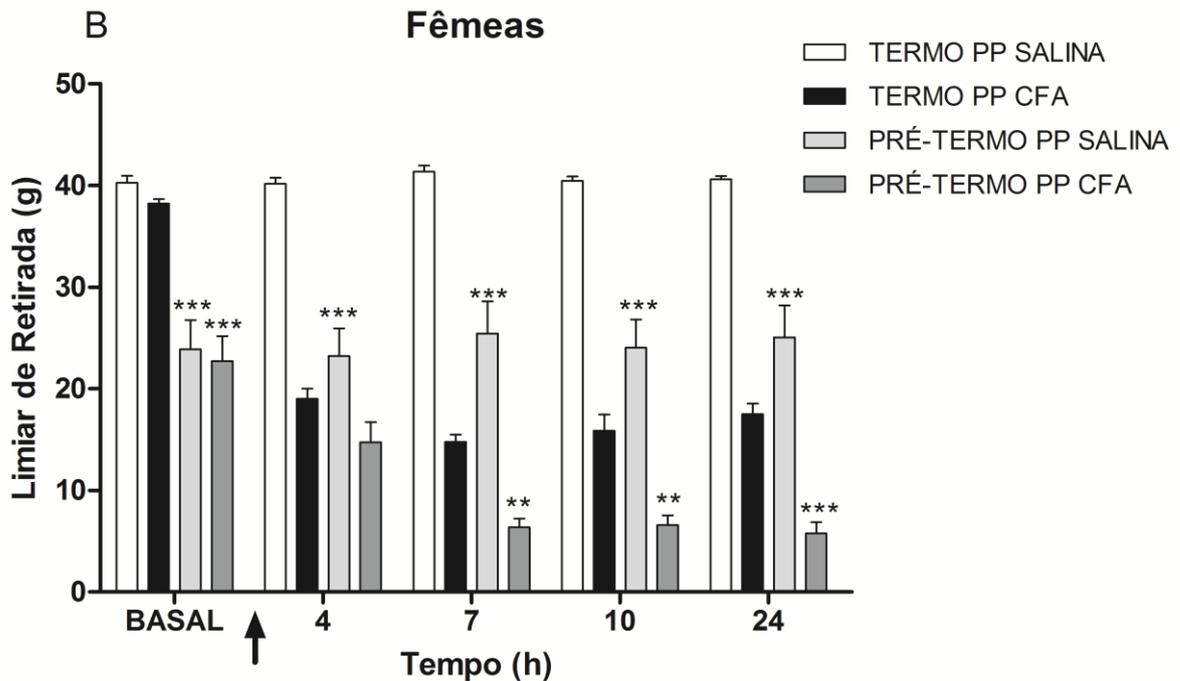


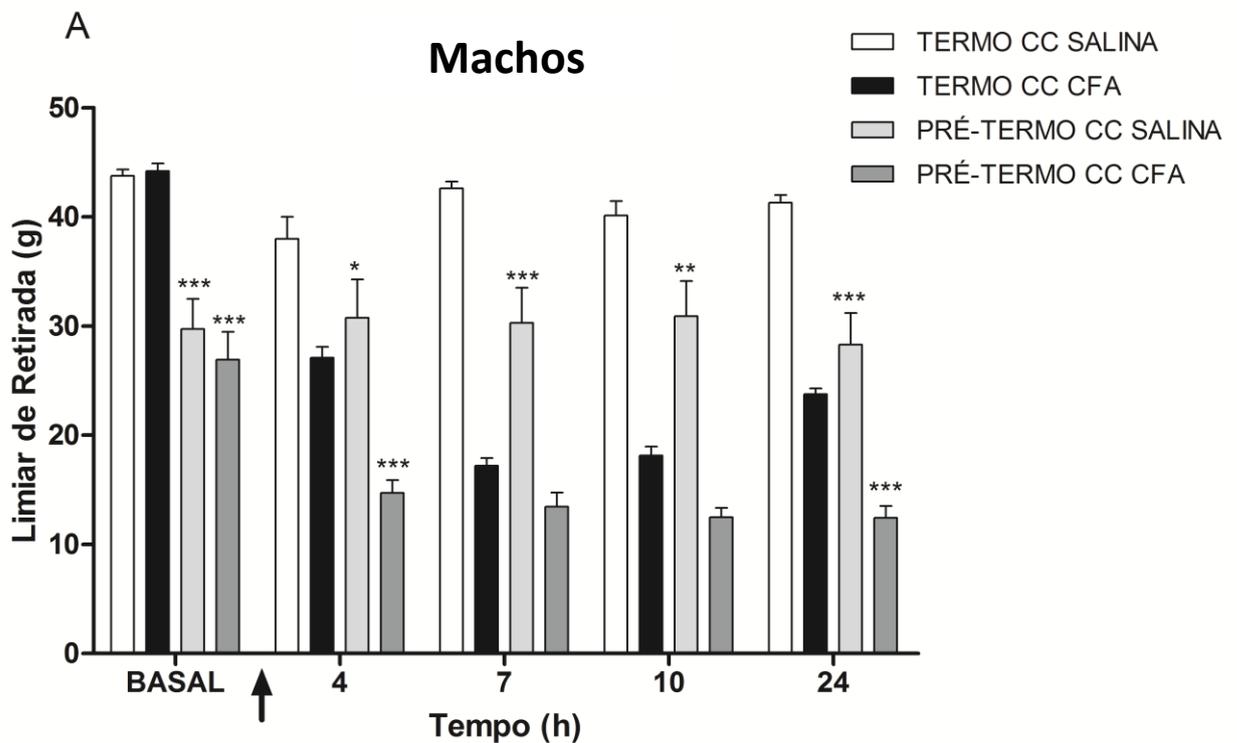
Figura 16- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15) sobre a nociceção mecânica no teste de von Frey antes e depois da injeção CFA ou salina ou intraplantar. Limiar de retirada da pata, em gramas, em ratos machos (A) ou fêmeas (B). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Comparação entre animais nascidos a termo e pré-termo submetidos ao estímulo *pinprick*, Comparação de grupo PP pré-termo salina com o grupo PP termo salina. Comparação de grupo PP pré-termo CFA com o grupo PP termo CFA. BASAL é a mensuração do limiar nociceptivo anteriormente a injeção intraplantar de CFA ou salina. A seta indica o momento de aplicação da injeção intraplantar de CFA ou salina.

Fonte: Autora

Os filhotes machos do grupo CC/ Sal pré-termo em todos os momentos quando comparados àqueles do grupo CC / Sal termo apresentaram limiar de retirada da pata estatisticamente menor com $p < 0,001$ para a medida Basal e tempo de 7 e 24 horas, $p < 0,05$ para 4 horas e $p < 0,01$ para 10 horas. Na comparação entre os grupos CC/CFA termo e CC/CFA pré-termo a redução do limiar foi mais acentuada na medida basal, 4 e 24 horas ($p < 0,001$), porém permaneceu nos tempos 7 e 10 horas após injeção de CFA ($p < 0,05$) representado na figura 17A. A análise com two-way ANOVA mostrou que houve um efeito significativo dos fatores CFA e prematuridade além de interação entre fatores os dois fatores sobre o limiar de retirada [fator CFA: $F_{(4,140)} = 22,49$, $p < 0,001$; fator prematuridade: $F_{(3,140)} = 152,8$, $p = 0,001$; interação CFA x prematuridade: $F_{(12, 140)} = 7,88$, $p = 0,001$].

Em relação aos filhotes fêmeas (Figura. 17B), houve redução no limiar de retirada ($p < 0,001$) no grupo CC/ Sal pré-termo em quase todos os momentos quando comparados aos grupos CC / Sal termo, sendo diferente apenas para a

medida basal ($p < 0,01$). Na comparação entre os grupos CC/CFA termo e CC/CFA pré-termo a redução do limiar ocorreu na medida basal e 24 horas ($p < 0,01$), porém permaneceu sem relevância estatística nos tempos 4, 7, 10 e 24 horas após injeção de CFA na figura 17B. A análise com two-way ANOVA mostrou que houve um efeito significativo dos fatores CFA e prematuridade além de interação entre fatores os dois fatores sobre o limiar de retirada [fator CFA: $F_{(4,140)} = 20,17$, $p < 0,001$; fator prematuridade: $F_{(3,140)} = 134$, $p = 0,001$; interação CFA x prematuridade: $F_{(12,140)} = 7,22$, $p = 0,001$].



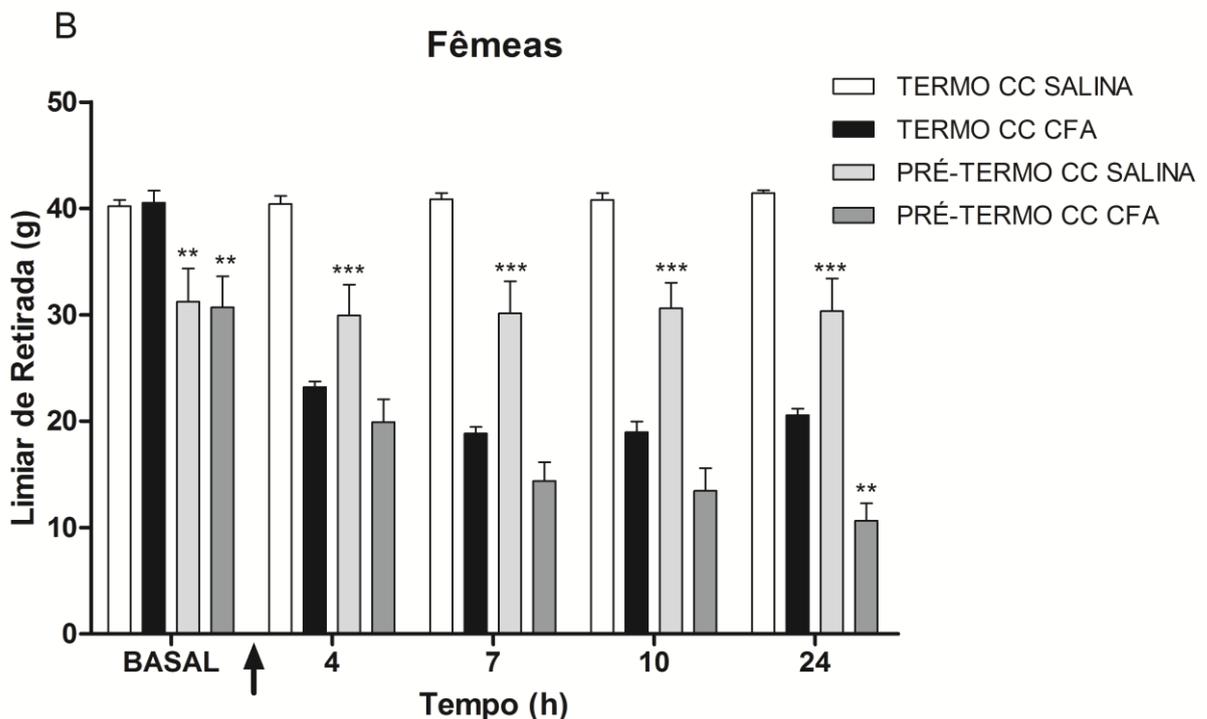


Figura 17- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15) sobre a nociceção mecânica no teste de von Frey antes e depois da injeção CFA ou salina ou intraplantar. Limiar de retirada da pata, em grammas, em ratos machos (A) ou fêmeas (B). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Comparação entre animais nascidos a termo e pré-termo não submetidos ao estímulo *pinprick* (grupo controle). Comparação de grupo controle pré-termo salina com o grupo controle termo salina. Comparação de grupo controle pré-termo CFA com o grupo controle termo CFA. BASAL é a mensuração do limiar nociceptivo anteriormente a injeção intraplantar de CFA ou salina. A seta indica o momento de aplicação da injeção intraplantar de CFA ou salina.

Fonte: Autora

Na avaliação do limiar nociceptivo pelo teste da formalina, com o *test t*, das ninhadas a termo, os machos do grupo PP não apresentaram aumento tempo de lambida ($p = 0,56$; figura. 18A) ou número de *flinches* ($p = 0,45$; Figura. 19A) na fase inicial (0 a 5 min), já na fase tardia (20 a 30 min) houve aumento do tempo de lambida ($p = 0,03$, figura. 18B), mas não do número de *flinches* ($p = 0,13$; figura. 19B) quando comparados aos animais do grupo CC. As fêmeas do grupo PP mostraram um aumento no tempo de lambida ($p = 0,047$; figura. 18C), mas não no número de *flinches* ($p = 0,25$; Figura. 19C) de 0 a 5 min (fase inicial) com um aumento no tempo de lambida ($p = 0,02$, figura. 18D) e no número *flinches* ($p = 0,03$; fig. 19D) de 20 a 30 min (fase tardia), quando comparados aos animais do grupo CC (resultados publicados, Anexo 2).

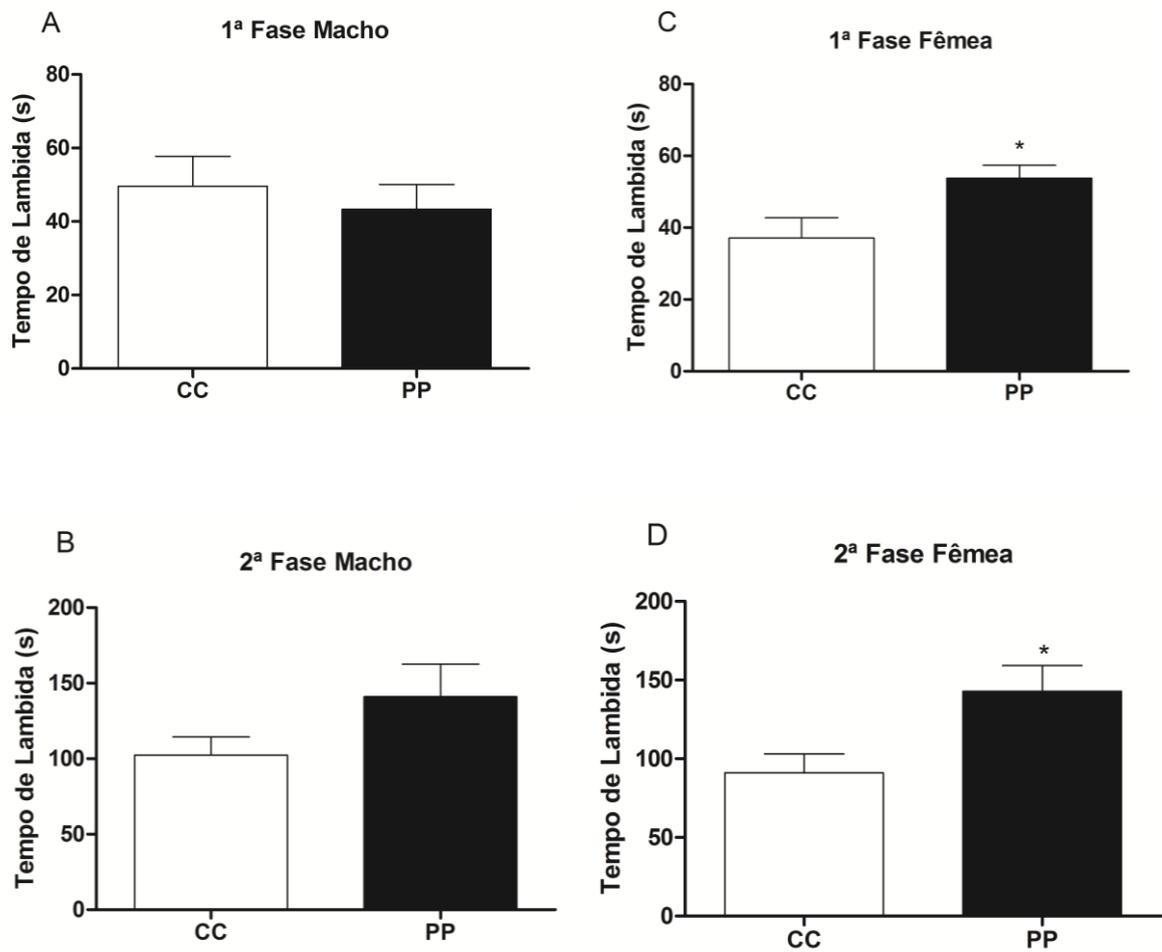
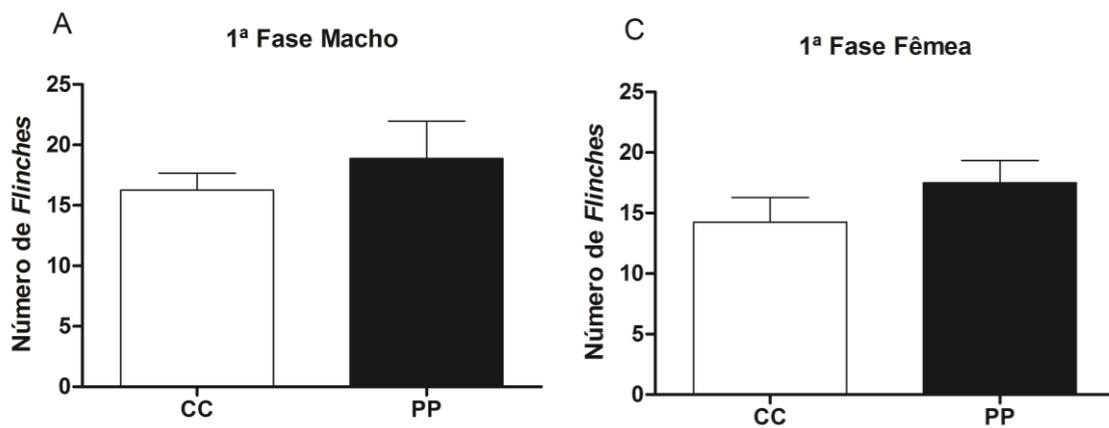


Figura 18- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15), em ninhadas termo, no teste de formalina nas fases inicial (0-5min) e tardia (20-30 min): duração do tempo de lambida da pata, em segundos, em ratos machos na fase inicial (A) ou tardia (B); duração do tempo de lambida da pata, em segundos, em ratos fêmeas na fase inicial (C) ou tardia (D). Representação da média (\pm S.E.M.) de 8 animais.

Fonte: Autora.



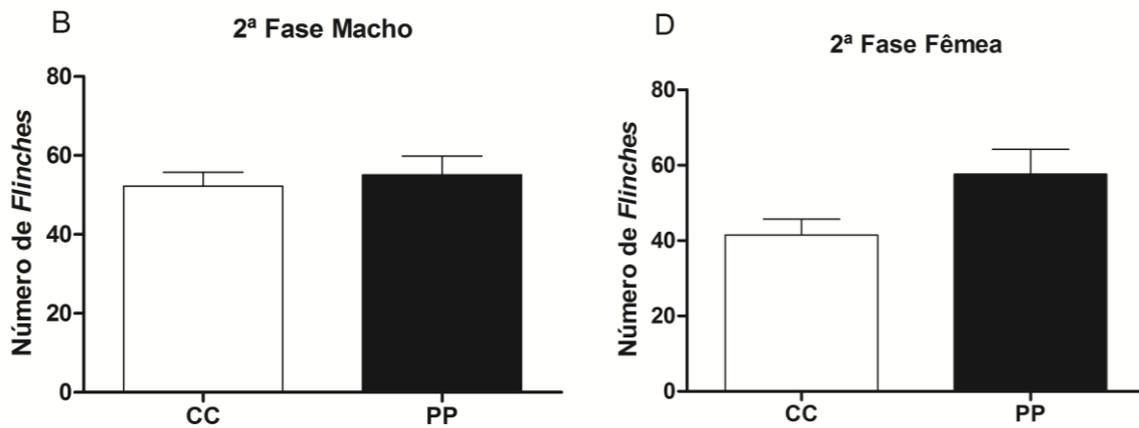


Figura 19- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15), em ninhadas termo, no teste de formalina nas fases inicial (0-5min) e tardia (20-30 min): número de *flinches* em ratos machos na fase inicial (A) ou tardia (B); número de *flinches* em ratos fêmeas na fase inicial (C) ou tardia (D). Representação da média (\pm S.E.M.) de 8 animais.

Fonte: Autora.

Na avaliação do limiar nociceptivo pelo teste da formalina, das ninhadas pré-termo, não foi observada diferença estatisticamente significativa ao comparar os animais, tanto machos quanto fêmeas, dos grupos CC e PP. Os ratos machos não apresentaram diferenças no tempo de lambida na fase inicial ($p = 0,94$; figura. 20A) ou tardia ($p = 0,61$; figura. 20), também não apresentaram diferenças quanto ao número de *flinches* na fase inicial ($p = 0,44$; figura. 21A) ou tardia ($p = 0,61$; figura. 21B). O mesmo foi observado nas fêmeas, não houve diferenças no tempo de lambida na fase inicial ($p = 0,31$; fig. 20C) ou tardia ($p = 0,89$; figura. 20D), também não apresentaram diferenças quanto ao número de *flinches* na fase inicial ($p = 0,61$; figura. 21C) ou tardia ($p = 0,19$; figura. 21D).

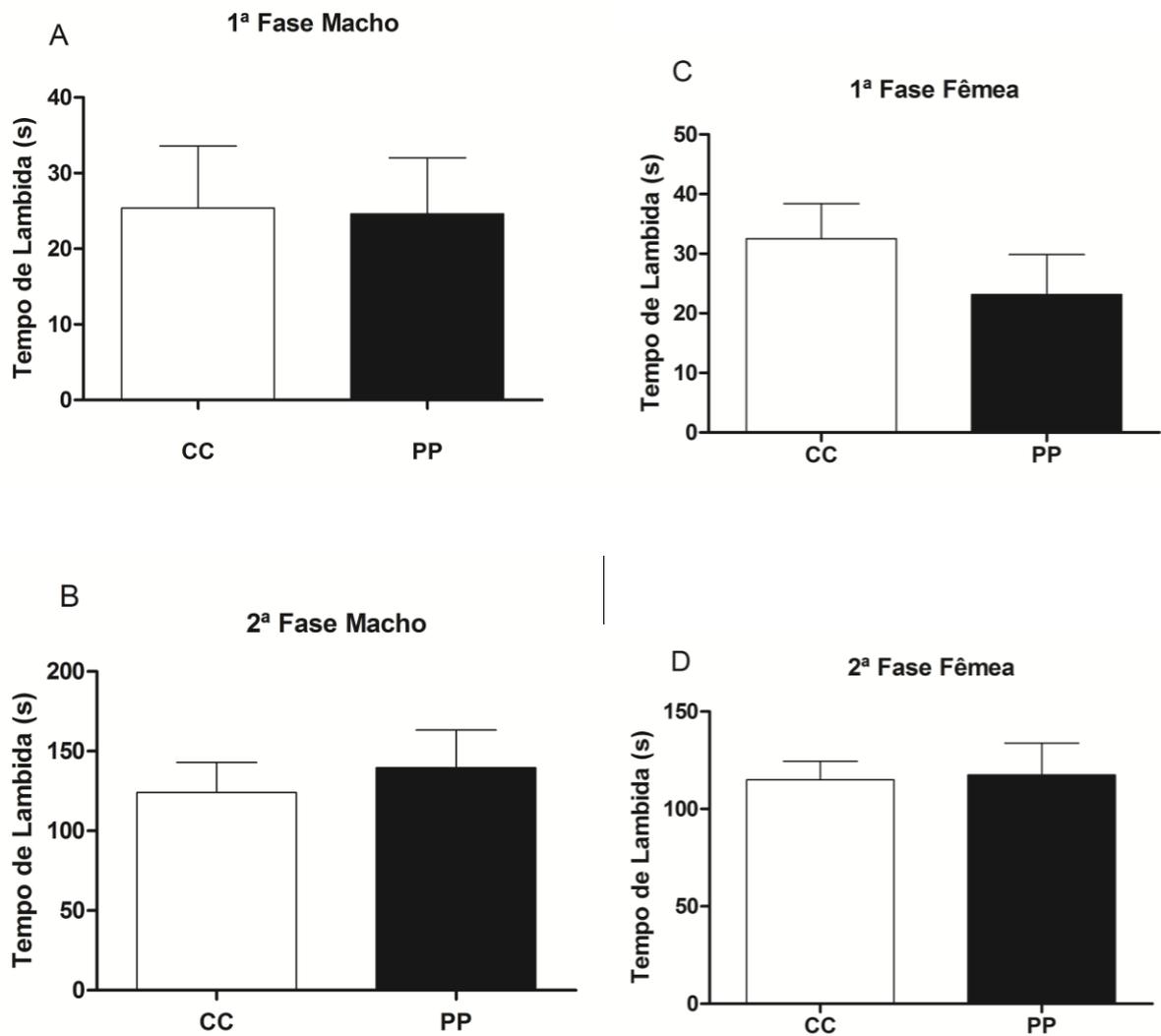


Figura 20- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15), em ninhadas pré-termo, no teste de formalina nas fases inicial (0-5min) e tardia (20-30 min): duração do tempo de lambida da pata, em segundos, em ratos machos na fase inicial (A) ou tardia (B); duração do tempo de lambida da pata, em segundos, em ratos fêmeas na fase inicial (C) ou tardia (D). Representação da média (\pm S.E.M.) de 8 animais.

Fonte: Autora.

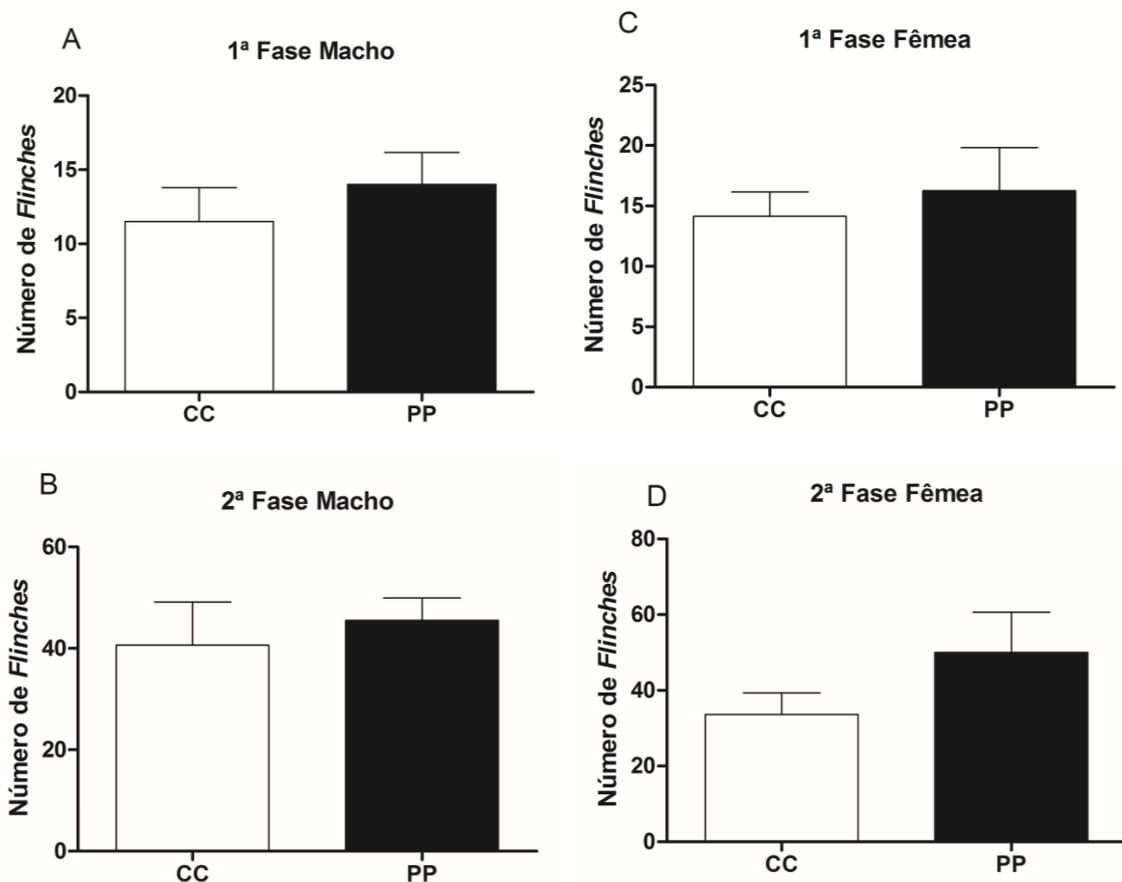


Figura 21- Efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15), em ninhadas pré-termo, no teste de formalina nas fases inicial (0-5min) e tardia (20-30 min): número de *flinches* em ratos machos na fase inicial (A) ou tardia (B); número de *flinches* em ratos fêmeas na fase inicial (C) ou tardia (D). Representação da média (\pm S.E.M.) de 8 animais.

Fonte: Autora.

Ao compararmos o limiar nociceptivo, avaliado pelo teste da formalina, entre os grupos de animais nascidos a termo e prematuros foi observada influência da prematuridade, no tempo de lambida, apenas em machos na fase inicial (0-5 minutos). A análise com two-way ANOVA mostrou que houve um efeito significativo da prematuridade sobre o tempo de lambida dos machos na fase inicial [fator PP: $F_{(1, 28)} = 0,21$, $p = 0,65$; fator prematuridade: $F_{(1,28)} = 7,93$, $p = 0,008$; interação PP x prematuridade: $F_{(1,28)} = 0,12$, $p = 0,72$; Figura. 22A]. Porém, não foi observada relevância estatística para o tempo de lambida de fêmeas na fase inicial [fator PP: $F_{(1,28)} = 0,50$, $p = 0,48$; fator prematuridade: $F_{(1,28)} = 0,15$, $p = 0,69$; interação PP x prematuridade: $F_{(1, 28)} = 0,36$, $p = 0,54$; Figura. 22B] ou na fase tardia de machos [fator PP: $F_{(1, 28)} = 1,48$, $p = 0,17$; fator prematuridade: $F_{(1,28)} = 0,26$, $p = 0,60$; interação PP x prematuridade: $F_{(1, 28)} = 0,35$, $p = 0,55$; Figura. 22C] e fêmeas [fator

PP: $F_{(1, 28)} = 3,80$, $p = 0,06$; fator prematuridade: $F_{(1,28)} = 0,003$, $p = 0,95$; interação PP x prematuridade: $F_{(1, 28)} = 3,13$, $p=0,08$; Figura 22D].

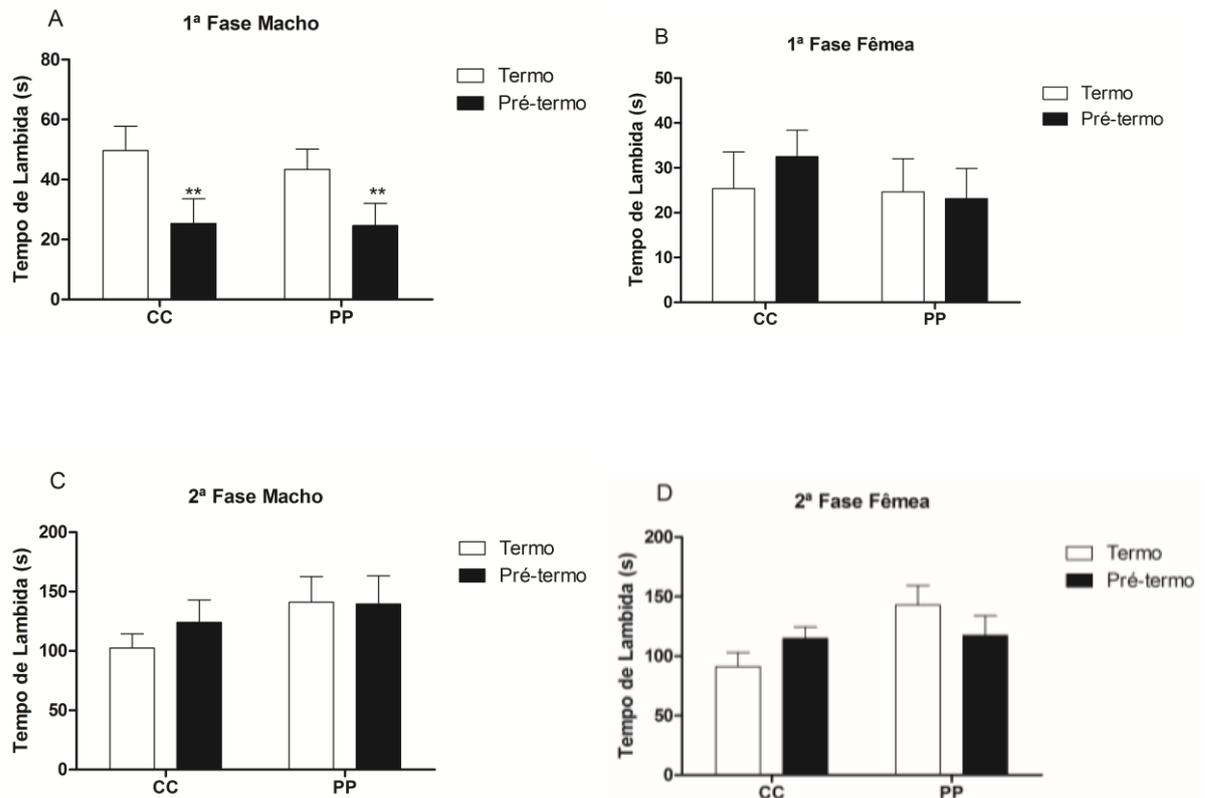


Figura 22- Comparação dos efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15), em ninhadas a termo e pré-termo, no teste de formalina nas fases inicial (0-5min) e tardia (20-30 min): duração do tempo de lambida da pata, em segundos, em ratos machos na fase inicial (A) ou tardia (B); duração do tempo de lambida da pata, em segundos, em ratos fêmeas na fase inicial (C) ou tardia (D). Representação da média (\pm S.E.M.) de 8 animais.

Fonte: Autora.

Em relação ao número de *flinches*, ao compararmos o limiar nociceptivo, avaliado pelo teste da formalina, entre os grupos de animais nascidos a termo e prematuros foi observada influência da prematuridade, apenas em machos na fase inicial (0-5 minutos). A análise com two-way ANOVA mostrou que houve um efeito significativo da prematuridade sobre o número de *flinches* dos machos na fase inicial [fator PP: $F_{(1, 28)} = 1,22$, $p = 0,27$; fator prematuridade: $F_{(1,28)} = 4,31$, $p < 0,05$; interação PP x prematuridade: $F_{(1, 28)} = 0,0007$, $p = 0,97$; Figura. 23A]. Porém, não foi observada relevância estatística para número de *flinches* de fêmeas na fase inicial [fator PP: $F_{(1,28)} = 1,18$, $p = 0,28$; fator prematuridade: $F_{(1,28)} = 0,07$, $p = 0,70$; interação PP x prematuridade: $F_{(1,28)} = 0,05$, $p = 0,82$; Figura. 23B] ou na fase tardia de machos [fator PP: $F_{(1,28)} = 0,47$, $p = 0,49$; fator prematuridade: $F_{(1,28)} = 3,57$, $p =$

0,06; interação PP x prematuridade: $F_{(1, 28)} = 0,03$, $p = 0,86$; Figura. 23C] e fêmeas [fator PP: $F_{(1, 28)} = 5,10$, $p = 0,03$; fator prematuridade: $F_{(1,28)} = 1,16$, $p = 0,29$; interação PP x prematuridade: $F_{(1, 28)} = 0,0003$, $p = 0,98$; Figura 23D].

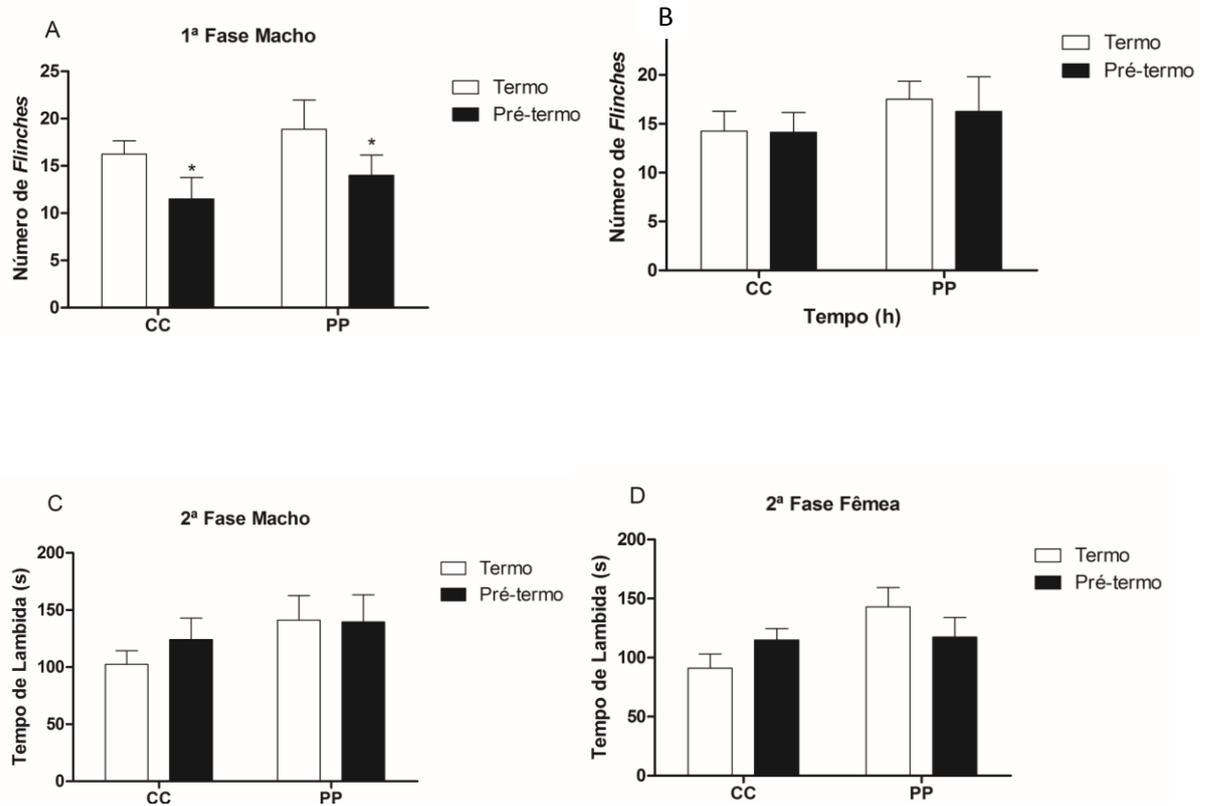


Figura 23- Comparação dos efeitos do *pinprick* no período neonatal (PND 2–15), em ninhadas termo e pré-termo, no teste de formalina nas fases inicial (0-5min) e tardia (20-30 min): número de *flinches* em ratos machos na fase inicial (A) ou tardia (B); número de *flinches* em ratos fêmeas na fase inicial (C) ou tardia (D). Representação da média (\pm S.E.M.) de 8 animais.

Fonte: Autora.

5 DISCUSSÃO

Ao nascimento, o sistema nervoso central de ratos está incompletamente formado, correspondendo ao de um recém-nascido pré-termo humano intra-uterino de 24 semanas (ANAND et al., 1999 ; SENGUPTA, 2013 ; DUTTA e SENGUPTA, 2016). Do ponto de vista do neurodesenvolvimento, a primeira semana pós-natal, de filhotes de ratos recém-nascidos corresponde a semanas gestacionais 24-36 em fetos humanos (WILSON, 1995 ; KIM et al., 1996) enquanto filhotes de 7 dias de idade têm a maturidade de um recém-nascido humano a termo (ANAND et al., 1999). O período sensível em relação às alterações a longo prazo nas respostas nociceptivas é limitado aos primeiros 7-10 dias de vida no rato (REN et al., 2005). No entanto, a detecção de uma idade mais precisa em ratos neonatos e o estudo dos efeitos das interações dor e estresse nesses animais contribuiriam para uma melhor compreensão deste importante tópico, (SANADA et al., 2014 ; CARMO EDE et al., 2016 ; NUSEIR et al., 2017) de modo que neste estudo usamos um modelo com estímulo doloroso do PND 2 ao PND 15.

O presente estudo mostra que o estímulo *pinprick*, de forma repetitiva, em proles a termo, durante as duas primeiras semanas de vida não afeta os limiares basais a estímulos mecânicos, mas aumenta a hipersensibilidade mecânica 24 h após a injeção de CFA, na vida adulta, em ratos machos e fêmeas. Além disso, as fêmeas apresentaram maior hipersensibilidade inflamatória induzida pela formalina em comparação aos machos, mas não foram encontradas diferenças no peso da ninhada ou no comportamento materno ou não materno.

Evidências atuais sugerem que animais submetidos a estímulos dolorosos no início da vida aumentaram a sensibilidade a estímulos químicos e mecânicos durante a vida adulta (BUTKEVICH et al., 2016b; van den HOOGEN et al., 2018a). Entretanto, estímulos dolorosos com *pinprick*, em proles a termo, do PND2 ao PND15 não alteraram o comportamento materno ou o peso da ninhada.

Neste estudo, avaliamos o comportamento materno para descartar sua influência nas mudanças das respostas inflamatórias nociceptivas. Embora haja uma tendência crescente no comportamento materno, não encontramos diferenças estatisticamente significativas no comportamento materno ou não materno. Tem sido

demonstrado que o comportamento materno em relação aos filhotes de ratos estimulados com dor periférica recorrente e precoce é semelhante quando comparado a um grupo controle (BUTKEVICH et al., 2016b). Entretanto, estímulos de dor que geram processos inflamatórios intensos em filhotes de ratos modificam o comportamento materno ao elevar a atividade materna (ANSELONI et al., 2005 ; WALKER et al., 2008). A sensibilização central é induzida após estímulos nociceptivos intensos, repetidos e sustentados, e a estimulação por picada de agulha é insuficiente para gerar o processo inflamatório (IANNETTI et al., 2013 ; van den BROEKE et al., 2015).

Além disso, experimentar estímulos dolorosos no início da vida não teve efeito sobre o peso corporal das ninhadas. Walker et al. (2003) demonstraram que os procedimentos repetitivos de indução de dor não afetam o crescimento e o desenvolvimento dos filhotes. Portanto, sugerimos que as alterações encontradas nas respostas nociceptivas durante a idade adulta podem ser atribuídas a utilização do estímulo pinprick precocemente e não a mudanças no comportamento materno ou no peso da ninhada.

Em nosso estudo, avaliamos a sensibilidade à dor inflamatória induzida por formalina ou CFA sob estímulo mecânico em ratos adultos, machos e fêmeas, que haviam sido submetidos a estímulo pinprick precoce. Nossos resultados mostraram que animais do sexo feminino que foram estimulados com pinprick no início da vida apresentaram maior sensibilidade ao estímulo inflamatório induzido pela formalina, uma vez que registraram um aumento do número de flinches da pata em ambas as fases no teste da formalina. Assim, podemos sugerir que as ratas submetidas a estímulos de dor no início da vida podem ser mais vulneráveis à estimulação inflamatória induzida pela formalina. Por outro lado, Butkevich et al. (2016a) mostraram que os machos eram mais vulneráveis à exposição prejudicial precoce do que as fêmeas, ao utilizarem o teste da formalina, observaram hipoalgesia em machos adultos submetidos à dor inflamatória nos primeiros dias de vida, mas não em fêmeas. Neste caso, no entanto, a dor inflamatória foi induzida no início da vida, o que é diferente do nosso procedimento.

Além de alterações nas respostas nociceptivas à hipersensibilidade inflamatória induzida pela formalina, também verificamos a influência do estímulo

pinprick nas respostas mecânicas da dor inflamatória induzida pela CFA através do teste de von Frey. Os nossos dados mostraram que machos e fêmeas apresentam um limiar de retirada inferior depois de terem sido injetados com CFA, demonstrando que a sensibilidade mecânica devido ao estímulo pinprick não é dependente do sexo. Essa inferência está de acordo com outros estudos que indicaram que a hiperalgesia basal ou secundária ocorre desde a infância até a idade adulta em animais expostos a estímulos de dor repetitivos durante o início da vida (CHEN et al., 2016).

O estímulo pinprick é similar ao procedimento tipicamente aplicado a recém-nascidos internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN). Nossos resultados mostraram que o estímulo pinprick no início da vida leva ao aumento da hipersensibilidade inflamatória mecânica na vida adulta. Modelos animais são ideais para investigar os efeitos a longo prazo da dor repetitiva neonatal na vida adulta. O modelo animal de estímulo pinprick é adequado para imitar a situação clínica comum em UTIN (den HOOGEN et al., 2017). O modelo consiste em uma picada de agulha na superfície plantar média da pata traseira direita com o objeto capaz de gerar ou avaliar a dor (TAL e BENNETT, 1994; KNAEPEN et al., 2013). Alguns modelos de estímulos que foram utilizados são um dispositivo de amostragem de glicose no sangue (CHEN et al., 2016), aplicação de agulha de calibre 22 no centro da pata (HOGAN et al., 2004), cirurgia de incisão cutânea plantar (LOW e FITZGERALD, 2012), picada de agulha (ANAND et al. , 1999), e os estímulos pinprick (TAL e BENNETT, 1994).

Em ratos, as duas primeiras semanas de vida representam o período crítico para o desenvolvimento de funções nociceptivas, sensoriais, emocionais e sociais (ELLENBROEK et al., 2005 ; FITZGERALD, 2005 ; BEGGS et al., 2012). Uma hipótese que tenta explicar isso é que a sensibilidade mecânica nociva dos neurônios do corno dorsal ipsilateral ou contralateral é alterada por estímulo nociceptivo no início da vida, sugerindo mudanças generalizadas no processamento sensorial da medula espinhal (van den HOOGEN et al., 2018a). Outra hipótese mecanicista para mudanças na sensibilidade à dor na vida adulta é que a adversidade no início da vida altera a expressão ou o funcionamento de receptores glicocorticóides ao longo da vida e, portanto, aumenta a sensibilidade à estimulação inflamatória (ZHU et al., 2017). Além disso, as vias descendentes de inibição da dor

são alteradas em animais adultos submetidos a estímulos dolorosos neonatais (WALKER et al., 2015).

A plasticidade neuronal é influenciada pelos hormônios do estresse que atingem o cérebro; cortisol em primatas e corticosterona em roedores (RADLEY et al., 2015). Muitos aspectos do desenvolvimento normal do cérebro dependem da experiência, a experiência inadequada em termos de desenvolvimento pode alterar significativamente a estrutura e função do sistema nervoso central (BHUTTA e ANAND, 2001). Há evidências abundantes de estudos em animais de que a dor repetitiva e / ou o estresse no início da vida podem alterar tanto a estrutura quanto a função do cérebro em desenvolvimento e, conseqüentemente, alterar a dor e / ou respostas ao estresse na vida adulta. Amaral et al. (2015) demonstraram que a estimulação nociceptiva inflamatória na primeira semana pós-natal reduz o tempo gasto explorando objetos novos e afeta a memória de longo prazo em animais machos. Mooney-Leber et al. (2018) mostraram que tanto o isolamento neonatal como a dor repetida alteraram os níveis de corticosterona e os níveis de glutamato no córtex frontal e no hipocampo. Holschneider et al. (2016) demonstraram que o estresse precoce provoca hiperalgesia visceral em ratos adultos. Esta pesquisa sugere que a dor repetida resulta em mudanças imediatas ou "adaptações" em sistemas mediadores de dor e estresse que podem se tornar permanentes.

Uma estimulação dolorosa precoce com estímulos pinprick aumenta a sensibilidade nociceptiva em ratos adultos, fêmeas e machos adultos, nascidos a termo, sendo que as fêmeas podem ser mais vulneráveis. Nossos dados contribuem para a compreensão do impacto de influências ambientais, tais como eventos estressantes da vida durante períodos críticos de desenvolvimento, sobre a vulnerabilidade à dor na vida adulta.

Além dos resultados referentes a proles nascidas a termo, o presente estudo demonstra, que a nocicepção induzida por *pinprick* durante as duas primeiras semanas de vida não afeta o comportamento materno ou ganho de peso em animais pré-termo.

Ao analisar o comportamento materno, buscamos descartar sua influência sobre as respostas inflamatórias nociceptivas. O *pinprick* consiste em um estímulo nociceptivo periférico que aplicado de forma precoce e repetidamente (PND2-15)

não influencia o comportamento maternal ou não-maternal (Carvalho et al., 2019). O mesmo não ocorre quando o estímulo doloroso gera um processo inflamatório intenso nos filhotes, o que aumenta a atividade maternal e, conseqüentemente, leva a alteração do comportamento materno (ANSELONI et al., 2005; WALKER et al., 2008).

Além de descartar a influencia do estímulo nociceptivo utilizado, a análise do comportamento materno buscou eliminar as possíveis influencias do nascimento prematuro e a utilização de mães adotivas para o cuidado da prole. A utilização de mães adotivas tem sido empregada por pesquisadores desde a década de 80, quando foi utilizada pela primeira vez (McKENNA et al., 1992). Desde então, estudos demonstram que a adoção de forma isolada não irá, necessariamente, surtir efeito negativo sobre o comportamento materno ou sobre o desenvolvimento da prole (OLEJNÍKOVÁ et al., 2018; BARROS et al., 2006). No presente estudo, corroborando com estudos anteriores, o comportamento materno não foi afetado seja pelo nascimento prematuro da prole ou pelo estímulo doloroso no período neonatal.

Assim como o comportamento materno, o ganho de peso corporal das ninhadas prematuras não foi alterado pelo estímulo nociceptivo no início da vida. Walker et al. (2003) mostraram que os procedimentos repetitivos de indução de dor não afetaram o crescimento e o desenvolvimento dos filhotes.

Portanto, sugerimos que as alterações encontradas nas respostas nociceptivas, de proles pré-termo, durante a vida adulta podem ser atribuídas à utilização do estímulo *pinprick* no início da vida e não às mudanças no comportamento materno ou alteração do ganho de peso da ninhada.

A estimulação dolorosa durante o período neonatal leva a diversas alterações na adolescência e vida adulta, como demonstrado anteriormente. Anand et al. (1999) verificaram que animais que sofrem nocicepção no período neonatal apresentam limiares nociceptivos reduzidos ao serem avaliados pelo teste da placa quente, bem como aumento do estresse e ansiedade na vida adulta. A dor neonatal também está relacionada à dificuldade de retenção de memória espacial (CHEN et al., 2016) e redução do limiar nociceptivo mecânico avaliado pelo teste de *von Frey*,

conforme demonstrado por Carvalho et al. (2019) e Chen et al. (2016), assim como no presente estudo.

As primeiras duas semanas de vida representam o período crítico para o desenvolvimento de funções nociceptivas, sensoriais, emocionais e sociais (ELLENBROEK et al., 2005; FITZGERALD, 2005; LUKAS et al., 2010; BEGGS et al., 2011). Uma hipótese para o aumento da sensibilidade nociceptiva mecânica é que a ativação dos neurônios do corno dorsal ipsilateral ou contralateral é alterada pelo estímulo doloroso no início da vida, sugerindo mudanças generalizadas no processamento sensorial (von den HOOGEN et al., 2018).

Outra hipótese mecanicista para mudanças na sensibilidade à dor na vida adulta é que a adversidade no início da vida altera a expressão ou o funcionamento do receptor glicocorticóide ao longo da vida e, portanto, aumenta a sensibilidade à estimulação inflamatória (ZHU et al., 2017).

As alterações no limiar nociceptivo mecânico identificadas na vida adulta de proles nascidas prematuramente submetidas ao *pinprick* se justificam pelo estímulo doloroso no período neonatal, mas também pela prematuridade em si, de acordo com os resultados apresentados no presente estudo.

Alguns modelos de animais, prematuros, tem sido utilizados para estudar doenças humanas relacionadas ao desenvolvimento. Li et al. (2013) sugerem que modelos prematuros de ratos se assemelham aos recém-nascidos humanos.

Ao utilizar ratos *Wistar* para investigar os efeitos da dor periférica inflamatória e do estresse de privação materna em filhotes e seus efeitos na vida adulta, foi demonstrado que o estresse de privação materna de curto prazo, isolamento maternal e a dor inflamatória no início da vida aumentaram, significativamente, a vulnerabilidade do sistema nociceptivo à dor inflamatória. Porém, esse estudo difere dos nossos resultados, pois utilizaram animais nascidos a termo e consideraram como prematuridade os primeiros dias de vida (BUTKEVICH e MIKHAILENKOIN, 2016).

Apesar das alterações encontradas no limiar nociceptivo mecânico dos animais adultos, cujo nascimento foi pré-termo, submetidas ao *pinprick* no período

neonatal, o mesmo grupo não apresentou nocicepção a estímulo químico alterada, independentemente do gênero.

Em contraste com nosso estudo, estudos anteriores demonstraram que a dor no período neonatal pode levar a alterações significativas da nocicepção induzida por estímulo química na vida adulta com influência do gênero. Butkevich e Mikhailenkoin (2016) demonstraram que os machos são mais vulneráveis a exposições nociceptivas precoces quando comparado às fêmeas. Em resposta ao teste químico, foi observada hipoalgesia em machos adultos submetidos à dor inflamatória nos primeiros dias de vida (1-2 dias), mas não em fêmeas, indo de encontro com nossos resultados.

Já em estudo desenvolvido por Page et al., (2011), as fêmeas apresentaram maior dor inflamatória induzida por formalina, comparadas aos machos, após estímulos dolorosos repetidos no início da vida, em todas as patas traseiras.

Em estudo anterior (CARVALHO et al., 2019), ao utilizarmos a mesma intervenção nociceptiva no período neonatal, porém em animais adultos nascidos a termo, observamos diferenças entre gênero na percepção nociceptiva induzida por estímulo químico no animal adulto. No teste da formalina, em animais nascidos a termo, as fêmeas mostraram maior sensibilidade ao estímulo inflamatório, considerando que apresentaram aumento do número *flinches* em ambas as fases do teste.

São inúmeros os estudos que investigam estímulos nociceptivo repetitivos em animais no início da vida e suas possíveis consequências no desenvolvimento e função cerebrais, bem como suas repercussões na vida adulta. No entanto, a correlação com a prematuridade ainda é escassa. Alguns autores apontam fatores que justificariam um limiar nociceptivo reduzido em prematuros, porém sem relacioná-los a ocorrência de dor no início da vida.

A hipersensibilidade nos recém-nascidos mais imaturos pode ser justificada por um limiar nociceptivo mais baixo e a falta de controles inibitórios, o que é coerente com o princípio geral de que os mecanismos excitatórios se desenvolvem mais cedo do que mecanismos inibitórios (BOUZA, 2009).

Os prematuros podem apresentar um limiar de percepção tátil menor, justificada por uma via descendente de inibição ainda imatura, expondo os prematuros a um período de vulnerabilidade à estímulos nociceptivos (CONG et al., 2017).

Ao associarmos o nascimento prematuro com a exposição a estímulos dolorosos no período neonatal, obtemos um modelo que se assemelha ao início da vida dos prematuros humanos, considerando a necessidade de cuidados em terapia intensiva imposta pela prematuridade.

Na avaliação comparativa, entre animais pré-termo e a termo, da sensibilidade à nocicepção inflamatória, pelo teste da formalina, ao compararmos animais nascidos a termo e pré-termo, foi observada maior sensibilidade ao teste pelos machos pré-termo na fase inicial (0-5 minutos) em relação ao tempo de lambida. Tal diferença ocorre tanto para machos sensibilizados previamente com o *pinprick* no início da vida como para machos não sensibilizados, sugerindo que o fator predisponente é a prematuridade.

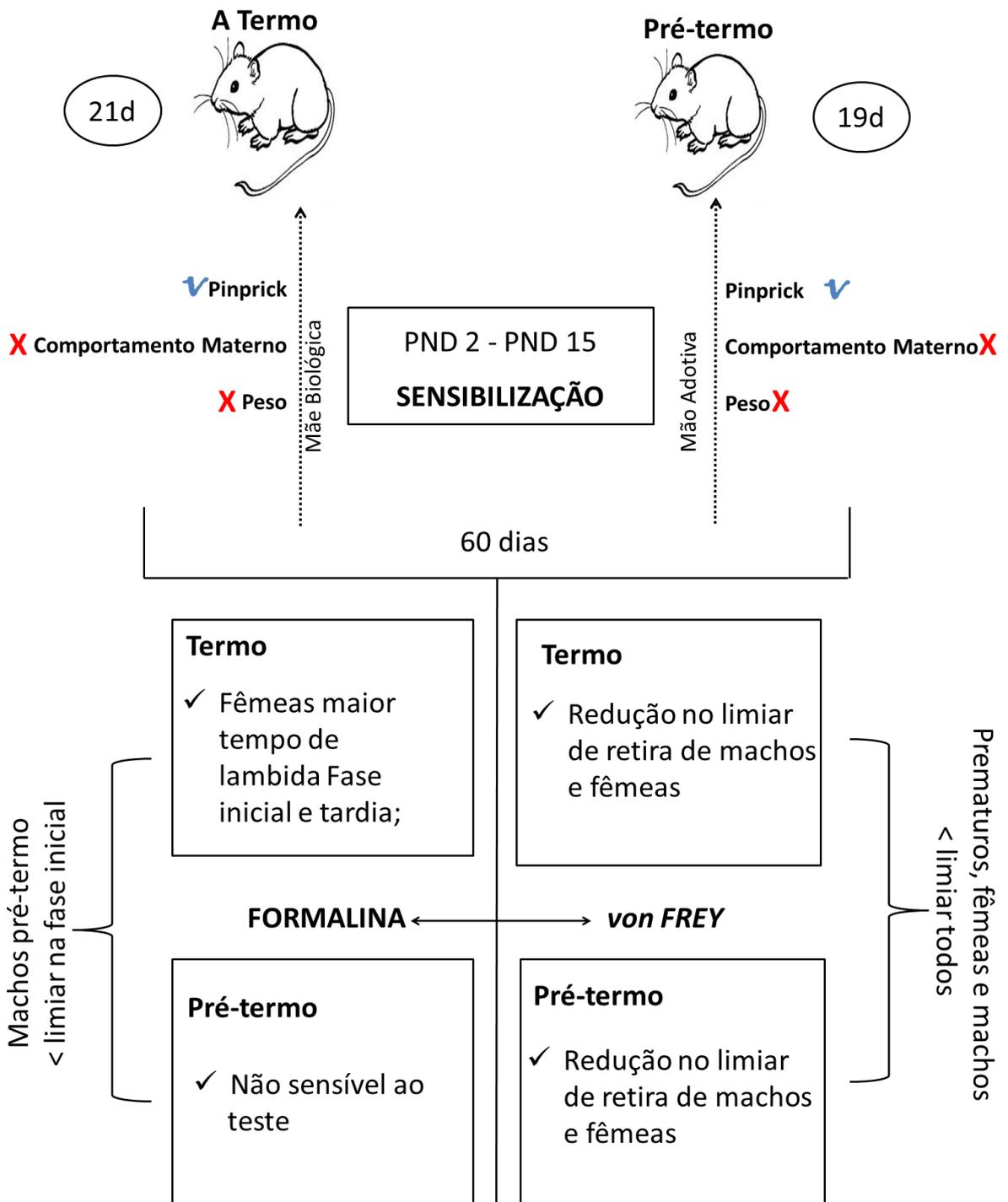
Não foram encontrados estudos utilizando o modelo de prematuridade semelhante ao utilizado no presente estudo. Ao considerar como prematuridade, os primeiros dias de vida (1-2), Butkevich e Mikhailenko (2016), demonstraram que os machos eram mais vulneráveis, que as fêmeas, a estímulos nociceptivos quando aplicados no período considerado como prematuridade. Essa vulnerabilidade foi demonstrada pelo teste nociceptivo da formalina, aplicado na vida adulta, o que justifica, parcialmente, nossos resultados.

Quando comparamos os resultados dos testes nociceptivos de proles nascidas a termo com proles pré-termo, verificamos diferenças importantes. A prematuridade influencia, diretamente, o limiar nociceptivo avaliado pelo teste mecânico de *von Frey* independente da indução inflamatória por CFA. As diferenças entre o limiar nociceptivo de recém-nascidos e adultos podem ser justificadas pela presença de uma via descendente pouco desenvolvida diante de uma via ascendente já desenvolvida, baixos níveis de serotonina e noradrenalina além de maturação tardia dos interneurônios (FITZGERALD e BEGGS, 2001). Porém, em relação aos resultados referentes ao menor limiar nociceptivo decorrente da prematuridade, não foram encontrados estudos que os confirmem, ou contradizem.

O presente estudo é pioneiro na utilização de animais pré-termo, nascidos por cesáreas aos 19 dias de gestação, para avaliação do limiar nociceptivo na vida adulta. A proposta de um novo modelo para estudo da dor no neonato pré-termo, proporciona um despertar diferenciado sobre essa população. Novos questionamentos surgem a partir desse modelo tanto em relação aos testes nociceptivos, formalina e *von Frey*, no animal adulto de ambos os sexos como em todas as vertentes envolvidas nos limiares nociceptivos desses animais, seja no período neonatal, seja na vida adulta.

Sugere-se, portanto, que a prematuridade, isoladamente, gera proles com o limiar nociceptivo reduzido na vida adulta e que, quando esse grupo de animais é submetido a estímulo nocivo repetido no período neonatal, resulta em condições diferenciadas de ativação do sistema de mediação da dor e estresse, que podem se tornar permanentes. Mais pesquisas são necessárias para determinar os efeitos da prematuridade e dor neonatal na idade adulta, e seus mecanismos para melhor manejo e intervenção nas consequências para o adulto, sobretudo em humanos.

A fim de resumir de forma esquemática, o presente estudo está ilustrado a seguir:



6 CONCLUSÃO

Em conclusão, tanto a estimulação nociceptiva precoce, com estímulo *pinprick*, quanto a prematuridade reduzem o limiar nociceptivo na vida adulta, de machos e fêmeas. Essa redução do limiar não é influenciada por alteração no comportamento materno ou ganho de peso das ninhadas. Mais estudos são necessários para investigar os mecanismos de ação da prematuridade que levam ao limiar nociceptivo reduzido no adulto, o limiar nociceptivo das mães quando a prole é exposta a estímulo nocivo no período neonatal, a adoção em relação ao limiar nociceptivo das mães, a influência da cesárea limiar nociceptivo do animal adulto que foi exposto a estímulo nocivo no período neonatal e a influência de variáveis como ansiedade e medo, no limiar nociceptivo do animal adulto exposto a estímulo nocivo no período neonatal.

REFERENCIAS

- ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, v.60, p. 91–102,1995.
- ALVES, C. O. et al. Emprego de soluções adocicadas no alívio da dor neonatal em recém-nascido prematuro: uma revisão integrativa. **Rev Gaúcha Enferm.**, v.32, n. 4, p. 788-96, 2011.
- AMARAL, C., ANTONIO, B., OLIVEIRA, M.G., HAMANI, C., GUINSBURG, R., COVOLAN, L., Early postnatal nociceptive stimulation results in deficits of spatial memory in male rats. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 125, p. 120–125, 2015.
- ANAND, K. J. S. et al. Long-term behavioral effects of repetitive pain in neonatal rat pups. **Physiol Behav**, v. 66, n. 4, p. 627-37, 1999.
- ANDREOLLO, N. A. et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arq. Bras. Cir. Dig**, v. 25, p. 49–51, 2012.
- ANSELONI, V.C. et al. Alterations in stress-associated behaviors and neurochemical markers in adult rats after neonatal short-lasting local inflammatory insult. **Neuroscience**, v. 131, p. 635-45, 2005.
- APPLEBY, C. J.; TOWNER, R. A. Magnetic resonance imaging of pulmonary damage in the term and premature at neonate exposed to hyperoxia. **Pediatric Research**, v. 50, n. 4, p. 502-7, 2001.
- BENARROCH, E. E. Descending monoaminergic pain modulation. **Neurology**, v. 71, p. 217-21, 2008.
- ARENDDT-NIELSEN, L. Central sensitization in humans: assessment and pharmacology. **Handb Exp Pharmacol**, v. 227, p. 79-102, 2015.
- ARENDDT-NIELSEN, L. et al. Assessment and manifestation of central sensitisation across different chronic pain conditions. **Eur J Pain**, v.22, n.2, p. 216-241, 2018.
- BARON, R.; HANS, G.; DICKENSON, A. H. Peripheral input and its importance for central sensitization. **Ann. Neurol.**, v.74, p.630–636, 2013.
- BARROS, V. G. et al. Prenatal stress and early adoption effects on benzodiazepine receptors and anxiogenic behavior in the adult rat brain. **Wiley Inter Science**, v. 60, p.609-618, 2006.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v.139, n.2, p.267–284., 2009.

BEGGS, S. et al. 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.** v. 16, p. 1249–1258, 2002.

BEGGS, S. et al. Priming of adult pain responses by neonatal pain experience: maintenance by central neuroimmune activity. **Brai**, v.135, p. 404–417, 2012.

BEGGS, S., TRANG, T., SALTER, M. W. P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. **Nat. Neurosci.**, v.15, p.1068–1073, 2012

BHUTTA, A.T., ANAND, K.J. Abnormal cognition and behavior in preterm neonates linked to smaller brain volumes. **Trends Neurosci.**, v.24, p.131–132, 2001.

BOISSE, L. et al. Neonatal immune challenge alters nociception in the adult rat. **Pain**, v. 119, p. 133–141, 2005.

BOUZA, H. The impact of pain in the immature brain. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 22, n. 9, p. 722-32, 2009.

BOWER, B. et al. Growth hormone treatment after cesarean delivery in rats increases the strength of the uterine scar. **Am J Obstet Gynecol**, v. 185, n. 3, p. 614-7, 2001.

BUENO, M.; KIMURA, A. F.; DINIZ, C. S. G. Evidências científicas no controle da dor no período neonatal. **Acta Paul Enferm**, v. 22, n. 6, p. 828-32, 2009.

BUENO, M. et al. Neonatal pain assessment program II: an innovative strategy to increase knowledge translation. **Rev Dor**, v.15, n. 2, p. 152-5, 2014.

BUTKEVICH, I. P. et al. Effects of neonatal pain, stress and their interrelation on pain sensitivity in later life in male rats. **Chin J Physiol**, v. 59, n. 4, p. 225-31, 2016.

BUTKEVICH, I. P., MIKHAILENKO, V. A. Long-Term Effects of Neonatal Pain and Stress on Reactivity of the Nociceptive System. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 161, n. 6, p. 706-10, 2016.

BUTKEVICH, I.P., BARR, G.A., MIKHAILENKO, V.A. Effects of prenatal stress on serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus and on pain behavior during the neonatal period of development. **Neurosci. Behav. Physiol**, v. 46, 2016a.

BUTKEVICH, I.P. et al. Effects of neonatal pain, stress and their interrelation on pain sensitivity in later life in male rats. **Chin. J. Physiol.**, v. 59, p. 225–231, 2016b.

CARMO, C. et al. Does pain in the neonatal period influence motor and sensory functions in a similar way for males and females during post-natal development in rats? **Pain Med**, v. 17, p. 1520–1529, 2016.

CARVALHO, R.C., et al. Repeated neonatal needle-prick stimulation increases inflammatory mechanical hypersensitivity in adult rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 2019.

CELIK, H.; AYAR, A. Effects of erythromycin on pregnancy duration and birth weight in lipopolysaccharide-induced preterm labor in pregnant rats. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 103, p. 22-25, 2001.

CHAPLAN, S. R., et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v. 53, p. 55-63, 1994.

CHEN, M. et al. Neonatal repetitive pain in rats leads to impaired spatial learning and dysregulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in later life. **Sci Rep**, v. 6, 2016.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nat Rev Dis Primers.**, v.16, p.1700-12, 2017.

CONG, X. et al. The impact of cumulative pain/stress on neurobehavioral development of preterm infants in the NICU. **Early Human Development**, v. 108, p. 9-16, 2017.

COSTA, H. H.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Continuous central infusion of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases maternal care in lactating rats: consequences for fear conditioning in adulthood males. **Behav Brain Res**, v. 27, p. 31-8, 2013.

DAMANHURI, H. A. et al. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in catecholaminergic brain regions: a marker of activation following acute hypotension and glucoprivation. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. 505-35, 2012.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth.**, v.75, n.2, p. 125-31, 1995.

den HOOGEN, N. J. V. et al. Neonatal plasticity of the nociceptive system: mechanisms, effects, and treatment of repetitive painful procedures during NICU admittance. **Curr. Pharm. Des.**, 23, 5902–5910.

ELLENBROEK, B. A.; DERKS, N.; PARK, H.J. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. **Stress**, v. 8, p. 247–257, 2005.

FEHRENBACHER, J. C.; VASKO, M. R.; DUARTE, D. B. Models of inflammation: carrageenan or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. **Curr. Protoc. Pharmacol Chapter**, v. 5, Unit 5.4, 2012.

FITZGERALD, M.; BEGGS, S. The neurobiology of pain: developmental aspects. **Neuroscientist**, v. 7, n. 3, p. 246-57, 2001.

FITZGERALD, M. The development of nociceptive circuits. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 6, p.507–520, 2005.

FRIEDRICH, L., CORSO, A. L., JONES, M. H. Prognóstico pulmonar em prematuros. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 1, p. 79-88, 2005.

GONÇALVES, N.; REBELO, S; TAVARES, I. Dor fetal mecanismos neurobiológicos e consequências. **Acta Med Port**, v. 23, p. 419-426, 2010.

GORZÍLIO, D. M. Desenvolvimento neurocomportamental em neonatos pré-termo hospitalizados relacionados com indicadores de estresse e dor. 2013. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

HACK, M. et al. Outcomes in young adulthood for very-low-birth-weight infants. **N Engl J Med**, v. 346, n. 3, 2002.

HEIDERICH, T. M.; LESLIE, N. T. F S.; GUINSBURG, R. Neonatal procedural pain can be assessed by computer software that has good sensitivity and specificity to detect facial movements **Acta Pediatric**, v. 104, n. 2, p. 63-69, 2015.

HATFIELD, L.A. Neonatal pain: what's age got to do with it? **Surg. Neurol**, v. 5, p.479–489, 2014.

HERMANN, C. et al. Long-term alteration of pain sensitivity in school-aged children with early pain experiences. **Pain** , v. 125,p. 278–285, 2006.

HOGAN Q. et al. Detection of neuropathic pain in a rat model of peripheral nerve injury. **Anesthesiology**, v.101, p.476-87, 2004.

HOHMANN, A.G. et al. Neonatal chronic hind paw inflammation alters sensitization to intradermal capsaicin in adult rats: a behavioral and immunocytochemical study. **J. Pain**, v. 6, p. 798–808, 2005.

HOLSCHNEIDER, D. P. et al. Early life stress elicits visceral hyperalgesia and functional reorganization of pain circuits in adult rats. **Neurobiol. Stress**, v. 3, p. 8–22, 2016.

IANNETTI, G. D. et al. Pinprick-evoked brain potentials: a novel tool to assess central sensitization of nociceptive pathways in humans. **J. Neurophysiol.**, v. 110, p. 1107–1116, 2013.

JENSEN, T. S. ; FINNERUP, N. B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. **Lancet Neurol.**, v.13, n.9, p.924-35, 2014.

JONES, L., et al. Nociceptive cortical activity is dissociated from nociceptive behavior in newborn human infants under stress. **Curr. Biol**, v. 27, p., 3846–3851, 2017.

JORGE, D. L. Influência do sexo e do ciclo estral sobre a sensibilidade à ijoir na atm de ratos (teste da formalina na atm). 2002. 194f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2002.

JOUNG, K. H.;CHO, S. C. The effect of sucrose on infants during a painful procedure. **Korean J Pediatr**, v.53, n.8, p.790-794, 2010.

KANDASAMY , R.; PRICE, T.J. The pharmacology of nociceptor priming. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 227, p.15–37, 2015.

KIM, J. J., FOY, M. R., THOMPSON, R. F. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.93, p.4750–4753. , 1996.

KLAWITTER, V. et al. Plasticity of basal ganglia neurocircuitries following perinatal asphyxia: effect of nicotinamide. **Exp Brain Res**, v. 180, p.139-152, 2007.

KNAEPEN, L. et al. Neonatal repetitive needle pricking: plasticity of the spinal nociceptive circuit and extended postoperative pain in later life. **Dev. Neurobiol.**, v. 73, p.85–97, 2013.

KNAEPEN, L. et al. Sex differences in inflammatory mechanical hypersensitivity in later life of rats exposed to repetitive needle pricking as neonates. **Neuroscience Letters**, v. 516, p. 285– 289, 2012.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nat. Med**, v. 16, p.1258–1266, 2010.

LAPRAIRIE, J. L.; MURPHY, A. Z. Neonatal injury alters adult pain sensitivity by increasing opioid tone in the periaqueductal gray. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 3, n. 31, p. 1-11, 2009.

LAPRAIRIE, J. L.; MURPHY, A. Z. Long term impact of neonatal injury in male and female rats: sex differences, mechanisms and clinical implications. **Front Neuroendocrinol**, v.31, n. 2, p. 193-202, 2010.

LATREMOLIERE, A., WOOLF, C.J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J. Pain**, v.10, p.895–926, 2009.

LEE, S. J. et al. Fetal Pain A Systematic Multidisciplinary Review of the Evidence. **JAMA**, v. 294, n. 8, p.947-54,2005.

LI, R. et al. Effect(s) of preterm birth on normal retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy in the neonatal rat. **Current Eye Research**, v. 38, n. 12, p. 1266-73, 2013.

LIMA, A. H.; HERMONT, A. P.; FRICHE, A. A. L. Analgesia in newborns: a case-control study of the efficacy of nutritive and non-nutritive sucking stimuli. **CoDAS**, v. 25, n. 4, p. 365-8, 2013.

LOTTO, C. R.; LINHARES, M. B. M. Contato “pele a pele” na prevenção de dor em bebês prematuros: revisão sistemática da literatura. **Trends Psychol.**, v. 26, n 4, p. 1699-1713, 2018.

LOW, L. A., FITZGERALD, M. Acute pain and a motivational pathway in adult rats: influence of early life pain experience. **PLoS One**, v. 7, p.343-16, 2012.

MACKENNA, P. et al. Eradication of hantavirus infection among laboratory rats by application of caesarian section and a foster mother technique. **Journal of Infection**, v. 25, p.181-190, 1992.

MALHEIROS, J.M. et al. Repetitive noxious neonatal stimuli increases dentate gyrus cell proliferation and hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. **Hippocampus**, v. 24, p.415–423, 2014.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, v. 62, n.4, p. 609-614, 2002.

MARTINS, S. W. Manejo de dor neonatal: contexto organizacional, estresse e coping dos profissionais de saúde. 2014. 257f. Tese (Doutorado em Psicologia) – Instituto de Psicologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

McNAIR, C. et al. Nonpharmacological Management of Pain During Common Needle Puncture Procedures in Infants **Clin. Perinatol.**, v.40, p. 493–508, 2013.

MIFFLIN, K. A.; KERR, B. J. The transition from acute to chronic pain: understanding how different biological systems interact. **Can. J. Anaesth.**, v.61, p.112–12, 2014.

MILLER, R. L. ; LOEWY, A. D. 5-HT neurons of the area postrema become c-Fos-activated after increases in plasma sodium levels and transmit interoceptive information to the nucleus accumbens. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 306, n. 9, p. 663-673, 2014.

MIZUMURA, K.; MURASE, S. Role of nerve growth factor in pain. **Handb. Exp. Pharmacol**, v.227, p.57–77, 2015.

MOONEY-LEBER, S. M., SPIELMANN, S. S., BRUMMELTE, S. Repetitive neonatal pain and reduced maternal care alter brain neurochemistry. **Dev. Psychobiol.**, v. 60, p. 963–974, 2018.

NEMERGUT, M. E.; YASTER, M.; COLBY, C. E Sedation and analgesia to facilitate mechanical ventilation. **Clin Perinatol.**, v. 40, p. 539–558, 2013.

NUSEIR, K. Q. et al. Sucrose and naltrexone prevent increased pain sensitivity and impaired long term memory induced by repetitive neonatal noxious stimulation: role of BDNF and beta-endorphin. **Physiol. Behav**, v. 179, p. 213–219, 2017.

OLD, E. A.; CLARK, A. K.; MALCANGIO, M. The role of glia in the spinal cord in neuropathic and inflammatory pain. **Handb. Exp. Pharmacol**, v.227, p.145–170, 2015.

OLEJNIKOVA, L. et al. Circadian alignment in a foster mother improves the offspring's pathological phenotype. **J Physiol**, v. 596, n.23, p. 5757-75, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Preterm birth. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/>>. Acesso em: 11 Jun. 2016.

PERLMAN, J. M. Neurobehavioral deficits in premature graduates of intensive care—potential medical and neonatal environmental risk factors. **Pediatrics**, v.108, o. 133-9, 2001.

PINHEIRO, I. O. et al. Pain evaluation in newborns using the neonatal facial activity coding scale during blood gases analysis. **Rev Dor**, v. 16, n. 3, p.176-80, 2015.

PRADO, P. T. C.; DEL BEL, E. A. C-fos, um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 424-33, 1998.

RADLEY, J. et al. Chronic stress and brain plasticity: mechanisms underlying adaptive and maladaptive changes and implications for stress-related CNS disorders. **Neurosci. Biobehav. Rev**, v. 58, p.79–91, 2015.

RAMOS, H. A. C.; CUMAN, R. K. N. Fatores de risco para prematuridade: pesquisa documental. **Esc Anna Nery Rev Enferm**, v.13, n. 2, p. 297-304, 2009.

REN, K. et al. Neonatal local noxious insult affects gene expression in the spinal dorsal horn of adult rats. **Mol. Pain**, v 1, p. 27. 2005.

RIRIE, D. G., BREMNER, L. R., FITZGERALD, M. Comparison of the immediate effects of surgical incision on dorsal horn neuronal receptive field size and responses during postnatal development. **Anesthesiology**, v. 109, p. 698–706, 2008.

SANADA, L. S. et al. Cortex glial cells activation, associated with lowered mechanical thresholds and motor dysfunction, persists into adulthood after neonatal pain. **Int J Devl Neuroscience**, v. 35, p. 55-63, 2014.

SEDIVEC, M. J. et al. Increase in nociceptive input to spinocervical tract neurons following chronic partial deafferentation. **J Neurosci.**, v.3, n.7, p. 1511-9,1983.

SENGUPTA, P. The laboratory rat: relating its age with human's. **Int. J. Prev. Med.**, v. 4, p.624–630, 2013.

SESSLE, B. J. Brainstem mechanisms underlying craniofacial pain and its modulation. **Adv Pain Res Ther**, v. 22, p.413-21, 1995.

SHONKOFF, J. P. et al. An integrated scientific framework for child survival and early childhood development. **Pediatrics**, v.129; p.460- 472, 2012.

SMITH, P.A. BDNF: no gain without pain? **Neuroscience**, p.283, p.107–123, 2014.

TANNO, A. P.; MARCONDES, F. K. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, 2002.

STAUD ,R. Is it all central sensitization? Role of peripheral tissue nociception in chronic musculoskeletal pain. **Curr Rheumatol Rep**, v.12, n. 6, p.448-54, 2010.

SOUSA, A. M. et al. Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 58, n. 4, p. 371-79, 2008.

SU, Z. et al. Postnatal high-protein diet improves learning and memory in premature rats via activation of mTOR signaling. **Brain Research**, v. 1611, p. 1-7, 2015.

TABATA-IMAI, A., INOUE, R., MORI, H.. Increased sensitivity to inflammatory pain induced by subcutaneous formalin injection in serine racemase knock-out mice. **PLoS One**, v. 9, p.1052-82, 2014.

TADDIO, A. et al. Effect of neonatal circumcision on pain response during subsequent routine vaccination. **Lancet**, v.349, p.599–603, 1997.

TAL, M.; BENNETT, G. J. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. **Pain**, v. 57, p.375-82, 1994.

THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). The IASP pain terminology. 2012 Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy?navItemNumber=576>. Acesso em: 20 de Mar de 2019.

TSIKLAURI, N. et al. Antinociceptive tolerance to NSAIDs in the rat formalin test is mediated by the opioid mechanism. **Pharmacol Rep**, v. 69, p. 168–175, 2017.

VALLEJO, R. et al. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain Practice**, v. 10, n. 3, p. 167-184, 2010.

van den BROEKE, E.N. et al. Characterizing pinprick-evoked brain potentials before and after experimentally induced secondary hyperalgesia. **J. Neurophysiol**, v. 114, p. 2672–2681, 2015.

van den HOOGEN, N.J. et al. Repeated touch and needle-prick stimulation in the neonatal period increases the baseline mechanical sensitivity and postinjury hypersensitivity of adult spinal sensory neurons. **Pain**, v. 159, p. 1166–1175, 2018a.

van den HOOGEN, N.J. et al. Adult spinal opioid receptor mu1 expression after incision is altered by early life repetitive tactile and noxious procedures in rats. **Dev. Neurobiol**, v. 78, p.417–426, 2018b.

VILELA, M. G.; SANTOS JÚNIOR, J. L.; SILVA, J. G. C. Determination of estrous cycle in rats by vaginal lavage. **FEMINA** , v. 35, n. 10, 2007.

VILELA, F. C. et al. The CB1 cannabinoid receptor mediates glucocorticoid-induced effects on behavioural and neuronal responses during lactation. **Pflugers Arch**, v. 465, n. 8, p. 1197-207, 2013.

VILELA, F.C. et al. Experiencing early life maternal separation increases pain sensitivity in adult offspring. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 62, p. 8–14, 2017.

von den BOSCH, G. E. Prematurity, opioid exposure and neonatal pain: do they affect the developing brain? **Neonatology**, v. 108, p. 8-15, 2015.

WALKER, S.M. Biological and neurodevelopmental implications of neonatal pain. **Clin. Perinatol**, v.40, p. 471–491, 2013.

WALKER, S. M. et al. Neonatal inflammation and primary afferent terminal plasticity in the rat dorsal horn. **Pain**, v.105, p.185–195, 2003.

WALKER, C.D. et al. Naturally occurring variations in maternal care modulate the effects of repeated neonatal pain on behavioral sensitivity to thermal pain in the adult offspring. **Pain**, v.140, p.167–176, 2008.

WALKER, S. M., FITZGERALD, M., HATHWAY, G. J. Surgical injury in the neonatal rat alters the adult pattern of descending modulation from the rostroventral medulla. **Anesthesiology**, v.122, p. 1391–1400, 2015.

WANG, J. et al. Whey peptides improve wound healing following caesarean section in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 1621-7, 2010.

WILSON, D. A., NMDA receptors mediate expression of one form of functional plasticity induced by olfactory deprivation. **Brain Res**, v. 77,p. 238–242, 1995.

WITT, N. et al. A guide to pain assessment and management in the neonate. **Curr Emerg Hosp Med Rep**, v.4, p.1–10, 2016.

WOOLF, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v.152, p.2-15, 2011.

WU, J. et al. Effect of electrical stimulation of sciatic nerve on synaptic plasticity of spinal dorsal horn and spinal c-fos expression in neonatal, juvenile and adult rats. **Brain Research**, v. 1448, p. 11-9, 2012.

ZHANG, H. et al. NMDA receptor channels are involved in expression of long-term potentiation of c-fiber evoked field potentials in rats spinal dorsal horn. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, v. 33, n. 12, p. 1283-9, 2006.

ZHANG, L. et al. Cannabinoid receptor 2 agonist attenuates pain related /behavior in rats with chronic alcohol/high fat diet induced pancreatitis. **Molecular Pain**, v. 10, n. 66, p. 1-16, 2014.

ZOMIGNANI, A. P.; ZAMBELLI, H. J. L.; ANTONIO, M. A. R. G. M. Desenvolvimento cerebral em recém-nascidos prematuros. **Rev Paul Pediatr**, v. 27, n. 2, p.198-203, 2009.

ANEXOS

Anexo 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização da percepção nociceptiva de ratos prematuros na idade adulta: influência do comportamento materno e participação do sistema descendente de controle da dor", registrada com o nº 48/2016, sob a responsabilidade de Marcelo Lourenço da Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, em reunião de 21/11/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 21/11/2016 a 01/09/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	338
Sexo	Macho: 10 Fêmea: 40 Filhote macho: 96 Filhote fêmea: 192
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 24 de novembro de 2016.

Estela Regina de Oliveira
 Prof.^a Dr.^a Estela Regina de Oliveira
 Coordenadora CEUA-UNIFAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICATE

We hereby certify that the proposal entitled "Characterization of nociceptive perception of premature rats in adulthood: influence of maternal behavior and involvement of pain descending control", registration number 48/2016, under the responsibility of Marcelo Lourenço da Silva, which implies production, maintenance or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching), is in compliance with Law no. 11794, published on October 8th, 2008, with Decree no. 6899, published on July 15th, 2009, and with the guidelines issued by the National Council on the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA), and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA-UNIFAL) (Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas) on 11/21/2016.

Purpose: () Teaching	(X) Scientific research
Expiration date	09/01/2020
Species/strain/breed	Wistar rat / Outbred
Number of animals	338
Sex	Male: 10 Female: 40 Puppies: 288
Origin	Central Vivarium UNIFAL-MG

Alfenas, November 24, 2016.

Estela Regina de Oliveira, PhD
 CEUA/UNIFAL Coordinator

Anexo 2

ARTICLE IN PRESS

International Journal of Developmental Neuroscience xxx (xxxx) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Developmental Neuroscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijdevneu

Repeated neonatal needle-prick stimulation increases inflammatory mechanical hypersensitivity in adult rats

Ravena Carolina de Carvalho^{a,b}, Lara Prado^a, Nayne Cristina Rissardo Oliveira^a, Fabiana Cardosos Vilela Giusti^c, Jádina Santos Vieira^{b,c}, Alexandre Giusti-Paiva^c, Josie Resende Torres da Silva^a, Marcelo Lourenço da Silva^{a,*}

^a Institute of Motricity Sciences, Federal University of Alfenas, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil

^b Graduate Program of Biosciences Applied to Health (PPGB), Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

^c Department of Physiological Sciences, Biomedical Sciences Institute, Federal University of Alfenas, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Pain
Newborn
Neonatal pain
Repetitive pain
Rat pups

ABSTRACT

Background and aims: Newborn infants are vulnerable to procedural stress and pain exposure on the first weeks of life that represents a critical period for the development of nociceptive, sensory, emotional, and social functions. We evaluated the nociceptive behavior of adult male and female rats that were submitted to nociceptive experience in the neonatal period and the maternal behavior in the postnatal period.

Methods: The animals were submitted to repetitive needle pricking from the second to the fifteenth postnatal day (PND 2–15). Maternal behavior and litter weight were evaluated during this period. Mechanical sensitivity to pain was assessed in offsprings during the adulthood by exposing them to inflammatory stimuli, including formalin test or the Freund's complete adjuvant (CFA) injection followed by the electronic von Frey test at 0, 3, 6 and 24 h later.

Results: Maternal behavior and litter weight were not altered by pinprick stimuli during PND 2–15. Additionally, pinprick stimulation reduced the paw withdrawal threshold in CFA-injected animals compared to control. In the formalin test, there was a difference between the genders. Female rats are statically more sensitive to formalin stimulation and showed an increased licking time in both the first and second phases and increased number of flinches in second phase.

Conclusions: Experiencing early life repetitive pain exposure increased inflammatory pain sensitivity in adult offspring rats and female rats are more sensitive to chemical stimulation.

Implications: Future investigations of the mechanisms involved in this effect may contribute to the improvement of the understanding of inflammatory pain sensitivity differences.

1. Introduction

Newborn infants who require major surgery or treatment in intensive care are exposed to repeated invasive procedures causing acute pain during the course of their stay in Neonatal Intensive Care Units (NICU). These experiences occur during a critical window of increased plasticity in the developing nervous system (Walker, 2013).

For many years neonatal pain was neglected because health professionals believed that neonates did not experience pain due to their immature nervous systems and the absence of pain memory (Hatfield, 2014; Marchant, 2014). Currently, the existence of neonatal pain has been established but the situation regarding the maturation of central

pain processing in the brainstem, thalamus, and cortex remains unclear (Fitzgerald and Beggs, 2001).

Tissue injury or inflammation leads to secondary effects such as hyperalgesia (increased pain in reaction to a stimulus that is normally painful) and allodynia (pain caused by stimuli that do not normally provoke pain). Primary hyperalgesia localizes to the area of tissue damage, whereas secondary hyperalgesia occurs in areas remote from the site of tissue damage. Fitzgerald et al. (1988) reported primary hyperalgesia following heel lances in newborns and its reversal with topical anaesthetic cream. Additionally, neonatal nociceptive stimulation induces persistent alterations in somatosensory structure and function, moreover, which affects activation that lasts into adulthood (Boisse

* Corresponding author at: Institute of Motricity Sciences, Federal University of Alfenas, UNIFAL, Av. Jovino Fernandes Sales 2600, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brazil.

E-mail address: marcelo.lourenco@unifal-mg.edu.br (M.L. da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.02.004>

Received 13 December 2018; Received in revised form 31 January 2019; Accepted 7 February 2019

0736-5748/ © 2019 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

et al., 2005; Hohmann et al., 2005). This differential change in adulthood depends on the nociceptive stimuli being applied during the sensitive period.

Many studies have demonstrated that the neurogenic effects of early repetitive noxious experiences are limited to PND 1 (postnatal day 1) and PND 8 (Malheiros et al., 2014; Amaral et al., 2015; den Hoogen et al., 2017) and that repetitive stimulation of the nociceptive system in a rat model using needle pricks in the hind-paw closely mimics the clinical situation of infants in NICU (den Hoogen et al., 2017). In contrast, repeated procedural pain during the first 14–15 days of life in rat pups resulted in impairment of long-term memory (Nuseir et al., 2017) and sensory and motor functions (Sanada et al., 2014; Carmo Ede et al., 2016). In fact, rat pups are born premature and the first week of their lives corresponds to gestation weeks 24–36 in human babies (Anand et al., 1999; Andreollo et al., 2012; Dutta and Sengupta, 2016) while week two corresponds to newborn human babies (Sengupta, 2013), so we chose to study the effect of painful stimuli during the first 15 days.

Repeated nociceptive stimulation during human infancy causes changes in sensory and nociceptive processing lasting for many months or years after injury (Taddio et al., 1997; Hermann et al., 2006; Beggs et al., 2012; Jones et al., 2017). At the spinal cord level, alterations of spinal nociceptive processing (Ririe et al., 2008), changes in the dorsal horn circuits (Beggs et al., 2002), and altered gene expression (Ren et al., 2005; van den Hoogen et al., 2018b) were described in rats. At the brain level, long-lasting changes in brain function, such as exploration and motivation (Low and Fitzgerald, 2012), or memory (Nuseir et al., 2017) and in brain structure, like increased glial activity in cortical areas that process pain behaviours (Sanada et al., 2014), were also described in adult rats after early-life pain experience.

Despite the increasing amount of literature about sex differences and painful stimulation during the neonatal stage, their interactions in early life and long-term effects on somatosensory system development need to be further explored. Therefore, our objective was to evaluate sensitivity to pain under inflammatory stimuli in adult male and female rats that had undergone pinprick stimuli during their early life.

2. Materials and methods

2.1. Animals and offspring

Adult Wistar male and nulliparous female rats at approximately eight weeks of age were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas and were housed in a temperature-controlled room (22 °C) on a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 h) with ad libitum access to water and standard laboratory rat chow. All experimental procedures followed the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of Alfenas (protocol 32/2016). The experiments were performed in accordance with good laboratory practice protocols and quality assurance methods.

2.2. Experimental design

Female rats were time-mated by placing them with sexually experienced male rats (two females to one male). The day on which sperm was observed during vaginal lavage was designated as gestation day zero, and parturition day was considered as PND 0. On PND 1, all litters were culled to eight pups (four males and four females). For all procedures we used 20 pregnant dams that were divided into 2 experimental groups (n = 10 per group): pinprick stimuli occurred at PND 2–15 (PP; group in which the pups were stimulated with pinprick) and control (CC; group in which the pups were not stimulated with pinprick). During this period, the maternal behaviour of the dams and the weight of the litters were monitored. After weaning in PND 22, the offspring animals were separated based on sex into cages with up to

four animals per cage until they reached adulthood at approximately eight weeks. Offspring animals were used to assess sensitivity to painful stimuli using the formalin test and Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced inflammatory pain using the electronic von Frey test. To avoid a litter effect, one male and one female rat from each mother were used in each experimental group for behavioural testing during adulthood and all animals were only used in a single experiment. To avoid hormonal interference in nociceptive responses in female offspring rats, the tests were only carried out on females during the dioestrus period of their oestrous cycle.

2.3. Pinprick stimuli

Repeated neonatal pain was induced using the pinprick, in a similar manner to the procedure described in a previous study (Anand et al., 1999). The pinprick stimuli were administered daily from PND 2 to PND 15. The 22-gauge needle was quickly inserted into the mid-plantar area of the right hind paw. Bleeding was stopped by the application of a cotton-tipped swab and lasted no more than a few seconds. Stimuli were repeated four times after two minutes, totalling eight stimuli.

The separation time of the rat pups from their dams was no more than five minutes for either group to avoid any confounding effects from maternal separation and neonatal handling. The control group was separated for the same time. Rat pups were returned to their dams between consecutive stimuli (Tal and Bennett, 1994; Chen et al., 2016).

2.4. Evaluation of maternal behaviour

From PND 2 To PND 15, the maternal behaviour of dams from both experimental groups (n = 10 per group) was made during two periods: in the morning before rat pups' pinprick stimuli (between 08:00 and 09:30) and in the afternoon after rat pups' pinprick stimuli (between 15:00 and 16:30). In each session, the behaviour of each mother was scored every 3 min (30 observations per period per day, making a total of 60 observations per mother per day) for the following parameters: maternal behaviour parameters—licking pups (either its body surface or its anogenital region), nursing pups with an arched-back posture, “blanket” posture in which the mother lays over the pups, passive posture in which the mother is lying either on her back or side while the pups are nursing, nest building, maternal self-grooming (breast stimulation through self-cleaning); and non-maternal behaviour parameters—feeding, exploring the cage housing, not exploring and no maternal self-grooming. Data are reported as the percentage of total maternal behaviour and non-maternal behaviour (number of observations in which the target behaviour was recorded divided by the total number of observations × 100) (Costa et al., 2013; Vilela et al., 2013).

2.5. Litter weight assessment

The weight of the litters was monitored during the period of pinprick stimulation (PND 2–15) in both the PP and CC litters (n = 8 per group). After analysing maternal behaviour and before pinprick stimulation, the weight of each litter was recorded for later analysis.

2.6. Formalin test

Rats from both groups (PP and CC) were injected with formalin for this experiment. A sub plantar injection of formalin (diluted to 5% in sterile 0.9% saline; 20 µl/paw) was administered to the right hind paw of the animals. Immediately after the formalin injection, animals were placed in an open Plexiglas box (10 × 20 × 24 cm), which permitted observation, for 30 min. Pain response was characterized by rapid jerks of the injected paw and by minor biting or licking. After the formalin injection, the rats displayed typical behaviour, i.e., they held the injected paw just off the floor. During this period, spontaneous flinching of the injected paw was also observed. Flinching is easily discriminated

behaviour that can be characterized as a rapid and brief withdrawal or flexion of the injected paw. These pain-related behaviours were quantified by counting the number of flinches and licking time behaviour during the initial phase (0–5 min) and late phase (20–30 min) (Abbott et al., 1995; Tabata-Imai et al., 2014; Tsiklauri et al., 2017). The females' cycles were monitored so that the test was performed only during the dioestrus period of their oestrous cycle.

2.7. Mechanical threshold test

In this experiment, rats from the PP and CC groups were injected with saline or CFA (100 µl) and then placed individually in acrylic cages (42 × 24 × 15 cm) with wire grid floors, 15–30 min before the start of the test, to assess mechanical hyperalgesia. The test consisted of evoking a hind paw flexion reflex with a hand-held force transducer adapted with a 0.5 mm² polypropylene tip (Electronic von Frey). The investigator was trained to apply the tip between the five distal footpads of the right hind paw with a gradual increase in pressure. The stimulus was automatically discontinued and its intensity recorded when the paw was withdrawn. The end-point was characterized by the removal of the paw by a clear flinch response after paw withdrawal. A subcutaneous injection of CFA induces prolonged inflammation that becomes maximal at 24 h and persists for at least 7 days (Fehrenbacher et al., 2012) and therefore the animals were tested before and 4, 7, 10, and 24 h after administration of saline or CFA (Vilela et al., 2017). Results were expressed by the withdrawal threshold (in grams, g), which was calculated by the average of three measurements. To avoid hormonal interference in nociceptive responses in female offspring, the tests were only carried out on females during the dioestrus period of their oestrous cycle.

2.8. Data analysis

Data were analysed using GraphPad software version 5.0 and were expressed as mean ± S.E.M. Statistically significant differences between groups were analysed by repeated measures using two-way analysis of variance (ANOVA) considering the following factors—evaluation of maternal and non-maternal parameters and litter weight assessment: PND and pinprick stimuli; formalin test: time and pinprick stimuli; von Frey: CFA and pinprick stimuli. The Bonferroni test was used for post hoc analysis when required.

3. Results

In this study, no differences were observed in the percentages of maternal and non-maternal behaviour in mothers of PP litters compared to CC litters. Fig. 1 shows the total percentage of maternal and non-maternal behaviour in PND 2–15 during the evaluations performed in the morning (8 am, Fig. 1A and B, for maternal and non-maternal behaviour, respectively) and in the afternoon (3 pm Fig. 1C and D, for maternal and non-maternal behaviour, respectively). Results from the two-way ANOVA showed that there was an effect of PND, but there were no effects of pinprick stimuli or any interaction between the two factors on percentage of maternal behaviour observed at 8 am (PND factor: $F_{13,182} = 10.71$, $p < 0.001$; pinprick stimuli factor: $F_{1,182} = 3.11$, $p = 0.07$; PND × pinprick stimuli interaction: $F_{13,182} = 0.33$, $p = 0.98$; Fig. 1A) or at 3 p.m. (PND factor: $F_{13,182} = 13.83$, $p < 0.001$; pinprick stimuli factor: $F_{1,182} = 3.74$, $p = 0.05$; PND × pinprick stimuli interaction: $F_{13,182} = 0.57$, $p = 0.87$; Fig. 1C). Regarding non-maternal behaviour, there was an effect of PND, but there were no significant effects from pinprick stimuli or any interaction between the two factors at 8 a.m. (PND factor: $F_{13,182} = 7.47$, $p < 0.001$; pinprick stimuli factor: $F_{1,182} = 3.47$, $p = 0.06$; PND × pinprick stimuli interaction: $F_{13,182} = 0.34$, $p = 0.98$; Fig. 1B) or at 3 p.m. (PND factor: $F_{13,182} = 13.82$, $p < 0.001$; pinprick stimuli factor: $F_{1,182} = 3.78$, $p = 0.05$; PND × pinprick stimuli

interaction: $F_{13,182} = 0.56$, $p = 0.87$; Fig. 1D).

Fig. 2 shows litter weight during the period of pinprick stimuli (PND 2–15). No changes in litter weight were observed in PP compared to CC litters. A two-way ANOVA showed that there was a significant effect of PND, but there were no significant effects of pinprick stimuli or interaction between the two factors on litter weight (PND factor: $F_{13,182} = 148.7$, $p < 0.001$; pinprick stimuli factor: $F_{1,182} = 1.27$, $p = 0.26$; PND × pinprick stimuli interaction: $F_{13,182} = 0.16$, $p = 0.99$).

Fig. 3 shows the mechanical threshold in the electronic von Frey test performed after CFA or saline injection. We observed a reduction in withdrawal threshold in the male offspring from the CC/CFA and PP/CFA groups at all times (Fig. 3A, $p < 0.001$ for both groups). After CFA injection, an accentuated reduction in withdrawal threshold was observed in the PP/CFA group when compared to the CC/CFA group (CFA factor: $F_{1,28} = 993.6$, $p < 0.001$; pinprick stimuli factor: $F_{1,28} = 7.04$, $p < 0.05$; CFA × pinprick stimuli: $F_{1,28} = 4.86$, $p < 0.05$). In female offspring, a reduction in withdrawal threshold in both the CC/CFA and PP/CFA groups was observed at all times (Fig. 3B, $p < 0.001$ for both groups). After CFA injection, an accentuated reduction in withdrawal threshold was observed in the PP/CFA group when compared to the CC/CFA group (CFA factor: $F_{1,28} = 1069$, $p < 0.001$; pinprick stimuli factor: $F_{1,28} = 13.43$, $p < 0.01$; CFA × pinprick stimuli: $F_{1,28} = 12.42$, $p < 0.01$).

Male offspring rats from the PP group did not show an increase in licking time ($p = 0.56$; Fig. 4A) or number of flinches ($p = 0.45$; Fig. 5A) from 0 to 5 min (initial phase) with an increase in licking time ($p = 0.03$, Fig. 4B) but not in the number of flinches ($p = 0.13$; Fig. 5B) from 20 to 30 min (late phase), when compared to CC animals. Female offspring rats the PP group showed an increase in licking time ($p = 0.047$; Fig. 4C) but not in the number of flinches ($p = 0.25$; Fig. 5C) from 0 to 5 min (initial phase) with an increase in licking time ($p = 0.02$, Fig. 4D) and in the number of flinches ($p = 0.03$; Fig. 5D) from 20 to 30 min (late phase), when compared to CC animals.

4. Discussion

The present study shows that repetitive needle pricking during the first two weeks of life does not affect basal thresholds to mechanical stimuli but increases mechanical hypersensitivity at 24 h after ipsilateral CFA-injection in later life in both male and female rats. Further, female animals showed higher formalin-induced inflammatory hypersensitivity compared to males but no differences in litter weight or maternal or non-maternal behaviour were found.

Current evidence suggests that animals subjected to painful stimuli early in life have increased sensitivity to chemical and mechanical stimuli during adult life (Butkevich et al., 2016b; van den Hoogen et al., 2018a). However, painful stimuli with pinprick from PND 2 to PND15 did not alter maternal behaviour or litter weight.

In this study, we evaluated maternal behaviour in order to rule out its influence on changes in inflammatory nociceptive responses. Although there is an increasing tendency in maternal behaviour, we did not find statistically significant differences in maternal or non-maternal behaviour. It has been demonstrated that maternal behaviour towards rat pups stimulated with early or early recurrent peripheral pain is similar when compared to a control group (Butkevich et al., 2016b). However, pain stimuli that generate intense inflammatory processes in rat pups modify maternal behaviour by elevating maternal activity (Anseloni et al., 2005; Walker et al., 2008). Central sensitization is induced after intense, repeated, and sustained nociceptive stimuli and pinprick stimulation is insufficient to generate the inflammatory process (Iannetti et al., 2013; van den Broeke et al., 2015).

Further, experiencing painful stimuli in early life had no effect on the body weight of the litters. Walker et al. (2003) showed that repeated pain-inducing procedures did not affect the growth and development of the pups. Therefore we suggest that changes found in nociceptive responses during adulthood may be attributed to early life

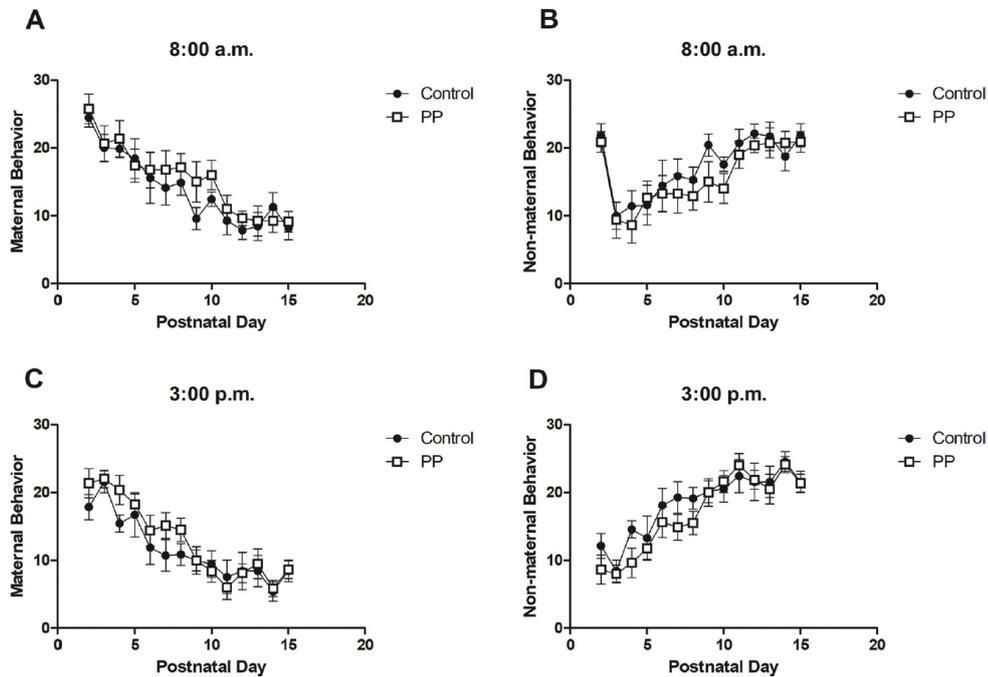


Fig. 1. Effects of the pinprick stimuli (PND 2–15) on the maternal behavior of lactating dams: percentage of total observations of maternal (A) or non-maternal (B) behavior performed at 8:00 a.m. Percentage of total observations of maternal (C) or non-maternal (D) behavior performed at 3:00 p.m. Each point represents the mean (\pm S.E.M.) of 8 animals. a.m.: before midday; p.m. after midday.

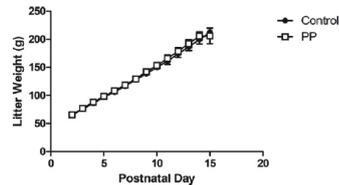


Fig. 2. Effects of the pinprick stimuli (PND 2–15) on litter weight in grams. Each point represents the mean (\pm S.E.M.) of 8 litters.

pinprick stimuli and not to changes in maternal behaviour or litter weight.

At birth, the rat central nervous system is incompletely formed, corresponding to that of a 24-week intra-uterine human preterm neonate (Anand et al., 1999; Sengupta, 2013; Dutta and Sengupta, 2016). From a neurodevelopmental perspective the first postnatal week of newborn rat pups corresponds to gestational weeks 24–36 in human foetuses (Wilson, 1995; Kim et al., 1996) while 7-day-old rat pups have the maturity of a full-term human neonate (Anand et al., 1999). The sensitive period in regard to long-term alterations in nociceptive responses is limited to the first 7–10 days of life in the rat (Ren et al., 2005). However the detection of a more precise age in neonatal rats and

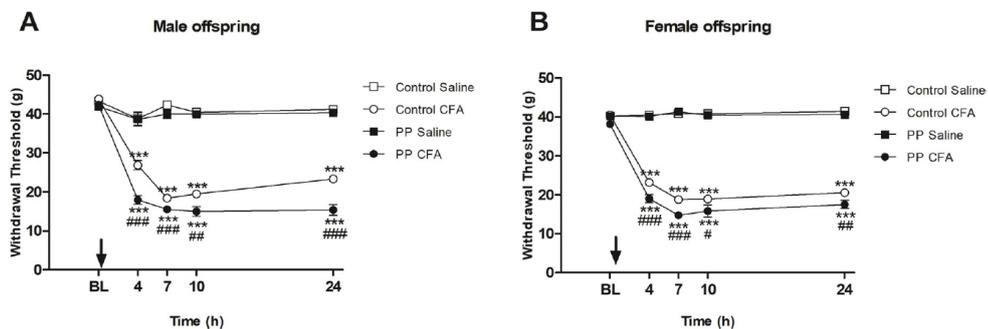


Fig. 3. Effects of the pinprick stimuli (PND 2–15) on mechanical sensitivity in von Frey test before and after saline or intraplantar CFA injection. Withdrawal threshold, in grams, in male (A) or female offspring rats (B). Each point represents the mean (\pm S.E.M.) of 8 animals. *** p < 0.001 compared to control/Saline and PP/Saline groups. # p < 0.05, # p < 0.01 and ### p < 0.001 compared to control/CFA group. CFA: Freund's complete adjuvant; control/Saline: animals not subjected to pinprick stimuli that received saline injection; PP/Saline: animals subjected to pinprick stimuli that received saline injection; control/CFA: animals not subjected to pinprick stimuli that received CFA injection; PP/CFA: animals subjected to pinprick stimuli that received CFA injection.

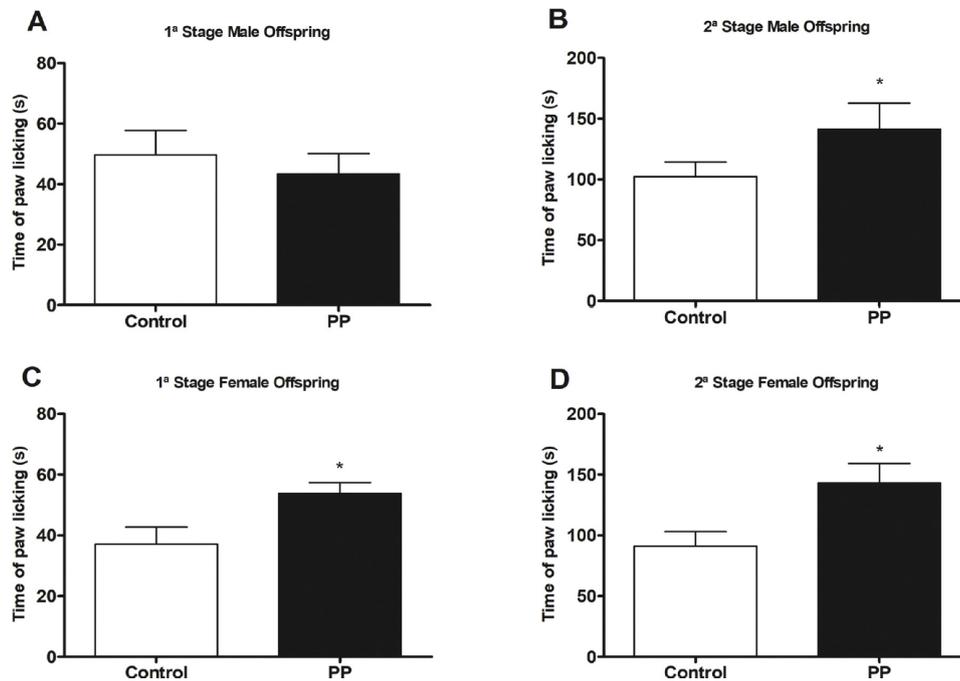


Fig. 4. Effects of the pinprick stimuli (PND 2–15) in the formalin test analyzed every initial phase (0–5min) and late phase (20–30 min): duration of paw licking in seconds in male offspring rats in the initial (A) or late phase (B); duration of paw licking in seconds in female offspring rats in the initial (C) or late phase (D). Each point represents the mean (\pm S.E.M.) of 8 animals. * $p < 0.05$.

the study of the effects of pain and stress interactions in these animals would contribute to a better understanding of this important topic so in this study we used a model with painful stimuli from PND 2 to PND 15 (Sanada et al., 2014; Carmo Ede et al., 2016; Nuseir et al., 2017).

In our study we evaluated sensitivity to formalin- or CFA-induced inflammatory pain under mechanical stimuli in adult male and female rats that had undergone early life pinprick stimuli. Our results showed that female animals that were stimulated with pinprick during early life showed greater sensitivity to the formalin-induced inflammatory stimulus since they recorded an increased number of flinches in both phases in the formalin test. Thus, we may suggest that female rats subjected to early life pain stimuli may be more vulnerable to formalin-induced inflammatory stimulation. Conversely, Butkevich et al. (2016a) showed that males were more vulnerable to early harmful exposure than females using the formalin test and they observed hypoalgesia in adult males subjected to inflammatory pain within the first days of life but not in female rats. In this case, however, inflammatory pain was induced in early life, which is different from our procedure.

In addition to alterations in the nociceptive responses to formalin-induced inflammatory hypersensitivity, we have also verified the influence of pinprick stimuli on CFA-induced inflammatory pain mechanical responses through the von Frey test. Our data showed that both male and female offspring rats had a lower withdrawal threshold after being injected with CFA, demonstrating that mechanical sensitivity due to pinprick stimuli is not sex dependent. This inference is in accordance with other studies that have indicated that basal or secondary hyperalgesia occurs from childhood to adulthood in animals exposed to repetitive pain stimuli during early life (Chen et al., 2016).

The pinprick stimuli are the same as a procedure typically applied to neonates admitted to NICU. Our results showed that repeated pinprick in early life leads to increased mechanical inflammatory hypersensitivity in adulthood. Animal models are optimal for investigating the

long-term effects of repeated minor neonatal pain in adulthood. The pinprick stimuli animal model is suitable to mimic the clinical situation common in NICU (den Hoogen et al., 2017). The model consists in a needle prick in the mid-plantar surface of the right hind paw with the objective of generating or evaluating pain (Tal and Bennett, 1994; Knaepen et al., 2013). Some stimuli models which have been used are a blood glucose sampling device (Chen et al., 2016), application of a 22-gauge needle in the centre of the paw (Hogan et al., 2004), plantar skin incision surgery (Low and Fitzgerald, 2012), a needle prick (Anand et al., 1999), and the pinprick stimuli (Tal and Bennett, 1994).

In rats, the first two weeks of life represent the critical period for the development of nociceptive, sensory, emotional, and social functions (Ellenbroek et al., 2005; Fitzgerald, 2005; Beggs et al., 2012). One hypothesis attempting to explain this is that the baseline noxious mechanical sensitivity of ipsilateral or contralateral spinal dorsal horn neurons is altered by repeated needle pricks in early life, suggesting widespread changes in spinal sensory processing (van den Hoogen et al., 2018a). Another mechanistic hypothesis for changes in pain sensitivity in later life is that early life adversity alters the expression or the functioning of the glucocorticoid receptor throughout the course of life and therefore increases sensitivity to inflammatory stimulation (Zhu et al., 2017). Moreover, descending pain inhibitory pathways are changed in adult animals submitted to neonatal painful stimuli (Walker et al., 2015).

Neuronal plasticity is influenced by stress hormones that target the brain; cortisol in primates and corticosterone in rodents (Radley et al., 2015). Many aspects of normal brain development depend on experience and developmentally inappropriate experience can significantly alter central nervous system structure and function (Bhutta and Anand, 2001). There is abundant evidence from animal studies that repetitive pain and/or stress in early life can alter both the structure and function of the developing brain and, consequently, alter pain and/or stress

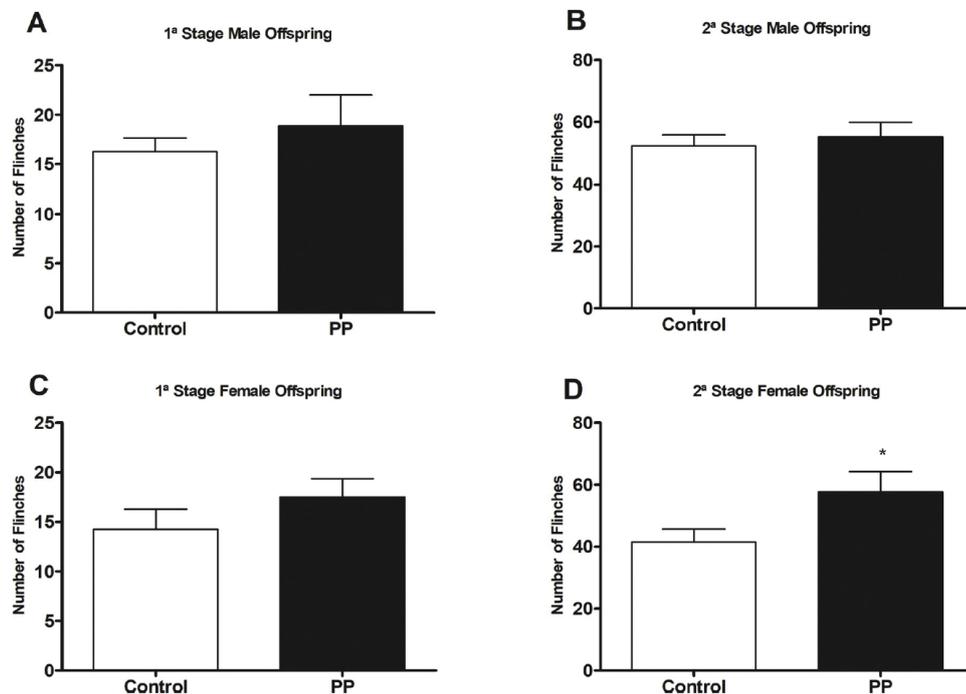


Fig. 5. Effects of the pinprick stimuli (PND 2–15) in the formalin test analyzed every initial phase (0–5min) and late phase (20–30min): number of flinches in male offspring rats in initial (A) or late phase (B); number of flinches in female offspring rats in initial (C) or late (D) phase. Each point represents the mean (\pm S.E.M.) of 8 animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the control group.

responses in adulthood. Amaral et al. (2015) have demonstrated that inflammatory nociceptive stimulation in the first postnatal week reduces the time spent exploring novel objects and affects long-term memory in male animals. Mooney-Leber et al. (2018) showed that both neonatal isolation and repeated pain altered the corticosterone levels and the glutamate levels within the frontal cortex and hippocampus. Holschneider et al. (2016) demonstrated that early life stress elicits visceral hyperalgesia in adult rats. This research suggests that repeated pain results in immediate changes or 'adaptations' in systems mediating pain and stress that may become permanent. More research is needed to determine the effects of neonatal pain in adulthood and their mechanism for better management and prevention of long-term consequences in humans.

5. Conclusion

In conclusion, an early painful stimulation with pinprick stimuli increases pain sensitivity in adult offspring rats and female offspring rats may be more vulnerable. Our data, therefore, make an important contribution to understanding the impact of environmental influences, such as stressful life events during critical developmental periods, on pain vulnerability.

Conflicts of Interest

The authors report no financial interests or potential conflicts of interest.

References

Abbott, F.V., Franklin, K.B., Westbrook, R.F., 1995. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 60, 91–102.

- Amaral, C., Antonio, B., Oliveira, M.G., Hamani, C., Guinsburg, R., Covolan, L., 2015. Early postnatal nociceptive stimulation results in deficits of spatial memory in male rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 125, 120–125.
- Anand, K.J., Coskun, V., Thirivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Plotsky, P.M., 1999. Long-term behavioral effects of repetitive pain in neonatal rat pups. *Physiol. Behav.* 66, 627–637.
- Andreollo, N.A., Santos, E.F., Aratijo, M.R., Lopes, L.R., 2012. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq. Bras. Cir. Dig.* 25, 49–51.
- Anseloni, V.C., He, E., Novikova, S.I., Turnbach Robbins, M., Lidow, L.A., Ennis, M., Lidow, M.S., 2005. Alterations in stress-associated behaviors and neurochemical markers in adult rats after neonatal short-lasting local inflammatory insult. *Neuroscience* 131, 635–645.
- Beggs, S., Torsney, C., Drew, L.J., Fitzgerald, M., 2002. 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.* 16, 1249–1258.
- Beggs, S., Currie, G., Salter, M.W., Fitzgerald, M., Walker, S.M., 2012. Priming of adult pain responses by neonatal pain experience: maintenance by central neuroimmune activity. *Brain* 135, 404–417.
- Bhutta, A.T., Anand, K.J., 2001. Abnormal cognition and behavior in preterm neonates linked to smaller brain volumes. *Trends Neurosci.* 24 (129–130), 131–132.
- Boisse, L., Spencer, S.J., Moutihate, A., Vergnolle, N., Pittman, Q.J., 2005. Neonatal immune challenge alters nociception in the adult rat. *Pain* 119, 133–141.
- Butkevich, I.P., Barr, G.A., Mikhailenko, V.A., 2016a. Effects of prenatal stress on serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus and on pain behavior during the neonatal period of development. *Neurosci. Behav. Physiol.* 46, 1005–1010.
- Butkevich, I.P., Mikhailenko, V.A., Vershinina, E.A., Aloisi, A.M., 2016b. Effects of neonatal pain, stress and their interrelation on pain sensitivity in later life in male rats. *Chin. J. Physiol.* 59, 225–231.
- Carmo Ede, C., Sanada, L.S., Machado, N.L., Fazan, V.P., 2016. Does pain in the neonatal period influence motor and sensory functions in a similar way for males and females during post-natal development in rats? *Pain Med.* 17, 1520–1529.
- Chen, M., Xia, D., Min, C., Zhao, X., Chen, Y., Liu, L., Li, X., 2016. Neonatal repetitive pain in rats leads to impaired spatial learning and dysregulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in later life. *Sci. Rep.* 6, 39159.
- Costa, H.H., Vilela, F.C., Giusti-Paiva, A., 2013. Continuous central infusion of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases maternal care in lactating rats: consequences for fear conditioning in adulthood males. *Behav. Brain Res.* 257, 31–38.
- den Hoogen, N.J.V., Patijn, J., Tibboel, D., Joosten, E.A., 2017. Neonatal plasticity of the nociceptive system: mechanisms, effects, and treatment of repetitive painful procedures during NICU admittance. *Curr. Pharm. Des.* 23, 5902–5910.

- Dutta, S., Sengupta, P., 2016. Men and mice: relating their ages. *Life Sci.* 152, 244–248.
- Ellenbroek, B.A., Derks, N., Park, H.J., 2005. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress* 8, 247–257.
- Fehrenbacher, J.C., Vasko, M.R., Duarte, D.B., 2012. Models of inflammation: carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. *Curr. Protoc. Pharmacol.* Chapter 5, Unit 5.4.
- Fitzgerald, M., 2005. The development of nociceptive circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 507–520.
- Fitzgerald, M., Beggs, S., 2001. The neurobiology of pain: developmental aspects. *Neuroscientist* 7, 246–257.
- Fitzgerald, M., Shaw, A., MacIntosh, N., 1988. Postnatal development of the cutaneous flexor reflex: comparative study of preterm infants and newborn rat pups. *Dev. Med. Child Neurol.* 30, 520–526.
- Hatfield, L.A., 2014. Neonatal pain: what's age got to do with it? *Surg. Neurol. Int.* 5, S479–489.
- Hermann, C., Hohmeister, J., Demirakca, S., Zohsel, K., Flor, H., 2006. Long-term alteration of pain sensitivity in school-aged children with early pain experiences. *Pain* 125, 278–285.
- Hogan, Q., Sapunar, D., Modric-Jednacak, K., McCallum, J.B., 2004. Detection of neuropathic pain in a rat model of peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 101, 476–487.
- Hohmann, A.G., Neely, M.H., Pina, J., Nackley, A.G., 2005. Neonatal chronic hind paw inflammation alters sensitization to intradermal capsaicin in adult rats: a behavioral and immunocytochemical study. *J. Pain* 6, 798–808.
- Holschneider, D.P., Guo, Y., Mayer, E.A., Wang, Z., 2016. Early life stress elicits visceral hyperalgesia and functional reorganization of pain circuits in adult rats. *Neurobiol. Stress* 3, 8–22.
- Iannetti, G.D., Baumgartner, U., Tracey, I., Treede, R.D., Magerl, W., 2013. Pinprick-evoked brain potentials: a novel tool to assess central sensitization of nociceptive pathways in humans. *J. Neurophysiol.* 110, 1107–1116.
- Jones, L., Fabrizio, L., Laudiano-Dray, M., Whitehead, K., Meek, J., Verriotti, M., Fitzgerald, M., 2017. Nociceptive cortical activity is dissociated from nociceptive behavior in newborn human infants under stress. *Curr. Biol.* 27, 3846–3851 e3843.
- Kim, J.J., Foy, M.R., Thompson, R.F., 1996. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 4750–4753.
- Knaepen, L., Patijn, J., van Kleef, M., Mulder, M., Tibboel, D., Joosten, E.A., 2013. Neonatal repetitive needle pricking: plasticity of the spinal nociceptive circuit and extended postoperative pain in later life. *Dev. Neurobiol.* 73, 85–97.
- Low, L.A., Fitzgerald, M., 2012. Acute pain and a motivational pathway in adult rats: influence of early life pain experience. *PLoS One* 7, e34316.
- Malheiros, J.M., Lima, M., Avanzi, R.D., Gomes da Silva, S., Suchecki, D., Guinsburg, R., Covolan, L., 2014. Repetitive noxious neonatal stimuli increases dentate gyrus cell proliferation and hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Hippocampus* 24, 415–423.
- Marchant, A., 2014. 'Neonates do not feel pain': a critical review of the evidence. *Bioscience Horizons: Intern. J. Stud. Res* 7.
- Mooney-Leber, S.M., Spielmann, S.S., Brummelte, S., 2018. Repetitive neonatal pain and reduced maternal care alter brain neurochemistry. *Dev. Psychobiol.* 60, 963–974.
- Nuseir, K.Q., Alzoubi, K.H., Alhusban, A., Bawaane, A., Al-Azzani, M., Khabour, O.F., 2017. Sucrose and naltrexone prevent increased pain sensitivity and impaired long-term memory induced by repetitive neonatal noxious stimulation: role of BDNF and beta-endorphin. *Physiol. Behav.* 179, 213–219.
- Radley, J., Morilak, D., Viau, V., Campeau, S., 2015. Chronic stress and brain plasticity: mechanisms underlying adaptive and maladaptive changes and implications for stress-related CNS disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 58, 79–91.
- Ren, K., Novikova, S.I., He, F., Dubner, R., Lidow, M.S., 2005. Neonatal local noxious insult affects gene expression in the spinal dorsal horn of adult rats. *Mol. Pain* 1, 27.
- Ririe, D.G., Bremner, L.R., Fitzgerald, M., 2008. Comparison of the immediate effects of surgical incision on dorsal horn neuronal receptive field size and responses during postnatal development. *Anesthesiology* 109, 698–706.
- Sanada, L.S., Sato, K.L., Machado, N.L., Carmo Ede, C., Sluka, K.A., Fazan, V.P., 2014. Cortex glial cells activation, associated with lowered mechanical thresholds and motor dysfunction, persists into adulthood after neonatal pain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 35, 55–63.
- Sengupta, P., 2013. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int. J. Prev. Med.* 4, 624–630.
- Tabata-Imai, A., Inoue, R., Mori, H., 2014. Increased sensitivity to inflammatory pain induced by subcutaneous formalin injection in serine racemase knock-out mice. *PLoS One* 9, e105282.
- Taddio, A., Katz, J., Ilersich, A.L., Koren, G., 1997. Effect of neonatal circumcision on pain response during subsequent routine vaccination. *Lancet* 349, 599–603.
- Tal, M., Bennett, G.J., 1994. Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* 57, 375–382.
- Tsiklauri, N., Nozadze, L., Gurtskaia, G., Tsagareli, M.G., 2017. Antinociceptive tolerance to NSAIDs in the rat formalin test is mediated by the opioid mechanism. *Pharmacol. Rep.* 69, 168–175.
- van den Broeke, E.N., Mouraux, A., Gronenberg, A.H., Pfau, D.B., Treede, R.D., Klein, T., 2015. Characterizing pinprick-evoked brain potentials before and after experimentally induced secondary hyperalgesia. *J. Neurophysiol.* 114, 2672–2681.
- van den Hoogen, N.J., Patijn, J., Tibboel, D., Joosten, B.A., Fitzgerald, M., Kwok, C.H.T., 2018a. Repeated touch and needle-prick stimulation in the neonatal period increases the baseline mechanical sensitivity and postinjury hypersensitivity of adult spinal sensory neurons. *Pain* 159, 1166–1175.
- van den Hoogen, N.J., van Reij, R.R., Patijn, J., Tibboel, D., Joosten, E.A.J., 2018b. Adult spinal opioid receptor mu1 expression after incision is altered by early life repetitive tactile and noxious procedures in rats. *Dev. Neurobiol.* 78, 417–426.
- Vilela, F.C., Ruginsk, S.G., de Melo, C.M., Giusti-Paiva, A., 2013. The CB1 cannabinoid receptor mediates glucocorticoid-induced effects on behavioural and neuronal responses during lactation. *Pflugers Arch.* 465, 1197–1207.
- Vilela, F.C., Vieira, J.S., Giusti-Paiva, A., Silva, M.L.D., 2017. Experiencing early life maternal separation increases pain sensitivity in adult offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 62, 8–14.
- Walker, S.M., 2013. Biological and neurodevelopmental implications of neonatal pain. *Clin. Perinatol.* 40, 471–491.
- Walker, S.M., Meredith-Middleton, J., Cooke-Yarborough, C., Fitzgerald, M., 2003. Neonatal inflammation and primary afferent terminal plasticity in the rat dorsal horn. *Pain* 105, 185–195.
- Walker, C.D., Xu, Z., Rochford, J., Johnston, C.C., 2008. Naturally occurring variations in maternal care modulate the effects of repeated neonatal pain on behavioral sensitivity to thermal pain in the adult offspring. *Pain* 140, 167–176.
- Walker, S.M., Fitzgerald, M., Hathway, G.J., 2015. Surgical injury in the neonatal rat alters the adult pattern of descending modulation from the rostral ventral medulla. *Anesthesiology* 122, 1391–1400.
- Wilson, D.A., 1995. NMDA receptors mediate expression of one form of functional plasticity induced by olfactory deprivation. *Brain Res.* 677, 238–242.
- Zhu, Y., Wang, Y., Yao, R., Hao, T., Cao, J., Huang, H., Wang, L., Wu, Y., 2017. Enhanced neuroinflammation mediated by DNA methylation of the glucocorticoid receptor triggers cognitive dysfunction after sevoflurane anesthesia in adult rats subjected to maternal separation during the neonatal period. *J. Neuroinflammation* 14, 6.